

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia em Fermentações

Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Viviane Borges Vieira

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza
Oliveira

São Paulo

2019

Viviane Borges Vieira

Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica.

Área de concentração: Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (FBT/FCF/USP).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (FBT/FCF/USP)

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

V657b Vieira, Viviane Borges
Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar / Viviane Borges Vieira. - São Paulo, 2019.
81 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza

1. *Pediococcus pentosaceus*. 2. Pediocina. 3. Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar. 4. Resíduo Agroindustrial. 5. Bioprodução. I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador.

Nome: Viviane Borges Vieira

Título: Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Fermentações.

Aprovado em: 05/07/2019

Banca Examinadora Orientadora: Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Assinatura: _____

Profa. Dra. Adriane E. Antunes de Moraes

Instituição: LLPP – FCA – UNICAMP

Julgamento: Aprovada.

Profa. Dra. Patrícia Léo

Instituição: LBI – Núcleo de Bionanomanufatura – IPT

Julgamento: Aprovada.

Profa. Dra. Livia Seno Ferreira Camargo

Instituição: Centro de Ciências Naturais e Humanas - UFABC

Julgamento: Aprovada.

São Paulo, 05 de Julho de 2019.

“Você precisa fazer aquilo que
pensa que não é capaz de fazer.”

Eleanor Roosevelt

Agradecimentos

Aos meus pais, Goreth e Manuel, por sempre me influenciarem, e à minha irmã, Suziane, que sempre me apoia.

Ao Alan, por todo apoio e carinho no decorrer de todas as minhas decisões e pela paciência nos momentos em que não pude controlar minhas emoções.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, por ter acreditado e me dado à oportunidade de realizar este desejo de conquistar mais um degrau em minha vida acadêmica e profissional.

À Dra. Tais Kuniyoshi que, com todo seu carinho, paciência e atenção foi fundamental para tornar esse trabalho possível. Muito obrigada por isso que se tornou uma grande amizade.

Aos meus amigos de trabalho, Thamires Simões, Anna Carolina Meireles, Sabrina Sabo, Ronaldo Lira, Pamela Azevedo e Gabriel Moretti, por todos os conselhos, dicas, ajuda, diversão, cafés e muito companheirismo. Vocês foram fundamentais não apenas para a realização deste trabalho, mas para tudo que virá em minha vida.

Ao Professor Attilio Convertti, pela orientação durante a redação desta dissertação.

Aos novos amigos, Eduardo Krebs, Livia Seno, Magali Uono, Marcello Bresola, Ana Lucia Jacome, Eleane Gomes, Sibylle Hacker e Marcela Albuquerque, que tornaram os dias mais divertidos.

Aos professores Dr. Marco Antonio Stephano, Dra. Livia Camargo e Dra. Patrícia Léo, pelas orientações dadas, durante a qualificação, que foram fundamentais para eu chegar até o final deste projeto e a Dra. Adriane E. Antunes de Moraes pela participação em minha defesa e suas sugestões para os desafios vindouros.

Ao amigo Rodolfo Ferreira, que foi um grande incentivador para eu realizar esta fase de minha vida.

A todos os meus amigos de longa data, que sempre acreditaram em mim e me fortaleceram em momentos críticos.

Aos técnicos, funcionários e colaboradores da universidade por todos os serviços prestados.

À Coordenação de Apoio Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida durante o meu mestrado.

Vieira, V. B.. Bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* ET34 em resíduo agroindustrial hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2019.

RESUMO

Um dos grandes desafios nas indústrias alimentícia, farmacêutica e agropecuária é a busca por novos compostos para substituir os antibióticos. Como possíveis candidatos estão as bacteriocinas para serem utilizados paralelamente aos antibióticos ou até substituí-los. As bactérias ácido-láticas podem produzir substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS - *bacteriocin-like inhibitory substances*) que possuem efeito bacteriostático ou bactericida contra diferentes grupos de bactéria sendo largamente utilizadas como bioconservantes alimentares. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o emprego de um resíduo agroindustrial, o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, como fonte de carbono em cultivos fermentativos para produção do BLIS pela cepa *Pediococcus pentosaceus* ET 34. Resultados revelaram que as células de ET34 foram capazes de crescer utilizando este resíduo agroindustrial como fonte de carbono e ensaios utilizando planejamento fatorial demonstraram que a agitação não influencia na produção de BLIS. Ao escalonar o cultivo em biorreatores, foi verificado que tanto o crescimento como a atividade antimicrobiana foram semelhantes aos obtidos em bancada com exceção da condição de 25% (v/v) de HBC (hidrolisado de bagaço de cana) que devido a maior viscosidade do meio, resultou em uma diminuição no crescimento e de produção de BLIS. O BLIS produzido por células de ET34 utilizando o HBC como fonte de carbono foi parcialmente purificado por sulfato de amônio e demonstrou atividade contra *Listeria monocytogenes* ATCC 934 e *Salmonella enterica* CECT 724. Desta maneira, pode-se concluir que *Pediococcus pentosaceus* ET34 foi capaz de crescer em meio contendo HBC como fonte de carbono produzindo BLIS em seu sobrenadante com ação frente a diferentes bactérias patogênicas. A possibilidade de utilizar uma fonte alternativa de carbono pode diminuir o custo de processo consideravelmente. Além disso, ensaios de planejamento fatorial, superfície de resposta e escalonamento em biorreator de bancada indicaram que concentrações baixas de HBC (5-15%, v/v) a 35 °C resultaram na maior produção de BLIS.

Palavras-chave: *Pediococcus pentosaceus*, Pediocina, Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar.

Vieira, V. B.. Bioproduction of Pediocin by *Pediococcus pentosaceus* ET34 in hydrolyzed sugar cane bagasse agroindustrial residue. [dissertation]. São Paulo: Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University; 2019.

ABSTRACT

The great challenge in the food, pharmaceutical and agricultural industries is the search for new compounds to replace antibiotics. Bacteriocins are possible candidates that can be used in parallel with the antibiotics or even to replace them. Lactic-acid bacteria can produce bacteriocin inhibitory substances (BLIS - bacteriocin-like inhibitory substances) that have a bacteriostatic or bactericidal effect against different bacterial species and are widely used as food bioconservatives. In this context, the aim of this work was to use of an agroindustrial waste, hydrolyzed sugarcane bagasse, as a carbon source in fermentative cultures for the production of BLIS by *Pediococcus pentosaceus* ET 34 strain. Results revealed that ET34 cells were able to grow using this agroindustrial residue as a carbon source, and trials using factorial design showed that agitation did not influence on the production of BLIS. When it was perform cultivation scale up in bioreactors, it was verified that both the growth and the antimicrobial activity were similar to those obtained in the workbench with the exception of the condition of 25% (v/v) of HBC (sugarcane bagasse hydrolyzate) that due to its higher viscosity, resulted in a decrease in growth and BLIS production. BLIS produced by ET34 cells using HBC as a carbon source that was partially purified by ammonium sulfate showed activity against *Listeria monocytogenes* ATCC 934 and *Salmonella enterica* CECT 724. Thus, it can be concluded that *Pediococcus pentosaceus* ET34 was able to grow in medium containing HBC as carbon source producing BLIS in its supernatant with action against different pathogenic bacteria. The possibility of using an alternative carbon source can greatly reduce the process cost. In addition, factorial design, response surface and scale up trials in bench bioreactors indicated that low concentrations of HBC (5-15% v/v) at 35 °C resulted in higher BLIS production.

Palavras-chave: *Pediococcus pentosaceus*, Pediocin, Sugarcane bagasse hydrolyzate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture</i>
AtvSLC	Atividade antimicrobiana do SLC
BAL	Bactéria Ácido-Lática
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLIS	<i>bacteriocin-like inhibitory substances</i>
°C	Celsius
CECT	<i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>
CLIST	Coleção de Listeria Instituto FioCruz
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
FAO	<i>Food Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Grama
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
h	Hora
HBC	Hidrolisado de Bagaço de cana-de-açúcar
HMF	Hidroximetilfurfural
kDa	Kilodalton
kg/ton	Kilo por tonelada
LAPTg	<i>Lactic Acid, Peptone, Tryptone and glucose medium</i>
M	Molar
Mmol	Milimolar
Mm	Milímetros
Min	Minuto
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
m/v	Massa por volume
Nm	Nanômetros
SLC	Sobrenadante Livre de Células
RPM	Rotação por minuto
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
v/v	Volume por volume
µL	Microlitros

WHO	<i>World Health Organization</i>
x g	Força Gravitacional
XOS	Xilo-oligossacarídeos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do procedimento para determinação da atividade microbiana.....	28
Figura 2: Atividade antimicrobiana do SLC de ET34 por <i>spot-on-lawn</i> frente à <i>Listeria innocua</i> CLIST 2711.....	37
Figura 3: Curva padrão relação massa seca e absorbância.....	38
Figura 4: Atividade antimicrobiana do BLIS de <i>P. pentosaceus</i> ET34 por <i>spot-on-lawn</i> frente à <i>Listeria innocua</i> CLIST 2711 acrescido em diferentes açúcares. Legenda: Glicose ¹ (1), Arabinose (2), Galactose (3), Rafinose (4), Frutose (5), Xilose (6), Maltose (7), Ribose (8), Lactose (9), Glicose ² (10), Sacarose (11), Raminose (12).....	40
Figura 5: Diagrama de Pareto da atividade antimicrobiana em função das variáveis independentes pH, concentração de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, agitação e temperatura de acordo com o planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ . Legendas: A = pH; B = porcentagem (%) de HBC; C = Agitação; D = Temperatura.....	45
Figura 6: Análise de superfície de resposta com 2 variáveis – temperatura (°C) e concentração do HBC (% v/v) – utilizando os resultados da atividade antimicrobiana obtidos a pH 6,0 de acordo com o planejamento fatorial 2 ³	47
Figura 7: Halos da atividade do BLIS produzidas determinada por <i>spot-on-lawn</i> frente à <i>Listeria innocua</i> CLIST 2711 para cada condição do planejamento experimental do tipo 2 ³ combinado com a metodologia de superfície de resposta.	47
Figura 8: Imagem do processo em biorreator utilizando 25% de HBC mostrando o acúmulo de resíduos nas pás e na parede do biorreator.....	49
Figura 9: Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de HBC em biorreator.	50
Figura 10: Quantificação da atividade antimicrobiana de BLIS (UA/mL) frente à <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 934 proveniente dos cultivos realizados em biorreator utilizando diferentes meios de cultivo seguido de uma purificação parcial por sulfato de amônio. As letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas correlacionando o meio de cultivo nos diferentes tempos pré-determinados. As letras minúsculas comparam os meios de cultivo estudados dentro do mesmo intervalo de tempo. Legendas: Controle LAPTg sem adição de HBC (0%); HBC na concentração de 5%; HBC na concentração de 10%; HBC na concentração de 15%.....	51
Figura 11: Quantificação da atividade antimicrobiana de BLIS (UA/mL) frente à <i>Salmonella enterica</i> CECT 724 proveniente dos cultivos realizados em biorreator utilizando diferentes meios de cultivo seguido de uma purificação parcial por sulfato de amônio. As letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas correlacionando o meio de cultivo nos diferentes tempos pré-determinados. As letras minúsculas comparam os meios de cultivo estudados dentro do mesmo intervalo de tempo. Legendas: Controle LAPTg sem adição de HBC	

(0%); HBC na concentração de 5%; HBC na concentração de 10%; HBC na concentração de 15%.....52

Figura 12: Efeito de 1.0% (m/v) tripsina na atividade antimicrobiana do BLIS de *P. pentosaceus* ET34 determinada por *spot-on-lawn* frente a *Listeria innocua* CLIST 2711. Legenda: (I) Solução livre de células contendo BLIS + tripsina. (II) Solução livre de células contendo BLIS.54

Figura 13: Efeito de sais, detergentes e EDTA na atividade do BLIS de *P. pentosaceus* ET34 determinada por *spot-on-lawn* frente à *Listeria innocua* CLIST 2711. Em todas as placas foram adicionadas: à direita apenas o BLIS, à esquerda o BLIS acrescentado às soluções e no centro apenas a solução que estava sendo testada.....55

Figura 14: Precipitação do BLIS em diferentes concentrações de sulfato de amônio. Legenda: (I) resultado obtido com concentração de 40%; (II) resultado obtido com 60%; (III) resultado com 20 %; (IV) BLIS sem precipitação; e (V) sulfato de amônio não demonstrou ação quanto à inibição do crescimento da bactéria bioindicadora.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição média característica do bagaço da cana. *Fibra: é a matéria seca e insolúvel em água, contida na cana de açúcar. **Brix: mede os sólidos solúveis em água. (SILVA et al., 2007).....	22
Tabela 2: Lista de cepas bioindicadoras empregadas para avaliação da produção de BLIS por <i>P. pentosaceus</i> ET34.....	28
Tabela 3: Condições do planejamento fatorial fracionado do tipo 2 ⁴⁻¹ usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato.....	31
Tabela 4: Condições e resultados do planejamento experimental fatorial do tipo 2 ³ usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono.....	32
Tabela 5: Atividade antimicrobiana do SLC de <i>P. pentosaceus</i> ET34. Legenda: zonas de inibição (++++) > 16.0 mm; (+++) 13.0 -15.9 mm; (++) 5.0-12.9 mm; (+) 2.1 – 4.9 mm; (-) < 2.0 aplicando 10 µL do SLC.....	36
Tabela 6: Resultados das leituras do crescimento de <i>P. pentosaceus</i> ET34 perante o consumo de diferentes açúcares. Leitura em 600nm de absorbância.	38
Tabela 7: Resultado de atividade antimicrobiana do SLC de <i>P. pentosaceus</i> ET34 em diferentes açúcares.	39
Tabela 8: Concentração celular de <i>P. pentosaceus</i> ET34 cultivado em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar diluído em meio LAPTg como fonte de carbono por 24 h a 37 °C.	42
Tabela 9: Dados preliminares dos metabolitos produzidos a partir do consumo de 10 % HBC em LAPTg por <i>P. pentosaceus</i> ET34 por 24 h a 37 °C.....	42
Tabela 10: Concentração dos compostos presentes no hidrolisado de bagaço e cana-de-açúcar não concentrado.....	43
Tabela 11: Concentração dos compostos presentes no hidrolisado de bagaço e cana-de-açúcar concentrado (amostra utilizada).....	43
Tabela 12: Resultados do planejamento fatorial fracionado do tipo 2 ⁴⁻¹ usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato.	44
Tabela 13: Resultado da atividade bactericida em UA/mL realizada a partir do planejamento experimental do tipo 2 ³ combinado com a metodologia de superfície de resposta para avaliar as melhores condições para a produção do BLIS em hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar.	46

ANEXOS

ANEXOS 1: Participação no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia em 2017 com o pôster "Isolation and identification of lactic acid bacterium which produces bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) for fermentation in skim milk and soy milk ".	68
ANEXOS 2: Participação no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia em 2017 com o pôster "Production, partial purification and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by <i>Pediococcus</i> spp".	71
ANEXOS 3: 2º Seminário Internacional de Bioprocessos.....	73
ANEXOS 4: Participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia em 2018 com o pôster "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) from Milk Samples".	74
ANEXOS 5: Participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia em 2018 com o pôster "Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) Production by <i>Pediococcus Petosaceus</i> ET34 Using Hydrolyzed Sugar Cane Bagasse as Carbon Source".....	76
ANEXOS 6: Ficha do Aluno.....	78
ANEXOS 7: Currículo <i>Lattes</i>	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	16
1.1.2. <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i>	17
1.2. Bacteriocinas	18
1.2.1. PEDIOCINA	20
1.3. Bagaço de cana-de-açúcar	21
1.4. Resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como meio fermentativo	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. MEIOS DE CULTIVO, MATERIAIS UTILIZADOS E FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS	24
4.2. AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BLIS PELA <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i> ET34	27
4.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO <i>P. PENTOSACEUS</i> ET 34	29
4.4. DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIA INIBITÓRIA TIPO BACTERIOCINA (BLIS) EM DIFERENTES TIPOS DE FONTE DE CARBONO	30
4.5. PREPARAÇÃO DO INÓCULO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	30
4.6. DETERMINAÇÃO DO BLIS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	32
4.7. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLIS	33
4.8. PRODUÇÃO DE BLIS POR HBC EM BIORREATOR	33
4.9. EFEITOS DE ENZIMAS, EDTA E DETERGENTES NA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BLIS	34
4.10. CONCENTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO DO BLIS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA <i>P. PENTOSACEUS</i> ET34.....	35
5.2. CONSUMO DE AÇÚCARES PELA LINHAGEM <i>P. PENTOSACEUS</i> ET34	37
5.3. PRODUÇÃO DE BLIS UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS AÇÚCARES COMO SUBSTRATO ..	39
5.4. CRESCIMENTO DE <i>P. PENTOSACEUS</i> ET34 UTILIZANDO HIDROLISADO DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO FONTE DE CARBONO.....	40
5.5. PRODUÇÃO DE BLIS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR	44
5.6. OBTENÇÃO DE BLIS POR <i>P. PENTOSACEUS</i> ET34 UTILIZANDO HBC EM BIORREATOR DE BANCADA.....	48
5.7. AÇÃO DE ENZIMAS, EDTA E DETERGENTES SOBRE A SUBSTÂNCIA BACTERICIDA.....	53
5.8. CONCENTRAÇÃO/PURIFICAÇÃO PARCIAL DO BLIS	55
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS	59
8. OUTRAS REALIZAÇÕES NO PERÍODO	67

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bactérias Ácido-Láticas

Os micro-organismos classificados como bactérias ácido-láticas (BAL) desempenham importante papel pelo fato de seus metabólitos serem bem utilizados em diversos produtos, contribuindo para as propriedades nutricionais, como também conferem segurança microbiológica devido à produção dos metabólitos, como ácido láctico, ácido acético, etanol, peróxido de hidrogênio, antibióticos e compostos fenólicos (Bartkiene et al., 2017). Os principais gêneros de BAL são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactosphaera*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Missococcus*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Teragenococcus*, *Alloiococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (König et al., 2017; Crowley et al., 2013).

A maioria das BAL são anaeróbicas facultativas, catalase negativa, não móveis, cocos ou bacilos, sem formação de esporos, podendo ser classificadas como homofermentativa ou heterofermentativa (Patel et al., 2016).

Dentre as BAL classificadas como homofermentativas estão *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* e *Pediococcus cerevisiae*, que são capazes de converter a maior parte da glicose em ácido láctico, sendo que cada molécula de glicose produz duas moléculas de ácido láctico (Garcia et al., 2018). As BAL heterofermentativas são reconhecidas por, adicionalmente à produção de ácido láctico, catabolizarem a glicose em etanol e CO₂. *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus cremoris*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum* são algumas bactérias heterofermentadoras que, dentre outras, são utilizadas para fermentação de alimentos (Garcia et al., 2018; Patel et al., 2016).

Os alimentos fermentados por esses micro-organismos ganharam notoriedade e têm sido muito relacionados ao bem-estar nutricional, já que conferem benefícios à

saúde e à aceitação sensorial ao produto. Em alguns casos, o conteúdo de folato dos alimentos aumenta devido à produção por bactérias (Kariluoto et al., 2006).

Além do fato de esses micro-organismos serem considerados culturas iniciadoras em processos de fermentação, eles também conferem característica de preservação aos alimentos, aumentando a vida-de-prateleira (Sabo et al., 2019). Algumas BAL possuem capacidade de retardar ou inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (Stefanello et al., 2018), não apenas pela produção dos compostos ácidos originados do catabolismo da glicose, como também pela produção de peptídeos antimicrobianos como por exemplo as bacteriocinas.

Este composto antimicrobiano é produzido por diversos outros micro-organismos; entretanto, quando produzido pelas BAL, vem recebendo maior atenção pelo fato deste grupo de bactérias geralmente apresentarem segurança para consumo humano (Sabo et al., 2019; Balciunas et al., 2013).

1.1.2. *Pediococcus pentosaceus*

O gênero *Pediococcus* é constituído por bactérias em forma de cocos, Gram-positivos, geralmente organizados em tétrades, homofermentativas, sem motilidade, não formadoras de esporos e anaeróbicas facultativas (Zhang et al., 2005). Esse gênero exige requerimento nutricional complexo e capacidade respiratória limitada, sendo sua multiplicação favorecida em condições microaerófilas e, ocasionalmente, anaeróbicas (Priest, 2006; Hough et al., 1982).

A espécie *Pediococcus pentosaceus* pode tolerar concentrações de sal de até 10%. *P. pentosaceus* não cresce em temperaturas por volta de 50° C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 28 e 35 °C, na qual metabolizam hexoses através da via glicolítica, usando preferencialmente, como fonte de carbono para fermentação, glicose, ribose, galactose, arabinose e frutose. Algumas linhagens são capazes de fermentar pentoses (Papagianni e Anastasiadou, 2009).

Ampla variedade de processos fermentativos alimentares, à base de lácteos, carnes e vegetais, vem sendo realizada com a utilização da *P. pentosaceus* como cultura iniciadora

Juntamente com outras bactérias, a cepa *P. pentosaceus* é considerada probiótica, sendo conhecida por promover benefícios ao hospedeiro quando é ingerida em quantidade adequada (FAO/WHO, 2002), apresentando tolerância ao suco gástrico e adesão de células HT-69 da mucosa intestinal e alta concentração biliar (Porto et al., 2017), combinada à síntese de bacteriocina nominada, quando produzida por este gênero, como pediocina.

As cepas que produzem pediocina vêm sendo frequentemente estudadas também quanto à preservação de alimentos, devido ao controle microbiano durante a fermentação e para inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes durante o armazenamento do produto (Díez et al., 2012).

1.2. Bacteriocinas

Os micro-organismos produzem um conjunto de sistemas de autodefesa, incluindo os antibióticos, os subprodutos metabólicos, como ácido láctico produzido por espécies de lactobacilos, os agentes líticos, tais como lisozimas, as diferentes exotoxinas proteicas, os peptídeos antimicrobianos (bacteriocinas) e as substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas (BLIS – *bacteriocin-like inhibitory substance*) (Cavera et al., 2015).

Por definição, as bacteriocinas são pequenos peptídeos sintetizados por ribossomos e lançados ao meio extracelular exercendo atividade bactericida ou bacteriostática contra micro-organismos da mesma espécie ou de outros gêneros (Martinez et al., 2013). Esse efeito antimicrobiano resulta na permeabilização da célula-alvo, inibição da síntese da parede celular, inibição da atividade da DNA girase ou da RNA polimerase da célula-alvo (Ogaki et al., 2015). Apesar de diversas bactérias produzirem bacteriocinas, aquelas produzidas por BAL têm ganhado destaque devido ao seu alto potencial de aplicação e à sua capacidade biopreservativa em alimentos (Cintas et al., 2001). Ademais, muitas linhagens deste grupo são consideradas seguras para a saúde humana (GRAS – *Generally Recognized as Safe*) pela FDA – *Food and Drug Administration* (Jeevaratnam et al., 2005).

As bacteriocinas são compostos já utilizados como contribuintes para o aumento da vida-de-prateleira e da segurança microbiológica de produto fermentado (Leroy e Vuyst, 2004; Mayo et al., 2010).

Os primeiros estudos sobre bacteriocinas estão datado em 1925, com a descoberta das colicinas produzidas por *Escherichia coli*. Inicialmente, os estudos das colicinas foram voltados para a ação apenas contra os micro-organismos Gram-negativos. Atualmente, são conhecidas muitas outras bacteriocinas produzidas por diversos micro-organismos (Rosa e Franco, 2002).

A atividade antimicrobiana das bacteriocinas varia conforme a bactéria que produz e o meio que elas se desenvolvem, podendo promover, de uma maneira geral, efeito bacteriostático ou efeito bactericida com ou sem lise celular. As bacteriocinas provenientes de bactérias ácido-láticas mostram, em geral, mecanismo de ação por dissipação da força próton-motriz, que modifica o potencial da membrana e do gradiente de concentração de H^+ , formando assim poros na membrana plasmática (Porto et al., 2017).

Estruturalmente, esses peptídeos são compostos de 20 a 60 aminoácidos e podem ser responsáveis pelas principais propriedades das bacteriocinas, que incluem tolerância ácida, termoestabilidade e especificidade bactericida (Colins et al., 2010). O mais conhecido exemplo é a nisina, a qual é bioproduzida por muitas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo considerada o protótipo de bacteriocina de BAL (Perin et al., 2012).

Em geral, os testes de atividade antimicrobiana utilizando métodos de difusão em ágar não distinguem as atividades inibitórias das bacteriocinas em comparação com agentes antimicrobianos, como bacteriófagos, metabólitos primários (água oxigenada, ácido lático, entre outros) ou antibióticos sintetizados não ribossomicamente (bacitracina). Tais testes também não discriminam a inibição atribuída à depleção de nutrientes ou às atividades combinadas de múltiplas bacteriocinas e/ou outros agentes inibitórios. Para isso, é recomendado o uso do acrônimo BLIS (para substâncias inibitórias semelhantes às bacteriocinas) para se referir a agentes inibidores, de origem proteica, ainda não caracterizados "semelhantes às bacteriocinas" na sua atividade antimicrobiana (Balciunas et al., 2016; Martinez et al., 2015; Souza Vera et al., 2018).

1.2.1. Pediocina

As bacteriocinas produzidas por BAL possuem três classificações e, dentro dessas classificações, as pediocinas pertencem à classe II, que se subdivide em IIa, IIb e IIc, sendo composta por peptídeos pequenos (<10 kDa), ativos na membrana – sendo estas as mais amplamente estudadas, devido a sua atividade antilistérica (Heng et al., 2007). Na classe IIa, à qual pertencem as pediocinas, em sua parte N-terminal definida – sequência YGNGV-C – (Cheikhoussef et al., 2008), as moléculas são anfipáticas e a hidrofobicidade de várias delas aumenta gradualmente da parte N-terminal para a C-terminal da molécula que dependem de fosfolipídios aniônicos para interagir com a membrana, enquanto os peptídios são ativos contra *Listeria ssp.* (Schulz et al., 2003). As bacteriocinas de classe IIa possuem espectro limitado de atividade e parecem ter sua ação mediada por algum tipo de receptor. A natureza desses receptores ainda não foi determinada (Cheikhoussef et al., 2008).

As pediocinas agem após estarem ligadas à membrana, dissipando a força motriz protônica. Com a dissipação da força protônica, 98,9% de ATP são hidrolisados, na tentativa de manutenção da FMP. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula pelos poros formados. Esse distúrbio primário talvez gere outras desordens como lise celular (Rosa e Franco, 2002).

Geralmente, a pediocina tem atividade de inibição contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. Greenetal (1997) e Anastasiadou et al. (2008) apresentaram o espectro de inibição da pediocina SA-1 produzida por *P. acidilactici* contra bactérias como *Bacillus cereus*, *Clostridium ssp.*, *Listeria monocytogenes* e, *Salmonella carnosus*; entretanto, verificaram que pediocina não inibiu a atividade contra *Salmonella enteritidis*.

Foi observado que a imunidade da cepa produtora *P. acidilactici* H à pediocina é controlada por uma proteína imune-específica codificada pelo gene bacteriano (Papagianni et al., 2009).

O fato de as pediocinas apresentarem estabilidade a diversidade de temperatura e de pH são características que engrandecem essas moléculas com o objetivo de uso como conservante de alimentos que demandam processos industriais e aqueles mantidos sob refrigeração (Porto et al., 2017).

Por isso, há grande importância nos estudos para ampliar o processo para obtenção desta molécula – que vem demonstrando grande importância tanto no campo alimentar como no farmacêutico.

1.3. Bagaço de cana-de-açúcar

Segundo pesquisas realizadas em 2014, o Brasil é o maior produtor e o maior exportador de produtos derivados da cana-de-açúcar, produzindo mais de 480 milhões de toneladas de cana (EMBRAPA, 2018). A produção brasileira de cana-de-açúcar, em 2016/2017, chegou a 691 milhões de toneladas, com aumento de 3,8% em relação à safra anterior (CONAB, 2018).

O açúcar produzido na Região Centro-Sul apresenta o menor custo de produção do mundo. O aumento da demanda por açúcar no mercado externo, associado ao mercado de etanol, além de outros fatores, resultou no aumento significativo de resíduos oriundos dos processos de obtenção desses produtos. A destinação adequada desses resíduos pode tornar-se cada vez mais valorizada dentre os processos industriais da fabricação do açúcar e de outros subprodutos – bagaço, vinhaça, torta de filtro etc. (Goes et al., 2008).

O maior problema ecológico está relacionado com a produção de bagaço da cana-de-açúcar que, segundo Silva et al. (2007), é o resíduo agroindustrial obtido em maior quantidade no Brasil – aproximadamente 280 kg/ton moída (30% do total moído). O bagaço da cana-de-açúcar é considerado um subproduto, gerado no processo de extração do caldo, obtido por meio de difusor ou moenda (Rebelato et al., 2013). A celulose, a hemicelulose e a lignina contidas no bagaço, caso descartadas nas águas residuais, podem ter enorme efeito poluidor, podendo aumentar significativamente os níveis de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), que é o critério utilizado para medir a carga orgânica dos efluentes e dos recursos hídricos (Rebelato et al., 2013).

Há variações na composição química do bagaço-de-cana, conforme diversos fatores, como a região do cultivo e os períodos de cultivo (Silva et al., 2007). Na Tabela 1, está demonstrada a composição média do bagaço-de-cana.

Tabela 1: Composição média característica do bagaço da cana. *Fibra: é a matéria seca e insolúvel em água, contida na cana de açúcar. **Brix: mede os sólidos solúveis em água. (SILVA et al., 2007).

Composição química média	
Carbono	39,7 – 49%
Oxigênio	40 – 46%
Hidrogênio	5,5 – 7,4%
Nitrogênio e cinzas	0 – 0,3%
Propriedades físico-químicas	
Umidade	50%
Fibra*	46%
Brix**	2%
Impurezas minerais	2%
Composição média da fibra do bagaço	
Celulose	26,6 – 54,3%
Hemicelulose	14,3 – 24,4%
Lignina	22,7 – 29,7%

Quando celulose e hemicelulose contidas no bagaço de cana-de-açúcar são hidrolisadas, uma mistura de monossacarídeos pode ser produzida. Os açúcares predominantes liberados são xilose, glicose e, em concentrações bem menores, arabinose, galactose e manose. Os micro-organismos expostos a essa mistura de açúcares se utilizam dos açúcares como fonte de carbono para a fermentação (Ferraz, 2010).

1.4. Resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como meio fermentativo

É cada vez mais importante estudar as interações entre as bactérias ácido-láticas e as fontes de nutrientes durante o processo fermentativo. A produção e a estabilidade das bacteriocinas são fortemente influenciadas pela temperatura, pelo tempo de incubação e pela fonte de carbono que será utilizada pela bactéria, tornando-se fundamental diminuir os custos de produção da pediocina. A utilização do hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar (HBC), como meio de cultivo, valoriza o conceito da produção de biomoléculas de alto valor agregado, como no caso das bacteriocinas, aliado ao aspecto ambiental. Além disso, é importante maximizar a eficácia das BAL utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio como os nutrientes responsáveis pelo crescimento celular.

O Brasil se tornou destaque no cenário econômico mundial, por conta de sua ampla atividade agrícola; porém, devido a esta atividade, está entre os países que mais geram resíduos agroindustriais (Furlan, 2015), que são de lenta decomposição, causando grande impacto ambiental. Segundo as informações da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2018), os subprodutos da cana e seus resíduos são utilizados para co-geração de energia elétrica, fabricação de ração animal, fertilizante para as lavouras e para a produção do combustível denominado como etanol de segunda geração, produzido a partir da hidrólise da celulose e lignocelulose do bagaço da cana-de-açúcar, o qual possibilita a redução da formação deste dejetos e fornece substrato para a produção de etanol, extraindo mais combustível da matéria-prima (FINEP, 2019).

Diversos fatores podem influenciar a produção das bacteriocinas, como aeração, pH, temperatura e composição do meio de fermentação (Garsa et al., 2014). O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso (celulose), composto principalmente de água (de 48 % a 52 %) e sacarose, com pH ao redor de 5,6 e após a hidrólise da celulose, os açúcares passam a serem disponibilizados para a fermentação por bactérias.

Neste sentido, mediante o emprego de resíduos agroindustriais como substratos em cultivos fermentativos, busca-se melhor aproveitamento desses resíduos, que são fontes altamente nutritivas (Arruda et al., 2008) e com grande capacidade de promover alto rendimento na produção de bacteriocina, podendo diminuir os custos de produção desta molécula antimicrobiana em nível industrial e atribuir melhor destino final aos resíduos – que podem ser prejudiciais ao meio ambiente se não descartados de forma correta (Silva et al., 2010).

Este trabalho propõe, portanto, o uso do resíduo agroindustrial bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado, através de processo térmico, o qual contém alta quantidade de substâncias orgânicas, para a elaboração de meio de cultivo alternativo, que permita obter biomoléculas de alto valor agregado (como as bacteriocinas), minimizando o impacto ambiental derivado da atividade agroindustrial de setores relevantes para o Brasil.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi a produção biotecnológica e avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias semelhantes à bacteriocina produzida por *Pediococcus pentosaceus* ET 34 cultivado em resíduo agroindustrial hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a influência do hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar para formular meios de cultivos mais econômicos e naturais no crescimento celular de *Pediococcus pentosaceus* ET34 e na produção de bacteriocina;
- Avaliar a influência das variáveis pH, agitação e concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para o crescimento da *P. pentosaceus* ET 34 e para a produção da substância antimicrobiana;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da pediocina produzida em biorreator frente a diversos micro-organismos patogênicos. Para isto foi avaliada a atividade antimicrobiana através de medidas de halos de inibição dos diversos extratos frente aos bio-indicadores: *Listeria innocua* CLIST 2711, *Listeria monocytogenes* ATCC 934 *Salmonella enterica* CECT 724.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de cultivo, materiais utilizados e fluxograma de experimentos

Os meios de cultivo utilizados foram determinados conforme o interesse específico quanto ao cultivo de cada espécie.

O meio de cultivo MRS – Man, Rogosa and Sharpe (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) apresenta a seguinte composição, expressa em g/L diluídos em água destilada:

Componentes	Volumes
Peptona	10,0
Extrato de carne	10,0
Extrato de levedura	5,0
Glicose	20,0
Tween 80	1,0
Citrato de amônio	2,0
Acetato de sódio	5,0
Sulfato de magnésio	0,1
Sulfato de manganês	0,05
Fosfato de potássio dibásico	2,0

O meio de cultivo TSB - *Tryptic Soy Broth* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) apresenta a seguinte composição, expressa em g/L diluídos em água destilada:

Componentes	Volumes
Triptona	17,0
Extrato de soja	3,0
Glicose	2,5
Cloreto de soja	5,0
Fosfato de potássio dibásico	2,5

O meio de cultivo BHI - *Brain Heart Infusion* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) apresenta a seguinte composição, expressa em g/L diluídos em água destilada:

Componentes	Volumes
Infusão (sólida) de coração e cérebro	6,0
Tecido animal sob digestão péptica	6,0
Gelatina de digestão pancreática	14,5
Dextrose	3,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato dissódico	2,5
Ácido p-aminobenzoico	0,05

O denominado Meio Mínimo proposto por Tanasupawat e Daengsubha (1983) foi escolhido para avaliação de diferentes fontes de carbono para o cultivo de *P. pentosaceus* e apresenta a seguinte composição, expressa em g/L diluídos em água destilada:

Componentes	Volumes	Fabricante
--------------------	----------------	-------------------

Extrato de levedura	4,0	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Peptona	5,0	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Sulfato de manganês tetrahidratado	0,01	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Sulfato ferroso heptahidratado	0,01	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Cloreto de sódio	0,01	(Labsynth, Diadema, SP, BR)

O meio denominado como LAPTg (*Lactic Acid, Peptone, Tryptone and glucose medium*) foi o escolhido para o cultivo de *Pediococcus pentosaceus* ET 34 suplementado com o hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono, preparado de acordo com a metodologia proposta por Testa de Nadal et al. (1997) e apresenta a seguinte composição, expressa em g/L diluídos em água destilada:

Componentes	Volumes	Fabricante
Extrato de levedura	10,0	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Peptona	15,0	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Triptona	10,0	(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)
Tween 80	1,0 (mL)	(Labsynth, Diadema, SP, BR)

Quando necessário, o pH dos meios de cultivo e da solução fermentada livre de células foram ajustados com HCl 1N (Labsynth, Diadema, SP, BR) e/ou NaOH 1N (Labsynth, Diadema, SP, BR).

O hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar (HBC) foi gentilmente fornecido pelo Laboratório Nacional de Biorrenováveis – LNBR, divisão do Centro Nacional de Pesquisas em Energias e Materiais - CNPEM, localizado em Campinas (São Paulo, Brasil).

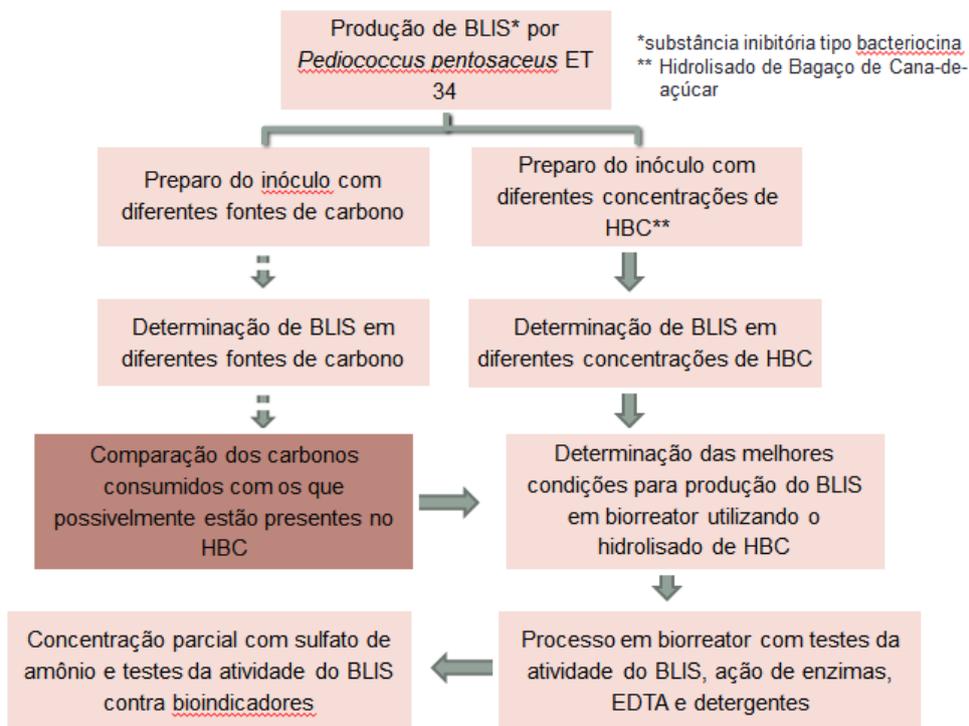
Todos os meios de cultura, soluções e instrumentos laboratoriais utilizados foram esterilizados a 121 °C a 1 atm por 15 min em autoclave (SD-75, Phoenix, SP, Brasil).

Os halos formados a partir da inibição de crescimento das bactérias bioindicadoras foram medidos utilizando-se o paquímetro digital (Lee Tools, modelo 684132, Houston, TX, USA).

Para a verificação da natureza proteica do BLIS, foram utilizadas tripsina, pepsina ou papaína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Para a estabilidade, utilizou o

sal cloreto de sódio (NaCl) (Labsynth, Diadema, SP, BR), EDTA e detergentes (Triton 100 X, Tween-20, Tween-80, SDS) (Alamar Tecno-Científica, Diadema, SP, BR).

Abaixo está o fluxograma para a representação gráfica da sequência dos experimentos para melhor compreensão da transição dos processos para a conclusão deste trabalho:



4.2. Avaliação de produção de BLIS pela *Pediococcus pentosaceus* ET34

Anteriormente à avaliação da possibilidade do HBC ser utilizado como substrato para produção de BLIS, foi avaliada a produção de pediocina da cepa de *Pediococcus pentosaceus* ET34 isolado de microbiota de salmão (Tomé et al., 2008). Esta cepa foi inoculada em meio MRS, a 37 °C, por 24 h, sem agitação.

Para avaliar a produção de pediocina, a alíquota do cultivo da cepa foi centrifugada a 4 °C, por 15 minutos, a 30.230 x g. Para eliminar a ação de ácidos orgânicos, o pH do sobrenadante livre de células (SLC) foi ajustado para pH 6,0-6,5 através da adição de NaOH 1,0 M; em seguida, aquecido a 80 °C, por 15 minutos, para a inativação de proteases; após isso, foi filtrado em membrana de filtro com

porosidade de 0,45 μm de diâmetro (Millipore, Billerica, MA, USA), conforme o esquema representado na Figura 1.



Figura 1: Esquema do procedimento para determinação da atividade microbiana.

A atividade antimicrobiana do SLC foi quantificada e expressa em unidades arbitrárias (AU) por mL de acordo com Todorov et al. (2011). Cada amostra foi aplicada (10 μL) na placa de cultivo em ágar (0,75%) contendo a cepa indicadora (tabela 2), a aproximadamente 10⁶ UFC, e incubada a 37°C, por 24 horas.

Tabela 2: Lista de cepas bioindicadoras empregadas para avaliação da produção de BLIS por *P. pentosaceus* ET34.

MICRO-ORGANISMOS BIOINDICADORES
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2052
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2861
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2871
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2860
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2873
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2711
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2865
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2864
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2193
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2863
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CECT 4020
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 239
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027

A atividade antimicrobiana do SLC (*AtvSLC*) foi expressa em UA por mL, a partir da medição em quatro direções do halo de inibição, utilizando-se um paquímetro digital, e calculada empregando-se a seguinte expressão matemática (Sabo et al., 2018; Sidek et al., 2016):

$$AtvSLC\left(\frac{UA}{mL}\right) = \frac{\pi R^2}{V}$$

Onde:

πR^2 = Área da zona de inibição do crescimento bacteriano (halo) em cm²;

v = Volume em mL do SLC que foi aplicado sobre o ágar

O SLC foi tratado com 1 mg/mL de tripsina, pepsina ou papaína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) durante 2 horas, a 30 °C, para verificação da natureza proteica do composto antimicrobiano, caso o halo de inibição desaparecesse.

4.3. Avaliação do consumo de diferentes fontes de carbono *P. pentosaceus* ET 34

Inicialmente, foi verificado quais açúcares a cepa ET34 de *P. Pentosaceus* consome e, logo, se esses açúcares estão presentes no HBC, seguindo o protocolo descrito por Tanasupawat e Daengsubha (1983) (Callejón et al., 2017). Para esses testes, a linhagem de *P. pentosaceus* ET 34 foi cultivada em caldo MRS, por 24h, a 37 °C, sem agitação. Após este período, este cultivo foi diluído 1:10 em solução salina e novamente diluído 1:10, resultando em uma quantidade inicial de células de aproximadamente 10⁶ com o meio de cultivo denominado Meio Mínimo (sem adição de fonte de carbono), para iniciar o experimento, acrescentando-se 0,5% (concentração final – v/v) dos açúcares ribose, glicose, xilose, frutose, arabinose, galactose, lactose, raminose, maltose, rafinose e glicerol (Alamar Tecno-Científica, Diadema, SP, BR). Estes ensaios foram realizados em triplicata.

As células foram inoculadas em microplacas de 96 poços durante 24 horas, a 37 °C, sem agitação. Após este período, foi verificado o crescimento das células utilizando o leitor de microplaca Synergy™ HTX (Biotek, Shoreline, WA), em que a placa foi agitada durante 1 minuto, a 1.200 rpm, e a concentração de biomassa foi determinada através da determinação de sua densidade ótica (600 nm). Quando o

valor da absorbância a 600 nm de uma amostra na presença de um determinado açúcar foi significativamente maior do que na presença apenas do Meio Mínimo sem acréscimo de uma fonte de carbono, foi considerado que células de *P. pentosaceus* ET34 foi capaz de consumir o respectivo açúcar. A concentração de massa celular foi determinada por densidade ótica utilizando curva de calibração ($R^2 = 0,9266$) versus massa seca e expresso em mg/L.

4.4. Determinação de substância inibitória tipo bacteriocina (BLIS) em diferentes tipos de fonte de carbono

Para avaliar a produção de substância inibitória tipo bacteriocina a partir do consumo de cada açúcar, uma alíquota de *P. pentosaceus* ET34 foi inoculada em MRS, por 24h, a 37 °C, sem agitação. Após este período, este cultivo foi diluído 1:10 em solução salina e novamente diluído 1:10 em meio LAPTg sem adição de fonte de carbono, para iniciar o experimento, acrescentando 1% (concentração final) dos açúcares xilose, frutose, ribose, lactose, rafinose, galactose, sacarose, glicose, arabinose, maltose, dextrose, raminose e sacarose, sendo que as soluções estoques de todos açúcares foram feitas em 15% (v/v) em água destilada.

Após 24 horas, as amostras foram centrifugadas 4 °C, por 15 minutos, a 4.470 x g. Para eliminar a ação de ácidos orgânicos, o pH do sobrenadante livre de células (SLC) foi ajustado para pH 6,0-6,5, através da adição de NaOH 1,0 M; em seguida, aquecido a 80 °C, por 15 minutos, para a inativação de proteases. Após isso, cada amostra diluída foi aplicada (20µL) na placa de cultivo em ágar (0,75%) contendo a cepa indicadora *Listeria innocua* CLIST 2711 (~10⁶ UFC) e incubada a 37°C, por 24 horas.

4.5. Preparação do inóculo em diferentes concentrações de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Para avaliar a produção de substância bactericida, a cepa de *Pediococcus pentosaceus* ET34, após ser retirada do ultrafreezer onde estava conservada a -70 °C em glicerol, foi cultivada em caldo MRS, por 24 h, a 37 °C, sem agitação. Após

este período, o caldo fermentado foi diluído 1:10, em solução salina, e novamente diluído 1:10, em meio LAPTg, preparado de acordo com a metodologia proposta por Testa de Nadal et al. (1997).

Este meio foi suplementado com HBC como fonte de carbono em diferentes proporções (0 - 50 %, v/v); o pH do meio foi ajustado para 5,0 a 7,0 com HCl 1.0 N e/ou NaOH 1.0 N e, posteriormente, submetido às condições do planejamento fracionado fatorial 2^{4-1} mostrado na Tabela 3.

Após a verificação das variáveis que influenciavam de forma estatisticamente significativa a produção da substância inibitória tipo bacteriocina (BLIS) por *P. pentosaceus* ET34, foi realizado outro planejamento experimental fatorial do tipo 2^3 combinado com a metodologia de superfície de resposta (RSM), variando pH, temperatura e %(v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 4).

Tabela 3: Condições do planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{4-1} usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Ensaio	1	2	3	4	Concentração do hidrolisado (% v/v)	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)
1	+1	-1	+1	-1	35	25	7	0
2	-1	-1	+1	+1	15	25	7	200
3	-1	-1	-1	-1	15	25	5	0
4	+1	-1	-1	+1	35	25	5	200
5	0	0	0	0	25	30	6	100
6	-1	+1	+1	-1	15	35	7	0
7	+1	+1	-1	-1	35	35	5	0
8	0	0	0	0	25	30	6	100
9	0	0	0	0	25	30	6	100
10	-1	+1	-1	+1	15	35	5	200
11	1	0	0	0	25	30	6	100

Tabela 4: Condições e resultados do planejamento experimental fatorial do tipo 2³ usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Ensaio	x1	x2	x3	Concentração do hidrolisado (% v/v)	Temperatura (°C)	pH
1	-1	-1	-1	5	25	5,5
2	+1	-1	-1	25	25	5,5
3	-1	+1	-1	5	35	5,5
4	+1	+1	-1	25	35	5,5
5	-1	-1	+1	5	25	6,5
6	+1	-1	+1	25	25	6,5
7	-1	+1	+1	5	35	6,5
8	+1	+1	+1	25	35	6,5
9	-1,68	0	0	0	30	6
10	+1,68	0	0	30	30	6
11	0	-1,68	0	15	20	6
12	0	+1,68	0	15	40	6
13	0	0	-1,68	15	30	5
14	0	0	+1,68	15	30	7
15	0	0	0	15	30	6
16	0	0	0	15	30	6
17	0	0	0	15	30	6

4.6. Determinação do BLIS em diferentes concentrações de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Para avaliar a produção do BLIS em cada condição dos dois planejamentos, alíquotas dos caldos fermentados contendo *P. pentosaceus* ET34 tiveram o pH ajustado para pH 2,0–2,5 com HCl 1,0 N e foram centrifugadas a 4 °C, por 5 minutos, a 4.470 x g. Para eliminar a ação de ácidos orgânicos, o pH do sobrenadante livre de células (SLC) foi ajustado para pH 6,0-6,5, através da adição

de NaOH 1,0 M e, em seguida, aquecido a 80 °C, por 15 minutos, para a inativação de proteases. Após isso, o SLC foi filtrado em membrana de filtro com porosidade de 0,45 µm de diâmetro (Millipore, Billerica, MA, USA).

4.7. Atividade antimicrobiana do BLIS

Para a determinação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o micro-organismo bioindicador *Listeria innocua* CLIST 2711 que, após a inoculação em meio de cultivo 10 mL do meio BHI e após ser retirada do ultra-freezer no qual estava conservada a -70 °C em glicerol, foi incubada a 37°C, por 24 horas, sem agitação. A suspensão final do cultivo foi diluída 1:100 em solução salina e novamente diluída 1:10 em 10 mL de meio BHI contendo ágar 0,75% (aproximadamente 10⁶).

A atividade antimicrobiana do SLC (*AtvSLC*) foi expressa em UA por mL, conforme descrito no item 4.2, cada amostra de SLC foi aplicada (20 µL) em placa de cultivo contendo meio BHI agarizado e incubada a 37°C, por 24 horas.

4.8. Produção de BLIS por HBC em biorreator

A partir dos resultados obtidos com o planejamento experimental fatorial do tipo 2³ combinado com a metodologia de superfície de resposta (RSM), foi investigada a produção de BLIS por *P. pentosaceus* ET 34 em biorreator de bancada, modelo Biostat® 3L B Single (Sartorius AG, Goettingen, Alemanha).

A biomassa para o inóculo foi preparada cultivando-se o micro-organismo em meio MRS (30 ml), por 24 h, a 37 °C, com subsequente recuperação das células por centrifugação a 4.470 g, a 30 °C, ressuspensão com solução salina (30 ml), nova centrifugação, nas mesmas condições, e ressuspensão final em meio LAPTg, pH 6,0, até atingir valor de D.O. entre 0,8 e 0,9.

As fermentações em biorreator de batelada foram realizadas a 35 °C, em meio LAPTg tamponado em pH 6,0 e enriquecido com HBC nas proporções volumétricas sugeridas pelos ensaios do planejamento fatorial (0 a 25%, v/v), em atmosfera de nitrogênio, para garantir condições anaeróbicas, que foi observada através de uma

sonda de oxigênio dissolvido acoplado no interior da dorna, reduzindo a concentração de oxigênio para 0% após a injeção do nitrogênio e agitação de 50 rpm. O inóculo foi realizado acrescentando-se 100 mL da suspensão celular anterior a 1 L deste meio de cultivo.

As amostras foram retiradas a cada 2 horas, até completarem 12 horas de fermentação. Após isso, a última amostra foi retirada na 24^a hora de fermentação – momento no qual foi finalizado o processo.

Para estudar o crescimento celular, as amostras coletadas durante os cultivos foram submetidas a 7 diluições seriadas de 1:10 (v/v), enquanto 10 µl de cada diluição foram aplicados, de acordo com a técnica *spot-on-lawn*, em placas de cultivo contendo MRS agarizado (0,75%) e incubados a 37 °C, por 24 h. Após enumeração das colônias, a concentração de células vivas foi expressa em UFC/mL.

Para a verificação de produção de BLIS, as amostras foram submetidas ao tratamento conforme o item 4.7.

4.9. Efeitos de enzimas, EDTA e detergentes na atividade antimicrobiana do BLIS

O SLC foi tratado com 1 mg/mL de tripsina, pepsina ou papaína e incubado durante 2 horas, a 30 °C, para verificação da natureza proteica do composto antimicrobiano.

Para verificar a estabilidade do BLIS em sal, EDTA e detergentes (Triton 100 X, Tween-20, Tween-80, SDS, na concentração final de 1% (m/v) ou (v/v), amostras contendo BLIS foram incubadas e tratadas com os compostos supracitados, de acordo com a metodologia empregada por Todorov et al. (2011).

4.10. Concentração/purificação do BLIS

Para a concentração e a purificação parcial do BLIS, após a obtenção do SLC, acrescentou-se sulfato de amônio (Labsynth, Diadema, SP, BR) em volumes entre 10 e 60 % (m/v) para saber qual é a melhor concentração para recuperação de BLIS.

Esta solução ficou em agitação de 75 rpm, a 14 °C. Após 2 h, o SLC foi desprezado e o BLIS foi recuperado com 1 mL de solução acetato de amônio a 25 mM a pH 6,5 (Labsynth). Após a observação da precipitação das proteínas, 10 µl de cada diluição foram aplicados, de acordo com a técnica *spot-on-lawn*, em placas de cultivo contendo *L. innocua* CLIST 2711 (Sabo et al., 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade antimicrobiana da *P. pentosaceus* ET34

Com o objetivo de comparar a produção do BLIS produzido por *P. pentosaceus* ET34, foi realizado o teste de atividade antimicrobiana do sobrenadante livre de células (SLC). Na Figura 2, observa-se a atividade antimicrobiana do SLC de *P. pentosaceus* ET34 de 12.800 UA/mL frente à *Listeria innocua* CLIST 2711. A linhagem *Pediococcus pentosaceus* ET34 foi isolada de salmão defumado e apresentou ação bacteriostática contra *Listeria innocua* 2030c *in vitro*, bem como quando inoculada nos filetes de salmão (Tomé et al., 2008). Esta bactéria apresenta capacidade de crescer e apresentar atividade antimicrobiana frente à *Listeria monocytogenes* na presença de NaCl (até 5%), baixas temperaturas 25 °C a 5 °C tanto em anaerobiose como na presença de oxigênio. Estas condições são ideais para conservação de frutos do mar e peixes embalados a vácuo (Tomé et al., 2006).

O SLC de ET34 apresentou atividade antimicrobiana contra diferentes linhagens de *Listeria spp* e também espectro de inibição frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O tamanho do halo de inibição foi semelhante para todas as *Listeria spp* (Tabela 5). Este resultado corrobora o fato de a pediocina ser uma bacteriocina pertencente à classe IIa, que é conhecida por ter efeito antilistérico eficaz (Porto et al., 2017, Drinder et al., 2006). O modo de ação das bacteriocinas pertencentes a esta classe ocorre pela formação de poros na membrana da célula-alvo (Ghraiiri et al., 2012). Esse mecanismo ocorre com a bacteriocina interagindo com sua porção N-terminal aos receptores na membrana celular da bactéria-alvo ou pela interação eletrostática com a membrana. Em seguida, a porção C-terminal alpha hélice da pediocina se insere na membrana causando dissipação da força

próton-motriz com modificação do potencial de membrana e no gradiente de concentração de H⁺ (Ghraiiri et al., 2012, Porto et al., 2017).

Também foram observados halos de inibição em *C. maltaromaticum* CECT 4020 e *L. sakei* ATCC 15521 (Tabela 5). Não foi observado nenhum efeito antimicrobiano frente a *S. aureus* e as linhagens Gram-negativas *E. coli* e *Pseudomonas*. A grande maioria das pediocinas apresenta efeito mais eficaz contra linhagens Gram-positivas, mas não se descarta a possibilidade de ação contra linhagens Gram-negativas (Porto et al., 2017).

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do SLC de *P. pentosaceus* ET34. Legenda: zonas de inibição (++++) > 16.0 mm; (++++) 13.0 -15.9 mm; (++) 5.0-12.9 mm; (+) 2.1 – 4.9 mm; (-) < 2.0 aplicando 10 µL do SLC.

Atividade antimicrobiana do SLC	
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2052	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2861	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2871	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2860	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2873	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2711	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2865	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2864	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2193	+++
<i>Listeria innocua</i> CLIST 2863	+++
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> CECT 4020	+++
<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521	++++
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 239	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-

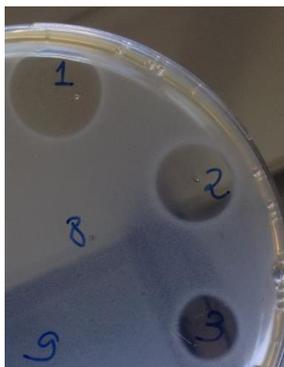


Figura 2: Atividade antimicrobiana do SLC de ET34 por *spot-on-lawn* frente à *Listeria innocua* CLIST 2711.

Para comprovação da natureza proteica do composto antimicrobiano situado no SLC, a amostra foi incubada na presença de tripsina, pepsina ou papaína (1mg/mL) – como descrito no item (4.8). Atividade antimicrobiana do SLC foi de entre 13.0 -15.9 mm de halos de inibição. Quando tratadas com as proteases supracitadas, o efeito bactericida foi interrompido, confirmando a natureza proteica do composto antimicrobiano produzido pelo *P. pentosaceus* ET34 em MRS.

5.2. Consumo de açúcares pela linhagem *P. pentosaceus* ET34

Para verificar que tipo de carboidrato a linhagem *P. pentosaceus* ET34 é capaz de consumir, foi realizado seu cultivo em meio mínimo na presença de 0,5% de diferentes açúcares. A avaliação dos resultados foi realizada pelo crescimento celular da linhagem citada em diferentes fontes de carbono (Item 4.3). Células de *P. pentosaceus* ET34 crescidas em meio mínimo sem adição de fonte de carbono, após 24 horas de cultivo a 37 °C, sem agitação, apresentaram D.O._{600nm} de 0,249 – o que representa, de acordo com a curva padrão, o equivalente a 34,9 mg/L. Quando os valores de absorvância a 600nm foram maiores do que 0,249, na presença de um determinado açúcar, foi considerado que as células de *P. pentosaceus* ET34 são capazes de consumir o açúcar que foi acrescentado ao cultivo. Conforme mostrado na Tabela 6, os resultados demonstraram que *P. pentosaseus* ET34 é capaz de consumir frutose, ribose, ramnose, glicose, maltose, arabinose e galactose, ao passo que xilose, rafinose, glicerol e sacarose não foram utilizadas como fonte de carbono por esta cepa nestas condições. No caso da lactose, houve pequeno crescimento

(~32 %) se comparado com as células crescidas sem fonte de carbono, o que sugere que células de *P. pentosaceus* ET 34 consomem este açúcar de forma bastante lenta nestas condições. Para verificação dos valores de massa seca de ET 34 após 24 h, foi utilizado o gráfico da curva de crescimento correlacionando a absorbância a 600 nm e a massa seca da *P. pentosaceus* ET34 (figura 3), como apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das leituras do crescimento de *P. pentosaceus* ET34 perante o consumo de diferentes açúcares. Leitura em 600nm de absorbância.

Fonte de Carbono		Valor de Biomassa	
		DO 600nm	mg/L
1	Xilose	0,262	36,7
2	Frutose	1,487	208,5
3	Ribose	1,770	248,2
4	Lactose	0,329	46,1
5	Raminose	1,328	186,2
6	Rafinose	0,249	34,9
7	Sacarose	0,286	40,1
8	Glicose	1,365	191,4
9	Maltose	1,754	245,9
10	Arabinose	1,609	225,6
11	Glicerol	0,340	47,7
12	Galactose	1,578	221
Controle sem açúcar		0,249	34,9

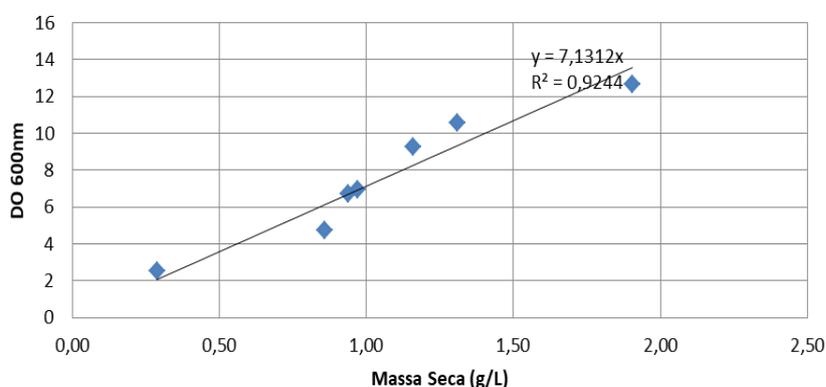


Figura 3: Curva padrão relação massa seca e absorbância.

5.3. Produção de BLIS utilizando diferentes tipos açúcares como substrato

Foram realizados testes de atividade antimicrobiana do SLC da linhagem *P. pentosaceus* ET34, com o objetivo de identificar a produção de substâncias semelhantes às bacteriocinas (BLIS) em diferentes açúcares.

Tabela 7: Resultado de atividade antimicrobiana do SLC de *P. pentosaceus* ET34 em diferentes açúcares.

Atividade antimicrobiana do SLC (UA/mL)		
1	Glicose (1)	16.362
2	Arabinose	19.483
3	Galactose	17.691
4	Rafinose	6.116
5	Frutose	16.983
6	Xilose	3.248
7	Maltose	18.740
8	Ribose	18.088
9	Lactose	4.241
10	Glicose (2)	17.860
11	Sacarose	3.604
12	Raminose	9.955

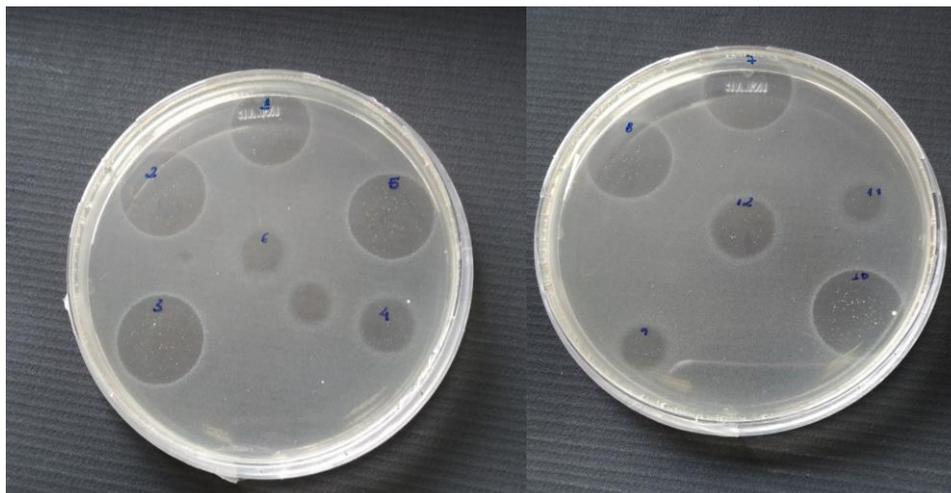


Figura 4: Atividade antimicrobiana do BLIS de *P. pentosaceus* ET34 por *spot-on-lawn* frente à *Listeria innocua* CLIST 2711 acrescido em diferentes açúcares. Legenda: Glicose¹ (1), Arabinose (2), Galactose (3), Rafinose (4), Frutose (5), Xilose (6), Maltose (7), Ribose (8), Lactose (9), Glicose² (10), Sacarose (11), Raminose (12).

Como observado na Tabela 7 e na Figura 4, a produção de BLIS é dependente da fonte de carbono utilizada. Ao utilizar os açúcares arabinose (19.483 UA/mL), maltose (18.740 UA/mL), ribose (18.088 UA/mL), galactose (17.691 UA/mL), glicose (17.111 UA/mL) e frutose (16.983 UA/mL), estes promoveram efeito antibacteriano expressivamente maior do que raminose (9.955 UA/mL), rafinose (6.116 UA/mL) e lactose (4.241 UA/mL).

Como *P. pentosaceus* não consome xilose e nem sacarose, o efeito antimicrobiano gerado foi semelhante ao obtido com apenas o meio de cultivo LAPTg sem fonte de carbono (dado não mostrado).

5.4. Crescimento de *P. pentosaceus* ET34 utilizando hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono

Inicialmente, verificou-se a viabilidade de crescimento de *P. pentosaceus* ET 34 utilizando HBC como fonte de carbono a diferentes diluições em meio LAPTg, à temperatura de 37°C, com o pH do meio ajustado para 5,0 a 7,0 com HCl 1.0 N e/ou NaOH 1.0. É possível observar, conforme a Tabela 8, que a máxima concentração celular de até $1,0 \times 10^9$ UFC/mL foi obtida em meio de cultivo contendo 20% (v/v)

deste resíduo em meio LAPTg. Por outro lado, na percentagem de 50% (v/v), a concentração celular (2×10^6 UFC/mL) foi nada menos que 94% menor do que no controle sem a adição da fonte de carbono, enquanto em todas as outras diluições foi maior – o que indica que, numa percentagem tão alta de hidrolisado, a presença de possíveis inibidores poderia ter fortemente inibido o crescimento celular de *P. pentosaceus* ET34.

Com efeito, o HBC, além de glicose, xilose, arabinose e xilo-oligossacarídeos (Tabelas 10 e 11), que são fontes de carbono facilmente utilizadas por bactérias ácido-láticas (Jain et al., 2014), contém também furfural e hidroximetilfurfural, que podem ter sido responsáveis pela inibição do crescimento acima mencionada na percentagem de 50% (v/v). Como relatado por Zhang *et al.* (2012), tais aldeídos podem, de fato, agir na parede e na membrana celular prejudicando atividades enzimáticas importantes e até mesmo a síntese de RNA de certos gêneros de microorganismos. Resumindo, estes ensaios demonstraram que *P. pentosaceus* ET34 foi capaz de crescer utilizando HBC como fonte de carbono no intervalo de 5 a 40% (v/v).

Resultados preliminares indicaram que células de *P. pentosaceus* ET34 foram capazes de consumir xilo-oligossacarídeos (dados não mostrados). Neste ensaio, células de ET34 crescidas apenas com LAPTg – ou utilizando este mesmo meio com suplementação de 10% de bagaço hidrolisado – tiveram seus açúcares totais analisados. Na Tabela 9, observa-se que houve hidrólise de aproximadamente 5,8% das arabinoxilanas, aumento do grupo acetila e de xilose o que comprova a hidrólise dos xilo-oligossacarídeos presentes no meio. Também houve o consumo de aproximadamente 62,75% das glicanas, indicado não apenas pela diminuição deste elemento como também pelo decréscimo de glicose e celobiose no meio. Apesar de ser necessário repetir estes ensaios, pela primeira vez se comprova a capacidade de células de *Pediococcus pentosaceus* consumirem XOS – o que abre caminho para futuros estudos de simbióticos (combinação de prebióticos e probióticos).

Tabela 8: Concentração celular de *P. pentosaceus* ET34 cultivado em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar diluído em meio LAPTg como fonte de carbono por 24 h a 37 °C.

Percentagem de HBC (% v/v)	0	5	10	20	30	40	50
Concentração celular (UFC/mL)	$3,3 \times 10^7$	$4,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,05 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$

Tabela 9: Dados preliminares* dos metabolitos produzidos a partir do consumo de 10 % HBC em LAPTg por *P. pentosaceus* ET34 por 24 h a 37 °C.

Componentes	Concentração (g/L)	
	Não Inoculado	Inoculado
Arabionse	0,26	0,06
Glicose	0,00	0,00
Xilose	2,44	2,59
Celobiose	0,00	0,00
Ácido Lático	0,20	1,57
Ácido fórmico	0,16	0,23
Ácido acético	0,31	0,50
Ácido levulínico	0,00	0,00
HMF	0,01	0,00
Furfural	0,00	0,00
Arabinosilanas	2,66	2,51
Glicana	1,07	0,40
Grupos acetilas	0,14	0,18

*Análise realizada na Planta Piloto de Desenvolvimento de Processos do LNBR - CNPEM.

Tabela 10: Concentração dos compostos presentes no hidrolisado de bagaço e cana-de-açúcar não concentrado*.

Identificação	Glicose g/L	Xilose g/L	Celobiose g/L	Arabinose g/L	ácido acético g/L	ácido fórmico g/L	HMF g/L	Furfural g/L	XOS g/L	Açúcar Livre g/L	Lignina Solúvel g/L	Diluição
Licor Hidrotérmico	0,60	4,99	0,00	0,70	1,60	0,16	0,19	1,09	0,78	6,29	2,80	200
Licor açúcar total	2,51	13,25	0,00	0,75	2,98	0,19	0,06	1,64	0,00	18,36		
Licor hidrotermico Destoxi	0,00	2,48	0,00	0,59	2,43	0,18	0,00	0,003	4,01	2,48	3,22	100
Licor açúcar total Destoxi	0,00	6,39	0,22	0,58	2,22	0,24	0,025	0,392	0,00	7,83	-	
Fator de conversão a polímero	0,9	0,88	0,947	0,88	0,717	-	1,286	1,375	-	-	-	-
Fator de conversão a sacarídeo	-	-	-	-	0,717	-	0,427	1,56	-	-	-	-

Tabela 11: Concentração dos compostos presentes no hidrolisado de bagaço e cana-de-açúcar concentrado (amostra utilizada)*.

Descrição	Arabinose (g/l)	Glicose (g/l)	Xilose (g/l)	Ácido Fórmico (g/l)	Ácido Acético (g/l)	HMF (g/l)	Furfural (g/l)	Ácido Levulínico (g/l)	Lignina Solúvel (g/l)
PPDP licor hidrotérmico concentrado (mono + oligo)	3,66	5,73	43,15	0,64	3,67	0,09	2,75	0,20	5,71
	3,65	5,70	43,02	0,64	3,68	0,09	2,75	0,20	5,61
Média	3,66	5,71	43,08	0,64	3,67	0,09	2,75	0,20	5,66
Desvio Padrão	0,01	0,02	0,09	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,08
PPDP licor hidrotérmico concentrado (mono)	2,08	1,89	25,40	0,11	2,20	0,10	0,00	0,00	9,04

*Análise realizada na Planta Piloto de Desenvolvimento de Processos do LNBR - CNPEM.

5.5. Produção de BLIS em diferentes concentrações de bagaço da cana-de-açúcar

Após delimitar a diluição do HBC para que não houvesse inibição no crescimento celular, foi realizado um delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} (Tabela 12), com o objetivo de observar quais as melhores condições de temperatura, concentração HBC, pH e agitação para obter a maior produção de BLIS. Observa-se que a maior atividade bactericida (12.550 UA/mL) foi obtida com 15% (v/v) de hidrolisado, a 35°C, pH 5 e 200 rpm.

Tabela 12: Resultados do planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{4-1} usado para a produção de substância antimicrobiana utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Ensaio	Concentração do hidrolisado (% v/v)	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)	Atividade antimicrobiana (UA/mL)
1	35	25	7	0	1.581
2	15	25	7	200	10.503
3	15	25	5	0	9.435
4	35	25	5	200	2.145
5	25	30	6	100	7.980
6	15	35	7	0	10.134
7	35	35	5	0	5.904
8	25	30	6	100	7.988
9	25	30	6	100	7.842
10	15	35	5	200	12.551
11	25	30	6	100	9.005

O Diagrama de Pareto (Figura 5) mostra que, apesar de a melhor condição ter ocorrido com agitação de 200 rpm, esta variável independente não foi estatisticamente significativa para a produção da substância bactericida, o que é comprovado por um p -valor $> 0,05$ ($p = 0,834$) no intervalo de confiança de 95%.

Pelo contrário, os p -valores das outras três variáveis o foram, sendo o p -valor 0,026 para o pH, 0,000 para a concentração do HBC e 0,024 para a temperatura. Pelo fato de o gênero *Pediococcus* ser anaeróbico facultativo, como a maioria das bactérias ácido-láticas, a agitação não teve influência direta no crescimento celular, assim como na produção de BLIS.

Alguns trabalhos indicam que a produção de BLIS ocorre na fase estacionária de crescimento, na qual ocorre depleção de oxigênio (Engelhardt et al., 2015; Porto et al., 2017), enquanto em muitos outros falam-se das bacteriocinas como produtos do metabolismo primário (Porto et al., 2017). Neste sentido, o presente estudo visa também contribuir para esclarecer esta questão controversa.

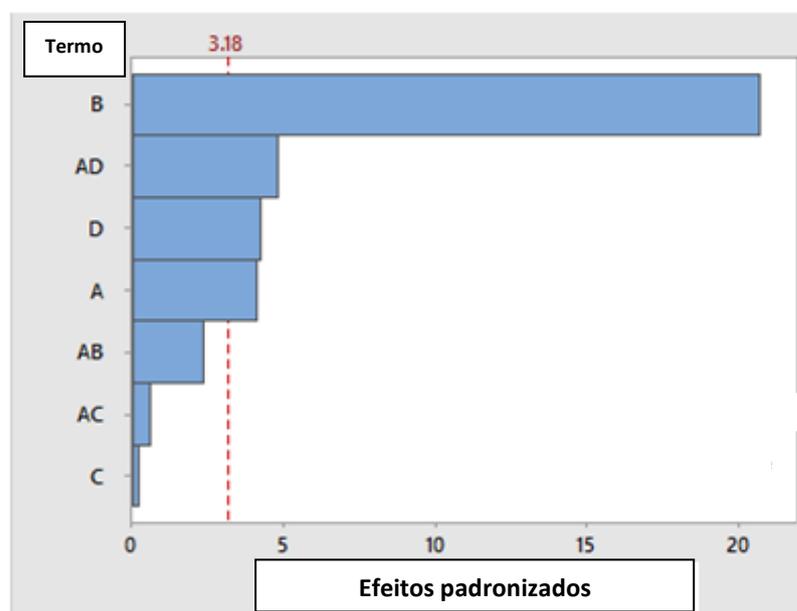


Figura 5: Diagrama de Pareto da atividade antimicrobiana em função das variáveis independentes pH, concentração de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, agitação e temperatura de acordo com o planejamento fatorial 2^{4-1} . Legendas: A = pH; B = porcentagem (%) de HBC; C = Agitação; D = Temperatura.

Com base nestes resultados, realizou-se um segundo planejamento experimental do tipo 2^3 combinado com a metodologia de superfície de resposta utilizando apenas as variáveis pH, temperatura de concentração do HBC – conforme a Tabela 4. Os resultados obtidos demonstraram que as condições dos ensaios realizados no ponto central (ensaios 15, 16 e 17) foram as melhores para a obtenção do BLIS, sendo as atividades antimicrobianas de 11.506, 12.944 e 14.416 UA/mL, respectivamente. No entanto, a produção de BLIS no ensaio 3 (12.435 UA/ml) foi

apenas 4% menor, mas com a vantagem de que, nessas condições, foi utilizada concentração de HBC (5%) igual apenas a um terço daquela do ponto central. A interação entre concentração do HBC e temperatura foi positiva e estatisticamente significativa, mostrando um *p*-valor (0,028) menor do que 0,05 (resultados não mostrados).

Na Tabela 13 e na Figura 6, observa-se que, ao diminuir a concentração de HBC até valores entre 5 e 10% (v/v), a atividade antimicrobiana foi expressiva (> 12.000 UA/mL) quando a temperatura de cultivo foi acima de 30 °C. Estudos realizados em biorreator de tanque agitado demonstraram que a adição de sacarose como fonte de carbono em valores de 9 ou 10 g/L resultou em diminuição da produção de BLIS (Papagianni e Papamichael, 2014), demonstrando que o excesso de certas fontes de carbono pode resultar em diminuição da produção de BLIS. Assim, para a realização de ensaios em biorreator, foram selecionados valores abaixo de 25% de HBC, para compor o meio de cultivo, dado que a produção mais expressiva de BLIS foi obtida nestas condições (Tabela 13).

Tabela 13: Resultado da atividade bactericida em UA/mL realizada a partir do planejamento experimental do tipo 2³ combinado com a metodologia de superfície de resposta para avaliar as melhores condições para a produção do BLIS em hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar.

Ensaio	Bagaço %	Temperatura °C	pH	Atividade UA/mL
1	5	25	5,5	9.384,5
2	25	25	5,5	1.2482
3	5	35	5,5	12.434,65
4	25	35	5,5	11.735,12
5	5	25	6,5	5.533,52
6	25	25	6,5	12.121,25
7	5	35	6,5	11.950,58
8	25	35	6,5	12.640,5
9	-1,33	30	6	10.238,81
10	31,33	30	6	10.512,5
11	15	21,835	6	6.962
12	15	38,165	6	8.580,5
13	15	30	5,1835	8.778,125
14	15	30	6,8165	9.193,68
15	15	30	6	11.506,45
16	15	30	6	12.944,41
17	15	30	6	14.416,02

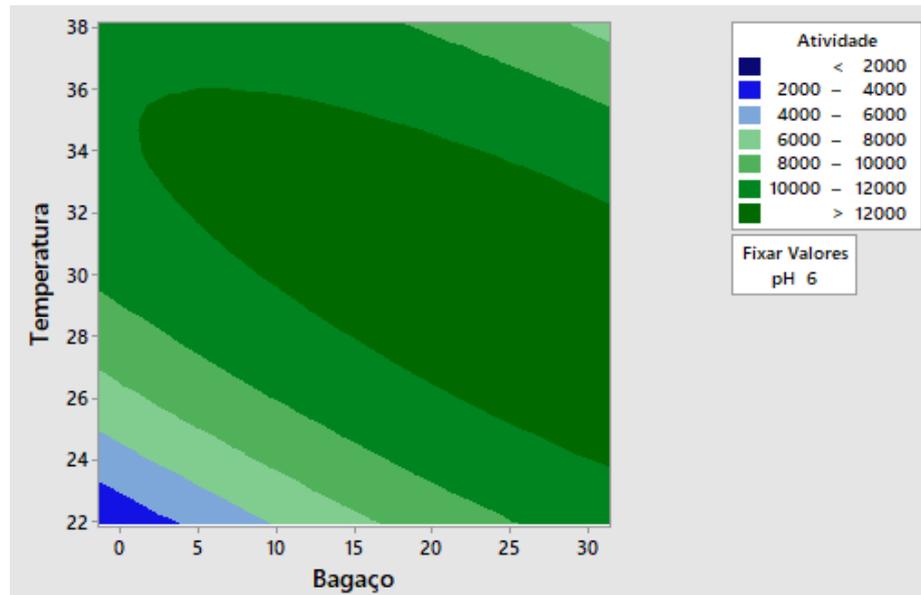


Figura 6: Análise de superfície de resposta com 2 variáveis – temperatura (°C) e concentração do HBC (% v/v) – utilizando os resultados da atividade antimicrobiana obtidos a pH 6,0 de acordo com o planejamento fatorial 2^3 .

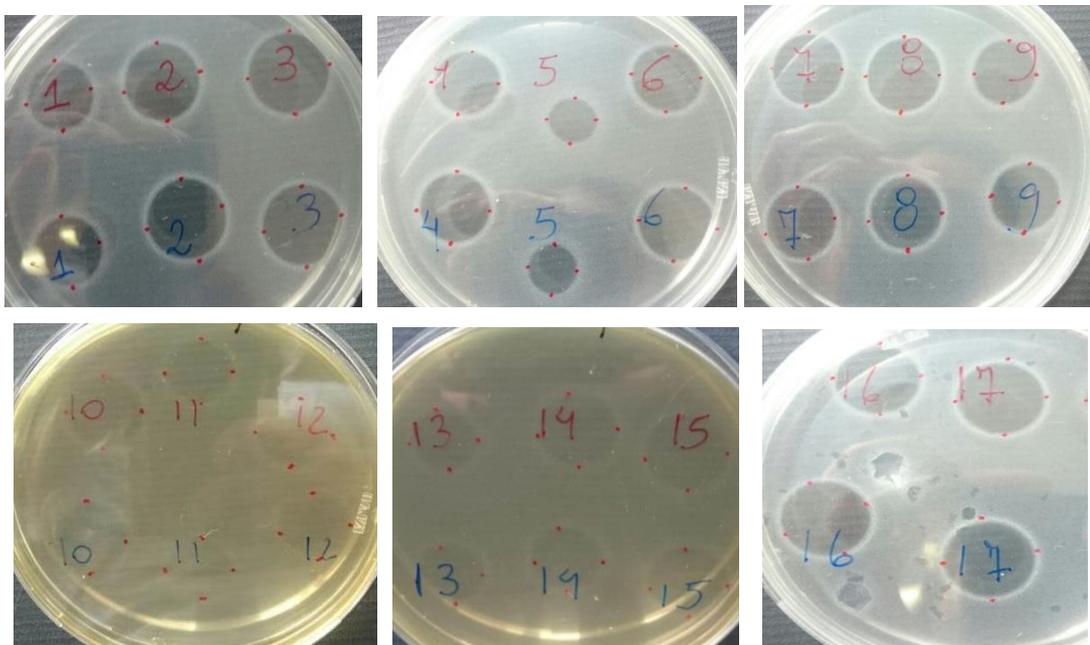


Figura 7: Halos da atividade do BLIS produzidas determinada por *spot-on-lawn* frente à *Listeria innocua* CLIST 2711 para cada condição do planejamento experimental do tipo 2^3 combinado com a metodologia de superfície de resposta.

Apesar de a variação de concentração do HBC ter demonstrado influência sobre a produção de BLIS, o crescimento de *P. pentosaceus* ocorreu em uma faixa

de temperatura ótima de crescimento entre 28 e 35 C° e de pH ótimo entre 5 e 8, confirmando o observado na literatura (Porto et al., 2017; Papagianni e Anastasiadou, 2009). Isso deve ser levado em consideração em futuros esforços para a produção de BLIS, principalmente ao escalonar o processo a nível industrial, a fim de prover um processo economicamente viável e iterativo.

5.6. Obtenção de BLIS por *P. pentosaceus* ET34 utilizando HBC em biorreator de bancada

O crescimento de *P. pentosaceus* ET34 e a produção de BLIS na presença de HBC em diferentes proporções volumétricas em relação ao meio LAPTg (0-25%) também foram investigados em biorreator de bancada, operado em processo descontínuo, em condições anaeróbicas por 24 h.

Como controle, foi realizada uma fermentação utilizando apenas o meio de cultivo LAPTg, acrescido de 10% (v/v) de inóculo. As sucessivas fermentações foram conduzidas utilizando 5, 10, 15 e 25% (v/v) de HBC.

O meio fermentado obtido nesta última condição (25%) não levou à formação de halos de inibição quando testado frente às cepas bioindicadoras. Provavelmente, devido ao fato de o HBC ser composto por um líquido bastante viscoso, que apresenta pequenos sedimentos residuais e que, nesta concentração, deve ter inibido o crescimento de *P. pentosaceus* ET34, assim como a sua própria produção de BLIS (Figura 8), além do fato do volume dos compostos presentes no HBC, como compostos fenólicos, o furfural e o HMF, que conferem toxicidade a micro-organismos (Arruda et al., 2008).



Figura 8: Imagem do processo em biorreator utilizando 25% de HBC mostrando o acúmulo de resíduos nas pás e na parede do biorreator.

Quanto às demais condições avaliadas, foi observado o máximo crescimento celular e também a maior produção de BLIS após a 10^a hora de cultivo. As concentrações de 5 e 15% (v/v) mostraram resultados semelhantes quanto ao crescimento de *P. pentosaceus* ET34 (média $6,0 \times 10^6$ UFC), enquanto o crescimento utilizando 10% de concentração de HBC (v/v) apresentou o melhor crescimento, com valor máximo de $3,0 \times 10^7$ UFC. Como pode ser observado na Figura 9, células de *P. pentosaceus* ET34 apresentaram um perfil de crescimento semelhante às células de *P. pentosaceus* ATCC43200 conforme descrito por Porto, 2017, passando da fase log para estacionária a partir de 8-10 horas de crescimento.

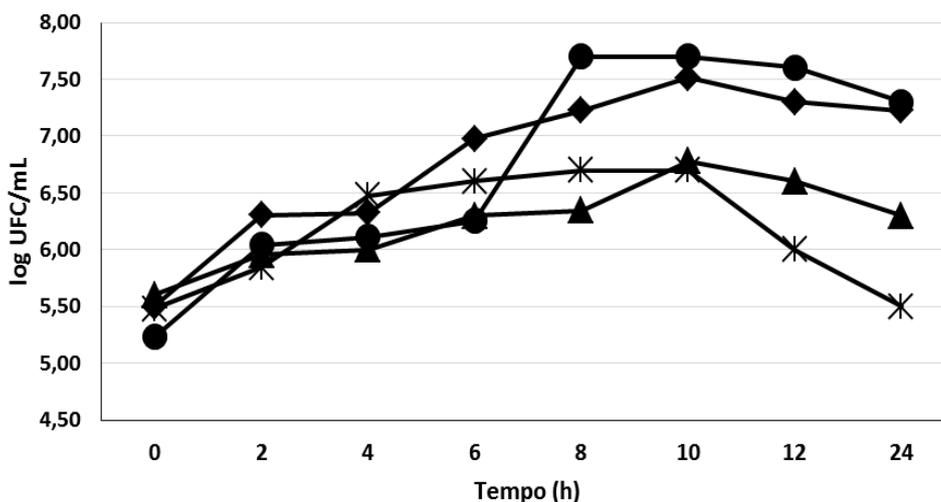


Figura 9: Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de HBC em biorreator.

Legendas: ● Controle LAPTg sem adição de HBC (0%); * HBC na concentração de 5%; ◆ HBC na concentração de 10%; ▲ HBC na concentração de 15%.

Para verificar a atividade antimicrobiana produzida pelas células ET34 crescidas em biorreator, foi realizada uma purificação parcial do BLIS utilizando precipitação por sulfato de amônio, como previamente descrito no item 4.10. De forma bastante interessante, a atividade obtida frente à linhagem *Listeria monocytogenes* ATCC 934 foi maior na condição de 5-10% de HBC após 10 horas de cultivo (35.721 e 32.761 UA/mL respectivamente) (Figura 10). Por outro lado, ao utilizar *Salmonella enterica* CECT 724 como linhagem bioindicadora a maior zona de inibição foi detectada pela amostra produzida com 15% de HBC (31.117 UA/mL) (Figura 11).

Esta diferença de atividade antimicrobiana pode ser devido à produção de mais de BLIS por *Pediococcus pentosaceus* ET34. A linhagem *P. pentosaceus* LI05 teve seu genoma sequenciado, sendo revelado que, além da pediocina, esta cepa possui gene que codifica a bacteriocina colicina V (Lv et al., 2014). Assim, esta diferença de atividade observada entre as linhagens bioindicadoras pode ser devido à presença de mais de uma bacteriocina produzida por esta linhagem e que, dependendo da concentração de HBC 5-10% ou 15%, células de ET34 podem produzir preferencialmente um tipo de BLIS. Vale ressaltar que, ao tratar estas amostras com proteases, a atividade antimicrobiana frente à CECT 724 e à ATCC 934 foi interrompida, garantindo assim a natureza proteica do produto testado.

Para as análises estatísticas, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o *software* Statistica, versão 10 (TIBICO Software

Inc., USA). Os resultados foram comparados usando-se o método de Turkey, considerando-se a diferença significativa de p -valor $< 0,05$.

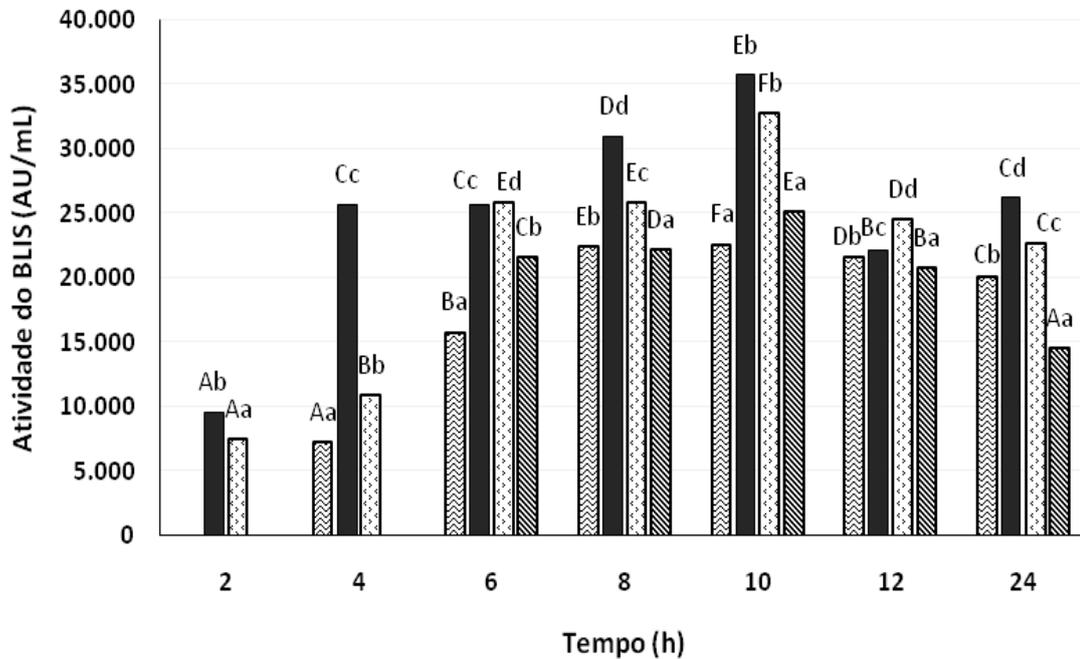


Figura 10: Quantificação da atividade antimicrobiana de BLIS (UA/mL) frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 934 proveniente dos cultivos realizados em biorreator utilizando diferentes meios de cultivo seguido de uma purificação parcial por sulfato de amônio. As letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas correlacionando o meio de cultivo nos diferentes tempos pré-determinados. As letras minúsculas comparam os meios de cultivo estudados dentro do mesmo intervalo de tempo. Legendas:  Controle LAPTg sem adição de HBC (0%);  HBC na concentração de 5%;  HBC na concentração de 10%;  HBC na concentração de 15%.

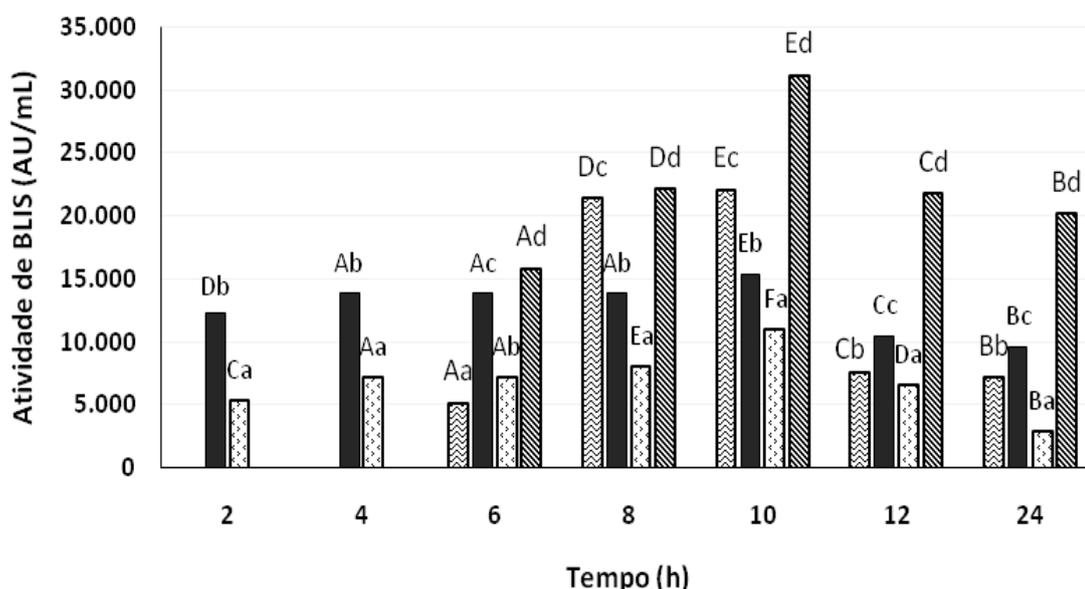


Figura 11: Quantificação da atividade antimicrobiana de BLIS (UA/mL) frente à *Salmonella enterica* CECT 724 proveniente dos cultivos realizados em biorreator utilizando diferentes meios de cultivo seguido de uma purificação parcial por sulfato de amônio. As letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas correlacionando o meio de cultivo nos diferentes tempos pré-determinados. As letras minúsculas comparam os meios de cultivo estudados dentro do mesmo intervalo de tempo. Legendas: [Controle LAPTg sem adição de HBC (0%); [HBC na concentração de 5%; [HBC na concentração de 10%; [HBC na concentração de 15%.

Sabe-se que o crescimento bacteriano, assim como a formação de produtos metabólicos, está diretamente ligados aos componentes presentes no meio. O aumento ou a diminuição de nutrientes pode inibir ou estimular fenômenos de regulação celular, permitindo assim que apenas ocorra a expressão ou repressão de genes (Souza, 2015).

Nos experimentos realizados em bancada, a concentração final de LAPTg foi sempre a mesma (1x), independentemente da porcentagem de hidrolisado de bagaço adicionado. Nos cultivos realizados em biorreator, entretanto, ao utilizar a condição de 15% (v/v) de HBC, foi adicionado 85% (v/v) de meio LAPTg, enquanto a de 5% (v/v) de HBC teve concentração final de 95% (v/v) de LAPTg. Desde modo, suplementar o meio com maiores concentrações de HBC resultou em menor fornecimento de fonte nitrogênio, uma vez que este LAPTg é rico em extrato de levedura, triptona e peptona. Isso pode ter influenciado de alguma forma a produção do BLIS nas primeiras horas do processo, ao contrário do ocorrido em concentrações mais baixas, e também deve ter afetado a conformação dos

aminoácidos, fazendo com que sua ação tenha sido melhor contra a bactéria Gram-negativa. Algumas BAL não possuem sistema proteolítico eficaz, o que leva à necessidade de suplementação para as sínteses de peptídeos e proteínas (Ummadi e Curic-Bawden, 2010; Pleissner e Venus, 2016; Sabo et al., 2018). Meios suplementados com fontes de nitrogênio demonstraram colaborar para o crescimento celular e, conseqüentemente, melhoraram a produção do BLIS, independentemente da condição da fermentação ter sido sob anaerofilia ou microanaerofilia, com ou sem agitação (Azevedo et al., 2018).

Sendo assim, a *P. pentosaceus* ET34, ao ser submetida a diferentes condições de fornecimento de fontes de carbono e nitrogênio presentes no HBC, pode ter produzido peptídeos antimicrobianos distintos para cada processo fermentativo.

Novos estudos devem ser realizados para otimizar o processo de obtenção do BLIS utilizando HBC, levando-se em consideração as necessidades de acréscimo de volumes maiores de fontes de nitrogênio, conforme a condição que será submetido quanto à concentração de HBC e à cinética de produção aprofundada, incluindo diferentes valores de pH e a possibilidade de um bioprocessamento sob microaerofilia.

5.7. Ação de enzimas, EDTA e detergentes sobre a substância bactericida

Para comprovação da natureza proteica do composto antimicrobiano, nas amostras da solução livre de células (SLC), foram acrescentadas soluções de tripsina, pepsina ou papaína na concentração de 1.0 mg/mL. Após este tratamento, não houve formação de uma zona de inibição, o que demonstrou a natureza proteica do composto antimicrobiano (Figura 12).

Para verificar a estabilidade da substância antimicrobiana, as amostras foram incubadas por 1 hora, a 30 °C, com diferentes sais ou detergentes em concentrações de 1,0% (m/v) ou 1% (v/v), respectivamente, usando SLC diluído, na mesma proporção, em água destilada – como controle. Após este período, foi realizado o teste antimicrobiano, utilizando a linhagem *Listeria innocua* CLIST 2711, acrescentando-se 10 µl de cada diluição pela técnica *spot-on-lawn*. É possível observar, na Figura 13, as ações individuais do BLIS e de cada sal ou detergente,

bem como a ação combinada do BLIS contido no SLC e do mesmo sal ou detergente sobre o crescimento do micro-organismo bioindicador.

A adição de Tween 80 à SLC levou ao aumento de cerca de 30% no diâmetro do halo de inibição comparado à SLC usada individualmente, podendo ser o resultado de um efeito sinérgico entre os dois compostos. Esse efeito sinérgico também foi observado para SDS, Tween 20, Triton 100x e NaCl em combinação com SLC. Com EDTA, apesar de já apresentar pequeno efeito antimicrobiano na concentração de 1,0% (v/v), o halo de inibição permaneceu praticamente o mesmo, sugerindo que a concentração usada poderia ter sido insuficiente para se detectar atividade antimicrobiana adicional. Além disso, o efeito do BLIS produzido por *P. pentosaceus* ET34 foi bastante reiterado na presença destes sais/detergentes, sendo o erro percentual entre placas em triplicata aceitavelmente baixo (inferior a 6%) (resultados não mostrados), assim como observado para outras substâncias inibitórias do tipo bacteriocina produzidas por outras BAL (Todorov et al., 2011).

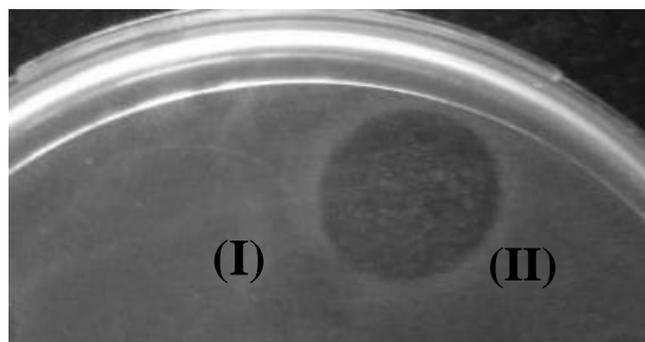


Figura 12: Efeito de 1.0% (m/v) tripsina na atividade antimicrobiana do BLIS de *P. pentosaceus* ET34 determinada por *spot-on-lawn* frente a *Listeria innocua* CLIST 2711. Legenda: (I) Solução livre de células contendo BLIS + tripsina. (II) Solução livre de células contendo BLIS.

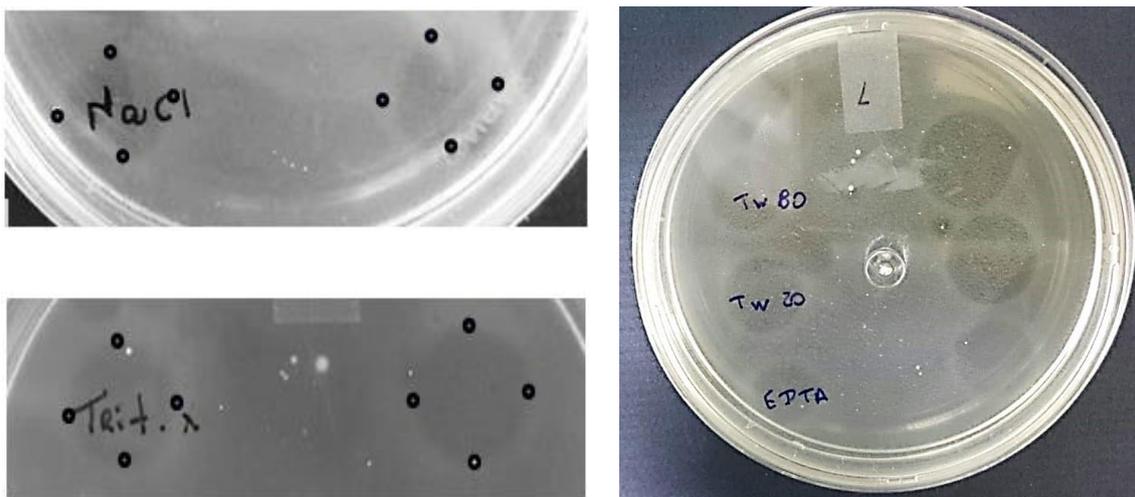


Figura 13: Efeito de sais, detergentes e EDTA na atividade do BLIS de *P. pentosaceus* ET34 determinada por *spot-on-lawn* frente à *Listeria innocua* CLIST 2711. Em todas as placas foram adicionadas: à direita apenas o BLIS, à esquerda o BLIS acrescentado às soluções e no centro apenas a solução que estava sendo testada.

5.8. Concentração/purificação parcial do BLIS

O BLIS produzido por *P. pentosaceus* ET34 foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio. A atividade antimicrobiana da substância antimicrobiana parcialmente purificada foi determinada por *spot-on-lawn*, usando-se a cepa *Listeria innocua* CLIST 2711 como bioindicadora. Observou-se aumento expressivo no diâmetro do halo de inibição comparado ao SLC sem tratamento com este sal (Figura 14), que correspondeu ao incremento da atividade antimicrobiana de 12.944 para 14.593 UA/mL utilizando 40 % (m/v) do sulfato de amônio. Este efeito pode ter sido o resultado não só da precipitação e da concentração das proteínas e, portanto, também do BLIS, mas também da remoção de açúcares e lipídeos que ficaram solubilizados no sobrenadante.

O BLIS parcialmente purificado também apresentou atividade contra a *Listeria monocytogenes* ATCC 934 e contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella enterica* CECT 724.

Existem, na literatura, diversos protocolos já utilizados para a purificação de bacteriocinas, nos quais são utilizadas técnicas cromatográficas, como a HPLC, para a etapa final de purificação (Sabo et al., 2014), mas esta técnica pode ser muito

eficaz e garantir rendimento de até 20% (Younas et al., 2017) no caso de soluções de bacteriocinas já bastante puras. Em alternativa e/ou em combinação, o método de Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de duas fases aquosas (ATPMS) vem sendo desenvolvido para purificação destas moléculas, o que poderá levar não apenas à simplificação, mas também à eficácia do protocolo de purificação (Sabo et al., 2014; Jozala et al., 2012; Liu et al., 1996).

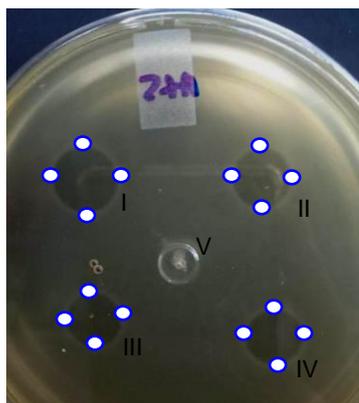


Figura 14: Precipitação do BLIS em diferentes concentrações de sulfato de amônio. Legenda: (I) resultado obtido com concentração de 40%; (II) resultado obtido com 60%; (III) resultado com 20 %; (IV) BLIS sem precipitação; e (V) sulfato de amônio não demonstrou ação quanto à inibição do crescimento da bactéria bioindicadora.

6. CONCLUSÕES

P. pentosaceus ET34 foi capaz de crescer utilizando fontes de carbono presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Para maximizar a produção do BLIS, foram realizados cultivos preliminares, de acordo com um planejamento fatorial 2^{4-1} , variando a concentração do hidrolisado de bagaço de cana entre 15 e 35%, a agitação entre 0 e 200 rpm, o pH entre 5 e 7 e a temperatura entre 25 e 40 °C. Neste experimento, foi verificado que a agitação não teve efeito significativo na atividade do BLIS. Também foi possível obter o BLIS com condição ótima de cultivo com a temperatura entre 25 e 35 °C e a concentração de bagaço 5-30 %, considerando o valor fixo de pH 6,0 para o início do bioprocessamento.

No estudo de superfície de resposta variando temperatura, pH e % de bagaço, observou-se que a interação bagaço e temperatura foi sinergicamente favorável em

vista ao seu p-valor ser $p < 0,05$ (p-valor = 0,028). Tanto a condição de bagaço hidrolisado a 5%, com temperatura de 35 °C, como altas concentrações de HBC (30%) e temperatura de 25 °C resultaram na produção da substância antibacteriana > 12.000 AU/mL contra *Listeria Innocua* CLIST 2711.

A utilização do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar no processo para a obtenção do BLIS mostrou-se promissora, direcionando-se para novos estudos que otimizem esse bioprocessamento, relacionando às melhores condições para o uso deste resíduo agroindustrial, atendendo à necessidade do micro-organismo envolvido, buscando-se uma forma ecológica e econômica de produção. Ensaio em biorreator permitiram observar a cinética de crescimento utilizando-se HBC entre 0 e 25% (v/v). A maior produção do BLIS ocorreu no tempo de 10 horas de cultivo, sendo que provavelmente houve a produção de mais de um BLIS por *P. pentosaceus* ET 34, uma vez que houve atividades diferenciadas entre as linhagens bioindicadoras *Listeria monocytogenes* ATCC 934 e *Salmonella enterica* CECT 724, ao utilizar o produto BLIS parcialmente purificado, produzidas em 5-10% de HBC ou 15% de HBC.

Ensaio realizados na presença de enzimas proteolíticas demonstraram que o BLIS presente no meio fermentado livre de células (SLC) tem natureza proteica. Além disso, o BLIS manteve sua atividade na presença de diferentes tipos de detergentes, como Tween 20, Tween 80 e Triton 100, e sais, tais como o cloreto de sódio, e mostrou até mesmo efeito sinérgico com o EDTA.

A concentração e a purificação parcial do BLIS com sulfato de amônio levaram ao aumento expressivo no diâmetro do halo de inibição frente à cepa bioindicadora *Listeria innocua* CLIST 2711 e ao incremento da atividade antimicrobiana de quase 13%. Os próximos esforços serão destinados à seleção de uma técnica de purificação parcial eficaz, baseada na Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares, que possibilite a posterior purificação completa do BLIS por HPLC.

A utilização do HBC como potencial substrato para a produção de BLIS não apenas apresenta uma nova perspectiva para a utilização deste rejeito agroindustrial de forma econômica, como também abre novos caminhos para estudos de meios de cultivos mais baratos e sustentáveis para obtenção de moléculas oriundas de fermentação utilizando a *P. pentosaceus* e outros micro-organismos. Também podemos destacar a possibilidade de diminuir os custos para a produção desta bacteriocina sendo assim um importante passo para tornar este produto viável

economicamente. Este composto antimicrobiano pode ser uma alternativa natural para a utilização como conservantes alimentares e, num futuro próximo, pode também ser utilizado em conjunto com outros fármacos para o tratamento contra à micro-organismos nocivos devido á sua eficaz ação bactericida.

7. REFERÊNCIAS

ANASTASIADOU, S. et al.. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 448-454, 2008.

ARRUDA, P. V. et al.. Efeito da Destoxificação do Hidrolisado de Bagaço de Cana sobre a Remoção de Fenóis, a Perda de Açúcares e a Bioconversão de Xilose em Xilitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166-182, 2008.

AZEVEDO, P. O. S.; MOLINARI, F.; OLIVEIRA, R. P. S.. Importance of the agar-media in the evaluation of bacteriocin activity against the same test-microorganisms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, 2018.

BALCIUNAS, E. M. et al.. Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Bifidobacterium lactis* using whey as a substrate. **International Journal of Dairy Technology**, v. 69, n. 2, p. 236-242, 2016.

BARTKIENE, E. et. al. The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoke pork sausages. **Food Control**, v.71, p. 285-292, 2017.

CAVERA, V. L. et al.. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 5, p. 494–501, 2015.

CALLEJÓN, S. et al.. Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. **PLoS One**, v. 12 (10), 2017.

CHEIKHYOUSSEF, A. et. al.. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. **Food Control**, v. 20, p. 553-559, 2008.

CINTAS, L. et al.. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 4, p. 281-305, (2001). Available at: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.917.4995&rep=rep1&type=pdf>>. Access in: feb 2018.

COLLINS, B.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P.. Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. In **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, eds. F. Mozzi, R.R. Raya, & G.M. Vignolo, p. 89-109. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, 2010.

Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_08_09_08_38_cana_de_zembro_novo.pdf> Ultimo acesso: 28/02/2018.

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D.. Current Perspectives on Antifungal Lactic Acid Bacteria as Natural Bio-Preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013.

DRIDER, D. et al.. The continuing story of class II bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

DÍEZ, L. et al.. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 167-172, 2012.

EMBRAPA. Agencia EMBRAPA de Informação Tecnológica. Available at: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/abertura.html>>. Access in: jan. 2018.

ENGELHARDT, T. et al.. Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB202 grown under pH and osmotic stress conditions. **Food Microbiology**, v. 48, p. 109-115, 2015.

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/. Último Acesso em dez. 2018.

FERRAZ, F. O.. Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol. 89 f.. **Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena**, São Paulo, 2010.

FINEP. Financiadora de Estudos e Projetos. Available at: <<http://www.finep.gov.br/a-finep-externo/aqui-tem-finep/bioetanol-etanol-de-2-geracao>>. Access in: jul. 2019.

FURLAN, A. D. F.. Produção de bioetanol de segunda geração pelo consórcio *Zymomonasmobilis* CCT4494 e *Candidatropicallis* em resíduos de uvas Isabel e Bordô. 92 f.. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas**, São Paulo, 2015. Availableat: <<http://hdl.handle.net/11449/127786>>.Access in: sep. 2018.

GARCIA, G. P. G. et. al.. Use of bacteria obtained from whey and its pontential use as probiotics in the food industry. A short rewiew. **Revista Boliviana de Química**, v.35, p. 40-45, 2018.

GARSA, A. K. et al.. Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Rocovery and Purification. *Probiotics & Antimicrobil Proteins*, v. 6, p. 47-58, 2014.

GHRAIRI T.; CHAFTAR N.; HANI K. (2012). Bacteriocins: recent advances and opportunities in **Progress in Food Preservation**, Chapter 23. eds Bhat R., Karim Alias A., Paliyath G., editors. Oxford: Wiley-Blackwell, 485–511.

GOES, T., MARRA, R., SILVA, G. S. E: Setor sucroalcooleiro no Brasil – Situação atual e perspectiva. **Revista Política Agrícola**, Brasília – DF. Ano XVII – Nº 2 –jun. 2008.

HENG, N. C. K.; WESCOMBE, P. A.; BURTON, J. B.; JACK, R. W.; TAGG, J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In M.A. Riley M.A. Chavan (Eds.), **Bacteriocins: Ecology and Evolution** (p. 45-83). Springer, New York, USA.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. (1982). **Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer**, 2^o ed. London: Chapman and Hall, p. 389-914.

JAIN, I.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T.. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, p. 131-142, 2015.

JEEVARATNAM, K.et al.. Biological preservation of foods – bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 446-454, 2005.

JIMENEZ, P. C. et al.. Lactic acid bacteria from fermented whey as a biocontrol tool against phytopathogenic microorganisms, **Fermentation Technology**, v. 3 (2), p. 82, 2015.

JOZALA, A. F. et al.. Aqueous two-phase micellar system for nisin extraction in the presence of electrolytes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 12, p. 3456-3461, 2012.

KARILUOTO, S. et al..Effects of yeast and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 137-143, 2006.

KÖNIG, H.; UNDEN, G.; FRÖHLICH, J.. (2017). Lactic acid bacteria, in **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**, Springer, p. 3- 41.

LEROY, F.; DE VUYST, L.. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LIU, C.L.; NIKAS, Y. J.; BLANKSCHTEIN, D.. Novel bioseparations using two-phase

aqueous micellar systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, n. 2, p. 185–192, 1996.

LV, L. X. et al.. Whole-genome sequence assembly of *Pediococcus pentosaceus* LI05 (CGMCC 7049) from the human gastrointestinal tract and comparative analysis with representative sequences from three food-borne strains. **Gut Pathogens**, v. 6:36, 2014.

MARTINEZ, F. A. C. et al.. Production of bacteriocin-like inhibitory substance by *Bifidobacterium lactis* in skim milk supplemented with additives. **Journal of Dairy Research**, v. 82, n. 3, p. 350–355, 2015.

MARTINEZ, F. A. C., et al.. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 482–488, 2013.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ- MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria, in: F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo (Ed.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, p. 3-33.

NADAL, T. De; VALLADARES, R. De; CÁRDENAS, B. De.. A culture medium for simultaneous counts of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in saliva. **Acta Odontol Latinoam**, v. 10, n. 1, p. 37-45, 1997.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F.. Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015. Available at: <<http://www.scielo.br/pdf/bjft/v18n4/1981-6723-bjft-18-4-267.pdf>>. Access in: feb. 2018.

PAPAGIANNI, M.; ANASTASIADOU S.. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. **Biomed Central: Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 3, p. 1-16, 2009.

PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL E. M.. Production of pediocin SM-1 by

Pediococcus pentosaceus Mees 1934 in fed-batch fermentation: Effects of sucrose concentration in a complex medium and process modeling. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2044-2048, 2014.

PATEL, S. A.; PARIKH S. C.. Production of lactic acid from whey by *Lactobacillus* sp. isolated from local dairy products, **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, p. 734-741, 2016.

PERIN, L. M., et al.. Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. **International Dairy Journal**, v. 25, p. 46-51, 2012.

PORTO, M. C. W.. Produção biotecnológica de peptídeos antimicrobianos e o crescimento de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação de povidona. 92 f.. **Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo 2016.

PORTO, M. C. W. et al. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 365-374, 2017.

PRIEST, F.G. (2006). Microbiology and microbiological control in the brewery. In Priest, F. G., Stewart, G.G. (Ed). **Handbook of Brewing**. Boca Raton: CRC Press, 607-627.

REBELATO, M. G. et al. Ponderação do Impacto Ambiental dos Resíduos e Subprodutos da Produção Industrial Sucreenergética. **Revista Gestão Industrial**, v. 9, n. 2, p. 92-415, jun. 2013.

ROSA, C. M.; FRANCO, B. D. G. M.. Bacteriocinas de Bactérias Láticas. **ConScientiae Saúde**, v.1, p. 9-15, 2002.

SABO, S. S. et al.. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. **Journal Dairy Sci.**, v. 102, p. 87-99, 2019.

SABO, S. S. et al.. Bacteriocin partitioning from a clarified fermentation broth of *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in aqueous two-phase systems with sodium sulfate and choline-based salts as additives. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 212-221, 2018.

SABO, S. S. et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SCHULZ D. et. al.. Bacteriocinas: Mecanismo de ação e uso na Conservação de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SILVA, V. S.; GARCIA, C. A.; SILVA, C. M.. O destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, p. 59-76, 2010.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S.. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2007.

SOUZA, G. M. S.. Biologia molecular – Ferramentas na biotecnologia farmacêutica industrial in: **Biotecnologia Farmacêutica – Aspectos sobre aplicação industrial**, capítulo 2. Ed Vitolo, M. São Paulo: Blucher, 2015

STEFANELLO, R. F.; FRIES, L. L. M.; COPETTI, M. V.. Natural conservation attached to the use of microorganisms. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 39, p. 42-28, 2018.

TANASUPAWAT, S.; DAENGSUBHA, W.. *Pediococcus* Species and Related Bacteria Found in Fermented Foods and Related Materials in Thailand. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 487-506, 1983.

TODOROV, S. D. et al.. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic

strain. **New Microbiologica**, v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011.

TOMÉ, E.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C.. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiology**. v. 121, p. 285–294, 2008.

VERA, E. C. S. et al.. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 168-178, 2018.

YOUNAS, S. et al. Isolation, purification and commercial operation of LAB bacteriocins. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 298-305, 2017.

Zhang, B., Tong, H., Dong, X.. *Pediococcus cellicola* sp., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2167-2170, 2005.

ZHANG, Y., HAN, B., EZEJI, T. C.. Biotransformation of furfural and 5 – hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. **New Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 345-351, 2012.

8. OUTRAS REALIZAÇÕES NO PERÍODO

- Participação da Comissão de Organização do III Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímica – Farmacêutica, realizado no período de 7 e 11 de agosto de 2017;
- Auxílio na execução dos experimentos e apresentação do pôster intitulado “Isolation and identification of lactic acid bacterium which produces bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) for fermentation in skim milk and soy milk” e participação no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, organizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) realizado no período de 22 a 25 de outubro de 2017 (ANEXO 1);
- Auxílio na execução dos experimentos e apresentação como co-autora do pôster intitulado “Production, partial purification and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Pediacoccus* spp.”, aceito para apresentação na forma de pôster no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, organizado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM) realizado no período de 22 a 25 de outubro de 2017 (ANEXO 2);
- Participação 2º Seminário Internacional de Bioprocessos, realizado em São Paulo no dia 15 de Agosto de 2018 (ANEXO 3);
- Apresentação do pôster intitulado “Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) from Milk Samples” aceito para participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia realizado no período de 22 a 31 de outubro de 2018 (ANEXO 4);
- Apresentação como co-autora do pôster intitulado “Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) Production by *Pediacoccus petosaceus* ET34 Using Hydrolyzed Sugar Cane Bagasse as Carbon Source” e participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia realizado no período de 22 a 31 de outubro de 2018 (ANEXO 5);
- Curso: Gerenciamento de Resíduos Químicos promovido pela Comissão Interna de Segurança Química e Biológica da faculdade de Ciências Farmacêuticas, realizado nos dias 6 e 7 de novembro de 2018;

- Conclusão de 37 dos 25 créditos exigidos quanto às disciplinas no mestrado.

ANEXOS 1: Participação no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia em 2017 com o pôster "Isolation and identification of lactic acid bacterium which produces bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) for fermentation in skim milk and soy milk".

AUTHORS: VIEIRA, V. B.¹, GIOSETTI, G.¹, SILVA, T. M. S. ¹, MENDES, M. A.¹, ARAÚJO, W. L.³, KUNIYOSHI, T.M.¹, OLIVEIRA, R. P. S.¹

INSTITUTIONS: 1-Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. (Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16 – Semi industrial, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brazil).

2- Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 21, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brazil).

3- Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508900, São Paulo-SP, Brazil).

ABSTRACT: Lactic-acid bacteria (LAB) are currently classified as part of the Gram-positive bacteria group which produce high added value bioproducts for the food industry through their fermentation process. The lactic acid is the largest metabolite produced by these bacteria even though other compounds, namely acetic acid, ethanol, aromas (diacetyl and ketone), polysaccharides, specific proteases or bacteriocins can also be produced. Bacteriocins are peptides described in the literature for their antimicrobial properties against certain bacteria, protozoan, fungi and viruses. In this work, bacteria were isolated from directly collected milk in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) and M17 agar. The isolate that showed an inhibition halo against *Listeria innocua* CLIST 2052 (FioCruz, Rio de Janeiro, Brazil) was selected for identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) and 16S rRNA gene sequencing. MALDI-TOFMS results revealed that the isolate belongs to the *Lactococcus* genus (Biotyper 3.1 score of 1.769). Furthermore, 16S rRNA gene sequencing showed 99% identity to *Lactococcus lactis*. The antimicrobial compound situated on the cell-free supernatant (CFS) treated with trypsin, papain or pepsin (1mg/ml) did not exhibit an inhibition zone, which demonstrates the composite's proteinaceous nature. The CFS was precipitated with 40% ammonium sulfate and had its antimicrobial activity improved, being analyzed in tricine-SDS-PAGE to better visualize the peptides. *L. lactis* cells (~106 CFU/mL) were cultivated in pasteurized 10% skim milk and soy milk at 37°C for 22 hours. The acidification activity of each sample was monitored by Cinac system (Ysebaert, Frépillon, France). Cells grown in soy milk showed Vmax (-103 pH units/min): 2.76 ± 0.1 and pH final: 4.69 ± 0.04 h whereas *L. lactis* cultivated in skim milk displayed Vmax(103 pH units/min): 1.44 ± 0.2 and pH final: 6.36 ± 0.021 h after 22 hours of fermentation. Nevertheless, bacterial counts were quite similar between the ones cultivated in skim milk (2.75×10^8 CFU/mL ± 0.83) and in soy milk (3.5×10^8 CFU/mL ± 1.1). These results indicate that despite the fact that the acidification profile between skim milk and soy milk were different, the final bacterial viability were quite similar. It could be explained due to the different compounds present on these matrix.

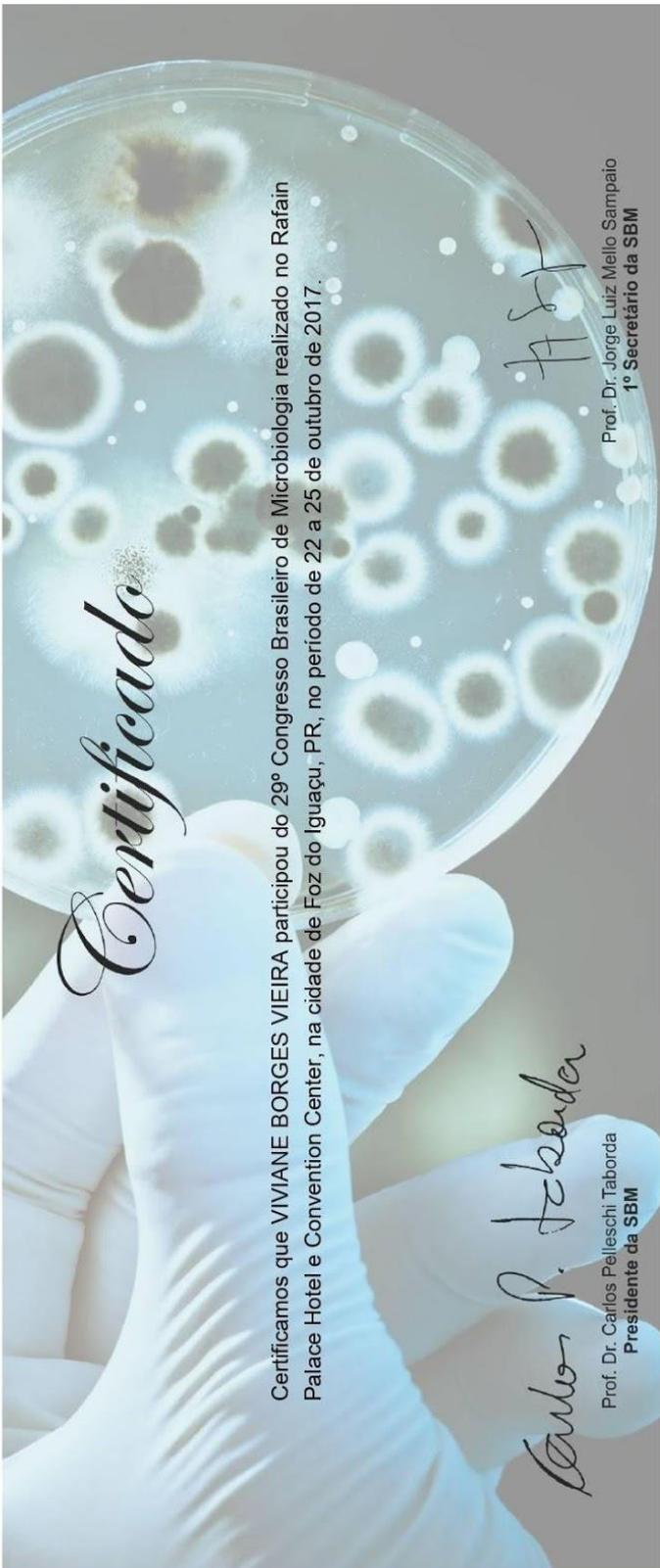
Keywords: Bacteriocin-like inhibitory substances, Latic-acid bacteria, Cinac, skim milk, soy milk Development.



29º Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu-Paraná-Brasil

"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"



Certificado

Certificamos que VIVIANE BORGES VIEIRA participou do 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Rafain Palace Hotel e Convention Center, na cidade de Foz do Iguaçu, PR, no período de 22 a 25 de outubro de 2017.

Carlos R. Taborada
Prof. Dr. Carlos Peleschi Taborada
Presidente da SBM

HSF
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1º Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:





29º Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil

"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIUM WHICH PRODUCES BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS) FOR FERMENTATION IN SKIM MILK AND SOY MILK com a autoria de: VIEIRA, V.B., GIOSETTI, G., SILVA, T.M.S., MENDES, M.A., ARAÚJO, W.L., KUNIYOSHI, T. M., OLIVEIRA, R.P.S. foi apresentado na forma de pôster durante o 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - CBM realizado no Rafain Palace Hotel e Convention Center, na cidade de Foz do Iguaçu, PR, no período de 22 a 25 de outubro de 2017.

Carlos R. Taborda

Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda
Presidente da SBM

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1º Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:



ANEXOS 2: Participação no 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia em 2017 com o pôster "Production, partial purification and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Pediococcus* spp".

AUTHORS: KUNIYOSHI, T. M., VIEIRA, V. B., OLIVEIRA, R. P. S.

INSTITUTION: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16 – Semi industrial, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brazil).

ABSTRACT: One of today's great challenges from the scientific area is the search of new compounds in order to substitute antibiotics. Bacteriocins are peptides produced by a number of bacteria that harbor bacteriostatic or bactericide effect over pathogenic and deleterious microorganism present in industrial processes. The ones produced by lactic acid bacteria (LAB) present an interest on industry as some of them are probiotic, therefore, acknowledged as safe on this field. A vast gamma of lineages from *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* genera are known for producing classes I and II bacteriocins. In this context, the aim of this work was to study the BLIS production from different lineages *Pediococcus* genus. This group is known for producing the class II bacteriocin named pediocin. The gene that codifies pediocin from these different lineages was sequenced and a global alignment was performed based on the pediocin sequences already deposited in the databank (GenBank). Upon the amino acid sequence analysis, it was possible to detect different aminoacid residues in comparison to the commercial pediocin PA-1, being included the 42nd conserved cysteine substitution with serine. The cell free supernatant (CFS) was obtained from each lineage of *Pediococcus* spp., partially purified with ammonium sulfate precipitation (40%) and purified in a SepPak C18 column and later analyzed in tricine-SDS-PAGE. The inhibition spectrum from the partially purified BLIS was determined using different Gram-Positive and Gram-Negative as bioindicator lineages. Besides, it was verified that BLIS lost its antimicrobial activity when treated with proteolytic enzymes (1mg/mL trypsin, papain or pepsin) but not when treated with α -amylase, lipase, Triton X-100, SDS, Tween 20, Tween 80, Urea, NaCl and EDTA indicating the proteinaceous nature of this compound. It was also evaluated the effect of different parameters (pH, temperature, agitation, sugar cane vinasse supplementation) on BLIS productivity using fractional factorial designs and rotational central composite design (RCCD).

Keywords: Bacteriocin-like inhibitory substances, *Pediococcus* spp., pediocin.

Agency: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.



29º Congresso Brasileiro de Microbiologia

De 22 a 25 de Outubro de 2017 / Foz do Iguaçu - Paraná - Brasil

"60 anos da Sociedade Brasileira de Microbiologia"

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado PRODUCTION, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS) PRODUCED BY PEDIOCOCCUS SPP. com a autoria de: KUNIYOSHI, T.M., VIEIRA, V.B., OLIVEIRA, R.P.S. foi apresentado na forma de pôster durante o 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Rafain Palace Hotel e Convention Center, na cidade de Foz do Iguaçu, PR, no período de 22 a 25 de outubro de 2017.

Carlos R. Taborada

Prof. Dr. Carlos Peileschi Taborada
Presidente da SBM

J. S. F.

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
1º Secretário da SBM

ORGANIZAÇÃO E REALIZAÇÃO:



APOIO:





ANEXOS 4: Participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia em 2018 com o pôster "Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) from Milk Samples".

AUTHORS: VIVIANE BORGES VIERA (M), TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI (PD), RICARDO PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA.

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology / FCF-USP

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Lactic-acid bacteria (LAB) are currently classified as part of the Gram-positive bacteria group which produce high added value bioproducts for the food industry through their fermentation process. The Bacteriocins are peptides described in the literature for their antimicrobial properties against certain microorganisms. The aim of this work was isolating LAB bacteriocin-producing from milk samples and propose a pre-purification technic.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria were isolated from the milk and planted directly on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) and agar M17. The isolate that showed zones of inhibition against *Listeria innocua* was selected for identification of MALDI-TOFMS and sequencing of the 16S rRNA gene. The cell-free supernatant (CFS) of the isolate was treated with proteolytic enzymes (1mg/ml), moreover pre-purified by precipitation with 40% ammonium sulfate (SA) and analyzed on SDS-PAGE tricine for visualization of peptides.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Results MALDI-TOFMS revealed that the isolate belongs to *Lactococcus* genus (Biotyper 3.1 - score of 1.769). In addition, sequencing of the 16S rRNA gene showed 99% identity with *Lactococcus lactis*. CFS treated with proteolytic enzymes did not exhibit a zone of inhibition demonstrating its protein nature. The one precipitated with SA generated a pronounced band about 2-5 kDa in tricine-SDS-PAGE which exhibit an effective antimicrobial activity against *Listeria innocua*. These results demonstrated that LAB producers of bacteriocin from the milk isolate were successfully obtained. Despite the fact that it is not possible to determine that bacteriocin corresponds to this antimicrobial substance produced by *Lactococcus lactis*, the compound has been shown to be a peptide.

Agency: CAPES; FAPESP.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



XXIII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
X Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas
XVIII Campanha de Diabetes

CERTIFICADO

Certificamos que **VIVIANE BORGES VIERA** apresentou o trabalho "ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA PRODUCING BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS) FROM MILK SAMPLES", de autoria de VIVIANE BORGES VIERA (M), TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI (PD), RICARDO PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA., em forma de pôster, durante a XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 22 a 31 de outubro de 2018.

São Paulo, 26 de outubro de 2018.

Prof. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
Presidente da Comissão de Avaliação de Pôsteres

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Presidente da Comissão Organizadora

ANEXOS 5: Participação no 23º Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia em 2018 com o pôster "Bacteriocin-Like Inhibitory Substances (BLIS) Production by *Pediococcus Pentosaceus* ET34 Using Hydrolyzed Sugar Cane Bagasse as Carbon Source".

AUTHORS: TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI (PD), VIVIANE BORGES VIERA (M), RICARDO PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology/FCF-USP

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

One of today's great challenges from the scientific area is the search of new compounds in order to substitute antibiotics. Bacteriocins are peptides produced by a number of bacteria that harbor bacteriostatic or bactericide effect over pathogenic and deleterious microorganism present in industrial processes. In this context, the aim of this work was to study the BLIS production by *Pediococcus pentosaceus* ET34 using hydrolyzed sugar cane bagasse as substrate.

MATERIAL AND METHODS

The gene that codifies pe diocin from ET34 was sequenced and a global alignment revealed 100% of identity with the commercial pediocin PA-1 sequence using ClustalW software. The inhibition spectrum from cell free supernatant of ET34 was determined using different bioindicator lineages through spot-on-lawn assay. Besides, it was verified that BLIS lost its antimicrobial activity when treated with proteolytic enzymes (1mg/mL of tripsin, papain or pepsin) indicating the proteinaceous nature of this compound.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Experimental data revealed that the factors which influenced the BLIS production are: hydrolyzed sugar cane bagasse concentration, temperature and pH. On the other hand, the agitation did not affect BLIS production by ET34 cells under conditions tested. In order to maximize BLIS production, cells should be cultivated with 15% sugar cane liquor at 35 °C and pH 7.0. In conclusion, it was obtained successfully BLIS production by *P. pentosaceus* ET34 using hydrolyzed sugar cane bagasse as carbon source.

Agency: FAPESP; CAPES.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



XXIII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica
X Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas
XVIII Campanha de Diabetes

CERTIFICADO

Certificamos que **TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI** apresentou o trabalho “BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES (BLIS) PRODUCTION BY PEDIOCOCCUS PETOSACEUS ET34 USING HYDROLYZED SUGAR CANE BAGASSE AS CARBON SOURCE”, de autoria de **TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI (PD), VIVIANE BORGES VIERA (M), RICARDO PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA**, em forma de pôster, durante a XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, realizada no período de 22 a 31 de outubro de 2018.

São Paulo, 26 de outubro de 2018.

Prof. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
Presidente da Comissão de Avaliação de Pôsteres

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Presidente da Comissão Organizadora

ANEXOS 6: Ficha do Aluno.

09/04/2019

Janus



Universidade de São Paulo
Brasil

Login

Aluno(a)
Viviane Borges Vieira
NUSP : 9030615
Sair

Apresentação

- Apresentação
- Vídeos tutoriais

+ Acesso público

+ Senha

+ Pessoa

+ Informações pessoais

- Aluno regular

- Ficha do aluno
- Bolsas
- Emissão de documentos
- Programa USP iFriends
- Validação de dados

+ PAE

+ Matrícula

+ Cartões USP

- Avisos
- Mapa do site
- E-mails automáticos
- Quem São

• Portal Alumni

NUSP: 9030615 Nome: Viviane Borges Vieira

Ficha do Aluno

Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
Especial	Tecnologia de Fermentações (9134)	1		
→ Mestrado	Tecnologia de Fermentações (9134)	2	Prorrogação	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 9030615/2 - Viviane Borges Vieira

Email: vieira.viviane@usp.br
Data de Nascimento: 26/11/1984
Cédula de Identidade: RG - 32.816.074-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 16/03/2017
Início da Contagem de Prazo: 16/03/2017
Data Limite para o Depósito: 15/04/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Atílio Converti - 16/03/2017 até 11/09/2018. Email: converti@unige.it
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - 12/09/2018 até o presente. Email: rsolive@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 16/03/2017
Prorrogação(ões): 30 dias
 Período de 16/03/2019 até 15/04/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 11/05/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 16/03/2017
 Prorrogação em 12/03/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Prorrogação em 12/03/2019

Impresso em: 09/04/2019 16:53:35

09/04/2019

Janus

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 9030615/2 - Viviane Borges Vieira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5729-7/1	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e à Medicamentos	22/05/2017	23/07/2017	90	6	100	A	N	Concluída
TNA5801-1/7	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	29/05/2017	09/07/2017	120	8	95	A	N	Concluída
FBF5805-2/4	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5787-2/1	Aplicação Biotecnológica de Bactérias Lácticas	18/01/2018	21/02/2018	45	3	100	A	N	Concluída
FBT5773-8/1	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	05/03/2018	15/05/2018	30	2	100	A	N	Concluída
FBT5715-7/4	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	15/05/2018	09/07/2018	120	8	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/7	Aprimoramento Pedagógico	02/10/2018	29/10/2018	60	4	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	37
Estágios:			
Total:	0	25	37

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 12/03/2019

Impresso em: 09/04/2019 16:53:35

Fale Conosco: pgfarma@usp.br | 2006-2011 - Pós-Graduação/USP | [Regimento da Pós-Graduação](#)

ANEXOS 7: Currículo *Lattes*.



Viviane Borges Vieira

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4377557196734358>
Última atualização do currículo em 27/03/2018

Possui graduação em Farmácia pelo Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas(2010), graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas(2006) e especialização em Gerenciamento de Projetos - Práticas do PMI pelo Centro Universitário Senac(2017). Atualmente é da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Biotecnologia. **(Texto gerado automaticamente pela aplicação CVLattes)**

Identificação

Nome	Viviane Borges Vieira
Nome em citações bibliográficas	VIEIRA, V. B.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017	Mestrado em andamento em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica (Conceito CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: .
2016 - 2017	Especialização em Gerenciamento de Projetos - Práticas do PMI. (Carga Horária: 360h). Centro Universitário Senac, SENAC/SP, Brasil. Título: CEEM- Centro de Excelência Esportiva Móvel - Simulação de Projeto Modelo PMI. Orientador: João Walter Saunders Pacheco e André Ricardi.
2007 - 2010	Graduação em Farmácia. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Brasil.
2003 - 2006	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Brasil. Título: Botulismo por Intoxicação Alimentar. Orientador: Pedro De Bellis.

Formação Complementar

2014 - 2014	FDA 21 CFR Part11 e Validação de Sistemas Computadorizados Seguindo as Dire. (Carga horária: 16h).
2013 - 2013	FIVE Validação de Sistemas Computadorizados, FIVE, Brasil. Método Lógico para Redação Científica. (Carga horária: 16h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2013 - 2013	Chromaster Ultra. (Carga horária: 5h). Merck Millipore, MERCK, Brasil.
2012 - 2012	Extensão universitária em Soros e Vacinas. (Carga horária: 30h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2012 - 2012	VI Curso Introdutório ao Programa de Aprimoramento Profissional. (Carga horária: 60h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2012 - 2012	IV Cursos de Políticas de Saúde e o SUS - Parte II. (Carga horária: 20h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2012 - 2012	VI Curso Introdutório da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção. (Carga horária: 80h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2012 - 2012	Manejo e Vias de Inoculação em Animais de Laboratório. (Carga horária: 3h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2012 - 2012	IV Cursos de Políticas de Saúde e o SUS - Parte I. (Carga horária: 20h). Instituto Butantan, IBU, Brasil.
2011 - 2011	Excel Avançada. (Carga horária: 40h). SENAI - Departamento Regional de São Paulo, SENAI/DR/SP, Brasil.

2011 - 2011	Controle Estatístico do Processo - Avançado. (Carga horária: 20h). SENAI - Departamento Regional de São Paulo, SENAI/DR/SP, Brasil.
2011 - 2011	Fundamentos de Controle Estatístico do Processo - CEP. (Carga horária: 20h). SENAI - Departamento Regional de São Paulo, SENAI/DR/SP, Brasil.
2010 - 2010	Planejamento, Programação e Controle da Produção - PPCP. (Carga horária: 12h). Gestori Consultoria Empresarial Ltda., GESTORI, Brasil.
2010 - 2010	Controle de Qualidade Aplicado a Insumos Farmacêuticos. (Carga horária: 20h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - SP (SP), SENAC, Brasil.
2008 - 2008	Formação de Auditores Internos da Qualidade ISO 9001:2000. (Carga horária: 8h). Horizonte Consultoria, HORIZONTE, Brasil.
2007 - 2007	Microbiologia Geral. (Carga horária: 60h). Portal Farmácia, PORTAL FARMÁCIA, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Instituto Butantan, IBU, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2013

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Programa de Aprimoramento Profissional - PAP, Carga horária: 40

Outras informações

Programa de Aprimoramento Profissional na área de Produtos Bacterianos na produção da Toxina Tetânica por meios fermentativos para posterior inativação e produção de soro antitetânico e vacina tetânica.

Fundação Butantan, FB*, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2015

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista da Qualidade ? Garantia da Qualidade, Carga horária: 40

Outras informações

Acompanhamento de processo produtivo para orientação as Boas Práticas de Fabricação. Gerenciamento de Controle de Mudanças. Gerenciamento de Desvios da qualidade e liberação de produtos. Colaboração em auditorias de órgãos nacionais e internacionais.

Vínculo institucional

2014 - 2015

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista Escritório de Projetos, Carga horária: 40

Outras informações

Colaboração nas rotinas gerais do setor, na organização, no arquivo e na preparação de documentos. Conhecimento da rotina de Escritório de Projetos, com base na metodologia PMI (PMBOK). Controle de Mudanças. Acompanhamento de reuniões. Ponto de apoio para assuntos internos

Vínculo institucional

2013 - 2014

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Tecnologista de Produção, Carga horária: 40
Participação no comitê de Controle de Mudanças. Controle de treinamentos e documentações destes, aplicáveis ao setor. Elaboração de procedimentos operacionais padrão e respectivos formulários. Controle de documentação de produção relativo ao processo de fermentação biotecnológica da bactéria Clostridium tetani posteriormente utilizada na vacina tetânica. Colaboração nas rotinas gerais do setor, na organização, no arquivo e na preparação de documentos.

Interteck Internacional Imp. Exp., INTERTECK, Brasil.

Vínculo institucional

2005 - 2010

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Aux. Laboratório, Carga horária: 40
Implementação do Sistema de Gestão da Qualidade. Auditorias internas. Padronização do processo de manuseio e embalagem de kits para diagnóstico "in vitro". Melhorias de processos no setor de logística. Desenvolvimento e atualizações de embalagens e instruções de uso dos produtos. Registro, renovações e revalidações de produtos perante ANVISA de produtos para diagnóstico "in vitro". Esclarecimentos de dúvidas ao cliente quanto ao produto e sua utilização, inclusive em inglês. Elaboração de cartas, relatórios e atas para direção, inclusive em inglês.

Delta Service Logistic Line Ltda, DELTA, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2012**Outras informações**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Responsável Técnica, Carga horária: 40
 Elaboração de manuais, procedimentos, instruções operacionais, conforme as Boas Práticas de Fabricação, Armazenamento e Distribuição. Auditorias da área operacional e administrativas quanto à organização e limpeza, bem como documentações pertinentes para o cumprimento das normas de Boas Práticas. Acompanhamento de auditorias / inspeções externas. Responsável pela armazenagem e processos de montagem de kits e expedição de produtos cosméticos e correlatos. Responsável pela organização de arquivo e preparação de documentos referentes ao setor de qualidade. Orientação sobre processos de qualidade para colaboradores.

Zambon Farmacêutica, ZAMBON, Brasil.

Vínculo institucional**2015 - 2017****Outras informações**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de Garantia da Qualidade, Carga horária: 40
 Elaboração de Relatórios Periódicos de Produtos. Gerenciamento de Desvios da qualidade e liberação de produtos. Elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão. Colaboração em auditorias de órgãos nacionais e internacionais.

Projetos de pesquisa**2017 - Atual**

Caracterização termodinâmica da bioprodução de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* em resíduos agroindustriais
 Descrição: Bacteriocinas são peptídeos produzidos por várias espécies de bactérias e apresentam propriedades antimicrobianas. Aquelas que são produzidas por bactérias lácticas têm um grande interesse pela indústria alimentícia e farmacêutica. Muitos fatores podem influenciar a produção das bacteriocinas como aeração, pH, temperatura e composição do meio de fermentação. Neste sentido, mediante o emprego de resíduos agroindustriais como substratos em cultivos fermentativos, busca-se um melhor aproveitamento desses resíduos, que são fontes altamente nutritivas e com grande capacidade de promover alto rendimento na produção de bacteriocina, diminuindo os custos de produção desta molécula antimicrobiana a nível industrial e atribuindo um melhor destino final a esses resíduos que podem ser prejudiciais ao meio ambiente se não descartados de forma correta. Assim, o presente projeto tem como objetivo principal o aproveitamento de resíduos agroindustriais (vinhaça de uva e bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado) como fontes renováveis para a produção biotecnológica de bacteriocina, empregando a cepa *Pediococcus pentosaceus* ET 34 e posterior avaliação de suas propriedades como aditivos. Desta forma, será avaliada a influência da vinhaça de uva e do bagaço da cana-de-açúcar hidrolisado na formulação de meios de cultivos alternativos e naturais assim, como também, avaliar, com auxílio de um planejamento fatorial fracionado a cinética e a influência de variáveis relevantes nos cultivos conduzidos em agitador rotativo. A bacteriocina de interesse (pediocina) será recuperada, isolada e o seu efeito antimicrobiano será avaliado frente a cepas de bactérias indicadoras tais como: *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Carnobacterium maltaromaticum* CECT 4020, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Listeria innocua* CLIST 2052, *L. innocua* CLIST 2861, *L. innocua* CLIST 2871, *L. innocua* CLIST 2860, *L. innocua* CLIST 2873, *L. innocua* CLIST 2711, *L. innocua* CLIST 2865, *L. innocua* CLIST 2864, *L. innocua* CLIST 2193, *L. innocua* CLIST 2863 e *Staphylococcus aureus* CECT 239. Por fim, será realizado um estudo termodinâmico sobre a produção e a termoestabilidade da bacteriocina, que se espera fornecer úteis indicações para seu potencial emprego industrial..
 Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
 Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Viviane Borges Vieira - Coordenador / Attilio Converti - Integrante / Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - Integrante.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biotecnologia.

Idiomas**Inglês**

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. **VIEIRA, V. B.**. Registro de Produtos para Saúde. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Isolation and identification of lactic acid bacterium which produces bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) for fermentation in skim milk and soy milk. 2017. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **VIEIRA, V. B.**. III Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. 2017. (Outro).

Inovação

Projetos de pesquisa

Outras informações relevantes

Trabalho Voluntário Jeffreys Bay, Africa do Sul ? de 12/outubro a 09/novembro de 2014. Teach Kids on the Beach (You to Africa ?Y2A) Auxilio a professoras/cuidadoras, em projeto de ?Day Care?, com crianças carentes entre as idades de 4 meses a 5 anos, com café da manhã e almoço- ajuda a alimentá-los ou cozinhar -, limpeza dos utensilios, programa geral de higiene - lavar as mãos e escovar os dentes ? músicas e dança, auxiliar na rotina de aprendizado. Obs: As crianças não falavam inglês, apenas Afrikaans ou Xhosa. O inglês era praticado com as professoras/cuidadoras do projeto, outros voluntários e com os cidadãos do local.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/03/2018 às 22:14:28