UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de ciências farmacêuticas

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia em Fermentações

Produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o crescimento de
Pediococcus pentosaceus ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação
de polidextrose

Maria Carolina Wanderley Porto

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Tit. Michele Vitolo

São Paulo

2016

Maria Carolina Wanderley Porto

Produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o crescimento de
Pediococcus pentosaceus ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação
de polidextrose

Versão Original

Dissertação destinada ao programa de pós-graduação da faculdade de ciências farmacêuticas (FCF-USP) para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Tecnologia de Fermentações

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Tit. Michele Vitolo

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Porto, Maria Carolina Wanderley
P853p Produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o
crescimento de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 em meio
de cultivo com suplementação de polidextrose / Maria Carolina
Wanderley Porto. -- São Paulo, 2016.
77p.

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

1. Tecnologia da fermentação 2. Probióticos 3. Fermentação
I. T. II. Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza, orientador. III.
Vitolo, Michele, co-orientador.

660.28449 CDD

Maria Carolina Wanderley Porto

Produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o crescimento de
Pediococcus pentosaceus ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação
de polidextrose

Comissão julgadora da dissertação para a obtenção do título de mestre

Orientador: Prof.Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

São Paulo, __, de _____ de 2016.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim
terás o que colher.”

Cora Coralina.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter me abandonado e sempre ter suprido todas as minhas necessidades emocionais com a sua bondade e misericórdia.

Aos meus pais, Irleoni Porto e Maria Aparecida W. Porto, por toda estrutura que me deram e dedicação que destinaram á mim, a minha educação e a minha formação.

À minha sobrinha Heloisa Porto que vêm me tornando um ser humano melhor e mais feliz

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira por ter me dado a oportunidade de aprender a trabalhar e ter me orientado com muita responsabilidade. Muito obrigada por todos conselhos e críticas que me fizeram avaliar a minha maneira de agir.

Ao meu co-orientador Prof.Dr. Michele Vitolo por ter me ensinado de maneira paciente e ter me incentivado nos momentos decisivos. Muito obrigada por ter sido tão paciente e presente.

Às minhas colegas de trabalho Sabrina Sabo, Pamela O. S. de Azevedo, Anna Carolina Meireles, Taís kuniyoshi por todo apoio durante os trabalhos difíceis e por terem tornado os meus dias mais divertidos. Obrigada por todo carinho e por terem me ensinado quando eu mais precisei de ajuda.

Aos professores Atilio Convertti, José Manuel Domínguez e João Carlos Monteiro de Carvalho por toda orientação que me foi dada durante a minha qualificação que foi fundamental para que eu chegasse até o final do projeto.

A todos os funcionários do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Miriam, Tânia e Rose. Muito obrigada por toda ajuda.

Ao Rodrigo por ter me ajudado durante todo o meu projeto, se colocando a disposição para o esclarecimento de dúvidas. Muito obrigada por ter me ajudado.

Ao Kleber Hoffman por toda assistência durante esta etapa final do projeto .

À Coordenação de Apoio Pessoal de nível de superior pela bolsa concedida durante o meu mestrado.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro através do processo.

À todos que me apoiaram, me incentivaram e que são os meus exemplos profissionais.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1- Delineamento tipo <i>Plackett & Burnman</i> fatorial 2^{4-1} , acrescido de 4 pontos centrais	55
Tabela 2- Parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento celular de <i>P.pentosaceus</i> ATCC 43200, onde X_{24} equivale à concentração celular em 24 horas.	42
Tabela 3- Parâmetros cinéticos relacionados ao consumo de substrato, formação de ácido lático e acidificação do meio de cultivo pelo <i>P.pentosaceus</i> ATCC 43200	44
Tabela 4- Coeficientes de cada variável que constituem as combinações dos componentes 1, 2 e 3.	49
Tabela 5- Equações e coeficientes de determinação (R-Sq), ajustado (R-Sq adj) e preditivo (R-Sq pred) para cada modelo componente 1, componente 2 e componente 3.	50
Tabela 6- Análise de variância para cada componente 1, 2 e 3 como funções lineares, quadráticas e interações entre os termos pH, polidextrose, agitação e temperatura.	52

CAPÍTULO III

Tabela 1- Parâmetros cinéticos de crescimento de <i>P.pentosaceus</i> ATCC 43200 cultivado sob condição ótima no biorreator.	66
Tabela 2- Parâmetros cinéticos de crescimento, consumo de substrato e formação de ácido lático por <i>P. pentosaceus</i> ATCC 43200 cultivado sob condição ótima no biorreator .	68
Tabela 3- Atividade antimicrobiana em AU/mL frente as cepas bioindicadoras	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1- Representação esquemática da formação de poros por bacteriocinas, mostrando os domínios N e C-terminais conectados por uma região flexível. (A) Face hidrofílica representada na cor escura e face hidrofóbica representada na cor clara; (B) Modelo de Ojcius e Young (1991) e Sahl (1991); (C) Modelo de Driessen et al., (1995). Fonte: Montville e Chen, 1998.4

CAPÍTULO II

- Figura 1 (a)- Curvas de crescimento do *P. pentosaceus* ATCC 43200 nas condições centrais [central 1(■), central 2(●), central 3(▲) e central 4(*) pH 5,0, poli 1,0%, 100 rpm e 30°C],[controle A (◇)pH 5,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C] e [controle B (▲) pH6,0, poli 0%,100 rpm e 30°C] estabelecidas no planejamento experimental. 41

- Figura 1 (b) - Curva de crescimento de *P. pentosaceus* ATCC 43200 nas diferentes condições estabelecidas no planejamento experimental. Legenda: [E1(■) pH 4,0, poli 0,5%, 50 rpm e 25°C],[E2(◆) pH6,0, poli 0,5%, 50 rpm e 35°C],[E3(●) pH 4,0, poli 1,5%, 50 rpm e 35°C], [E4(▲) pH 6,0, poli 1,5%, 50 rpm e 25 °C], [E5(--▲--) pH 4,0, poli 0,5%, 150 rpm e 35°C, [E6(...●...) pH 6,0, poli 0,5%, 150 rpm e 25 °C], [E7(...◆...) pH 4,0, poli 1,5%, 150 rpm e 25°C], [E8(■)pH 6,0, poli 1,5%, 150 rpm e 35C].43

- Figura 1 (c) - Formação de ácido láctico por *P. pentosaceus* ATCC 43200 em meio MRS nas 24 horas de fermentação. Os ensaios foram realizados conforme as condições propostas pelo planejamento experimental. Legenda: [E1 (... ■ ...) pH 4,0, poli 0,5%, 50 rpm e 25°C], [E2 (◆) pH 6,0, poli 0,5%, 50 rpm e 35°C], [E3 (●) pH 4,0, poli 1,5%, 50 rpm e 35°C], [E4 (▲) pH 6,0, poli 1,5%, 50 rpm e 25°C], [E5 (--▲--) pH 4,0, poli 0,5%, 150 rpm e 35°C], [E6 (...●...) pH 6,0, poli 0,5%, 150 rpm e 25°C], [E7 (...◆...) pH 4,0, poli 1,5%, 150 rpm e 25°C], [E8 (■) pH 6,0, poli 1,5%, 150 rpm e 35°C], [Central 1(--■--), central 2(*), central 3(▲) e central 4(x) pH 5,0, poli 1,0%, 100 rpm e 30°C], [controle A(◇) pH 5,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C] e [controle B(--▲--) pH 6,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C].45

- Figura 2- Relação das condições de cultivo com as respostas biológicas representadas pelos componentes componente 1 (crescimento exponencial), componente 2 (crescimento na fase lag) e componente 3 (produção de bacteriocina). Legenda: (■) E1; (▼) E2; (▲) E3; (■) E4; (●) E5; (◀) E6; (◇) E7; (●) E8; (▶) E9, E10, E11 e E12.53

Figura 1- Crescimento celular de <i>P.pentosaceus</i> ATCC 43200 em <i>shaker</i> (A) e no biorreator (B) sob as condições dos ensaios (pH=6, 0,5% de poli, 50rpm e 35°C). Legenda: (◇) A e (◆) B.	66
Figura 2 - Acidificação do meio de cultivo com redução do pH e formação de ácido láctico pelo <i>P. pentosaceus</i> ATCC 43200 nos ensaios realizados (n=3) no <i>shaker</i> (A) e no biorreator(B). Legenda: (◇) A e (◆) B	67
Figura 3- Curva de saturação de oxigênio (%) durante o crescimento de <i>P.pentosaceus</i> ATCC 43200 no cultivo em biorreator por 24 horas. Legenda: (◆) B	68
Figura 4- Produtividade de bacteriocina (AU/mL.h ⁻¹) com base na atividade antimicrobiana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> 101. Legenda: (■) Média dos ensaios (n=3).	71
Figura 5- Produtividade de bacteriocina (AU/mL.h ⁻¹) com base na atividade antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Legenda: (■) Média dos ensaios(n=3).	71

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- AT_t- atividade de bacteriocina a cada tempo
- ATCC- *American Type Culture*
- AU/mL- *arbitray bacteriocin units/mililitre* UA/mL- unidades arbitrárias /mililitro
- Agt- agitação
- BALS- bactéria ácido-láticas
- BHI- *Brain Heart Infusion*
- BRP- proteína de liberação de bacteriocina
- °C- celsius
- CaCO₂- células intestinais epiteliais
- CLA- ácido linolênico conjugado
- Classe IIa- classificação das pediocinas
- Controle A- ensaio controle A
- Controle B- ensaio controle B
- CP1- componente 1
- CP2- componente 2
- CP3- componente 3
- Cx- concentração celular
- CC3- concentração celular em 3 horas
- CO₂- dióxido de carbono
- CYP7A1 – enzima hidroxilase-7-a- colesterol
- β-defensina
- β- glucosidase
- β-glucoronidase
- E.coli* ATCC 25922- *Escherichia coli* ATCC 25 922
- E- ensaio (n°)
- Enzima EII- enzimas transportadoras
- Ensaio A- ensaio realizado em *shaker* (capítulo III)
- Ensaio B- ensaio realizado em biorreator(capítulo III)
- Ex situ*- extracelular
- FAO- *Food Agriculture Organization*
- FCF- Faculdade de ciências farmacêuticas
- GABA- ácido gama-aminobutírico

g- grama

Genes CD36/ SDC1 e PPAR γ

IC₅₀- bacteriocina com atividade contra 50% da concentração das bactérias bioindicadoras.

kDa- kilodalton

HT29- linhagem de células epiteliais intestinais

h- hora

h⁻¹- hora elevada a menos 1

HMGCoA redutase- enzima da via do mevalonato, via metabólica de produção do colesterol

In situ- intracelular

IIC e IID- subunidade de operon

IL- interleucinas

INT- γ - interferon gama (mediador produzido por Th1)

L.m 101 – *Listeria monocytogenes* 101

Man-PTS- sistema fosfotranferase manose permease

M - molar Mm- milimolar

Mm- milímetro

Min- minuto

MRS- *Man, Rogosa e Sharpe*

nm- nanômetros

Pr_{bac}-produtividade de bacteriocina

Pr_{lac}- produtividade de ácido láctico

Pr_t- produto formado a cada tempo

Pr (%) - percentual de ácido láctico formado

Poli ou PDX- polidextrose

pg/ml- picograma por milílitro

pH_t- pH a cada tempo

rRNA- RNA ribossomal

rpm- rotação por minuto

Rearranjo angular- 30° á 60° (graus)

Symbiotic Forte 2000®- marca registrada de formulação com bactérias probióticas

Subst- substrato

S_t - substrato consumido a cada tempo

Subst (%) - percentual de substrato consumido

v/v - volume/volume

Vel. específica. Subst.- velocidade específica de consumo de substrato

Vel. específica. Prod- velocidade específica de formação de produto

μl - microlitros

μm - micrometro

μmax - velocidade máxima de crescimento

WHO- *World Health Organization*

YGNGV- ordem de aminoácidos na porção N-terminal

$Y_{p/s}$ - fator de conversão substrato em ácido lático

$Y_{p/x}$ - fator de conversão de produto por g de célula

$Y_{x/s}$ - fator de conversão de substrato em célula

X_{max} - concentração celular máxima

X_t - concentração celular em cada tempo

***Pediococcus* spp.: Importante gênero de bactéria ácido láctica produtor de pediocinas**

Resumo.....	
Abstract	
1. Introdução	1
2. Biosíntese de bacteriocina	1
2.1 Autoimunidade.....	2
2.2 Resistência.....	3
2.3 Modo de ação.....	3
3. Pediocinas.....	5
3.1 Importante gênero de bactérias produtoras de pediocina: <i>Pediococcus</i> spp.....	7
3.2 Condições de cultivo, produção de pediocina por <i>Pediococcus</i> spp. e caracterização.....	9
4. Interessantes aplicações.....	12
4.1 <i>Pediococcus</i> spp. produtoras de pediocina com aplicação alimentar em:.....	13
4.1.1 Vegetais.....	15
4.1.2 Leite.....	16
4.1.3 Peixes e alimentos marinhos.....	17
4.1.4 Pães.....	18
4.1.5 Vinhos	18
4.2 Aplicação Clínica.....	19
4.2.1 Ensaios <i>in vitro</i>	20
4.2.2 Imunomodulação.....	20
4.2.3 Atividade probiótica no trato gastrointestinal.....	22
4.2.4 Redução do nível de colesterol.....	23
4.2.5 Atividade simbiótica entre bactérias lácticas probióticas no trato respiratório...	25
4.2.6 <i>Pediococcus</i> spp. como probiótico vaginal.....	26
5. Conclusões e perspectivas.....	27
6. Referências.....	27

Título:

***Pediococcus spp.*: Importante gênero de bactéria ácido láctica produtor de pediocina**

Maria Carolina W. Porto, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, Michele Vitolo, Ricardo Pinheiro de Souza
Oliveira*

¹Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 580, São Paulo 05508-900, Brazil

Resumo

Pediocinas são moléculas catiônicas, pequenas, organizadas em porção N-terminal hidrofílica-YGNGV e porção C-terminal anfifílica variável. A termoestabilidade e ação antimicrobiana agregam características importantes a essas bacteriocinas da classe IIa. Por meio da biopreservação alimentar, a atividade anti-listeria tornou-se uma particularidade dessas biomoléculas. Dentre as bactérias ácido lácticas (BALs) encontram-se diferentes cepas bioprodutoras de pediocinas com importantes propriedades biotecnológicas. O gênero de *Pediococcus spp.* define-se por cocos rearranjados em tétrades, catalase negativa e anaeróbios facultativos. *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici* são as principais espécies empregadas na otimização da biosíntese de pediocinas. Alguns estudos desenvolvem-se com isolados bacterianos provenientes de múltiplos nichos biológicos e promovem sistemas heterogêneos para conduzir os processos fermentativos. O atual estudo reúne as informações significantes a respeito de cultivo, modo de ação, variedade de micro-organismos produtores do gênero *Pediococcus spp.* e aplicações biotecnológicas, ênfase nas alimentares para melhor compreensão do tema proposto.

Palavras-chaves: *Pediococcus spp.*, bactérias ácido- lácticas, bacteriocina, pediocina

Title:***Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producer**

Maria Carolina W. Porto, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, Michele Vitolo, Ricardo Pinheiro de Souza
Oliveira*

¹Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes 580, São Paulo 05508-900, Brazil.

Abstract

Pediocins are cationic molecules, small, arranged in a hydrophilic N-terminal portion – YGNGV – and an amphiphilic C-terminal variable portion. The thermal stability and antimicrobial effect add important features to these bacteriocins of class IIa. Through food biopreservation, anti-listeria activity became a peculiarity of these biomolecules. Among the lactic-acid bacteria (LAB), are different pediocin bioproducer strains with important biotechnological properties. *Pediococcus* spp. are characterized by coccus shaped bacteria arranged in tetrads, Gram-positive, non-motile, non-spore forming, catalase negative and facultative anaerobes. *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* are the main species used in the optimization of the pediocins biosynthesis. Some studies have been developed with bacteria isolates from multiple biological niches and promote heterogeneous systems to conduct fermentation processes. This review joins the most significant information about cultivation, mode of action, variability of bacteriocin producer microorganisms from *Pediococcus* spp. and the biotechnological application of these bacteriocins, with emphasis on food products.

Keywords: *Pediococcus* spp., lactic acid bacteria, bacteriocin, pediocins

*Corresponding author Tel.: E-mail address: rpsolive@usp.br

1. Introdução

Correspondente à classificação das bacteriocinas proposta por Cotter et al. (2005), as pediocinas são biomoléculas sintetizadas pelas bactérias ácido-láticas, responsáveis por amplo espectro de inibição, especificamente, atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. Os estudos quanto à biosíntese e aos efeitos antimicrobianos destas bacteriocinas, especialmente aquelas originadas a partir de alimentos fermentados, foram impulsionados pelo interesse de se controlar o crescimento de bactérias patogênicas em alimentos.

Em relação ao desenvolvimento de diversos estudos sobre as pediocinas, algumas de suas características como: ser um peptídeo pequeno (<10kDa) com 37 a 48 resíduos de aminoácidos, sequência N-terminal bastante conservada, alta especificidade do domínio na porção C-terminal com as células-alvo e efetiva atividade em baixa concentração (até na escala nanomolar) foram de extrema importância.

Como resultado de inúmeros estudos na área, esta revisão tem como objetivo apresentar informações a respeito da biosíntese, classificação, mecanismo de ação e atuação das pediocinas produzidas por *Pediococcus sp.*

2. Biosíntese de bacteriocina

A produção de bacteriocina ocorre inicialmente como um mecanismo de resposta aos estímulos ou ao estresse ambiental ocasionado pela competição microbiana. Geralmente, as bacteriocinas são sintetizadas como pré-peptídeos inativos com uma sequência precursora na região N-terminal (Xie e Van Der Donk, 2004) que é transportada à superfície celular durante a fase exponencial e catalisada na sua forma ativa (Aucher et al., 2005).

A regulação da produção das pediocinas (Drider et al., 2006) ocorre através da ativação de genes que podem estar localizados nos cromossomos ou nos plasmídeos (Ennanhar et al., 2000) das bactérias produtoras. Essa regulação é composta por três componentes: peptídeo indutor (feromônio ou fator de ativação), histidina quinase posicionada transmembrana (receptor do feromônio) e regulador da resposta. O peptídeo indutor é sintetizado, no ribossomo, em baixos níveis como um pré-peptídeo o qual é clivado e secretado no meio externo pelo transportador. A uma determinada concentração, este pré-peptídeo clivado ativa

a histidina quinase transmembrana que promove a autofosforilação do resíduo de histidina e, assim, um fosfato é transportado ao regulador da resposta. Este regulador fosforilado ativa a transcrição da bacteriocina (Nes et al., 1999) que será sintetizada na sua forma inativa nos ribossomos. A interferência eletrostática ocasionada pela variação do pH e pela concentração de sais no meio promove um efeito negativo nesta sinalização. Do mesmo modo, a densidade celular no meio interfere na comunicação bacteriana (*quorum sensing*), fator que estimula a autoindução do peptídeo indutor (Ennanhar et al., 2000; Eijsink et al., 2002; Kotelkinova e Gelfand, 2002).

As bacteriocinas de classe IIa são sintetizadas na forma de pré-peptídeo contendo uma sequência de 18 a 27 aminoácidos com 2 glicinas na região N-terminal e, esta sequência de aminoácidos é responsável por tornar esta molécula biologicamente inativa e, assim, manter a integridade da célula produtora. As duas glicinas também servem como um sinal de reconhecimento para o sistema de transporte de proteínas que envolve as proteínas transportadoras do sistema ABC e uma proteína acessória (Nes et al., 1999). Após o reconhecimento do pré-peptídeo, esta sequência de aminoácidos é removida e a bacteriocina é excretada da célula (Cotter et al., 2005; Ennanhar et al., 2000; Fimland et al., 2005). O sistema de transporte coopera para a proteção da célula produtora na presença da bacteriocina ativa (Cotter et al., 2005).

2.1 Autoimunidade

As bactérias produtoras de bacteriocinas têm a capacidade de produzir proteínas – ditas de imunidade - que lhes conferem proteção contra as próprias bacteriocinas. As proteínas de imunidade são constituídas de 51 a 150 aminoácidos e não apresentam homologia significativa entre si, o contrário se observa com as bacteriocinas, que apresentam 5 a 85% de similaridade (Abbe et al., 1995; Aymerich et al., 1996; Cotter et al., 2005; Fimland et al., 2005). Essas proteínas são intracelulares e se ligam as proteínas de membrana da célula produtora impedindo a atuação da bacteriocina quer por competição pelo mesmo receptor quer por inativação direta (Allison & Klaenhammer, 1999; Quadri et al., 1995; Ennahar, 2000).

As bacteriocinas são acumuladas no citoplasma antes de serem liberadas da célula. São transportadas de forma solúvel e este transporte depende da expressão de um gene que codifica a proteína de liberação da bacteriocina (BRP), também chamada de proteína de lise (Daw e Falkner, 1996).

Os genes responsáveis pela produção e imunidade de muitas bacteriocinas estão agrupados e organizados em um ou até dois operons e, geralmente, o gene que codifica a imunidade está muito próximo do gene de produção (Cleveland et al., 2001; Eisjsink et al., 2002; Kolter e Moreno, 1992). Em geral, o operon da bacteriocina codifica as três proteínas: a bacteriocina, a proteína de imunidade e a proteína de lise (Cleveland et al., 2001; Daw e Falkner, 1996; Jack et al., 1995).

2.2 Resistência

Para manter a condição de sobrevivência em um meio com bactérias competitivas, as bactérias precisam apresentar formas de resistência para que não se tornem alvo dos produtos antimicrobianos, como, por exemplo, as bacteriocinas, produzidas por suas competidoras. A autoresistência está ligada ao mecanismo de proteção para manter a integridade celular frente a qualquer agressor. Desta forma, as células tornam-se resistentes por mecanismos genéticos de respostas ligados à composição, estrutura e presença de receptores, mutação de receptores e alterações na formação de poros na membrana ou parede celular. Outro fator importante é a liberação de proteases ao redor das células susceptíveis aos produtos antimicrobianos, tal como as bacteriocinas (Eisjsink et al., 2002).

A transcrição do operon Man-PTS (sistema fosfotransferase-manose-permease) regula a sensibilidade bacteriana através de componentes de membrana denominados IIA, IIB e IIC. A expressão da manose permease pelo sistema de enzimas transportadoras (enzima EII) sensibiliza as células de *Listeria monocytogenes* para a ação da pediocina. Após a inserção da porção C-terminal da bacteriocina no receptor de membrana, a expressão proteica estabiliza-se (Cotter et al., 2005; Deegan et al., 2005).

Segundo Diep et al. (2006), a deleção do operon e ausência das subunidades IIC e IID na membrana de *Listeria monocytogenes* promove a sensibilidade deste microorganismo à pediocina. A capacidade da *Listeria monocytogenes* em resistir à ação antimicrobiana de bacteriocinas de classe IIa se deve à redução da expressão de manose permease do sistema fosfotransferase (Cotter et al., 2005).

2.3 Modo de ação

A ação das bacteriocinas ocorre nos domínios da membrana citoplasmática (Montville e Chen, 1998), podendo ser esta ação do tipo bacteriostática ou bactericida, dependendo da sua

concentração. As bacteriocinas permeabilizam a membrana de células sensíveis através da formação de poros, causando desbalanço iônico e fluxo de íons fosfato. Essa formação de poros na membrana citoplasmática promove a dissipação da força motriz protônica com modificação no potencial de membrana e no gradiente de concentração de íons hidrogênio (Bruno e Montville, 1993; Cleveland et al., 2001; Moll et al., 1999; Papagianni et al., 2003).

Moll et al. (1999) e Montville e Chen (1998) apresentaram dois modelos alternativos para a formação de poros. No primeiro modelo, a bacteriocina se liga como um monômero e se insere nas bi-camadas de lipídeos e esses monômeros inseridos agregam-se lateralmente para formação de poros (Ojcius e Young, 1991; Sahl, 1991). No segundo modelo a formação de poros é causada por uma perturbação local na camada lipídica a partir da ligação da bacteriocina (Driessen et al., 1995). Através da força próton motriz a bacteriocina é atraída à membrana e esta não entra em contato com a parte hidrofóbica da membrana, ou seja, os resíduos da bacteriocina são superficialmente inseridos na parte externa da bicamada lipídica (Figura 1) (Schulz et al., 2003).

A bacteriocina produzida pelo *Pediococcus acidilactici*, pediocina PA-1, apresenta mecanismo de ação através de formação de poros na membrana citoplasmática da bactéria sensível. A interação entre o peptídeo anfifílico e o receptor promove a re-organização das porções hidrofílicas e hidrofóbicas dos fosfolipídeos da membrana citoplasmática. A transposição peptídica na membrana exige maior hidrofobicidade e, para isto, os aminoácidos mais hidrofóbicos são direcionados à porção externa da sequência do peptídeo, superficialmente em contato com os fosfolipídeos, resultando na depressão da força motriz e saída dos componentes essenciais à célula (fosfatos, aminoácidos e outros metabólitos) pelos poros (Synder e Worobo, 2014).

Figura 1- Representação esquemática da formação de poros por bacteriocinas, mostrando os domínios N e C-terminais conectados por uma região flexível. (A) Face hidrofílica representada na cor escura e face hidrofóbica representada na cor clara; (B) Modelo de Ojcius e Young (1991) e Sahl (1991); (C) Modelo de Driessen et al., (1995). Fonte: Montville e Chen, 1998.

3 Pediocinas

Os aminoácidos que compõem a pediocina PA-1, produzida pelo *Pediococcus acidilactici*, estão organizados nas seguintes posições: 1° e 11° lisina, 12° histidina, 7° e 16° valina, 9°, 14°, 24° e 44° cisteína e 18° ou 33° triptofano na sequência de aminoácidos, sendo que a histidina e a lisina são os aminoácidos que influenciam diretamente na construção de poros na membrana citoplasmática das bactérias alvo (Ennanhar et al., 2000). Esses aminoácidos são os responsáveis pela formação da porção N-terminal hidrofílica com aminoácidos-YGNGXV- comuns em conformação β -hélice. A formação das pediocinas híbridas atribui-se à substituição de diferentes aminoácidos na posição X ou pela junção das porções N e C- terminais. (Cotter et al., 2005; Eijsink et al., 1998; Eijsink et al., 2002; Ennanhar et al., 2000; Mointville e Chen, 1998).

A porção C-terminal possui característica hidrofóbica/anfifílica atribuída à composição de seus aminoácidos como, por exemplo, o triptofano (Fimland et al., 2005) e conformação α -hélice em rearranjo angular de 30°. Essa organização conformacional proporciona flexibilidade molecular a essa porção. Quando inserida em uma membrana citoplasmática, as conformações α - hélice rearranjam-se em 60° e se estabilizam pela interação das ligações dissulfeto entre as cisteínas na porção C-terminal e N-terminal (Ennanhar et al., 2000). Para algumas pediocinas, encontra-se na posição C-terminal triptofano no lugar de cisteína. Na pediocina PA-1 e enterocina A encontram-se duas ligações dissulfeto entre as cisteínas, diferentemente da sakacina P e curvacina A, que apresenta apenas uma ponte dissulfeto entre as cisteínas nas posições 9° e 14°. De acordo com Eijsink et al. (1998), a segunda ligação da pediocina PA-1 e enterocina A é a responsável pela atividade antimicrobiana dessas bacteriocinas e, interferentes na primeira ou na segunda ligação entre as cisteínas podem modificar este efeito antimicrobiano. Um exemplo é o agente redutor ditiotreitól na primeira ligação entre cisteínas promove moderada atividade antimicrobiana da pediocina enquanto que, este mesmo agente redutor, na segunda ligação contribui para a perda total do potencial antimicrobiano da pediocina. As pediocinas PA-1 e AcH são exemplos de bacteriocinas da classe IIa que possuem a sua atividade relacionada à segunda ligação dissulfeto entre as cisteínas (Eijsink et al., 2002; Ennanhar et al., 2000).

As pediocinas PA-1/AcH, produzidas por *Pediococcus acidilactici*, apresentam grande homologia entre si no que se refere ao peso molecular, sequência peptídica e rearranjo estrutural. Atualmente outras pediocinas também são conhecidas como, por exemplo, a pediocina SM-1 produzida por *Pediococcus pentosaceus* Mees 1934 que é altamente estável em condições variáveis de temperatura e pH e apresenta amplo espectro de inibição

(Anastasiadou et al., 2008a), a pediocina SB83, produzida por *Pediococcus pentosaceus* SB83, que apresenta ampla atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis* (Borges et al., 2014) e a pediocina ppk34, produzida por *Pediococcus pentosaceus* K34, com atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes* (Abrams et al., 2011).

Uma das importantes características das pediocinas de classe IIa é a sua capacidade termoestável e atividade em ampla faixa de pH, características que valorizam bastante a sua aplicação em alimentos tratados termicamente como, por exemplo, na esterilização durante o processamento industrial do alimento e para alimentos mantidos refrigerados.

Alguns estudos com pediocinas são desenvolvidos a fim de se fundamentar a estabilidade desta biomolécula frente a diversas condições de tratamento e cultivo. De acordo com Todorov e Dicks (2005), a estabilidade da atividade bacteriostática da pediocina ST18, produzida por *Pediococcus pentosaceus* ST18, isolado de boza, foi mantida após o seu tratamento a 121 °C por 30 minutos. No entanto, a completa inativação ou significativa redução na atividade antimicrobiana foi observada após o tratamento com protease IV e pronase E, confirmando a natureza proteica desta pediocina (Todorov e Dicks, 2009). A atividade da pediocina ST44AM, produzida por *Pediococcus pentosaceus* ST44AM, também se manteve estável após tratamento térmico a 100° C por 2 horas. Houve redução da sua atividade antimicrobiana de $3,3 \times 10^6$ para $4,1 \times 10^5$ UFC/mL contra *Listeria ivanovvi* subsp. *ivanovvi* apenas quando esta pediocina foi exposta a 121 °C por 20 minutos (Todorov e Dicks, 2009). Desta forma, é possível observar que a capacidade termoestável entre as pediocinas pode variar, como o demonstrado em relação à pediocina ST44AM (Todorov e Dicks, 2009) e ST18 (Todorov e Dicks, 2005). Vale ainda ressaltar que os autores verificaram atividade da pediocina ST44AM após seis meses da sua produção quando esta bacteriocina foi armazenada a 25 °C assim como manteve a sua atividade em uma ampla faixa de pH (2-12) e completa inativação quando tratada com enzimas proteolíticas (papaína, tripsina, proteinase K e α -crimotripsina) (Todorov e Dicks, 2009). O tratamento com α -amilase e lipase não afetou a atividade desta pediocina, descartando a sua classificação como uma bacteriocina de classe IV (Klaenhammer, 1988). A presença de compostos químicos como Tween 80, Tween 20, Triton X-100, uréia, EDTA e NaCl não afetaram a sua atividade.

Vários estudos relataram que a pediocina da classe IIa, quando armazenada em baixas temperaturas, apresenta maior tempo de estabilidade em relação a sua atividade antimicrobiana como, por exemplo, as pediocinas backPP34 (Abrams et al., 2011), bac ALP57 (Pinto et al., 2009) e MCH14 (Nieto-Lozano et al., 2010) que se mantiveram ativas

por 1 mês quando armazenadas a -20 °C e 4 °C, 6 meses quando armazenadas a 4 °C e 30-60 dias quando armazenadas a 15 °C e 4-10 °C, respectivamente.

Segundo Devi e Halami (2011), a pediocina PA-1 sintetizada por algumas cepas de espécies diferentes: *P. acidilactici* Cb1, *L. plantarum* Acr2, *Streptococcus equinus* AC1, *P. pentosaceus* (Cb4 e R38), *Enterococcus faecium* (Acr4, BL1 e V3) apresentou ótima atividade antimicrobiana a 40-80 °C e em pH 7-8. O aumento da temperatura (121 °C) e redução do pH (2-4) diminui em 50% a atividade destas pediocinas. Resultados similares foram descritos por Pinto et al. (2009) para as bacteriocinas bacALP57 e bacALP7, no qual ambas as pediocinas mantiveram atividade de 50% em pH 2-8, estabilidade a compostos químicos (Tween 80, Tween 20, Triton X-100, uréia, EDTA e NaCl) e sensibilidade a atividade proteolítica (proteinase K, pepsina, pronase e pepsina).

Jang et al. (2014) relataram atividade antilistérica (halo de inibição > 6 mm) da pediocina T1 sintetizada por *Pediococcus pentosaceus* T1, isolado de Kimchi (vegetal fermentado no sul da Coréia), após tratamento a 80 e 110°C na faixa de pH 4-8.

3.1 *Pediococcus* spp: Importante gênero de bactérias produtoras de pediocina

Os principais gêneros de cocos, a saber, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, são bactérias ácido-láticas. O gênero *Pediococcus* spp. é constituído pelas seguintes espécies: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus halophilus* e *Pediococcus urinaeequi* (Holzapfel et al., 2006, Holzapfel e Wood, 2014). As células de *Pediococcus pentosaceus* são esféricas, rearranjadas em tétrades, Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, catalase negativa e homofermentativas. A fermentação de hexoses ocorre pela via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas, cujo produto final é o ácido láctico (Madigan et al., 2010). Seu material genético é constituído por 37% de guanina e citosina com extensão de 1,83 mbp e sua transcrição resulta em um total de 5rRNAs, 55tRNAs e 1757 proteínas (Marakova e Koonin, 2007; Papagianni e Anastasiadou, 2009).

A identificação e caracterização de bactérias ácido-láticas com aplicação biotecnológica como, por exemplo, a sua aplicação em produtos como silagens e alimentos fermentáveis (feijões, chucrutes, cereais, azeitonas e derivados cárneos) têm ganhado bastante destaque nos últimos anos.

É bastante evidente o destaque que se tem atribuído no desenvolvimento de pesquisas envolvendo o gênero *Pediococcus*, especialmente às espécies *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus*, caracterizando-se os seus aspectos genéticos, moleculares e fisiológicos. Ambas as espécies são aplicadas industrialmente em bioprocessos de alimentos fermentados e são capazes de promover a biopreservação de vegetais, salsichas e produtos cárneos através da produção de bacteriocinas (pediocinas) (Papagianni e Anastasiadou, 2009).

Recentemente, diversas cepas de *Pediococcus pentosaceus* foram identificadas. Dez cepas deste micro-organismo foram isolados de grãos de pólen (Beldahy et al., 2014), seis cepas da mesma espécie foram isoladas de alimento fermentado (Idly) do sul da Índia (Vidhyasagar e Jeevaratnam, 2013), trinta e uma cepas foram isoladas de queijos, salsichas, leite fermentado, leite em pó, sorgo fermentado, bambu fermentado e milho fermentado, tendo sido geneticamente e fenotipicamente estudadas (Martino et al., 2013). Além dessas cepas de *Pediococcus* identificadas, Oki et al. (2011) identificaram oito cepas de bactérias ácido-láticas, incluindo cepas de *Pediococcus*, de diferentes tipos de salsichas (Jamma e Arjja) provenientes do sul do Himalaia. Todorov e Dicks (2009) também identificaram cepa de *Pediococcus pentosaceus* ST44AM em Marula (*Scerocarya birrea*) assim como, também, Jang et al. (2014) conseguiram isolar o *Pediococcus pentosaceus* T1 num total de quinze cepas obtidas de Kimchi fermentado.

Devi e Halami (2011) conseguiram isolar a partir de vegetais três diferentes cepas de *Pediococcus*, *Pediococcus acidilactici* CB1, *Pediococcus pentosaceus* CB4 e *Pediococcus pentosaceus* R38, produtoras de pediocina de pequeno tamanho molecular (4,5 kDa) e com propriedades características de pediocina da classe IIa.

Federici et al. (2014) identificaram bactérias ácido-láticas em salame provenientes da região central da Itália e caracterizaram, pela sequência 16SrRNA, 99% de identidade à espécie *Pediococcus pentosaceus*. As nove cepas de *Pediococcus* isoladas demonstraram propriedades probióticas tais como: resistência a pH ácido e a bile, e adesão as células intestinais Caco-2. Oh et al. (2015) isolaram duas cepas de *Pediococcus*, *Pediococcus pentosaceus* SW01 e *Pediococcus acidilactici* SW05, de bebida coreana fermentada de milho (*Omegisool*) demonstrando 99% de homologia com *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* pelo sequenciamento de gene (16rRNA). As duas cepas foram caracterizadas como bactérias Gram-positivas, catalase-negativa e oxidase-negativa capazes de fermentar glicose, fructose, mannose e galactose. Quando expostas ao suco gástrico (pH 2,0, 2,5 e 3,0) mantiveram-se tolerantes por 3 horas com viabilidade celular de 10^9 UFC/mL, assim como também foram resistentes a incubação *in vitro* por 24 a 48 horas com sais biliares e tiveram 65% de adesão às

células HT-29 da mucosa intestinal. Ambas as cepas não apresentaram atividade β -hemolítica tendo apenas a cepa *P. pentosaceus* SW01 apresentado atividade α -hemolítica. Logo, ambos isolados demonstraram potencial probiótico comprovado por testes *in vitro* tornando-os ótimos candidatos para preparações probióticas alimentares.

Carafa et al. (2015) caracterizaram um conjunto de noventa e cinco bactérias ácido-láticas (BALs) de queijo fermentado espontaneamente, proveniente de Malga, Itália. O sequenciamento do gene 16S rRNA evidenciou a presença de 73,6% de espécies de *Lactobacillus* spp. e 26,4 % de *Pediococcus* spp. Das 29 cepas isoladas do leite cru, 21 foram identificados como *Pediococcus pentosaceus*. Setenta BALs foram resistentes a alta concentração de sal, cultivo a 30 °C, heterofermentativas facultativas e algumas cepas demonstraram propriedades tecnológicas de produção de bioativos como: GABA (ácido gama-amino butírico) e CLA (ácido linolênico conjugado). Os resultados confirmaram a biodiversidade de BALs residentes neste alimento que podem ser exploradas para a aplicação probiótica em queijos, a fim de valorizar qualitativamente as características organolépticas deste alimento.

3.2. Condições de cultivo, produção de pediocina por *Pediococcus* spp. e caracterização

Recentemente vários estudos demonstraram a produção de pediocina por diversas cepas de *Pediococcus* como: *P. pentosaceus* ST44M (Todorov e Dicks, 2009), *P. pentosaceus* CB4 (Devi e Halami, 2011), *P. pentosaceus* R38 (Devi e Halami, 2011), *P. pentosaceus* OZF (Osmangoaglu et al., 2011), *P. pentosaceus* 3772 (Kingcha et al., 2012) e *P. pentosaceus* ND273 (Simha et al., 2012).

O aumento gradual da concentração de pediocina ocorre simultaneamente ao crescimento exponencial da bactéria e, sendo assim, as bacteriocinas sintetizadas por esta espécie são classificadas como metabólito primário. As cepas de *Pediococcus pentosaceus* BCC3772 (Kingcha et al., 2012), *Pediococcus pentosaceus* 05-10 (Huang et al., 2009) e *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (Piva e Headon, 1994) apresentaram máxima produção de pediocina entre o final da fase logarítmica (12 horas) e início da fase estacionária (15 horas). Albano et al. (2007) relataram máxima produtividade e atividade das pediocinas bacH-6111-2 e bacH-5692-3, produzidas por *Pediococcus acidilactici*, na fase estacionária (18 horas) assim, como também, o *Pediococcus pentosaceus* K34 que obteve melhor bioprodução no momento de transição da fase exponencial para a fase estacionária, entre 15 a 18 horas.

Filogeneticamente, a espécie de *Pediococcus pentosaceus* foi definida apresentando propriedades de biossíntese de pediocina bem similares a do *P. acidilactici*.

Alguns estudos envolvendo a espécie *Pediococcus acidilactici* como: *P. acidilactici* HA6111-2 e *P. acidilactici* HA5692-3 (Albano et al., 2007); *P. acidilactici* UL5 (Dabour et al., 2009); *P. acidilactici* MHC14 (Nieto-Lozano et al., 2010); *P. acidilactici* J347-29 (Díez et al., 2012); demonstraram que esta espécie de *Pediococcus* exibe, como particularidade da espécie, a fermentação em leite e derivados lácteos, tanto em cultura única em soro de leite ou em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Somkuti e Stenbeirg, 2010).

Atualmente sabemos que os diferentes parâmetros de cultivo como temperatura, pH, agitação e aeração influenciam de forma bastante importante atividade das bacteriocinas. Frequentemente, a produção de pediocina em pequena escala ocorre de forma satisfatória entre temperaturas de 28 a 32 °C e pH inicial do meio de cultivo neutro, chegando ao final da fermentação em pH 4,0 devido a acidificação que ocorre pela produção e liberação de ácido láctico no meio. A viabilidade da bactéria produtora da pediocina pode ser avaliada durante todo o processo de fermentação através da contagem de colônias em MRS-ágar após incubação a 30 °C por 24 horas (Holzapfel e Wood, 2014).

A ampliação de escala mantendo a produção de pediocina com altos valores de rendimento encontra-se entre as principais limitações para a otimização industrial. Pensando nisso, diversos pesquisadores buscam estratégias para conduzir processos de maior escala envolvendo a fermentação descontínua e descontínua alimentada. A estratégia de suplementação de sacarose em sistema descontínuo alimentado para a síntese de pediocina por *Pediococcus pentosaceus* Mees 1934 foi adotada por Papagianni e Papamichael (2014) e os autores demonstraram que a alimentação com 7g/L.h⁻¹ de sacarose permitiu o aumento na produção de pediocina em 119 % com atividade de 145 AU/mL frente ao *Pediococcus acidilactici* ATCC 25740 utilizado como micro-organismo bioindicador. Nagamouchi et al. (2008) compararam a produção de pediocina entre duas formas de processo fermentativo: descontínuo com células livres e descontínuo alimentado com células de *Pediococcus acidilactici* UL5 imobilizadas. A atividade máxima da pediocina PA-1/AcH em soro de leite e MRS foi de 2,048 e 4,096 AU/mL, respectivamente, após 12 horas de fermentação descontínua e produtividade volumétrica de 187 ou 342 AU/mL.h⁻¹. Em sistema descontínuo, por ciclos repetidos, a atividade da pediocina aumentou expressivamente (4,096 AU/mL) em ambas as fermentações em apenas 45 minutos de cultivo em MRS e 2 horas em soro de leite. A produtividade volumétrica foi 5,461 e 2,048 AU/mL.h⁻¹, respectivamente, o que

corresponde a 133 e 50 mg pediocina L⁻¹.h⁻¹. O rendimento em processo fermentativo descontínuo alimentado cíclico, baseado na produtividade volumétrica, foi 16 vezes maior em MRS e 6 vezes maior em soro de leite quando comparado à fermentação descontínua nos mesmos meios de cultivo. Essa forma de otimização pode ser usada para a ampliação de escala nos processos industriais, adotando-se a re-alcanilização do meio de cultivo por vários ciclos. A re-alcanilização do meio de cultivo permite o desenvolvimento favorável das células saudáveis durante a fase exponencial de crescimento, permitindo a síntese de pediocina na sua forma de pré-peptídeo, que se tornará ativa após sua modificação molecular em pH baixo e, ao mesmo tempo a produção de ácido láctico (Anastasiadou et al., 2008b).

A acidificação gradativa do meio potencializa a biossíntese de pediocina PA-1, por ativar enzimas dependentes de pH ácido para o processo de translocação da bacteriocina para o meio externo. Segundo Simha et al. (2012), a redução de uma unidade no valor do pH (7-6) duplicou a concentração de pediocina PA-1 sintetizada por *P. pentosaceus* e o pH igual ou inferior a 5 aumentou a produção da pediocina bacpK34 por *P. pentosaceus* PK34 (Abrams et al., 2011).

A investigação sobre a interferência das condições de estresse ocasionadas por variações de pH no meio de cultivo foi ressaltada com *Pediococcus acidilactici* HA6111-2. A pediocina sintetizada em pH 3,5 e 8,5 apresentou atividade antilisterica moderada e maior tempo na fase lag devido a uma adaptação mais lenta do *Pediococcus*. Mesmo assim, a atividade da pediocina foi bastante satisfatória apresentando alta atividade antimicrobiana (25,600 AU/mL), após 18 horas, contra as cepas de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* 971 e acidificação final do meio de cultivo característico da fermentação por BALs. A maior dificuldade de adaptabilidade do pediococcus foi vista em pH inicial de 3,5, mesmo assim, a atividade máxima da pediocina (6,400 AU/mL) continuou satisfatória contra *Listeria monocytogenes* 971, cepa que apresentou maior suscetibilidade a esta pediocina (Engelhardt et al., 2014).

Guerra et al. (2008) avaliaram a produção de pediocina por *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 em sistema descontínuo e descontínuo alimentado re-alcanilizado. Em sistema descontínuo, a atividade da pediocina em MRS e soro de leite (desproteínizado e suplementado com 2% de extrato de levedura) foi de 493 e 58 AU/mL, respectivamente. A re-alcalinização foi avaliada em diferentes meios de cultivo, e a suplementação de 400 g/L de glicose em soro de leite proporcionou aumento na atividade desta pediocina (494 AU/mL). Com a mesma suplementação de fonte de carbono e 4% de extrato de levedura, esta mesma pediocina passou a apresentar a atividade da ordem de 716 AU/mL, no entanto, a

produtividade volumétrica foi similar nas duas condições de suplementação (3,43 e 3,45 AU/mL.h⁻¹, respectivamente). De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a proposta de realcalinização em sistema descontínuo alimentado com suplementação do soro de leite com fonte de carbono diferente da lactose (glicose) e extrato de levedura melhorou a produção/atividade da pediocina.

Algumas condições de aeração foram analisadas por Anastasiadou et al. (2008a) ao biossintetizar a pediocina SM-1 por *P. pentosaceus* Mees 1934, tendo sido a sua produção mais favorável na condição de semi-aerobiose com 60% de saturação. A atividade da pediocina produzida em semi-aerobiose foi quatro vezes maior (70 AU/mL) do que a atividade da pediocina produzida em aerobiose ou anaerobiose (18 AU/mL). O crescimento e o metabolismo do *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 também foram avaliados em diferentes condições de aeração. Quando cultivado em anaerobiose, esta cepa de *Pediococcus* apresentou melhor crescimento e produção de ácido láctico, porém o cultivo em anaerobiose ou aerobiose total não foram condições satisfatórias para a produção de pediocina com maior atividade. A saturação de oxigênio do meio em 60 %, condição de aerobiose parcial, resultou em máxima atividade da pediocina (160 AU/mL) em 14 horas de cultivo. Acredita-se que a tolerância ao oxigênio afeta vias metabólicas oxidativas da síntese de bioprodutos e pediocina SA-1 pelo *P. acidilactici* NRRL B-5627. A pediocina SA-1 na forma de pré-peptídeo é um metabólito primário e, ao final do crescimento do micro-organismo, os mecanismos de translação e excreção são ativados. Desta forma, a síntese desta pediocina está parcialmente vinculada ao crescimento do *Pediococcus* (Anastasiadou et al., 2008b).

4 Interessantes Aplicações

Aplicação de bacteriocinas como bioconservantes tem recebido crescent atenção nos recentes anos (Deegan et al., 2006). Culturas de *Pediococcus* são comercializadas, atualmente, como culturas protetoras contra bactérias comuns na deterioração de alimentos e patogênicas e tal aplicação destas culturas podem levar a melhoria na qualidade dos alimentos e atributos sensoriais através do controle da flora, induzindo a lise celular (Bhowmilk and Martch, 1990).

4.1 *Pediococcus* spp. produtor de pediocina com aplicação alimentar

Com o aumento pela busca de alimentos funcionais, tornou-se uma prática industrial a adição de micro-organismos probióticos em diferentes tipos de alimentos. As espécies de bactérias eletivas para esta aplicação são as bactérias ácido-láticas pois estas são reconhecidas como seguras e apresentam boa adaptabilidade ao ambiente da flora intestinal humana. De acordo com a Organização de agricultura e alimento (FAO) e Organização mundial de saúde (WHO), probióticos são micro-organismos vivos capazes de promoverem efeitos benéficos à saúde (WHO/FAO, 2002). Os efeitos benéficos são variados e devem ser comprovados cientificamente.

Os probióticos são capazes de promover o equilíbrio da flora intestinal pois, por serem resistentes à acidez do estômago e aos sais biliares no intestino delgado, conseguem chegar ainda viáveis ao intestino grosso (cólon). De acordo com a WHO/FAO (2002), é necessário a concentração de 10^6 - 10^7 UFC/g⁻¹ do micro-organismo viável no alimento e durante o processamento desse no trato gastrointestinal, para que possa ser observado o seu efeito probiótico no intestino grosso.

Albano et al. (2009) evidenciaram a sobrevivência do probiótico *Pediococcus acidilactici* HA-6111-2 durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal, além de avaliar o efeito da secagem por spray-drying sobre sua viabilidade como cultura probiótica em alimentos. A viabilidade foi muito pouca afetada, com redução na concentração celular de menos 1 unidade (na escala log) após a exposição deste probiótico à acidez gastrointestinal simulada através da presença de pepsina. Após 60 dias, o concentrado celular foi ressuspensionado e teve decréscimo na contagem celular de menos 1 unidade na escala log. O concentrado celular deste probiótico em baixa temperatura (4 °C) reduziu apenas 0,6 unidade na escala log, enquanto em temperatura ambiente houve diminuição apenas de 2,9 unidades na escala log das células viáveis. Esses resultados reforçam a indicação do *P. acidilactici* HA 6111-2 como aditivo probiótico em alimentos funcionais (Barbosa et al., 2015).

Federici et al. (2014) propuseram a identificação de isolados bacterianos de matriz alimentar e a comparação entre a capacidade de resistência à acidez, à bile, a antibióticos e à adesão às células intestinais CaCo-2. Dentre os candidatos a probióticos, as cepas de *P. pentosaceus* identificadas foram resistentes ao pH gástrico por 3 horas, mantendo o seu número celular inferior a 5 log/mL. Os *Pediococcus*, também, cresceram na presença de bile e mantiveram-se viáveis por 4 horas, sendo que 31 % das cepas apresentaram média adesão a células intestinais. Significativamente, a adesão dos probióticos *in vitro*, expresso pelo

número de células bacterianas por células intestinais, indicou a habilidade destes micro-organismos na colonização do intestino.

A inoculação das bactérias ácido-láticas em alimentos, como culturas iniciadoras, tornou-se uma alternativa funcional e altamente aplicável nas indústrias para o controle de bactérias patogênicas, visto que as propriedades organolépticas dos alimentos são mantidas. Naturalmente, alimentos cárneos constituem consideráveis fontes de microbiota benéfica e desejável no processo fermentativo, desta forma, cepas probióticas de *Pediococcus pentosaceus* são utilizadas no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos cárneos.

Kingcha et al. (2012) investigaram a adição de *Pediococcus pentosaceus* BCC3772 em salsichas derivadas de carne suína fermentada (Nham), proveniente da Tailândia. Após triagem dos isolados bacterianos, efetivamente a cultura de bactéria ácido-lática (10^6 UFC/mL) foi capaz de reduzir o crescimento de *Listeria monocytogenes* ATCC19115 numa escala superior a 3,2 log UFC/mL após 24 horas e completa inibição após 36 horas. Com um inóculo inicial de 10^4 UFC/mL de *P. pentosaceus*, a inibição do crescimento de Listéria foi menor (inferior a 2 log UFC/mL) se comparado ao inóculo inicial anterior (10^6 UFC/mL) em 24 horas. Os autores defendem o uso de *P. pentosaceus* BCC7772 como cultura iniciadora capaz de manter a integridade alimentar e as propriedades organolépticas do alimento.

Huang et al. (2009) caracterizaram a pediocina 05-10 sintetizada por *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolado de picles chinês fermentado, que apresentou atividade bactericida contra *L.monocytogenes* 54002 por 2 horas no presunto suíno, com redução celular de $4,5 \times 10^8$ UFC/mL para $4,4 \times 10^5$ UFC/mL, e o crescimento desta cepa de listeria foi controlado por 10 dias. Ao contrário, na ausência desta pediocina, houve crescimento bacteriano de $5,5 \times 10^3$ UFC/g para $3,3 \times 10^7$ UFC/g. Outra vantagem interessante desta bacteriocina foi a sua capacidade de se manter estável numa ampla faixa de pH (2,0-8,0) e a 121 °C por 15 minutos, tornando-a bastante atraente para o controle microbiano em alimentos cárneos (pH neutro a básico) biopreservados por tratamento térmico. As propriedades tecnológicas da pediocina são fundamentais para garantir a sua aplicação em alimentos.

Na diversidade das bactérias ácido-láticas isoladas de salsicha suína tradicional de português (Alheiras), identificou-se a presença da pediocina bacPPK34 produzida por *Pediococcus pentosaceus* K34 de tamanho molecular entre 2,5 a 6,2 kDa. A máxima produtividade desta bacteriocina na fase log tardia/início da fase estacionária (15-18 h) foi de 12,800 AU/mL, permitindo a inibição do crescimento logarítmico de três cepas de *Listeria monocytogenes* (L1, L2 e L3). A atividade anti-listéria foi mantida após a bacteriocina ter sido tratada por 1 hora em pHs extremos (2,0 e 8,0). A estabilidade da atividade antimicrobiana foi

mantida após a exposição da bacteriocina a 121°C por 15 minutos e após estocagem do sobrenadante a 4 °C e -20 °C por 1 mês. De acordo com os resultados, a cepa de *P. pentosaceus* K34 apresentou boa adaptabilidade nessa matriz alimentar e a adição do sobrenadante livre de células e com a pediocina backPKK34 permitiu a biopreservação de alimentos (Abrams et al., 2011).

Albano et al. (2007) isolaram (salsicha Alheira) e classificaram duas pediocinas produzidas por *P. acidilactici* HA-6111-02 e *P. acidilactici* HA-5692-3 com tamanho molecular de 3,5 e 6,5 KDa, respectivamente. Essas moléculas peptídicas foram codificadas pelo fragmento de DNA (1044 bp), apresentando homologia entre os fragmentos genéticos ped A (108 bp), ped B (338bp) e ped C (524 bp) da pediocina PA-1. Ambas as bacteriocinas apresentaram máxima atividade de 3,200 AU/mL em 18 horas de cultivo na presença de *Enterococcus faecium* HKLSH e 1,600 AU/mL foi capaz de controlar por 7 horas o crescimento da *L. innocua* N27.

Nieto-Lozano et al. (2010) avaliaram a atividade da pediocina, sintetizada por *Pediococcus acidilactici* MCH14, contra *Listeria monocytogenes* CECT4031 e *Clostridium perfringens* CECT376 ao inocularem esta cepa probiótico de *Pediococcus* em carnes, salsichas secas fermentadas e em *Frankfruturs*. Na presença da pediocina, houve redução em 2 unidades log de UFC/mL (7×10^3 a 2×10^1 UFC/g) de *L. monocytogenes* CECT4031 nas salsichas. A atividade de 5,000 AU/mL de pediocina PA-1 nos Frankfruturs contaminados com *L. monocytogenes* CECT4031 e *Clostridium perfringens* CECT376 resultou na redução de 2 log de UFC/mL de ambas as cepas indicadoras. Quando armazenada a 15 °C, esta pediocina apresentou atividade apenas por 30 dias, tendo sido capaz de reduzir o crescimento de ambas as bactérias indicadoras para 0,6 e 0,8 UFC/g, respectivamente. De acordo com os resultados, os autores evidenciaram que as melhores temperaturas para o armazenamento desta pediocina foram 4 e 10 °C, no qual se manteve a atividade antimicrobiana por 60 dias, demonstrando a favorável aplicação desta pediocina em alimentos refrigerados.

4.1.1. Vegetais

A bacteriocina de dez isolados bacterianos de coalho, feijões, leite bruto e pepinos foram avaliados quanto a sua atividade anti-listéria. A cepa de *Pediococcus pentosaceus* CFR19 isolado de feijões apresentou atividade antimicrobiana contra os principais patógenos alimentares, demonstrada pela formação de halos (halos de inibição ≤ 8 mm foram considerados como resultado positivo para a atividade antimicrobiana). A atividade

antimicrobiana frente cepa *Escherichi coli* foi baixa com halos de 8-10 mm, moderada contra *Salmonella thyphi*, *Salmonella parathyphi* e *Staphilococcus aureus* com halos de 10-12 mm, porém, a maior atividade foi observada contra *Listeria monocytogenes* Scot-A (halo 16 mm), tendo sido esta bacteriocina coletada em 6 horas de cultivo. Esta cepa de *Pediococcus* pode ser utilizada como uma cultura probiótica, sendo aplicada nos processos fermentativos como cultura simples ou co-cultura para a produção de pediocina *in situ*. Contudo, os estudos relacionados ao processo de purificação para a obtenção de pediocina pura e termoestável para a aplicação *ex situ* em carnes, peixes e vegetais ainda se fazem necessário (Venkateshwari et al., 2010).

A bacteriocina PP-SIII sintetizada por *Pediococcus pentosaceus* CFR SIII, isolado de pepinos fermentados apresentou termoestabilidade a 121 °C por 15 minutos e estabilidade entre as faixas de pH de 3,0 a 5,0. Esta bacteriocina também apresentou atividade anti-listéria (*L. monocytogenes* Scott) e com um amplo espectro de inibição contra outros micro-organismos Gram-positivos. A identificação das características moleculares, antimicrobianas e físico-químicas desta bacteriocina viabiliza o futuro uso tecnológico de *P. pentosaceus* CFR SIII na biopreservação de vegetais minimamente processados ou em preparações de queijos (Halami et al., 2010).

Kimchi é um vegetal fermentado tradicional da Coreia, proveniente da fermentação espontânea por várias espécies de micro-organismos e, frequentemente espécies de BALs são encontradas neste alimento. A cepa de *Pediococcus pentosaceus* T1 foi isolada deste vegetal por Jang et al. (2014). A adição desse isolado bacteriano em cultura concentrada permitiu média viabilidade da microflora total por 105 dias, com 5×10^5 UFC/mL contra 2×10^7 UFC/mL do controle. O controle das células viáveis mantém melhores propriedades sensoriais de acidez e textura. As cepas de *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc mesenteroides* isoladas de Kimchi foram suscetíveis ao sobrenadante de *P. pentosaceus* T1. A atividade desse sobrenadante resultou em halos de inibição de 12 mm (Jang et al., 2014).

4.1.2. Leite

O cultivo simples de *Pediococcus spp.* para a síntese de pediocina associada ao crescimento celular em leite e derivados lácteos limita-se pela restrição do metabolismo de lactose por essas bactérias ácido-láticas. O leite de soja apresenta baixos níveis de carboidratos, ácidos graxos e gordura, condições não muito favoráveis ao *Pediococcus acidilactici*. Sendo assim, a síntese de Pediocina PA-1 em co-cultura tende a ser vista como

uma alternativa, nesse artigo a co-cultura de *Enterococcus faecium* NCIM 5423, *Lactobacillus plantarum* Acr2 e *Pediococcus acidilactici* NCIM 5424 apresentou efeito inibitório contra *Listeria monocytogenes* Scott A promovendo acentuada diminuição celular ($3,2 \pm 0,03$ log UFC/mL para $0,03 \pm 0,12$ log UFC/mL) nas primeiras 8 horas, $2,2 \pm 0,03$ log UFC/mL em co-cultura com *E. faecium* NCIM e *Lb. Plantarum* Acr2) e para $2,2 \pm 0,03$ log UFC/mL co-cultura com as três bactérias lácticas. A viabilidade celular se manteve em $8,5 \pm 0,01$ log UFC/mL por 15 dias em ambas as condições de co-cultura, apresentando atividade antimicrobiana de 6,400 AU/mL a 25,600 AU/mL, havendo diminuição das células de *P. acidilactici* NCIM para $1,6 \pm 0,01$ log UFC/mL. Estes resultados demonstraram que a cepa de *P. acidilactici* NCIM cultivada em co-cultura em leite de soja não apresentou crescimento celular e síntese de bacteriocina favoráveis (Devi e Halami, 2011).

Somkuti e Stenbeirg (2010) avaliaram a síntese da pediocina por *Pediococcus acidilactici* PAF em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* em iogurte de leite desnatado e leite com 2% de gordura. A combinação de culturas entre *P. acidilactici* PAF e *Streptococcus thermophilus* ou a combinação com as três cepas de interesse, permitiu o aumento da concentração de galactose pela hidrólise de lactose por *L. delbrueckii* e síntese de pediocina por *P. acidilactici* PAF em leite desnatado com atividade inibitória de $3,200 \text{ AU/mL}^{-1}$. A expressiva diminuição na viabilidade celular de *L. monocytogenes* Scott A ($2 \times 10^3 \text{ UFC/mL}^{-1}$ para $0,1 \times 10^2 \text{ UFC/mL}^{-1}$) após tratamento com a pediocina sintetizada em iogurte de leite desnatado com culturas mistas por 16 dias a 4°C , demonstra o seu potencial antimicrobiano quando sintetizada em co-cultivo em leite fermentado.

4.1.3. Alimentos marinhos e peixes

A estratégia da biopreservação dos alimentos marinhos fermentados com o uso da pediocina ALP57 (pediocina PA-1) foi defendida por Pinto et al. (2009), por esta se tratar da primeira pediocina PA-1 caracterizada e isolada de alimentos marinhos não fermentados (ostras, mexilhões e moluscos) e por, possivelmente, a cepa *Pediococcus acidilactici* ALP57 apresentar maior adaptabilidade à peixes e frutos do mar. A síntese de pediocina PA-1 em alimentos marinhos fermentados e frescos vem sendo descrita porém, a sua utilização na biopreservação alimentar restringe-se a outros tipos de alimentos. Reforçando a aplicação de pediocina neste tipo de alimento, os autores desenvolveram testes de atividade com bactérias isoladas de alimentos marinhos como, por exemplo, a *L. monocytogenes* ESB54 (Densidade

ótica ($DO_{600nm} = 0,3$) que teve o seu crescimento inibido após o tratamento com a pediocina ALP57 (12,800 AU/mL), resultado similar ao observado contra *Listeria innocua* 2030c ($DO_{600nm} = 0,2$), no qual esta pediocina apresentou atividade de 6,400 AU/mL. A atividade antilisteria foi mantida no sobrenadante livre de células conservado a 4 °C por 6 meses.

A cepa de *Pediococcus pentosaceus* T1 isolada de Kimchi apresentou efeito antilisteria em filé de salmão tendo sido este efeito dose dependente e bastante expressivo na diminuição da viabilidade celular de *Listeria monocytogenes* ($1,3 \times 10^9$ UFC/mL para $>10^2$ UFC/mL). A concentração mínima inibitória (CMI) da cultura de *P. pentosaceus* T1 aplicada no salmão foi de 20 mg/mL, concentração menor quando comparada a CMI da nisina, e a pulverização desta cultura probiótica promoveu a redução da cepa de listeria de 10^7 UFC/mL para 10^3 UFC/mL (Jang et al., 2015).

4.1.4. Pães

Cizeikiene et al. (2013) propuseram avaliar a atividade antimicrobiana das bactérias ácido-láticas isoladas de alimentos quanto a biopreservação de pães, devido a prevalência de contaminação por esporos de *Bacillus subtilis* nas matérias-primas dos pães, nos equipamentos, na própria atmosfera das padarias industriais e nos pães mesmo após o procedimento de esterilização. As bacteriocinas sintetizadas por três cepas de *Pediococcus pentosaceus* (KTU05-8, KTU05-9 e KTU05-10) foram ativas contra os *Bacillus subtilis* e *Bacillus thuringiensis*. O controle da germinação (5×10^4 UFC/g⁻¹ de esporos de *Bacillus subtilis*) foi efetivo por 4 a 6 dias em pães estocados a 23 °C e a 30 °C após inoculação com 20 % de *Pediococcus pentosaceus* KTU05-9. A inibição de cepas Gram-negativa (*Pseudomonas* sp.) e de outras bactérias patogênicas foi reportada. A bacteriocina sintetizada pela cepa de *Pediococcus pentosaceus* KTU05-10 apresentou atividade inibitória contra *Escherichia coli* 25922.

4.1.5. Vinhos

Díez et al. (2012) reportaram máxima atividade da pediocina PA-1, produzida por *Pediococcus acidilactici* J347-29, a partir do sobrenadante dos cultivos com mosto de uva (40-60% com 2% de etanol ou 20% de mosto com 2-4% de etanol). Os autores avaliaram o controle do crescimento microbiológico após a adição de pediocina nos vinhos, com ou sem a combinação com agentes químicos antimicrobianos. A pediocina PA-1 apresentou efeito

bactericida contra 16 cepas de *Oneococcus oeni* (bactérias ácido-acética e etanol resistente) com concentração de inibição de 50% da população bacteriana (IC_{50}) de 19 ng/mL, efeito bacteriostático com IC_{50} de 312,5 ng/mL em 79% das BALs avaliadas, como também, efeito contra as leveduras testadas com $IC_{50} > 625$ ng/mL. Os autores também avaliaram a combinação de diferentes concentrações desta pediocina (10 ng/mL e 169 ng/mL) com metabissulfito frente a *O. oeni* e BALs, respectivamente, e observaram que com o IC_{50} (100 ng/mL) a diminuição da população de *O. oeni* foi duas vezes maior e quatro vezes maior nas espécies de bactérias ácido-láticas. Este estudo demonstra a benéfica aplicação da pediocina PA-1, durante os estágios de vinificação, na bioprevenção e controle do crescimento tanto de bactérias ácido-láticas, ácido-acéticas e leveduras.

4.2. Aplicação clínica

Atualmente, os estudos envolvendo os probióticos na profilaxia ou no controle de doenças inflamatórias, distúrbios gastrointestinais, alergias, diarreia, tumores e infecções pulmonares têm se intensificado bastante e, para se entender melhor o mecanismo de ação e aplicação destes micro-organismos, estudos *in vitro* e com modelos animais vêm sendo utilizados.

Através de estudos *in vitro*, Jensen et al. (2011) verificaram a viabilidade celular de *Pediococcus pentosaceus* após exposição ao suco gástrico simulado (pH 3,0) por 180 minutos, redução máxima de 1.0 log UFC após exposição deste micro-organismo ao líquido intestinal simulado com pancreatina e sais de bile e adesão de 6,2 % as células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29. Corroborando com os resultados anteriores, Mukherjee et al. (2013) verificaram viabilidade celular de *Pediococcus pentosaceus* CRA51 ($5,77 \pm 0,03$ log UFC/mL⁻¹ vs. $6,02 \pm 0,13$ log UFC/mL⁻¹) após exposição deste micro-organismo a simulada condição gástrica e adesão de 14 % as células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29, resultados que ajudam a demonstrar as propriedades probióticas do pediococcus e confirmar a sua potencialidade na aplicação de formulações alimentares com o objetivo de promover benefícios clínicos.

Estudos recentes demonstraram a complexa e importante interação existente entre a microbiota e o seu hospedeiro como, também, os benefícios clínicos ao hospedeiro relacionado à presença dos probióticos (Alexandre et al., 2014; Canibe e Jensen, 2012).

4.2.1. Ensaio *in vitro*

Para verificar as propriedades probióticas do *Pediococcus pentosaceus* OZF, alguns estudos *in vitro* foram realizados e, de acordo com os resultados obtidos este *Pediococcus* foi capaz de resistir ao pH baixo, aos sais biliares e não demonstrou nenhuma característica que o pudesse classificar como patogênico como, por exemplo, a γ -hemólise, susceptibilidade a antibióticos, e ainda apresentou atividade anti-listéria, autoagregação de 85,71 % e co-agregação de 6,26 % e 12,99 % com *Salmonella* entérica sorotipo *Typhimurium* SL 1344 e com *Escherichia coli* LMG 3083, respectivamente. Estes resultados permitiram classificar esta cepa de *Pediococcus* como segura (resistência ao pH ácido, aos sais biliares, aderência ao muco intestinal e colonização do trato gastrointestinal excluindo bactérias patogênicas) e ser capaz de promover uma imunomodulação no hospedeiro (Osmanagaoglu et al., 2010). Com o objetivo de avaliar a imunomodulação promovida por esta cepa de *Pediococcus*, estudos *in vivo* foram desenvolvidos e, a partir desses estudos, verificou-se viabilidade celular do *Pediococcus* de 10^7 UFC g⁻¹ no trato gastrointestinal de ratos pela recuperação de 10^6 UFC g⁻¹ da bactéria nas fezes destes animais. A administração oral desta cepa de *Pediococcus* aumentou a síntese de interleucina IL-6 ($89,15 \pm 7,89$ ng/mL⁻¹, $p < 0,001$), como também, nos ensaios *in vitro*, 10^4 UFC/mL⁻¹ de células mortas de *P. pentosaceus* OZF provocou o aumento de IFN- γ independente de interleucina 2 e as interleucinas são importantes mediadores humorais que participam na regulação da resposta imune. Os autores ressaltam a importância sobre a investigação da ação induzida à produção de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM para que seja possível a formulação de vacinas orais (Osmanagaoglu et al., 2013).

4.2.2. Imunomodulação

O processo de imunomodulação faz parte das propriedades probióticas das bactérias lácticas uma vez que a síntese de peptídeos antimicrobianos regula a colonização da microbiota intestinal, eliminando bactérias com alta capacidade de patogenicidade, recrutando o sistema imune para o combate do antígeno e mantendo a regulação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e diminuindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) (Mandal et al., 2014).

A imunomodulação intragástrica em ratos acometidos com lesão intraperitonal aguda, causada pela administração de 1,1 g/kg de D-galactosamina (D-GalN), tratados com uma mistura de bactérias lácticas incluindo o *P. pentosaceus* LI05, foi avaliada através da

verificação das funções histológicas dos animais, incluindo análise das enzimas, citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, TNF- α , IL- β) e a composição da microflora.

A combinação de *Lactobacillus salivarius* LI02 e *P. pentosaceus* LI05 promoveu a redução da alta concentração de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, prevenindo o acúmulo de bilirrubina nas células do fígado e do íleo, aumento os níveis de IL-10 e INF- γ e ativação da circulação de células T, evitando a desintegração da mucosa e criptas intestinais, dos vasos sanguíneos e a translocação da bactéria do meio intracelular para a corrente sanguínea. Os autores defendem o uso desta co-cultura, a partir de bactérias liofilizadas, para a prevenção de doenças hepáticas, assim como para evitar os danos ocasionados por enzimas envolvidas na formação da bile (Lv et al., 2014).

A cepa de *Pediococcus pentosaceus* JWS939, isolada do intestino de patos, promoveu efeitos interessantes na imunomodulação *in vitro* de macrófagos peritoneais de ratos e *in vivo* em ratos infectados com *Listeria monocytogenes*. Previamente, nos ensaios *in vitro*, verificou-se que houve a síntese de óxido nítrico e citocinas e, nos estudos *in vivo*, após administração oral de células vivas (5×10^7 UFC/mL), observou-se o aumento de óxido nítrico ($2,845 \pm 97,71$ pg/mL vs. $1683,64 \pm 35$ pg/mL), interleucina IL-1 β ($1082,57 \pm 298,12$ pg/mL) e fator anti-necrose TFN- α ($895,67 \pm 280,54$ pg/mL), três importantes imunomoduladores sintetizados pelos macrófagos que permite maior sobrevivência dos ratos infectados devido à supressão dos patógenos e controle do processo inflamatório. Desta forma, os autores propõem o uso desta cepa de *pediococcus*, com propriedades probióticas, em casos de processos inflamatórios gastrointestinais de patos (Choi et al., 2011).

O excesso da produção de imunoglobulina estimula os processos alérgicos do tipo 1 que são, normalmente, alergias alimentares e dermatites. A imunoglobulina IgE intermedeia a ligação dos antígenos nas superfícies celulares, produzindo mediadores químicos como leucotrienos e prostaglandinas e atribui-se a modulação da resposta ocasionada pelo IgE aos linfócitos T-helper do tipo Th 1 e Th2, interleucina 4 e IFN- γ . A cepa de *Pediococcus pentosaceus* Sn26 induz fortemente a síntese de IL-12, que é inibidora de IgE (sintetizado por linfócito Th1) e IFN- γ (secretado por linfócitos Th1), em ratos induzidos à diarreia alérgica através da administração oral de 10 mg de albumina do ovo, administrada 3 vezes por semana. A diarreia alérgica ocorreu em 80% dos animais, resultando em elevada concentração de IgE (2,000 ng/mL) nos animais do grupo controle, ou seja, nos animais que não recebem tratamento com probióticos. A supressão da síntese de IL-4 provocou um balanço entre Th1/Th 2 e um efeito anti-alérgico (Masuda et al., 2010).

A acidificação contínua, competição por substrato limitante e adesão celular promovendo a inativação de fatores de virulência são alguns mecanismos de ação das bactérias probióticas que ajudam a promover a imunomodulação no hospedeiro, com reforço na função de barreira das células epiteliais e síntese de bacteriocinas com atividade antimicrobiana. A função de barreira das células epiteliais desenvolve-se juntamente com o muco presente no local, somado à presença dos peptídeos antimicrobianos (β defensinas), fatores que ajudam a melhorar a estabilidade das junções intercelulares (Alexandre et al., 2014).

4.2.3. Atividade probiótica no trato gastro intestinal

Muitos estudos recentes buscaram compreender e avaliar o uso de probióticos em animais (estudos *in vivo*) e em humanos com o objetivo de melhorar os efeitos clínicos resultantes de infecções gastrointestinais (Mandal et al., 2014).

A translocação bacteriana da microbiota intestinal para locais extraintestinais (tecidos ou linfonos mesentéricos) é uma das principais causas de infecções em pacientes pós-cirúrgicos, que tiveram interrupção da barreira intestinal, uma condição que ocasiona o comprometimento da permeabilidade intestinal e deficiência no controle imunológico. O uso de probióticos para evitar ou diminuir esse tipo de risco está fundamentado em estudos como: duplo-cego com 80 pacientes recém-operados (pancreato-duodenectomia com preservação do piloro) e com aplicação de mistura probiótica (Synbiotic 2000®) contendo 1×10^{10} UFC/mL de cada bactéria (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Leuconostoc mesenteroides*), que ajudou na redução da incidência de infecções nosocomiais (2,5 % vs. 40 % do grupo controle) (Rayes et al., 2007). Rayes et al. (2005) observaram que a suplementação alimentar com esta mistura probiótica e fibras prebióticas num grupo de 66 pacientes com fígado transplantado, permitiu a incidência de 3% nos pacientes tratados e 48% nos pacientes do grupo controle. Olah et al. (2005) identificaram a diminuição da incidência (8%) de inflamação sistêmica ou em multi-órgãos em pacientes com pancreatite aguda, que receberam a mistura probiótica Synbiotic 2000 Forte®, comparada à incidência de 14% no grupo controle. Da mesma maneira, os pacientes que tiveram menores complicações no quadro clínico foram os tratados com probióticos.

A nutrição de rebanhos suínos por formulações com cereais (trigo, cevada, aveia) fermentadas por bactérias ácido-láticas, vem se tornando uma interessante alternativa para reduzir os impactos de doenças entéricas nesses animais. Pela própria fermentação, o alimento

se torna colonizado por bactérias probióticas da espécie *Pediococcus pentosaceus* (dominante neste tipo de alimento) produtoras de ácidos orgânicos e substâncias antimicrobianas, que regulam no equilíbrio da microbiota intestinal e atuam reduzindo a contaminação por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. (Canibe e Jensen, 2012).

Canibe e Jensen (2012) reuniram um conjunto de estudos sobre alimentação fermentada e os seus contribuintes microbiológicos que comprovassem os efeitos clínicos em porcos com diarreia após desmame, salmonelose, enteropatia proliferativa e disenteria suína. A diminuição da concentração de coliformes indicou, na maioria dos casos, baixo risco de permanecer a diarreia após desmame, redução do risco de contaminação dos rebanhos por cepas de *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella thyphimurium*, encurtando o período da enteropatia proliferativa porcina de 15,5 dias para 11,7 dias pela excreção de *Lawsonia intracellularis* ou pela sua baixa prevalência nas fezes (15 % vs. 26 %) em relação aos porcos que receberam outro tipo de alimentação. Da mesma maneira, houve diminuição na incidência de disenteria suína provocada por *Brachyspira hyodysenteriae* (44 % vs. 82 %), assim como diminuição da excreção fecal total por dia (21 % vs. ~45 %) comparado aos porcos que receberam alimentação sólida.

4.2.4. Redução do nível de Colesterol

Avaliando a influência do probiótico *Pediococcus pentosaceus* LP28 em grupos de ratos com obesidade induzida por dieta rica em lipídeos, Zhao et al. (2012) acompanharam o dinamismo metabólico ocasionado pela presença desta bactéria láctica. Esta cepa de *pediococcus* foi isolada da fruta longan (*Euphoria longana*) e administrada por via oral numa concentração de $1,25 \times 10^9$ UFC/g nos grupos controles, obesos induzidos e obesos induzidos com dieta modificada após 8 semanas. A indução da obesidade nos ratos provocou o aumento do peso corpóreo ($32,0 \pm 0,7$ g vs. $27,0 \pm 0,6$ g), colesterol plasmático (1257 ± 44 mg/L vs 804 ± 51 mg/L), tecido adiposo ($2,86 \pm 0,6$ g vs. $0,57 \pm 0,01$ g), colesterol livre ($6,6 \pm 2,2$ mg vs. $5,1 \pm 0,8$ mg) e triglicerídeos livre ($27,9 \pm 2,9$ mg vs $23,3 \pm 5,1$ mg). A suplementação com *P. pentosaceus* LP28 proporcionou redução de 40 % no peso corporal dos ratos obesos demonstrando o significativo efeito da dieta suplementada com probiótico no ganho de gordura corporal e que a ausência de suplementação proporciona um ganho de 10,2 g no peso, aproximadamente 1,2 g de gordura visceral adquirida. Quando os animais receberam alimentação não suplementada, apresentaram um ganho de 6,2 g no peso corpóreo e ganho

menor que 1,2 g de gordura visceral. Por ter ocorrido a diminuição dos adipócitos em número e tamanho, a quantidade de colesterol hepático foi menor (Zhao et al., 2012).

Quanto à expressão genética do fígado após a dieta com alimentação incluindo bactéria láctica, a expressão dos genes CD36, SCD1 e PPAR γ mantiveram-se reduzidas. O transporte de ácidos graxos e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade vinculam-se à expressão do gene CD36, cuja expressão se intensificou na condição de obesidade. A resistência ao acúmulo de gordura devido à conversão de ácido graxo saturado para monosaturado atrela-se à baixa regulação do gene SCD1. O mesmo ocorre com o gene PPAR γ , que participa do metabolismo do tecido adiposo regulando a homeostase de triglicerídeos livres, evitando o excesso de fontes de gorduras livres aos ratos tratados com a cepa probiótica de *P. pentosaceus* LP28 (Zhao et al., 2012).

A diminuição do colesterol pelo uso da suplementação alimentar probiótica com *P. pentosaceus* KID7 foi investigada por Damodharan et al. (2015) através de estudos com ratos induzidos à hipercolesterolemia a partir da alimentação. Esta suplementação alimentar provocou a redução de 19,8 % do colesterol sérico total e 35,5 % do nível de LDL. Nutricionalmente esses animais são induzidos a apresentarem maior expressão de genes correlacionados aos receptores de lipoproteínas (LDLR, hidroxilase-7 α -colesterol (CYP7A1) e apolipoproteínas E (APOE) na presença das bactérias probióticas. O resgate de LDL para a formação de reservatório lipídico nos adipócitos tende a ser mais efetivo na condição de hipercolesterolemia nos ratos alimentados com *P. pentosaceus* KID7, diminuindo a regulação de HMG CoA-redutase e receptores LDL por fed-back negativo. Geneticamente, CYP7A1 codifica a enzima hidroxilase-7-colesterol relacionada à conversão de ácidos da bile através do colesterol hepático, concentrando o ácido cólico formado nas fezes. O notável mecanismo para a perda de colesterol como efeito ocasionado pela presença da bactéria láctica deve-se à atividade da hidrolase na formação de sais da bile.

Em estudos *in vitro* com algumas cepas de *Pediococcus* foi possível observar a redução do nível de colesterol de 58 a 73 % em meio de cultura com adição de 100-200 μ L de colesterol na presença de 0,3 % de bile (Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2013). Os estudos também demonstraram a diminuição entre 2 e 12 % no colesterol sérico, 30,5 % e 14,9 % do colesterol total hepático após o uso das cepas de *P. acidilactici* M76 e DSM 20284, respectivamente (Moon et al., 2014).

Para estudos com animais, 0,2 mL do suplemento probiótico (10^8 UFC/mL/dia) de cada probiótico: *Bifidobacterium longum* SPM 1205, *Lactobacillus acidophilus* e *Pediococcus pentosaceus*) adicionado à formulação prebiótica com 5 ou 10 % de celulose e administrado

diariamente a ratos por 2 semanas, promoveu a redução do colesterol total de 73 a 51 mg/dL, redução do HDL de 12 a 7 mg/dL e aumento da viabilidade celular de $5,51 \pm 0,81$ para $6,11 \pm 0,69$ log UFC/g de fezes, reduzindo a atividade das enzimas β -glucosidase, β -glucoronidase e triptase (enzimas envolvidas na geração de compostos tóxicos e carcinogênicos) no bolo fecal (Lee et al., 2011).

4.2.5 Atividade simbiótica entre bactérias lácticas probióticas no trato respiratório

Mediante as evidências clínicas benéficas dos probióticos, Alexandre et al. (2014) avaliaram a função destes micro-organismos juntamente com a microbiota alveolar e pulmonar no trato respiratório com o objetivo de fundamentar o uso dos probióticos com finalidade terapêutica nos casos de infecções respiratórias como, por exemplo, na pneumonia adquirida ou nosocomial, bronquite obstrutiva crônica e fibrose cística. A formulação simbiótica Synbiotic 2000 Forte[®] composta por *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* e *Lactobacillus plantarum* administrada em pacientes com pneumonia adquirida permitiu o avanço no tratamento desta doença.

Na pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), infecção frequente caracterizada pela colonização bacteriana das vias respiratórias e parcialmente das vias aerodigestivas e formação de biofilme, atualmente tratada com o uso de antibióticos combinados com antifúngicos (Alexandre et al., 2014), poderia apresentar resultados melhores e mais rápidos com o uso concomitante dos probióticos.

Knight et al. (2009) analisaram o efeito dos probióticos quando administrado (10^{10} UFC/mL) por via oral ou nasal, duas vezes ao dia por 28 dias, em 130 pacientes ingleses submetidos à ventilação mecânica por pelo menos 2 dias. A incidência de pneumonia adquirida foi 4 % menor no grupo de pacientes tratados concomitantemente com os probióticos (grupo probiótico= 9 % vs. grupo controle = 13 %) e redução na mortalidade de aproximadamente 5 %. Kotzampassi et al. (2006) e Spindler-Vesel et al. (2007) também obtiveram progressos com o uso da formulação probiótica. Kotzampassi et al. (2006) em estudo duplo-cego randomizado com 65 pacientes gregos acometidos com as seguintes doenças: síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepsis severa, múltiplos traumas e pacientes submetidos à ventilação mecânica pulmonar, os quais receberam tratamento coadjuvante com os probióticos, 54 % destes pacientes apresentaram novo quadro de infecção após o tratamento, enquanto que no grupo controle (sem tratamento com os probióticos), 80 %

(30 pacientes) apresentaram uma re-infecção, resultado que demonstra o efeito clínico benéfico dos probióticos, como o *Pediococcus pentosaceus*. Com probabilidade de re-infecção 0,30 menor no grupo tratado. A taxa de mortalidade dos pacientes foi duas vezes menor no grupo de pacientes que receberam os probióticos em relação ao grupo controle (14 % vs. 30 %, respectivamente), demonstrando o efeito clínico benéfico do uso dos probióticos como *P.pentosaceus*.

Spindler-Vesel et al. (2007) também observaram o benéfico efeito clínico do uso dos probióticos em seu estudo no qual demonstraram mortalidade de 8%, a incidência de 15% e probabilidade (0,09) de re-infecção em 26 pacientes tratados com formulação probiótica (10^{10} UFC/mL/dia) administrada diariamente por via nasal ou oral até a eliminação de uma unidade. No grupo controle, ocorreu 39% de incidência (26 pacientes), a probabilidade de re-infecção foi 0,89 e 6 % de mortalidade.

4.2.6 *Pediococcus* spp. como probiótico vaginal

A colonização da mucosa vaginal por bactérias ácido-láticas é bastante importante uma vez que essas bactérias promovem o equilíbrio da microbiota vaginal e minimizam o risco de infecções como, por exemplo, infecções por *Listeria monocytogenes*. De acordo com o estudo de Borges et al. (2013), 35 cepas de *Pediococcus* spp. foram capazes de crescer, quando cultivadas em meio de cultivo formulado com os mesmos componentes presentes no fluido vaginal (pH 4,2), sendo que 62,5 % delas produziram bacteriocina com atividade entre 400 e 6,400 AU/mL. A cepa de *Pediococcus pentosaceus* SB83 foi isolada e as suas características foram determinadas. Este *Pediococcus* não apresentou fatores de virulência, produção de gelatinase, lipase e DNase, atividade hemolítica e genes de virulência assim como demonstrou considerável susceptibilidade aos antibióticos testados, moderada ou fraca formação de biofilme e alta viabilidade, com redução apenas de 0,3 log UFC mL⁻¹ após 48 horas de cultivo. Por apresentar atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e por promover a acidificação vaginal, condições que ajudariam a evitar casos de listeriose, o *Pediococcus* foi caracterizado como um potencial probiótico de aplicação vaginal. Porém, deve-se considerar a restrição do uso deste micro-organismo em mulheres grávidas em virtude da baixa imunidade, que ocorre durante a gestação, para que assim seja evitada a transmissão de doenças neonatais ao feto como, até mesmo, o aborto.

5. Conclusão e perspectivas

A respeito do importante potencial e valor da produção de bacteriocina por *Pediococcus*, esta revisão reúne o que já se tem conhecimento sobre *pediococcus* associado às bacteriocinas e sobre o uso destes probióticos em alimentos e aplicações clínicas, através da revisão sobre a classificação, modo de ação, determinantes genéticos, espectro de atividade e fatores que influenciam a produção desta bacteriocina. O caminho para futuras aplicações de *Pediococcus* e da comercialização das suas bacteriocinas dependerão do uso da cepa bacteriana “per se” e/ou da necessidade de purificação em maior ou menor grau desses peptídeos. Por conseguinte, deve ser enfatizado o aumento dos estudos sobre o uso do *Pediococcus* tanto como agente probiótico quanto produtor de bacteriocinas, visando a ampliação do seu emprego em biotecnologia.

6. Referências

- Abee T, Krockel L, Hill C, 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 28(2), 169-185.
- Abrams D, Barbosa J, Albano H, Silva J, Gibbs A P, Teixeira P, 2011.
Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. **Journal Elsevier: Food control**, 22, 940-6.
- Albano H, Todorov SD, Van Reenen CA, Hogg T, Dicks LMT, Teixeira P, 2007.
Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International journal of food Microbiology**, 116, 239-47.
- Albano H, Pinho C, Leite D, 2009. Evaluation of bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as biopreservative for “Alheira” a fermented meat sausage. **Journal Elsevier: Food Control**, 20, 764-70.
- Alexandre Y, Blay GL, Gastrin SB, Gall FL, Arnaud GH, Gouriou S, Vallet S, Berre RL. ,2014. Probiotics: A new way to fight bacterial pulmonary infections? **Journal Elsevier Masson: Médecine et maladies infectieuses**, 44, 9-17.
- Allison, G E., and Klaenhammer, T. R. 1999. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria and their use in novel industrial applications." **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. ASM Press, Washington, DC, 789-808.

Anastasiadou S, Papagianni M, Ambrosiadis I, Koidis P, 2008(a).

Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Journal Elsevier: Enzyme and Microbial Technology**, 43, 448-54.

Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P., 2008(b).

Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B 5627: production conditions, purification and characterization. **Journal Bioresource Technology**, 99, 5384-90.

Aucher W, Lacombe C, Héquet A, Frère J, Berjeaud JM.,2005.

Influence of amino acid substitutions in the leader peptide on maturation and secretion of mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology, Washington**, 187(6), 2218-23.

Aymerich T, Holo H, Hävarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF,2005.

Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Applied and environmental Microbiology**, 62(5), 1776-82.

Barbosa J, Borges S, Teixeira P, 2015. *Pediococcus acidilactici* as probiotic to be used in food industry. **International Journal of Food Science and Techonology**, 50, 1151-57.

Belhadj H, Harzallah D, Bouamra D, Khenouf S, Dahamna S, Ghadbane, M.,2014.

Phenotypic and Genotypic characterization of some lactic acid bacteria isolated from Bee Pollen: A preliminary Study. **Bioscience of microbiota, Food and Health**, 33(1), 11-23.

Bhowmik T, Marth EH, 1990. B-galactosidase of *Pediococcus* species: induction, purification and partial characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 33,317:23.

Borges S, Barbosa J, Silva J, Teixeira P, 2013. Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. **Journal of Applied Microbiology**, 115,527-38.

Bruno MEC, Montville TJ,1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiology**, 59(9), 3001-10.

Canibe N, Jensen BB, 2012. Fermented liquid feed- Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs. **Journal Elsevier: Animal Feed Science and Technology**. 173, 17-40.

Carafa I, Nardin T, Larcher R, Viola R, Tuohy K, Franciosi E.,2015.

Identification and characterization of wild lactobacili and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. **Journal Elsevier: Food Microbiology**, 48,123-132.

Cizeikiene D, Juodeikeine G, Paskevicius A, Bartkiene E,2013.

Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Journal Elsevier: Food Control**, 31,539-45.

Choi HJ, Kim JY, Shin SM, Lee SM, Lee WK, 2011.

Immuno-modulatory effects of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* JWS 939 in Mice. **Korean J. food Sel. Anl. Resource**, 31(5), 719-26.

Cleveland J, Mointville TJ, Nes IF, Chikindas ML, 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**. 71, 1-20.

Cotter PD, Hill C, Ross RP, 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature publishing group: Reviews**. 3,777-88.

Dabour N, Zihler A ,Kheadr E , Lacroix C, Fliss I.,2009.

In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. **International Journal of food and microbiology**. 133, 225-233.

Daw MA, Falkiner FR, 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. **Jounal Elsevier: Micron**. 27(6):467-479.

Deegan LH, Cotter PD, Hill C. Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**. 16,1058-71.

Devi SM, Halami PM, 2011. Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria. **Curr. Microbiol**. 63, 181-85.

Diep DB, Skaugen M, Salehlan Z, Holo H, Nes IF.,2007.

Common mechanism of target cell recognition and imunity for class II bacteriocins. **Journal PNAS org**. 104(7) 2384-89.

Driessen A.J.M, Van den Hooven H.W, Kuiper W, Camp M.V, Sahl H.G, Konings R.N.H, Konings W.N., 1995. Mechanistic studies of lantibiotic induced permeabilization of phospholipid vesicles. **Biochemistry, Washington**. 34(5):1606-14.

- Diéz L, Rojo-Bezares B, Zarazagua M, Rodríguez JM, Torres C, Ruiz-Larrea F, 2012.
Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. **Journal Elsevier: Food Microbiology**, 31,167-72.
- Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Journal ASM org: Microbiology and molecular biology Reviews**, 70(2),564.
- Eisjsink, V GH, Skeie, M, Middelhoven, PH., Bruberg, MB, Nes, IF, 1998.
Comparatives studies of Class IIa bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(9), 3275–3281.
- Eisjsink, VGH, Axelson, L, Diep, DB, Harvastein, LS, Holo, H, Nes, IF, 2002.
Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 81, 639-54.
- Engelhardt, H, Albano, G, Kiskó, G, Farkas, CM, Teixeira, P, 2015.
Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA 6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions. **J. Food Microbiol**, 48, 109-15.
- Ennanhar, S, Sashihara, T, Sonomoto, K, Ishizaki, A, 2000.
Class IIa Bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity. **Journal Elsevier Few's microbiology**, Reviews 24, 64-106.
- Federici, S, Ciarrocchi, F, Campana, R, Ciandrini, E, Blasi, G, Baffone, W, 2014.
Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. **Journal Meat Science**, 98,575-84.
- Fimland, G, Jonhsen, L, Dalhus, B, Nissen-Meyer, J, 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action. **Journal Peptide Science**, 11, 688-96.
- Guerra NP, Bernárdez PF, Castro LP, 2008. Modelling the stress inducing biphasic growth and pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRI B-5627 in re-alkalized fed-batch cultures. **Journal Biochemical Engineering**, 40,465-72.
- Halami PM, Badarinath V, Devi SM, Vijayendra SVN., 2010. Partial characterization of heat-stable, antilisterial and cell lytic bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* CFR SIII isolated from a vegetable source. **Springer: Ann Microbial**, 61, 323-30.
- Holzapfel WH, Franz CMAP, Ludwig W, Back W, Dicks LMT, 2006.
Genera *Pediococcus* *Tetragenococcus*. **The prokaryotes: springer**, 229-66.

- Holzapfel W, Wood BJB, 2014. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy. The Genus *Pediococcus*, 1^a ed. **United Kingdom: John Wiley & Sons.**
- Huang Y, Luo Y, Zhai Z, Zhang H, Yang C, Tian H, Li Z, Feng J, Liu H, Hao Y.,2009. Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Journal Elsevier: Food Control.** 20, 1030- 35.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B,1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiology Review**, 59,171-200.
- Jang S, Lee J, Jung U, Choi HS, Suh HJ, 2014. Identification of anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from kimchi, a traditional fermented vegetable. **Journal Elsevier: Food Control**, 43:42-48.
- Jang S, Lee D, Jang Sii, Choi HS, Suh HJ, 2015. The culture of *Pediococcus pentosaceus* T1 inhibits *Listeria* proliferation in Salmon fillets and controls maturation of kimchi. **Food Technology and biotechnology**, 53(1), 29-37.
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L, 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **Journal Elsevier: International Journal of Food Microbiology**, 153,216-222.
- Kingcha Y, Tosukhowong A, Zendo T, Roytrakuls S, Luxananil P, Chareonpornsook K, Valyasevi R, Jang S, Lee J, Jung U, Choi HS, Suh HJ,2012. Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control**, 25(1), 190-196.
- Knight DJW, Gardiner D, Banks A, Snape SE, Weston VC, Bengmark S, et al., 2009. Effect of symbiotic therapy on the incidence of ventilator associated pneumonia in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Intensive-care Med**, 35,854-61.
- Kolter R, Moreno F,1992. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. **Annual Review Microbiology**, 46,141-63.
- Kotzampassi K, Giamerellos-Bourboulis EJ, Voudouris A, Kazamias P, Eleftheriadis E.,2006. Benefits of symbiotic formula symbiotic 2000 forte) in critically III trauma patients: early results of a randomized controlled trial. **World J surg.**, 30, 1848-1855.
- Klaenhammer TR., 1993.Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiological Review**, 12, 39-85.

- Kotelkinova EA, Gelfand MS, 2002. Bacteriocin production by Gram positive bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. **Russian journal of Genetics**, 38(2), 628-41.
- Lee DK, Park SY, Jang S, Baek EH, Kim M.J, Huh S.M, Choi K.S, Chung M.J, Kim E.J., 2011. The combination of mixed lactic acid bacteria and dietary fiber lowers serum cholesterol levels and fecal harmful enzyme activities in rats. **Springer: Archives Pharmacal Research**, 34(1), 23-29.
- Lv XL, Hu XJ, Qian GR, Zhang H, Lu H.F, Zheng, B.W, Jiang L., Li L.J., 2014. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 and *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D- galactosamine in rats. **Springer: Appl. Microbial. Biotechnological**, 98, 5619-32.
- Madigan MT, Martinko JM, Clark DP., 2010. Microbiologia de Brock, 12^a ed., Porto Alegre: **Artmed**.
- Mandal SM, Silva ON, Franco OL., 2014. Recombinant probiotic with antimicrobial peptides: a dual strategy to improve immune response in immunocompromised patients. **Journal Elsevier: Drug discovers today**, 19(8), 1046-50.
- Marakova KS, Koonin EV, 2007. Evolutionary genomics of Lactic Acid bacteria. **J. Bacteriol.** 189:1199-1208.
- Martino ME, Maifreni M, Marino M, Bartolomeoli I, Carraro L, Fasolato L, Cardazzo B, 2013. Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterization of penocin operon. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 103, 1149-63.
- Masuda T, Kimura, M, Okada S, Yasui H, 2010. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. **Bioscience Biotechnology Biochemical**, 74(2), 329-35.
- Mointville TJ, Chen Y, 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Springer: Appl. Microbial Biotchnol**, 1998, 50, 511-19.
- Moll GN, Konings WN, Driessen AJM, 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie Leeuwenhoek, Netherlands**, 76(1), 185-98.
- Moon YJ, Baik SH, Cha YS, 2014. Lipid-Lowering effects of *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from Korean traditional makgeolli in high fat diet induced obese mice. **Nutrients**, 6, 1016-28.
- Mukherjee S, Singh AK, Adhikani MD, Ramesh A, 2013. Quantitative appraisal of the probiotic attributes and in vivo adhesion potential of anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Springer: Probiotic & Antimicrobial**, 5, 99-109.
- Nagamouchi K, Fliss I, Drider D, Lacroix C, 2008. Pediocin PA-1 production during repeated-cycle batch culture of immobilized *Pediococcus acidilactici* UL5 cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105(5), 513-17.

- Nes IF, Diep Dp, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H, 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht**. 60:113-28.
- Nieto-Lozano JC, Reguera-Useros JI, Pelàez-Martínez MDC, Sacristán-Pérez-Minayo G., Guitiérrez-Fernández AJ, Hardisson Del La Torre A., 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and “frankfurters”. **Journal Elsevier: Food Control**, 21,679-85.
- Ojcius DM, Young JDE, 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides – is there a common structural motif. **Trends in Biochem. Sci, Oxford**, 16(6), 225-229.
- Osmanagaoglu O, Kiran F, Ataoglu H, 2010. Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. **Springer: Probiotics and antimicrobials**, 2:162-74.
- Osmanagaoglu O, Kiran F, Nes IF, 2011. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH-PA-1. **African Journal of Biotechnology**, 10(11):2070-79.
- Osmanagaoglu O, Kiran F, Yagci FC, Gursel I, 2013. Immunomodulatory function and in vivo proprieties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain. **Springer: Ann. Microbiol**, 63, 1311-18.
- Oh YJ, Jung DS, 2015. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. **Journal Elsevier: Food Science and Technology**, 63:437-44.
- Oki K, Rai AK, Sato S, Watanabe K, Tamang JP., 2011. Lactic acid bacteria isolated from ethnic preserved meat products of the Western Himalayas. **Food Microbiology**, 28:1308-15.
- Olah A, Belagyi T, Issekutz A, et al, 2005. Combination of early nasojejunal feeding with modern synbiotic therapy in the treatment of severe acute pancreatitis (prospective, randomized, double-blind study). **Magy Seb**, 58,173–178.
- Papagianni M, 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnol, Adv Thessaloniki**, 21(1):465-99.
- Papagianni M, Anastasiadou S, 2009. Pediocins: The bacteriocins of *Pedococci*. Sources, production, properties and applications. **Biomed Central: Microbial Cell Factories**, 8(3):1-16.
- Papagianni M, Papamichael EM, 2014. 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. **Journal Elsevier: Process Biochemistry**, 49,2044-48.

- Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs PA.,2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non fermented seafood. **Journal Elsevier: International Journal of Food Microbiology**, 129,50-58.
- Piva A, Headon DR,1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. **Microbiology**, 140,697-702.
- Quadri LEN, Sailer M, Terebiznik MR, Roy KL, Vederas JC, Stiles ME.,1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of the carnobacteriocins B2 and BM1. **J. Bacteriology, Whashington**, 177,1144-51.
- Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, et al, 2005. Supply of preand probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation: a randomized, double-blind trial. **Am. J. Transplant**, 5, 125-30.
- Rayes N, Seehofer D, Theruvath T, et al, 2007. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: a randomized, double blind trial. **Ann Surg**, 246: 36-41.
- Sahl HG, 1991. Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. In: Jung J, Sahl HG (Ed). Nisin and novel lantibiotics. **Leiden: Escom**. 347-58.
- Simha BV, Sood SK, Kumariya R, Garsa AK, 2012. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. **Journal Elsevier: Microbiological Research**, 167,544-549.
- Somkuti GA, Steinberg DH, 2010. Pediocin production in milk by *Pediococcus acidilactici* co-culture with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. **Journal in Microbiological Biotechnology**, 37:65-69.
- Spindler-Vesel A, Bengmark S, Vovk I, Cerovic O, Kompan L.,2007. Symbiotics prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. **IPEN J Parenter Enteral Nutr**, 31:119-26.
- Schulz D, Pereira MA, Bonelli RR, Nunes MM, Batista, CRV.,2003. Bacteriocinas: mecanismos de ação e uso na conservação de alimentos. **Alim Nutr, Araraquara**, 14(2):229-35.
- Synder AB, Worobo RW, 2014. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. **Journal science Food Agricolal**, 94,28-44.
- Todorov S, Dicks LMT, 2009. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from (*Scerocarya birrea*). **International journal of Food microbiology**, 132,117-136.
- Todorov S, Dicks LMT.,2005. Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Journal Elsevier: Process Biochemistry**, 40,365-370.

- Venkateshwari S, Halami P, Vijayendra SVN, 2010. Characterization of the heat-stable bacteriocin-producing and vancomycin-sensitive *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 isolated from beans. **Journal Beneficial microbes**, (1), 159-164.
- Vidhyasagar V, Jeevaratnam K, 2013. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. **Journal Elsevier: Functional foods**, 5:235-243.
- Damodharan, K, Lee, YS., Palaniyandi, SA., Yang, S.H., Suh, JW., 2015. Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. **Frontiers in microbiology**, 6(768).
- Zhao X, Higashikawa F, Noda M, Kawamura Y, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M., 2012.
The obesity and fatty liver are reduced by plant-derived *Pediococcus pentosaceus* LP28 in high fat diet-induced obese mice. **Plos One**, 7(2).
- Xie L, Van Der Donk WA, 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology, Oxford**, 8(5), 498-507.
- WHO/FAO, 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Foos. **London, Ontario, Canada**, April 30 and May.

CAPÍTULO II

Efeito da adição de polidextrose no crescimento celular, na produção de ácido láctico e na atividade antimicrobiana de *Pediococcus pentosaceus* ATCC® 43200: cultivo em agitador rotativo.

Resumo.....	37
1.Introdução	39
2.Resultados e discussão	41
2.1 Crescimento celular	41
2.2 Consumo de substrato e formação de ácido láctico.....	43
2.3 Atividade de bacteriocina.....	46
2.4 Análise estatística	47
3 . Conclusão	53
4. Materiais e métodos	54
4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivos.....	54
4.2 Preparo do meio de cultivo , do pré-inóculo e condições de cultivo	54
4.3 Planejamento experimental	55
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana da bacteriocina	56
4.5 Procedimentos das análises.....	56
4.6 Análise estatística	57
5. Referências bibliográficas	57

Efeitos da adição de polidextrose no crescimento celular, na produção de ácido láctico e na atividade antimicrobiana de *Pediococcus pentosaceus* ATCC® 4320): cultivo em agitador rotativo.

Maria Carolina W.Porto, Taís Kuniyoshi, Felipe Rebello Lourenço, Michele Vitolo e Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Resumo

Introdução: Os efeitos prebióticos da polidextrose foram avaliados na otimização do crescimento e produção de bacteriocina por *Pediococcus pentosaceus* ATCC® 43200™.

Resultados: No meio MRS- sem polidextrose, *P. pentosaceus* ATCC® 43200™ foi capaz de crescer nos ensaios controle A ($X_{\max}=3,78 \text{ g.L}^{-1}$) e controle B ($X_{\max}=4,38 \text{ g.L}^{-1}$), respectivamente. No meio MRS suplementado com 1% de polidextrose foi obtida concentração celular ($X_{\max}=4,77 \text{ g.L}^{-1}$) próxima à alcançada no controle B. Com relação à velocidade máxima de crescimento $\mu_{\max}$ e ao tempo de geração (tg) no controle A ($\mu_{\max} = 0,95 \text{ h}^{-1}$ e $tg=0,73 \text{ h}$), a bactéria láctica atingiu crescimento 6,32% maior do que no controle B ($\mu_{\max} = 0,89 \text{ h}^{-1}$ e $tg = 0,78 \text{ h}$) e no MRS com 1% de polidextrose ($\mu_{\max} = 0,90 \text{ h}^{-1}$ e $tg = 0,77 \text{ h}$). A fermentação da polidextrose ocorre mais lenta, como esperado, por tratar-se de um polissacarídeo que precisa ser clivado para ser transportado via sistema de fosfotransferência de fosfoenolpiruvato para dentro da célula bacteriana. A máxima concentração celular ($X=10,24 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtida no MRS com 1,5% de polidextrose permitindo produtividade celular Pr_x de $0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. No controle B, MRS-glicose, as velocidades de consumo de substrato e formação de ácido láctico ($0,11 \text{ g/gcel. h}^{-1}$) foram similares. *P.pentosaceus* ATCC® 43200™ consumiu $11,3 \text{ g.L}^{-1}$, equivalente, a 70,54% da glicose inicial. A produção de ácido láctico ($\text{ác.lac}=12,45 \text{ g.L}^{-1}$) foi 50,84% e 43,61 maior do que no controle A ($\text{ác.lac}=6,12 \text{ g.L}^{-1}$) e no MRS-1% de polidextrose ($\text{ác.lac}=7,02 \text{ g.L}^{-1}$), respectivamente, e resultou na produtividade máxima ($Pr_p = 0,52 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A atividade antimicrobiana da bacteriocina tinha sido constatada com *Listeria monocytogenes* 101 e *Escherichia coli* ATCC 25922 com amostras de sobrenadantes isentas de células. Com as amostras de cultivo de MRS com 1% de polidextrose (ensaios centrais), MRS com 0,5% de polidextrose e MRS com glicose (controle A e B), 3200 AU/mL de bacteriocina foi quantificada frente à *Listeria monocytogenes* 101, como cepa bioindicadora. Bacteriocinas produzidas pelo gênero *Pediococcus* possuem dificuldade de agir em bactérias Gram-negativas. Neste trabalho foi obtida uma atividade de 6400 AU/mL, cultivando a bactéria estudada em MRS-0,5% de polidextrose e quantificada

com *E.coli* ATCC 25922; ou seja, duas vezes a mais do que a quantidade observada com *L. monocytogenes* 101. As amostras utilizadas para a quantificação foram coletadas entre 3-4 horas de crescimento na fase exponencial. Por fim, a partir da análise estatística feita com os resultados de crescimento celular, pH e produtos (bacteriocina e ácido láctico) foi obtida a condição ótima de cultivo para a produção de bacteriocina.

Conclusão: Os resultados obtidos apresentam relevância para a produção industrial de pediocina por *P.pentosaceus* ATCC43200 e fundamentam o uso de polidextrose como prebiótico fermentável por bactéria ácido-lática.

Palavra-chave: Pediocina, *Pediococcus pentosaceus* ATCC® 43200™, polidextrose, prebiótico

Correspondente: rpsolive@usp.br

1. Introdução

As bactérias ácido-láticas (BALs) compõem um importante grupo de bactérias com perfil GRAS (Geneticamente consideradas seguras), conforme a administração americana de drogas e alimentos (FDA). *Pediococcus*, BAL homofermentativa, vêm sendo aplicada como culturas iniciadoras de fermentação em salsichas, embutidos cárneos, pepinos, pães, queijos e vinhos (Cizeikiene et al., 2013; Díez et al., 2012; Martino et al., 2013; Pinto et al., 2009; Venkateswari et al., 2010). São bactérias Gram-positivas, catalase e oxidase negativas, reorganizadas em tetrade (cocos) com capacidade de produzir bacteriocinas. Bacteriocinas são peptídeos com atividade antimicrobiana utilizadas como conservantes alimentares naturais (Cleveland et al., 2001; Halami et al., 2010). As pediocinas fazem parte da classe II das bacteriocinas, pequenas, termoestáveis, não contêm peptídeos de Lantionina e possuem atividade antimicrobiana frente a *Listeria* sp (Cotter et al., 2005).

A seguir estão citadas algumas cepas produtoras de pediocinas: *P. pentosaceus* ST18 (Todorov e Dicks, 2005), *P. pentosaceus* SM-I (Anastasiadou et al., 2008), *P. pentosaceus* ST44M (Todorov e Dicks, 2009), *P. pentosaceus* OZF (Osmanagaoglu et al., 2011), *P. pentosaceus* R38 e *P. pentosaceus* Cb4 (Devi e Halami, 2011), *P. pentosaceus* 3772 (Kingcha et al., 2012), *P. pentosaceus* NDCD 273 (Simha et al., 2012), *P. pentosaceus* T1 (Jang et al., 2014) e *P. pentosaceus* K34 (Kaur et al., 2014).

Como probióticos, as cepas de *Pediococcus pentosaceus* apresentam parcial resistência ao suco gástrico, a pancreatina e a bile e são capazes de aderir as células intestinais adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) promovendo a colonização do trato gastrointestinal com a exclusão de bactérias patogênicas (Barbosa et al., 2015; Jensen et al., 2011; Mukerjee et al., 2013). Os efeitos biológicos ocasionados por estas bactérias em animais e humanos são relevantes para as terapias clínicas. A imunomodulação intragástrica proporcionada pelo *P. pentosaceus* LI05 previniu o acúmulo de bilirrubina no fígado, a desintegração da mucosa intestinal aumentando a circulação de células de defesa T, interleucina 10 e interferon gama (INT- γ) em ratos acometidos com lesão intraperitoneal aguda (LV et al., 2014). Nos patos acometidos com infecção intestinal por *Listeria monocytogenes*, a administração de *P. pentosaceus* JWS939 suprimiu a ação da bactéria patogênica, permitindo o aumento de óxido nítrico, interleucina IL-1 β e fator anti-necrose TNF- α que são importantes fatores sintetizados pelos macrófagos (Choi et al., 2011).

A grande parte deste grupo fermenta glicose, manose, sacarose, galactose e frutose e variam quanto ao padrão de fermentação em relação à lactose, raffinose, maltose e ribose. O perfil de fermentação da fonte de carbono tornou-se cepa-dependente (Martino et al., 2013). Os *P.pentosaceus* SW01 como o *P.pentosaceus* SW05 não fermentam arabinose, xilose, arabitol, xilitol, inositol. Porém a primeira, fermenta tagatose e não fermenta lactose, sacarose e raffinose, enquanto que o *P. pentosaceus* SW05 produz ácido lático com raffinose, sacarose, maltose e ribose (Oh et al., 2015).

A polidextrose (PDX) é constituída por monômeros de glicose conectados através de ligações osídicas alfa e beta. É uma molécula altamente ramificada e fermentável por bactérias constituintes da microbiota intestinal (Roberfroid, 2007; Roytio e Owehand, 2014; Hernot et al., 2009). A fermentação é efetuada lentamente por culturas mistas de bactérias intestinais, à medida que a PDX transita ao longo da extensão do intestino desde a porção distal até o cólon em animais e humanos (Mäkeläinen et al., 2010_b). A PDX interferiu na composição da microbiota intestinal em humanos, sendo observada a prevalência de bactérias dos gêneros *Actinobacterium*, *Clostridiaceae*, *Akkermansia*, *Dialister* em detrimento das espécies dos gêneros *Ruminococcus*, *Eubacterium* e *Coprococcus* (Hooda et al., 2012).

A síntese de ácidos orgânicos e gases ocorre mais lentamente e em menores concentrações quando comparada às concentrações obtidas na fermentação de oligosacarídeos (Hernot et al., 2009). O butirato produzido na fermentação da PDX influencia na diferenciação celular da mucosa intestinal, assim como, na diminuição da resposta inflamatória do cólon em ratos (Roytio e Owehand, 2014). A saciedade, efeitos na formação de ácidos graxos e nos níveis de colesterol, além da regulação da constipação intestinal são alguns efeitos prebióticos mais comuns relatados em humanos. Os níveis de amônia fecal, compostos fenólicos, indol e cresol provenientes da fermentação proteica são reduzidos após a presença de PDX em ensaios *in vitro* (Mäkeläinen et al., 2010^a). A absorção intestinal de íons, como cálcio e magnésio foi melhorada em teste feito *in vitro* (Legette et al., 2012) e a de ferro em ensaio feito em ratos. Visto que a bactéria a ser estudada possui capacidade de produzir pediocina (Piva e Headon, 1994) e associando aos possíveis efeitos prebióticos da polidextrose, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da polidextrose no crescimento e produção de bacteriocina pelo *P.pentosaceus* ATCC[®] 43200[™] nas diferentes condições de cultivo.

2. Resultados e discussão

2.1 Crescimento celular

Analisando a figura 1 (a), *P. pentosaceus* ATCC 43200 cresceu nos cultivos nas condições controle A (pH=5, MRS-glicose, 100 rpm e 30 °C), controle B (pH=6, MRS-glicose, 100 rpm e 30°C) e centrais (pH=5, MRS-1,0% de polidextrose, 100rpm e 30°C). Nos dois controles (A e B) notou-se crescimento exponencial até o instante 9h de cultivo e início da fase estacionária em 12 horas. No meio sem suplementação de polidextrose (MRS-glicose) e pH=6, a concentração final ($X_{\max}=4,38 \text{ g.L}^{-1}$) foi próxima ao valor obtido em MRS suplementado com 1% de polidextrose ($X_{\max}=4,77 \text{ g.L}^{-1}$). A respeito da velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e do tempo de geração, estes ensaios atingiram resultados coincidentes ($\mu_{\max} = 0,89 \text{ h}^{-1}$, $t_g = 0,78\text{h}$; $\mu_{\max} = 0,90 \text{ h}^{-1}$ e $t_g = 0,77 \text{ h}$) e menores aos resultados obtidos no controle A ($\mu_{\max} = 0,95 \text{ h}^{-1}$ e $t_g = 0,73\text{h}$) ilustrados na tabela 2. Ou seja, o crescimento desta bactéria ácido láctica foi 6,32% maior no controle A. A fermentação da polidextrose ocorre de maneira lenta porque esse polissacarídeo deve ser clivado pela bactéria para que seja transportado para dentro da célula por transportadores específicos dependentes de ATP pelo sistema de fosfotransferência por fosfoenolpiruvato (Andersen et al., 2012; Hernot et al., 2009).

Figura 1(a)- Curvas de crescimento do *P. pentosaceus* ATCC 43200 nas condições centrais[central 1(■),central 2(●),central 3(▲) e central 4(*)pH 5,0, poli 1,0%,100rpm e 30°C],[controle A (◇)pH 5,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C] e [controle B (▲)pH6,0,poli 0%,100pm e 30°C] estabelecidas no planejamento experimental.

Tabela 2- Parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento celular de *P.pentosaceus* ATCC 3200, onde X_{24} equivale à concentração celular em 24 horas.

Ensaio	$X_{24}(\text{g.L}^{-1})$	$\mu_{max}(\text{h}^{-1})$	$t_g(\text{h})$	$Y_{x/s}(\text{g/g})$	$Y_{p/x}(\text{g/g})$	$Pr_x(\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$
Cont.A	3,78	0,95	0,73	0,47	1,62	0,16
Cont.B	4,38	0,89	0,89	0,39	2,84	0,18
1	5,00	0,92	0,75	0,65	0,970	0,21
2	7,03	0,98	0,70	0,47	1,56	0,29
3	1,09	0,91	0,76	0,63	1,06	0,050
4	7,08	0,99	0,70	1,1	0,540	0,30
5	5,17	0,84	0,82	0,76	0,970	0,22
6	7,33	0,72	0,96	2,4	0,540	0,31
7	5,24	0,94	0,68	1,1	0,510	0,22
8	10,24	0,78	0,88	1,5	0,670	0,43
9	4,94	0,82	0,84	0,63	1,86	0,21
10	3,72	0,89	0,88	0,47	1,93	0,16
11	5,38	0,96	0,72	0,68	0,870	0,22
12	5,02	0,93	0,75	0,64	1,00	0,21

Como ilustrada na figura 1(b), a máxima concentração celular ($10,24 \text{ g.L}^{-1}$) e produtividade celular ($Pr_x=0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi exibida no cultivo MRS (pH=6) com 1,5% de polidextrose submetido à incubação a 35°C e agitação de 50 rpm (ensaio 8). A fase exponencial manteve-se até as 9 horas de fermentação. Esta concentração máxima equivale a um ganho celular 57,23% e 46,58% com relação ao ensaio controle B e aos ensaios centrais(9-12).

Estes resultados podem ser justificados pelas condições de cultivo com valores de pH e agitação situados dentro da faixa ótima descrita por alguns autores. O pH igual a 6 foi definido como pH ótimo para o crescimento de *P.pentosaceus*, apesar das cepas desta espécie serem capazes de crescer em pH= 5 a 8 (Anastasiadou et al.,2008b; Huys et al.,2012 Papagianni e Anastasiadou, 2009). *P.pentosaceus* Mees 1934 apresentou crescimento de 6,5 g/L em MRS (pH=6) (Anastasiadou et al., 2008a) e 2,62 g/L em MRS com pH controlado (6,5), *P.pentosaceus* ALP57 e *P.pentosaceus* CFRIII cresceram em meios diferentes (APT e MRS) com pH=6,7- 6,5, respectivamente. A temperatura empregada encontra-se na faixa de

temperatura ótima (28 a 35°C) para o crescimento de *P.pentosaceus* (Papagianni e Anastasiadou,2009). A agitação de 150 rpm foi adotada no crescimento de *P.pentosaceus* Mees e *P.acidilactici* NRRL B5627 com MRS (pH=6). Ambas as cepas cresceram melhor (6,5 g/L) quando a agitação foi combinada com 60% de saturação com oxigênio.

Figura 1(b) - Curva de crescimento de *P. pentosaceus* ATCC 43200 nas diferentes condições estabelecidas no planejamento experimental [E1(■) pH 4,0, poli 0,5%, 50 rpm e 25°C],[E2(◆) pH 6,0, poli 0,5%, 50 rpm e 35°C],[E3(●) pH 4,0, poli 1,5%, 50 rpm e 35°C], [E4(▲) pH 6,0, poli 1,5%, 50 rpm e 25 °C], [E5(--▲--) pH 4,0, poli 0,5%, 150 rpm e 35°C, [E6(...●...) pH 6,0, poli 0,5%, 150 rpm e 25 °C], [E7(...◆...) pH 4,0, poli 1,5%, 150 rpm e 25°C], [E8(■)pH 6,0, poli 1,5%, 150 rpm e 35°C].

2.2 Consumo de substrato e formação de ácido lático

Na tabela 3 estão apresentados os dados referentes ao consumo de substrato e formação de produto. Na figura 1(c), o aumento progressivo da concentração de ácido lático, expresso em (g.L⁻¹), ocorreu durante 24 horas. A glicose é o principal monossacarídeo fermentável pelas bactérias ácido-láticas, sendo o *P.pentosaceus* ATC C 43200 caracterizado como bactéria anaeróbia facultativa homofermentativa (Lehninger et al.,1993; Madigan et al., 2010; Papagianni e Anastasiadou, 2009). A fermentação homolática de hexoses é baseada na glicólise, resultando somente ácido lático a partir da redução do piruvato catalisada pela enzima NAD-dependente lactato desidrogenase. Dessa reação resultam duas moléculas de lactato com a geração de duas moléculas de ATP (Gao et al., 2011; Lehninger et al.,1993)

Tabela 3- Parâmetros cinéticos relacionados ao consumo de substrato, formação de ácido lático e acidificação do meio de cultivo pelo *P.pentosaceus* ATCC 43200. *pH= redução de pH em 24 horas. Considerando diferentes valores de pH inicial: pH 4 nos ensaios 1, 3,5 e 7; pH 5 nos ensaios controle A e centrais 9,10,11,12 e pH 6 nos ensaios controle B, 2,4,6,8. * Substrato consumido em g.L⁻¹ e em percentual (%). * ácido lático formado em g.L⁻¹ e em percentual (%). P_p Produtividade de lactato em 24 horas de cultivo.

Ensaio	*pH	Subs. *(g.L ⁻¹)	Subs. *(%)	Lac. * (g.L ⁻¹)	Lac. *(%)	Vel.con. sub(g/g.h ⁻¹)	Vel.For. Lac(g/g.h ⁻¹)	Y _{p/s} (g/g)	P _p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
Cont.pH5	1,08	8,10	46,15	6,12	91,07	0,089	0,067	0,76	0,26
Cont.pH6	1,89	11,3	70,54	12,4	95,04	0,11	0,12	1,1	0,52
1	0,390	7,75	35,53	4,84	83,16	0,065	0,040	0,62	0,20
2	1,87	15,0	68,78	11,0	92,67	0,089	0,065	0,73	0,46
3	0,210	1,72	9,140	1,15	49,78	0,066	0,050	0,67	0,050
4	1,91	6,48	49,54	3,79	42,97	0,038	0,044	0,58	0,16
5	0,640	6,76	32,70	5,01	86,83	0,054	0,022	0,74	0,21
6	2,05	3,00	25,00	3,97	45,84	0,017	0,040	1,3	0,17
7	0,310	4,59	28,69	2,69	47,19	0,036	0,023	0,59	0,11
8	1,94	6,73	48,55	6,91	87,03	0,027	0,021	0,61	0,29
9	1,14	7,90	56,55	9,20	90,37	0,067	0,078	1,0	0,38
10	1,24	7,94	52,62	7,18	88,64	0,089	0,080	1,2	0,30
11	1,20	7,91	56,62	4,68	50,43	0,061	0,036	0,90	0,20
12	1,26	7,85	56,19	5,00	52,25	0,065	0,042	0,64	0,21

No ensaio controle B (MRS-glicose) foi consumida $11,3 \text{ g.L}^{-1}$ (70,54%) de glicose e houve a máxima formação de ácido láctico $12,45 \text{ g.L}^{-1}$ (tabela 3). Houve ganho de 50,84% e 43,61% com relação à concentração de ácido láctico no ensaio controle A ($6,12 \text{ g.L}^{-1}$) e nos ensaios centrais ($7,02 \text{ g.L}^{-1}$). Com relação às velocidades de consumo de glicose e de formação de ácido láctico, ambos os valores foram coincidentes ($0,11 \text{ g/gcel. h}^{-1}$). A produtividade de ácido láctico ($P_p=0,52 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), fator de conversão de glicose em ácido láctico ($Y_{p/s}=1,10 \text{ g/g}$) e fator de conversão de ácido láctico por células ($Y_{p/x}=2,52 \text{ g/g}$) reforçam a preferência por monômeros de glicose pela bactéria láctica estudada.

Figura 1(c) - Formação de ácido láctico por *P. pentosaceus* ATCC 43200 em meio MRS nas 24 horas de fermentação. Os ensaios foram realizados conforme as condições propostas pelo planejamento experimental. [E1 (...■...) pH 4,0, poli 0,5%, 50 rpm e 25°C], [E2 (♦) pH 6,0, poli 0,5%, 50 rpm e 35°C], [E3 (●) pH 4,0, poli 1,5%, 50 rpm e 35°C], [E4 (▲) pH 6,0, poli 1,5%, 50 rpm e 25°C], [E5 (--▲--) pH 4,0, poli 0,5%, 150 rpm e 35°C], [E6 (...●...) pH 6,0, poli 0,5%, 150 rpm e 25°C], [E7 (...♦...) pH 4,0, poli 1,5%, 150 rpm e 25°C], [E8 (■) pH 6,0, poli 1,5%, 150 rpm e 35°C], [Central 1(--■--), central 2(*), central 3(▲) e central 4(x) pH 5,0, poli 1,0%, 100rpm e 30°C], [controle A(♦) pH 5,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C] e [controle B(--▲--) pH 6,0, poli 0%, 100 rpm e 30°C].

A polidextrose é um polímero ramificado constituído por monômeros de glicose, possuindo em sua estrutura vários tipos de ligações osídicas, a saber: (α) e (β) [1,2; 1,3; 1,4 e 1,6]. A capacidade da degradação da PDX pela microbiota intestinal do cólon foi avaliada por Lahtinen et al. (2010). Os autores notaram que no decorrer da fermentação restou uma molécula central de PDX não ramificada e houve o aumento de unidades ramificadas de PDX

(de até 3 unidades) com glicose na forma cíclica (glicopirranose) ou frutose na forma cíclica (frutofuranose). A preferência das bactérias por glicopirranose (β -1,6) foi evidenciada pela diminuição dessa forma, enquanto, que a frutose cíclica não foi fermentada. As ramificações terminais da PDX foram escolhidas pelas bactérias. A polidextrose está vinculada na regulação genética do sistema de transporte, baseado em transportadores vinculados ao ATP e, também, ao sistema de fosfotransferência em fosfoenolpiruvato dependentes de açúcares. Ambos os sistemas regulam a via glicolítica de fermentação de hexoses (Andersen et al., 2012).

Acredita-se que a redução da velocidade de consumo de substrato esteja relacionada à fermentação parcial do teor de polidextrose por monocultura de bactérias intestinais. Mäkeläinen et al.(2010) avaliaram a fermentação de PDX por monocultura e não relataram ou indícios da degradação de PDX, enquanto os grupos de bactérias que compõem a microbiota exibiram maior adaptação para a fermentação deste polímero (Costalibe et al., 2012; Fava et al., 2007; Mäkeläinen et al., 2007; Roytio e Owehand, 2014). Makivuokko et al.(2005) avaliaram a fermentação da PDX com diferentes concentrações (0,5%, 1,0% e 1,5%). Os autores viram que a degradação da PDX ocorreu gradualmente da parte distal do intestino até o cólon e relacionaram a concentração de PDX fermentada ao teor inicial adicionado.

2.3 Atividade de bacteriocina

As duas cepas indicadoras utilizadas nos ensaios preliminares de atividade antimicrobiana demonstraram suscetibilidade à bacteriocina estudada. Sendo assim, a quantificação da bacteriocina com amostra de diluições seriadas foi proposta, a fim de obter os valores de bacteriocina em AU/mL. A máxima atividade foi alcançada com diluições das amostras coletadas de 3-4 horas. A bacteriocina estudada apresentou perfil de metabólito primário por ser produzida durante o crescimento exponencial do *P.pentosaceus* ATCC® 43200™ até 9-12 horas) (Piva e Headon, 1994). *P.pentosaceus* BCC3772 (Kingcha et al. 2012) e *P.pentosaceus* 05-10 (Huang et al., 2009) demonstraram semelhante perfil na produção de bacteriocina. Frente à *Listeria monocytogenes* 101, obteve-se a concentração máxima de bacteriocina (3200 AU/mL) nos ensaios controle A (MRS-glicose), centrais (MRS-1% de polidextrose) e ensaio 5 (MRS-0,5% de polidextrose), equivalente à atividade antimicrobiana 2-4 vezes maior do que os valores obtidos nos demais ensaios (1600-800 AU/mL). A acidificação do meio de cultivo permite a liberação da pediocina PA-1

intracelular para o sobrenadante; alguns autores (Abrams et al., 2011; Engelhardt et al., 2014; Papagianni e Sergeledis, 2015; Simha et al., 2012) relataram melhora na produção com a diminuição do pH. *P.pentosaceus* PK34 exibiu máxima atividade com $MRS \leq 5$; o dobro de pediocina PA-1 foi produzido por *P.pentosaceus* NCDB273 quando houve a diminuição do pH (de 7 para 6); *P.pentosaceus* Mees 1934 produziu 170 AU/mL, ou seja 25% a mais de pediocina PA-1 do que no MRS com pH=6,5; e *P.accidilatici* HA6111-2 produziu 6400 AU/mL em MRS (pH=3,5).

A máxima atividade antimicrobiana (6400AU/mL) obtida frente à *E.coli* ATCC 25922 com amostras de sobrenadante (MRS-0,5% de polidextrose) do ensaio 2. Neste caso, este resultado foi duas vezes superior (3200 AU/mL) aos obtidos nos ensaios 3 e 8 (MRS-1,5% de polidextrose) e quatro vezes a mais (1600 AU/mL) do que nos demais ensaios. O modo de ação da pediocina PA-1 se baseia na formação de poros na membrana celular, levando ao desequilíbrio iônico entre as faces externa e interna da membrana, reduzindo a intensidade da força motriz de transporte através da membrana (Mointville e Chen, 1998; Moll et al., 1999; Synder e Worobo, 2014). As bactérias Gram-negativas apresentam menor suscetibilidade à ação da pediocina por apresentarem parede celular que dificulta a inserção do peptídeo e, consequentemente, ação antimicrobiana (Cotter et al, 2005; Madigan et al, 2010). Bacteriocina como a pediocina D ocasiona a interrupção da formação da membrana celular por ter afinidade com molécula de glicerolipídeo, essencial para a formação dos peptideoglicanos de membrana e parede celular (Hasper et al., 2006). Tiwari et al. (2015) sugeriram a aplicação da bacteriocina híbrida (N-terminal da pediocina PA-1 e C-terminal da enterocina 50-52) na inibição de bactérias patogênicas, inclusive Gram-negativas, por ter apresentado MIC (concentração mínima para inibição) 64 vezes menor comparado à forma natural de pediocina. Cizeikene et al. (2013) apresentaram resultados de formação de halos frente à *E.coli* ATCC 25922 e *E.coli* 1.10 com amostras de sobrenadantes derivadas dos cultivos (em MRS a 35°C) de *P.pentosaceus* KTU05-10.

2.4 Análise estatística

A análise de componentes principais foi feita com os resultados de crescimento celular, pH, concentração de substrato e concentração de produtos (ácido láctico e bacteriocina) objetivando a redução do conjunto de variáveis com a criação de componentes. Dentre os 40 componentes com combinações das variáveis consideradas, somente três foram escolhidos (1, 2 e 3), conforme o critério de Kaiser (variância > 1). As variâncias apresentadas foram 24,88,

4,09 e 3,88. A soma da variância entre os componentes escolhidos precisa representar $\geq 80\%$ da variância total; nesta análise somente os três componentes exibiram 80,12% da variância (Cp1=62,22 %, Cp2= 10,2% e Cp3=7,7).

Como ilustrado na Tabela 4, cada resultado de crescimento celular (X), pH, concentração de substrato (S) e concentração de ácido láctico (P) e bacteriocina (AT) foram combinados de forma linear gerando coeficientes de resposta pelo Minitab 17. O valor absoluto de cada coeficiente representa a participação de cada resultado e o conjunto de coeficientes (componente) representa as respostas biológicas. Analisando o componente 1 (CP1), as concentrações celulares (9-18 horas), consumo de substrato (3-21 horas), formação de ácido láctico (9-12 horas) e o pH apresentaram coeficientes relevantes, que representam o crescimento exponencial do *P. pentosaceus* ATCC 43200. As concentrações celulares, de substrato (3 horas) e de produto (bacteriocina e ácido láctico) obtidas em até 3 h de cultivo são as mais importantes para o componente 2 (CP2), sendo assim, a fase *lag* do crescimento bacteriano e a produção de bacteriocina (obtida em 4 h de cultivo) estão relacionadas a este componente. Os valores máximos de coeficientes para bacteriocina foram mostrados no componente 3 (CP3) com *L.m101*(0,326) e *E.coli* ATCC 25922(0,417-0,414).

Tabela 4- Coeficientes de cada variável que constituem as combinações dos componentes 1, 2 e 3.

X_t	X₀	X₃	X₆	X₉	X₁₂	X₁₅	X₁₈	X₂₁	X₂₄
CP1	-0,020	0,078	0,117	0,170	0,185	0,171	0,172	0,158	0,140
CP2	-0,377	-0,061	0,060	0,069	-0,063	-0,046	-0,062	-0,033	-0,044
CP3	-0,073	0,302	0,230	0,054	-0,044	0,016	0,089	0,192	0,224
S_t	S₀	S₃	S₆	S₉	S₁₂	S₁₅	S₁₈	S₂₁	S₂₄
CP1	-0,103	-0,179	-0,188	-0,188	-0,189	-0,183	-0,181	-0,125	-0,166
CP2	0,198	0,022	-0,047	-0,071	-0,089	-0,118	-0,169	-0,119	-0,195
CP3	0,297	0,159	0,123	0,095	0,073	0,073	0,018	0,108	0,085
P_t	P₀	P₃	P₆	P₉	P₁₂	P₁₅	P₁₈	P₂₁	P₂₄
CP1	0,137	0,168	0,191	0,197	0,186	0,165	0,163	0,161	0,156
CP2	-0,270	-0,205	-0,033	0,024	0,095	0,200	0,223	0,229	0,245
CP3	-0,148	-0,067	-0,039	0,022	0,093	0,140	0,073	0,054	0,086
pH_t	pH₀	pH₃	pH₆	pH₉	pH₁₂	pH₁₅	pH₁₈	pH₂₁	pH₂₄
CP1	0,193	0,194	0,189	0,185	0,173	0,170	0,170	0,165	0,161
CP2	-0,023	-0,029	-0,049	-0,019	-0,196	-0,188	-0,199	-0,207	-0,186
CP3	0,092	-0,041	-0,116	-0,116	-0,061	-0,067	-0,047	0,035	0,079
AT_t	Lm101	Lm101	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>					
	(4 hrs)	(24hrs)	(4hrs)	(24 hrs)					
CP1	-0,022	-0,036	0,027	0,072					
CP2	0,215	-0,296	-0,163	0,017					
CP3	-0,064	0,326	0,417	0,414					

Sabendo que o CP1 representa o crescimento exponencial, CP2 a fase *lag* do crescimento e o CP3 a produção de bacteriocina, procedeu-se à análise da superfície de resposta para verificar as interações significativas entre teor de polidextrose, pH, agitação e temperatura para as respostas biológicas supracitadas. Na Tabela 5 observou-se um modelo para cada componente (CP1, CP2 e CP3), que apresentou os termos lineares (pH, agitação, polidextrose e temperatura), quadráticos (pH) e suas interações. Os coeficientes de determinação (R-Sq), ajustado (R-Sq adj) e preditivo (R-Sq pred) foram exibidos para cada modelo.

Tabela 5 – Equações e coeficientes de determinação (R-Sq), ajustado (R-Sq adj) e preditivo (R-Sq pred) para cada modelo CP1, CP2 e CP3.

Resposta	Modelo	R-Sq	R-Sq adj	R-Sq pred
CP1	CP1 = -53,21 + 19,40 pH – 0,87 Poli(%)	98,52	98,09	97,94
	+ 0,0475 Agt – 0,554 Temp. –			
	1,525 pH*pH + 0,427 pH*Poli –			
	0,00991 pH*Agt + 0,0727 pH*Temp.			
CP2	CP2 = -70,32 + 28,46 pH – 1,75 Poli	89,19	85,99	85,36
	+ 0,0672 Agt – 0,184 Temp – 2,925 pH*pH –			
	0,098 pH*Poli – 0,01115 pH*Agt			
	+ 0,0646 pH*Temp.			
CP3	CP3 = 67,87 – 25,57 pH – 0,94 Poli	84,02	79,28	75,82
	+ 0,0188 Agt – 0,589 Temp + 2,179 pH*pH –			
	0,098 pH*Poli – 0,00409 pH*Agt			
	+ 0,1555 pH*Temp			

Conforme a análise de variância apresentada na Tabela 6, o pH e teor de polidextrose apresentaram efeitos lineares significativos ($p=0,00$), ao contrário a agitação não foi significativa [(CP1) $p=0,46$; (CP2) $p=0,62$] para que a cepa pudesse crescer e produzir bacteriocina. As interações entre o pH e agitação ($p=0,00$) ou pH com a temperatura ($p=0,01$) foram significativas para o crescimento celular (representado pelo CP1 e CP2). Por outro lado, para a produção de bacteriocina (CP3), somente a interação de pH e temperatura ($p=0,00$) foi significativa. O único efeito quadrático relevante foi do pH ($p=0,00$). A significância de cada termo foi definida pelo valor de $p \leq 0,05$.

Notou-se que para o componente 1, os dois efeitos de interação (pH e agitação/pH e temperatura) foram considerados para atingir o máximo crescimento celular (CP1>5) (Figura 2). A condição proposta no Ensaio 4 proporcionou um valor do componente 1 superior a 5, representando a condição ótima para o crescimento celular ($X_{\max}= 10,35 \text{ g.L}^{-1}$) em 18 h de cultivo, porém em seguida iniciou-se a fase de morte celular, diminuindo a concentração celular final para $7,08 \text{ g.L}^{-1}$.

As condições dos ensaios 2, 6 e 8 apresentaram componente 1 igual a 5, sendo que no último ensaio obteve-se a máxima concentração celular ($E8=10,24 \text{ g.L}^{-1}$). Já os ensaios propostos nos pontos centrais (E9-E12) alcançaram o componente 1 próximo a 5 com concentração celular média de $4,46 \text{ g.L}^{-1}$. Observando a Figura 2, notou-se que o pH 4,0 combinado com agitação e temperatura (ensaios 1, 3, 5 e 7) não promoveria crescimento celular (CP1= -5), no entanto diferentes resultados foram obtidos ($E1=5,00 \text{ g.L}^{-1}$; $E3=1,09 \text{ g.L}^{-1}$; $E5=5,17 \text{ g.L}^{-1}$; $E7=5,24 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 6- Análise de variância para CP1, CP2 e CP3 como funções lineares, quadráticas e interações entre os termos pH, povidona, agitação e temperatura

	CP1			CP2			CP3		
Fonte	df	SS	p	df	SS	p	df	SS	P
Modelo	8	858,2	0,000	8	127,8	0,000	8	90,80	0,000
Linear	4	829,5	0,000	4	49,39	0,000	4	37,23	0,000
pH	1	797,9	0,000	1	0,075	0,720	1	3,432	0,028
Poli	1	9,5	0,000	1	29,97	0,000	1	12,29	0,000
Agt	1	0,61	0,466	1	7,868	0,001	1	0,161	0,620
Temp.	1	21,7	0,000	1	11,48	0,000	1	21,35	0,000
Quadrático	1	18,6	0,000	1	68,42	0,000	1	38,00	0,000
pH*pH	1	18,6	0,000	1	68,42	0,000	1	38,00	0,000
Interações	3	10,2	0,001	3	10,01	0,003	3	15,57	0,001
pH*Poli	1	1,092	0,142	1	0,057	0,755	1	0,058	0,765
pH*Agt	1	5,893	0,002	1	7,454	0,001	1	1,002	0,222
pH*Temp	1	3,172	0,016	1	2,500	0,046	1	14,51	0,000
Erro	27	12,86		27	15,49		27	17,27	
Total	35	871,1		35	143,3		35	108,1	

Legenda: df- valor dos quadrados SS- Soma dos quadrados p- Valor de p. Agt: agitação; poli : povidona, Temp: Temperatura

Figura 2- Relação das condições de cultivo com as respostas biológicas representadas pelos componentes CP1 (crescimento exponencial), CP2 (crescimento na fase *lag*) e CP3 (produção de bacteriocina). Legenda: E (ensaio); (■) E1; (▼) E2; (▲) E3; (■) E4; (●) E5; (▼) E6; (◇) E7; (●) E8; (►) E9, E10, E11 e E12.

No que diz respeito à produção de bacteriocina (CP2), os ensaios centrais (E9-E12) apresentaram máxima atividade antimicrobiana frente a *L.m101* (3200 AU/mL) em 3 h de cultivo. O ensaio 4 apresentou menor valor de componente 2 (CP2=-2) em consequência a mínima atividade antimicrobiana frente a *L.m101* (800 AU/mL). Com a finalidade de atingir a máxima produção de bacteriocina, a condição ótima a ser escolhida deveria ser a que proporcionasse a maior resposta do componente 3 (CP3). Neste âmbito, a condição do ensaio 2 proporcionou este valor (CP3= 3,88) frente a *E. coli* ATCC 25922 (6400 AU/mL). Portanto, esta condição será aplicada nos ensaios em biorreator.

3.Conclusão

O efeito da suplementação de povidexose combinado com pH, temperatura e agitação foi avaliado, seguindo o planejamento do tipo *Plackett & Burnman* com o objetivo de melhorar a produção de bacteriocina por *P. pentosaceus* ATCC® 43200™. A povidexose (MRS-1,5% de povidexose) estimulou o crescimento celular, permitindo obter concentração 2,71 vezes maior no ensaio 8 ($X_{\max}=10,24 \text{ g.L}^{-1}$) quando comparado ao controle A (MRS-

glicose), permitindo produtividade celular ($Pr_x=0,43 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). No entanto, o melhor μ_{max} foi alcançado com MRS-glicose sob as condições do ensaio controle A. A máxima produção em ácido láctico foi também vista em MRS-glicose (controle B) com a produtividade final ($Pr_{\text{ác.lac}}=0,52 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}=1,1 \text{ g/g}$) e de célula em produto ($Y_{p/x}=2,84 \text{ g/g}$). A respeito da atividade antimicrobiana, ao que tudo indica a polidextrose não exerceu influência direta na produção de bacteriocina, já que, em ambos os ensaios controles (MRS-glicose) e nos quatro ensaios centrais (MRS-1% polidextrose) foram obtidos resultados coincidentes frente à *L. monocytogenes* 101. Importante resultado foi visto com *E. coli* ATCC 25922, que precisa ser melhor investigado. Finalizando o estudo com análise estatística, vimos que as interações de pH/agitação e pH/temperatura são favoráveis ao crescimento celular e à produção de bacteriocina. Portanto, com base nos resultados de superfície de resposta, evidenciou-se a condição ótima para a produção desta biomolécula. Esta condição será reproduzida em biorreator, associando-se com a avaliação da aeração e da saturação de oxigênio durante 24 horas de cultivo.

4 Materiais e Métodos

4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivos

Pediococcus pentosaceus ATCC® 43200™ foi obtida da “American Type Culture Collection” (ATCC) e foi usada como bactéria produtora de bacteriocina. Esta foi cultivada em caldo *Man Rogosa e Sharpe* (MRS-Difco, MI, USA) pH 6,0 por 12 horas a 30°C e 100 rpm de agitação. Como cepas bioindicadoras de atividade antimicrobiana, *Listeria monocytogenes* 101 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas. A cepa de *Listeria* foi cultivada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI-Difco,MI,USA) e a *E.coli* em caldo *Tryptic Soy* (TSB-Difco,MI,USA). Cem microlitros de cada cepa indicadora, previamente criopreservada em -70°C em 40%(v/v) de glicerol, foi cultivada em 5 mL de caldo por 12-14 horas a 30°C, sem agitação.

4.2 Preparo do meio de cultivo, do pré-inóculo e condições de cultivo

O meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS-Difco,MI,USA) foi utilizado para todos os ensaios. Nos ensaios controles (A e B) e no pré-inóculo a glicose foi usada como única fonte de carbono. Os demais ensaios foram suplementados com 0,5, 1,0 e 1,5% de polidextrose Litesse® (Dupont, Wilmington, USA). O ajuste de pH do MRS comercial (pH=6,5) para valores de pH 6,0, 5,0 e 4,0 foi feito com a adição de HCL 1,3N. O pré-inóculo de

P.pentosaceus ATCC® 43200™ foi preparado com cem microlitros da cepa criopreservada (-70°C com 40% de glicerol) adicionados a 50mL de caldo MRS (pH=6,5) contido em frascos Erlenmeyer de 250mL. Os frascos foram submetidos à incubação em agitador metabólico a 100 rpm e 30°C por 12 horas. Todo volume do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 2L contendo 450mL de MRS. Os cultivos durante 24 horas e amostragem a cada 3 horas foram feitos em triplicata.

4.3 Planejamento experimental

O delineamento experimental tipo *Plackett & Burnman* fatorial 2^{4-1} (acrescido de quatro pontos centrais) foi proposto com quatro variáveis: pH, teor de polidextrose, agitação e temperatura. Ao todo foram 14 ensaios: dois ensaios controles (controle A e controle B), 4 ensaios centrais e 8 ensaios com diferentes condições de cultivo como ilustrado na tabela 1.

Tabela 1- Delineamento tipo *Plackett & Burnman* fatorial 2^{4-1} , acrescido de 4 pontos centrais

Ensaios	pH	Percentual de polidextrose (%)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)
Cont.A	5	0	100	30
Cont.B	6	0	100	30
1	4	0,50	50	25
2	6	0,50	50	35
3	4	1,5	50	35
4	6	1,5	50	25
5	4	0,50	150	35
6	6	0,50	150	25
7	4	1,5	150	25
8	6	1,5	150	35
9	5	1,0	100	30
10	5	1,0	100	30
11	5	1,0	100	30
12	5	1,0	100	30

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana da bacteriocina

A atividade antimicrobiana foi vista pela formação de halos por teste de ágar difusão com as cepas indicadoras *Listeria monocytogenes* 101 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As amostras de sobrenadantes (2 mL) foram centrifugadas 5000 g a 4°C por 10 minutos e filtradas por filtros com membranas de poros de 45µm de diâmetro. Estas tiveram pH ajustado para 6,5 pela adição de NaOH 1 N e foram aquecidas a 80°C por 10 minutos para a inativação de proteases.

A quantificação da bacteriocina foi feita por *spot-on-law*. Dez microlitros de cada cepa indicadora foram adicionados a 10 mL de meio morno previamente suplementado com 1% de ágar. Após a total solidificação do meio, 10 µl de cada dupla diluição de amostra foram aplicadas na superfície. A incubação foi feita de 16-18 horas a 30°C. A atividade da bacteriocina foi expressa em unidades arbitrárias (AU/mL). Os resultados foram considerados até a primeira diluição, na qual, não houve mais halos de inibição e foram convertidos em AU/mL, conforme: $D^n \cdot 1000/P$ (D= fator de diluição, n= diluição considerada e P= volume aplicado da amostra). A determinação de atividade antimicrobiana foi feita em duplicata.

4.5 Procedimento das análises

O crescimento celular de *P.pentosaceus* ATCC® 43200™ foi acompanhado por densidade óptica D.O_{600nm} a cada 3 horas durante 24 horas de fermentação. Através da curva de calibração ($R^2 = 0,998$) os valores de D.O foram convertidos em concentração celular (g/L⁻¹). A acidificação do meio de cultivo foi acompanhada com pH medido em pHmetro, modelo 400M1 (Quimis, SP, Brasil). As medições bioquímicas foram determinadas com reagentes de grau analítico. Soluções padrões de alta pureza de glicose e ácido láctico foram diluídas com água ultra-pura obtida do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) em faixa de 2,0-0,1 g.L⁻¹ para a obtenção da curva de calibração. As medições de glicose e ácido láctico foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para o preparo de sobrenadante isento de células, a centrifugação foi feita 5000g por 20 min a 4°C pela micro centrífuga (U-32R Boeckel, Hamburg, Alemanha). As amostras filtradas com membrana com diâmetro de poro 0,45 µm (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemanha) foram aplicadas no sistema HPLC (Shimadzu, modelo Prominence, Kyoto, Japão). O auto- injetor SIL-20AHT foi ajustado para a injeção de 30µl de amostra, UV-vis SPD 20 A, vetores de diodo SPDM 20A, com ondas de extensão entre 190-230nm, detectores de índices refrativos (RID-10A) e controlador CBM 20A. O sistema é constituído por duas bombas LC20AD, coluna aquecida

CTO20AC, coluna de exclusão iônica Aminex HPX87-H (300X7.8mm, Laboratório Bio-Rad, USA) e degasser modelo (DGU-A20). Para a análise quantitativa, a fase móvel (5.0mM ácido sulfúrico) com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 215nm foram escolhidos. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

4.6 Análise estatística

Primeiramente, a análise de componentes principais foi feita com os resultados de crescimento celular, pH, produção de ácido lático e bacteriocina. Para análise de superfície de resposta para cada componente, os efeitos lineares, quadráticos e de interação foram definidos como significantes pelo valor de p de < 0,05.

Contribuição dos autores

Todos autores contribuíram igualmente para o trabalho.

Detalhes dos autores

¹ Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes 580, São Paulo 05508-900, Brasil.

5. Referências

- Abrams D, Barbosa J, Albano H, Silva J, Gibbs AP, Teixeira P(2011). Characterization of bacPPK34 a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* strain K34 isolated from “Alheira”. **Journal Elsevier: Food control**, 22,940-6.
- Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P (2008a). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Journal Elsevier: Enzyme and Microbial Technology**, 43,448-54.
- Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P (2008b). Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B 5627: production conditions, purification and characterization. **Journal Bioresource Technology**, 99, 5384-90.
- Andersen J.M., Barrangou R., Hachem M.A., Lantinen S.J, Goh Y. J., Svensson B., Klaenhammer T.R.(2012). Transcriptional Analysis of Prebiotic Uptake and Catabolism by *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **PLoS ONE**, 7(9),1-12.
- Barbosa J, Borges S, Teixeira P(2015) *Pediococcus acidilactici* as probiotic to be used in food industry. **International Journal of Food Science and Techonology**, 50, 1151-57.

- Cizeikiene D, Juodeikine G, Paskevicius A, Bartkiene E (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Journal Elsevier: Food Control**, 31,539-45.
- Choi HJ, Kim JY, Shin SM, Lee SM, Lee WK (2011). Immuno-modulatory effects of bacteriocin-producing *Pediococcus pentosaceus* JWS 939 in Mice. **Korean J. food Sel. Anl. Resource**, 31(5),719-26.
- Cleveland J, Mointville TJ, Nes IF, Chikindas ML(2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 71, 1-20.
- Costalibe A, Fava F, Röytiö H, Forssten SD, Olli K, Klievink J, Rowland IR, Ouwehand AC., Rastall RA, Gibson GR and Walton GE(2012).Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, 108, 471-481.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP(2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature publishing group: Reviews**, 3,777-88.
- Devi SM, Halami PM (2011). Detection and Characterization of Pediocin PA-1/AcH like bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria. **Curr. Microbiol.**,63, 181-85.
- Diez L, Rojo-Bezares B, Zarazagua M, Rodríguez JM, Torres C, Ruiz-Larrea F.(2012). Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. **Journal Elsevier: Food Microbiology**, 31,167-72.
- Engelhardt H, Albano G, Kiskó G, Farkas CM, Teixeira P(2015). Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA 6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions. **Journal food Microbiology**, 48,109-15.
- Fava F, Mäkituokko H, Siljander-Rasi H, Putaala H, Tiihonen K, Stowell J, Tuohy K, Gibson, G.R. and Rautonen N(2007). Effect of polydextrose on intestinal microbes and immune functions in pigs. **British Journal of Nutrition**, 98, 123-133.
- Gao C, Ma, C, Xu, P(2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, 29, 930-939.
- Halami PM, Badarinath V, Devi SM, Vijayendra SVN(2010). Partial characterization of heat-stable, antilisterial and cell lytic bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* CFR SIII isolated from a vegetable source. **Springer: Ann Microbial**, 61,323-30.

- Hasper HE, Kramer NF, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuipers OP, de Kruijff B, Breukink E.(2006). An alternative bactericidal mechanism of action for lanbionic peptides that target lipid II. **Science**, 313, 1636-1637.
- Hernot DC, Boileau TW, Bauer LL, Middelbos, IS, Murphy, MR, Swanson, KS and Fahey Jr, GC (2009). *In vitro* fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57, 1354-1361.
- Hooda S, Boler BM, Seroo MC, Brulc JM., Staeger MA., Boileau TW, Dowd SE, Fahey Jr, GC and Swanson KS(2012). 454-pyrosequencing reveals a shift in fecal microbiota of healthy adult men consuming polydextrose or soluble corn fiber. **Journal of Nutrition**, 142, 1259-1265.
- Huang Y, Luo Y, Zhai Z, Zhang H, Yang C, Tian H, Li Z, Feng J, Liu H, Hao Y.(2009). Characterization and application of an anti-Listeria bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Journal Elsevier: Food Control**, 20, 1030- 35.
- Huys G, Leisner J, Bjorkroth J (2012).The lesser LAB gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* and affiliated genera. In: S. Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen,A.V. Wright (Ed.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, CRC Press, **BocaRaton, USA**, 1-16.
- Jang S, Lee J, Jung U, Choi HS, Suh HJ. (2014). Identification of anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from kimchi, a traditional fermented vegetable. **Journal Elsevier: Food Control**, 43, 42-48.
- Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria (2012). **Journal Elsevier: International Journal of Food Microbiology**, 153,216-222.
- Kaur G, Singh TJ, Malik RK, Bhardawaj A, De S. (2014). Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *L. monocytogenes*, *E. faecium* and *E. faecalis* and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants. **Journal food Science and Technology**, 51(2), 233-44.
- Kingcha Y, Tosukhowong A, Zendo T, Roytrakuls S, Luxananil P, Chareonpornsook K,Valyasevi R, Jang S, Lee J, Jung U, Choi HS, Suh HJ(2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control** 25(1), 190-196.

- Lahtinen SJ, Knoblock K, Drakoularakou A, Jacob M, Stowell J, Gibson GR and Ouwehand, AC (2010). Effect of molecule branching and glycosidic linkage on the degradation of polydextrose by gut microbiota. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 74, 2016-2021.
- Legette LL, Lee W, Martin BR., Story JA, Campbell JK and Weaver CM (2012). Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. **Journal of Food Science**, 77, H88-H94.
- Lehninger, AL; Nelson, DL; Cox, MM. (1993). Principles of Biochemistry. 2 ed. **United States of America**, 415 -418p.
- Lv XL, Hu XJ, Qian GR, Zhang H, Lu H.F, Zheng, B.W, Jiang L.,Li L.J.(2014). Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 and *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. **Springer: Appl. Microbial. Biotechnological**, 98, 5619-32.
- Madigan MT, Martinko JM, Clark DP. Microbiologia de Brock, 12^a ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2010.
- Martino ME, Maifreni M, Marino M, Bartolomeoli I, Carraro L, Fasolato L, Cardazzo B.(2013). Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterization of penocin operon. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 103:1149-63.
- Mäkeläinen, H, Ottman, N, Forssten, S, Saarinen, M, Rautonen, N and Ouwehand, AC(2010). Synbiotic effects of GOS, PDX and *Bifidobacterium lactis* Bi-07 *in vitro*. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, 5, 203-210.
- Mäkeläinen H, Saarinen M, Stowell J, Rautonen N. and Ouwehand AC(2010). Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. **Beneficial Microbes**, 1: 139-148.
- Mäkeläinen HS, Mäkiyuokko HA, Salminen SJ, Rautonen NE and Ouwehand AC(2007).The effects of polydextrose and xylitol on microbial community and activity in a 4-stage colon simulator. **Journal of Food Science**, 72, M153-M159.
- Mäkiyuokko H, Nurmi J, Nurminen P, Stowell J and Rautonen N (2005). *In vitro* effects polydextrose by colonic bacteria and caco-2 cell cyclooxygenase gene expression. **Nutrition and Cancer**, 52, 94-104.

- Mointville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions.(1998). **Springer: Appl. Microbial Biotechnol**, 50,511-19.
- Moll GN, Konings WN, Driessen AJM.(1999) Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. **Antonie Leeuwenhoek, Netherlands**. 1999, 76(1), 185-98.
- Mukherjee S, Singh AK, Adhikani MD, Ramesh A.(2013). Quantitative appraisal of the probiotic attributes and in vivo adhesion potential of anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Springer: Probiotic & Antimicrobial**, 5, 99-109.
- Oh YJ, Jung DS. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea (2015). **Journal Elsevier: Food Science and Technology**, 63,437-44.
- Osmanagaoglu O, Kiran F, Nes IF. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH-PA-1.(2011). **African Journal of Biotechnology**, 10(11), 2070-79.
- Papagianni M, Anastasiadou S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications.(2009). **Biomed Central: Microbial Cell Factories**, 8(3):1-16.
- Papagianni M, Sergelidis D.Chemostat production of pediocin Sm-1 by *Pediococcus* Mees 1934.(2015).**Journal of American Institute of chemical Engineers**,31(6),1481-1486.
- Pinto AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P, Gibbs PA. Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non fermented seafood.(2009).**Journal Elsevier: International Journal of Food Microbiology**, 129,50-58.
- Piva A, Headon DR.(1994) Pediocin A, a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* FBB61. **Microbiology**, 140,697-702.
- Simha BV, Sood SK, Kumariya R, Garsa AK.(2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. **Journal Elsevier: Microbiological Research**,167,544-549.
- Synder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety(2014). **Journal science Food Agricolal**, 94,28-44.
- Röytio H, Owehand AC(2014). The fermentation of polydextrose in the large intestine and its beneficial effects. **Beneficial Microbes**, 5(3),305-314.

- Tiwari SK, Noll K.S, Cavera, VL,Chikindas, ML(2015). Improved antimicrobial activities of synthetic hybrid bacteriocins designed from enterocin E50-52 and pediocin PA-1.**Applied and Environmental Microbiology**,81(5),1661-1667.
- Todorov S, Dicks LMT(2009). Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from (*Scerocarya birrea*). **International journal of Food microbiology**,132, 117-136.
- Todorov S, Dicks LMT(2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. **Journal Elsevier: Process Biochemistry**, 40, 365-370.
- Venkateshwari S, Halami P, Vijayendra SVN.(2010). Characterization of the heat-stable bacteriocin-producing and vancomycin-sensitive *Pediococcus pentosaceus* CFR B19 isolated from beans. **Journal Beneficial microbes**, (1), 159-164.

Ensaio realizado no biorreator-CAPÍTULO III

Sumário

Resumo	64
1. Materiais e métodos	64
2. Resultados e discussão.....	65
2.1 Crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto	65
2.2 Quantificação bacteriocina.....	69
3. Conclusão.....	72
4. Referências bibliográficas	72
5. Apêndice	73
Apêndice I- Artigos e Resumos.....	73
6. Anexos	74
Anexo I- Instruções	74
Anexo II- Declaração de dispensa do comitê de ética	75
Anexo III- Curriculum <i>Lattes</i>	76
Anexo IV- Ficha do aluno	77

Cultivo de *Pediococcus pentosaceus* em biorreator de bancada: efeito da adição de polidextrose no crescimento celular e na produção de bacteriocina Maria Carolina W.Porto^a, Taís Kuniyoshi^a, Michele Vitolo^a e Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira^a.

Resumo

Neste estudo, realizado em biorreator de bancada, utilizou-se a melhor condição (pH=6; 0,5% de polidextrose; 50 rpm e 35°C) obtida em agitador rotativo (*shaker*) com aeração de 0,5vvm. Observou-se que os valores de crescimento e produtividade celular de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 foram 7,06 g.L⁻¹ e 0,29 g.L⁻¹.h⁻¹, ou seja, valores semelhantes aos obtidos em *shaker*. Por outro lado, notou-se que os ensaios realizados em biorreator apresentaram maiores valores de fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}=1,02$ g/g), produção de pediocina (102400 AU/mL) e produtividade (34133,33 AU/mL.h⁻¹) quando comparados aos ensaios realizados em *shaker*.

1. Materiais e Métodos

Para o ensaio realizado em triplicata no biorreator de bancada, o pré- inóculo foi feito a partir de 100µL de *P. pentosaceus* ATCC 43200 adicionados a 100 mL contido em frasco Erlenmeyer de 250mL. O frasco foi submetido a 100 rpm, 30°C± 0,5°C por 12 horas. O pré- inóculo (D.O=0,8-0,9) foi transferido para 1L de meio de cultivo MRS suplementado com 0,5% de polidextrose e ajustado para pH=6, contido na dorna de capacidade para 3L. O pré- inóculo foi injetado com o auxílio de uma seringa estéril no canal adequado em condições estéreis.

O meio de cultivo MRS foi preparado conforme as recomendações do fabricante e suplementado com 0,5% (p/v) de polidextrose Litesse® (Dupont, Wilmington, USA). O pH foi modificado (pH=6) com a adição de HCl 1,3 N. O meio de cultivo foi autoclavado (121°C por 15 minutos) dentro da dorna com todos os acessórios (filtros, eletrodos, frasco de anti-espumante, mangueiras) acoplados.

O ensaio foi realizado no biorreator Biostat® 3L B Single (SartoriusAG, Goettingen, Alemanha) nas mesmas condições do ensaio 2 (realizado previamente em *shaker*). Em particular, a agitação foi de 50 rpm e aeração aplicada foi de 0,5vvm (volume de ar por volume de meio). O consumo de oxigênio foi acompanhado pelo sensor OxyFerm™

FDAVP225 (HamiltonBonaduzAG, Bonaduz,Suiça). Para estas determinações utilizou-se um medidor/controlador de oxigênio dissolvido acoplado a uma sonda de oxigênio dissolvido tipo célula polarográfica. Esta sonda de oxigênio dissolvido foi previamente calibrada. Inicialmente a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo localizado no interior da dorna foi reduzida a 0% através de injeção de nitrogênio gasoso ao meio de cultivo. E o 100% foi definido com injeção de ar comprimido. A polarização do sensor foi realizada em um período de 2 horas. O pH foi acompanhado pelo eletrodo EasyFerm plus™ (HamiltonBonaduzAG, Bonaduz,Suiça) durante as 24 horas de cultivo. A calibração foi feita utilizando soluções tampão com pH=7 e pH=4 do próprio fabricante. Porém, o pH das amostras foi medido com pHmetro (Quimis Q400M1, São Paulo, SP, Brasil). O agente antiespumante (ThomasScienT, Swedesboro, USA) foi adicionado na quantidade de 5mL, quando necessário. O procedimento da determinação da concentração celular e quantificação da bacteriocina foi o mesmo adotado nos ensaios em *shaker* ((seções 4.4 e 4.5 do capítulo II).

2. Resultados e discussão

2.1 Crescimento celular, consumo de substrato e formação de ácido láctico

Como ilustrado na Figura 1, o crescimento celular iniciou-se na concentração de $X=0,040 \text{ g.L}^{-1}$, onde notou-se que o crescimento de *P. pentosaceus* foi 34,44% maior no instante de 9h e 27,43 % maior no instante de 12h, respectivamente. Após 24h de cultivo em biorreator, a concentração celular foi $7,06 \text{ g.L}^{-1}$, ou seja, similar obtido em *shaker*, resultando em um valor de produtividade celular de $0,29 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Figura 1- Crescimento celular de *P. pentosaceus* ATCC 43200 em shaker (A◇) e em biorreator (B◆). Condição de cultivo: A: pH=6, 0,5% de PD (polidextrose), 50rpm e 35°C).

Tabela 1- Parâmetros cinéticos de crescimento de *P.pentosaceus* ATCC 43200 cultivado sob condição ótima no *shaker* (A) e no biorreator (B).

Ensaio	X_{24} (g.L ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	t_g (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/x}$ (g/g)	Pr_x (g.L.h ⁻¹)
A*	7,03±0,04	0,98±0,08	0,70±0,07	0,46±0,00	1,59±0,10	0,29±0,05
B*	7,06±1,21	0,69±0,09	1,02±0,14	1,02±0,56	0,76±0,28	0,29±0,05

* n=3

Na Tabela 1, observou-se que houve uma redução de 30 % na velocidade máxima de crescimento obtida em biorreator. Por outro lado, o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) foi de aproximadamente 55 % maior em relação ao valor obtido em *shaker*. Papagianni e Sergelidis (2015) investigaram a produção de pediocina SM-1 por *P. pentosaceus* Mees 1934 em meio de cultivo MRS contendo 10 g/L de glicose em pH=6,5, submetido em condição de quimiostasia (150rpm, 60% de saturação de oxigênio e 30°C). Em termos de μ_{max} estes autores obtiveram ou valor de 0,74 h⁻¹, ou seja, similar ao valor obtido no nosso trabalho.

Na Tabela 1, observou-se que a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{max}= 0,60 \text{ h}^{-1}$) foi o valor médio obtido da triplicata ($\mu_{max}= 0,75 \text{ h}^{-1}$; $\mu_{max}= 0,42 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{max}=0,62 \text{ h}^{-1}$). Este resultado representou a diminuição de 38,78% no μ_{max} do valor obtido no ensaio 2 ($\mu_{max}=0,98 \text{ h}^{-1}$) feito em *shaker*. A produtividade celular apresentou resultados coincidentes ($Pr_x=0,29 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), já a conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) aumentou 41,25% nos cultivos no biorreator.

Analisando a figura 2 e Tabela 2, a cepa estudada consumiu em média $11,47 \text{ g.L}^{-1}$ de substrato (glicose+polidextrose). E formou $9,71 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido láctico, promovendo aumento de 42,97% na conversão de substrato em ácido láctico ($Y_{p/s}=1,24 \text{ g/g}$). Ao contrário em *shaker*, a conversão de ácido láctico por cada grama de célula ($Y_{p/x}= 1,59 \text{ g/g}$) superou o valor obtido nestes ensaios ($Y_{p/x}= 0,76 \text{ g/g}$). As velocidades específicas de formação de produto não tiveram diferença (Vel.prod.= $0,06 \text{ g/gcel.h}^{-1}$) entre os resultados das duas maneiras de realizar os cultivos (*shaker* e biorreator), por enquanto que a velocidade específica de consumo de substrato foi 1,6 vezes maior (Vel.sub= $0,08 \text{ g/gcel.h}^{-1}$) em *shaker*. A acidificação foi vista em ambos com a diminuição do pH (pH=1,71 e pH=1,87).

Figura 2 - Acidificação do meio de cultivo com redução do pH e formação de ácido láctico pelo *P. pentosaceus* ATCC 43200 nos ensaios realizados (n=3) no biorreator (B) e nos ensaios feitos em *shaker* (A), submetidos a condição pH=6,0, 0,5% poli, 50 rpm e 35°C. Legenda: A(◇) e B(◆).

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos de crescimento, consumo de substrato e formação de ácido lático por *P.pentosaceus* ATCC 43200 cultivado sob condição ótima no biorreator.

E.	S. cons. (g.L ⁻¹)	*S. (%)	Vel.S. (g/gcel.h ⁻¹)	P. (g.L ⁻¹)	*P (%)	Pr _p (g.h ⁻¹)	Vel.P (g/gcel.h ⁻¹)	Y _{p/s} (g/g)	pH
A	15,00±1,33	68,78	0,08±0,005	11,00±0,71	92,67	0,46±0,03	0,06±0,005	0,74±0,08	1,87±0,02
B	11,47± 1,4	51,18	0,05±0,01	9,71±0,67	65,71	0,45± 0,19	0,07±0,01	1,24±0,16	1,71±0,04

Figura 3- Curva de saturação de oxigênio (%) durante o crescimento de *P.pentosaceus* ATCC 43200 no cultivo em biorreator por 24 horas. Legenda: (-■-) Média dos ensaios (n=3).

A saturação de oxigênio (Figura 3) foi em média 52,83% durante a fase exponencial do micro-organismo. Já na fase estacionária, a saturação de oxigênio aumentou em 36 %, alcançando a saturação máxima (100%) em fase de morte celular.

2.2 Quantificação da bacteriocina

Observou-se que na Figura 4 que o biorreator aumentou a atividade antimicrobiana de *P. pentosaceus* frente a *L. monocytogenes* 101. Após 3 h de cultivo foi obtido um valor de 102400 AU/mL, sendo que em *shaker* o valor de atividade antimicrobiana foi de 800 AU/mL (Tabela 3).

Tabela 3- Atividade antimicrobiana em AU/mL frente as cepas bioindicadoras.

Atividade antimicrobiana inicial (3h) e final(24 h)				
Ensaio (n=3)	<i>Listeria monocytogenes</i> 101		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
A	800 AU/mL		6400 AU/mL	
B	102400 AU/mL	69333 AU/mL	3200 AU/mL	800 AU/mL

Legenda: A ensaios realizados em shaker e B ensaios realizados em bioreator.

Segundo Anastasiadou et al. (2008_a e 2008_b) sugerem que a síntese da pediocina é associado á uma via metabólica oxidativa, após verificarem que a condição de semi-aerobiose com 60% de saturação foi a mais favorável para a produção de pediocina SM-1 por *P.pentosaceus* Mees e de pediocina SA-1 por *P. acidilactici* NRRL B5627 em diferentes estudos.

De acordo com Nagamouchi et al. (2008), a atividade máxima da pediocina PA-1 foi 2048 AU mL⁻¹ quando utilizado meio de cultivo MRS e 4096 AU mL⁻¹ quando utilizado sorro de leite como meio de cultivo em processo de batelada simples com células livres de *P. acidilactici*. Enquanto que por *fed batch* a atividade da pediocina aumentou expressivamente nos dois tipos de meio de cultivo (4,096 AU mL⁻¹).

Guerra et al. (2008) mostraram que a re- alcalinização do meio MRS suplementado com 2% de extrato de levedura favoreceu a produção de pediocina (716 AU/mL) por *P.acidilactici* NRRL B56-27 em cultivo descontínuo alimentado durante 150 h..

O crescimento de *P.pentosaceus* Mees 1934 e a produção de pediocina SM-1 foram acompanhados durante o cultivo em MRS (pH=6/150rpm) submetido ao processo descontínuo. Três condições de aeração foram avaliadas: anaerobiose, semi-aerobiose (60% de oxigênio) e aerobiose. A produção de pediocina foi favorecida sob condição de semi aerobiose (60% de saturação) com a formação de 70 AU/mL, 84 vezes superior a

concentração de pediocina determinada nas outras condições (18 AU/mL) frente ao micro-organismo bioindicador *Micrococcus luteus* CECT 241. (Anastasiadou et al., 2008).

Por outro lado, Papagianni e Papamichael (2014) obtiveram uma maior produção de pediocina SM-1 quando utilizada a sacarose como fonte de carbono. Na condição de semi-aerobiose (60%) com agitação de 150 rpm, *P. pentosaceus* Mees 1934 produziu 145 AU/mL de pediocina em cultivo descontínuo alimentado com alimentação de 7g/l/h de sacarose, ou seja, aumentando em 119% a atividade de pediocina SM-1 frente ao micro-organismo bioindicador *P. acidilactici* ATCC 25740.

Papagianni e Sergelidis (2015) investigaram a produção de pediocina SM-1 por *P. pentosaceus* Mees 1934 no meio com pH controlado (pH=6,5) submetido a condição de quimiostasia (150rpm, 60% de saturação e 30°C). A máxima produção de pediocina (185 AU/mL) foi obtida durante a fase exponencial (2 a 10 horas) utilizando 10 g/L de glicose. Mesmo com sacarose e fucose houve produção de pediocina SM-1 145 AU/mL e 130 AU/mL, respectivamente. Em ambos os casos, a velocidade de produção desta bacteriocina foi 30 % menor ($0,12 \text{ h}^{-1}$), logo, a glicose atingiu resultados mais significativos.

A bacteriocina apresentou perfil de metabólito primário com máxima produtividade ($\text{Pr}_{\text{bac}}=34133,33 \text{ AU/mL.h}^{-1}$) obtida em 3 horas de cultivo, alcançando um valor $\text{Pr}_{\text{bac}}=8533,33 \text{ AU/mL.h}^{-1}$ após 12 h de cultivo (Figura 4). Em particular, cada g de substrato consumido proporcionou um valor de 15236,39 AU/ ($\text{Y}_{\text{bac/s}}$). Nagamouchi et al. (2008) utilizaram a fermentação descontínua alimentada com re-alcanilização do meio (MRS e soro de leite) para a otimização da produção de pediocina por *P. acidilactici* UL5 imobilizado ou não. A máxima produtividade foi obtida quando utilizou-se células imobilizadas, sendo $\text{Pr}_{\text{bac}}=5461 \text{ AU/mL.h}^{-1}$ (MRS) e $\text{Pr}_{\text{bac}}=2048 \text{ AU/mL.h}^{-1}$ (soro de leite) em 12 h de cultivo. Em células não imobilizadas a produtividade de pediocina PA-1 foi 16 vezes inferior quando utilizado meio de cultivo MRS e 6 inferior quando utilizado soro de leite.

Figura 4 - Produtividade de bacteriocina (AU/mL.h⁻¹) com base na atividade antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* 101. Legenda: (■) Média dos ensaios.

Figura 5- Produtividade de bacteriocina (AU/mL.h⁻¹) com base na atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Legenda: (■) Média dos ensaios.

Como esperado, o valor de 3200 AU/mL a atividade antimicrobiana frente a *E.coli* ATCC 25922 foi inferior ao obtido frente a *L.m*101 (102400 AU/mL) (Tabela 3). A máxima atividade antimicrobiana (3200 AU/mL) foi obtida durante 3 h de cultivo, sendo que após 12 h e 24 h, o valor foi de 1600 AU/mL e 800 AU/mL, respectivamente. Em particular a produtividade de bacteriocina foi de $Pr_{bac} = 888,89 \text{ AU/mL.h}^{-1}$ durante 4 h de cultivo e $Pr_{bac} = 33 \text{ AU/mL.h}^{-1}$ após 24 h.

3. Conclusão

A condição ótima de cultivo (pH=6; 0,5% de PD; 50 rpm e 35°C) junto com aeração (0,5 vvm) permitiu que a *P. pentosaceus* obtivesse valores de crescimento e produtividade celular semelhantes aos obtidos em *shaker*. Por outro lado, notou-se que os estudos realizados em biorreator proporcionaram maiores valores, em termos de fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}=1,02$ g/g), produção de pediocina (102400 AU/mL) e produtividade (34133,33 AU/mL.h⁻¹) quando comparado aos estudos realizados em *shaker*.

4. Referências

Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P (2008a).

Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Journal Elsevier: Enzyme and Microbial Technology**, 43,448-54.

Anastasiadou S, Papagianni M, Filiouis G, Ambrosiadis I, Koidis P (2008b).

Pedocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B 5627: production conditions, purification and characterization. **Journal Bioresource Technology**, 99, 5384-90.

Cho HY, Yousef AE, Yang ST (1996). Continuous production of pediocin by immobilized *Pediococcus acidilactici* PO2 in packed-bed bioreactor. **Appl. Microbiology Biotechnology**. 1996;45:589-594.

Guerra NP, Bernárdez PF, Castro LP (2008). Modelling the stress inducing biphasic growth and pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 in re-alkalized fed-batch cultures. **Journal Biochemical Engineering**, 40,;465-72

Nagamouchi K, Fliss I, Drider D, Lacroix C. 2008. Pediocin PA-1 production during repeated-cycle batch culture of immobilized *Pediococcus acidilactici* UL5 cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 105(5), 513-17.

Papagianni M, Papamichael EM. 2014. 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. **Journal Elsevier: Process Biochemistry**, 49,2044-48.

Papagianni M, Sergelidis D. 2015. Chemostat production of pediocin Sm-1 by *Pediococcus* Mees 1934. **Journal of American Institute of chemical Engineer**, 31(6), 1481-1486.

5. Apêndice

Apêndice I- Artigos e Resumos

Maria Carolina W. Porto, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, Taís Mayumi Kuniyoshi, Michele Vitolo, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. ***Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producer.** O artigo está formatado as exigências da revista e será submetido para a revista *Biotechnology Advances* (Fator de impacto: 9,015).

Maria Carolina W. Porto, Taís Mayumi Kuniyoshi, Felipe Rebelo Lourenço, Michele Vitolo, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. **Effect of polydextrose on growth and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200.** O artigo será submetido para a revista *Applied Microbiology and Biotechnology* (Fator de impacto: 3,337).

Luiz R.L. Farinha, Sabrina S. Sabo, Maria C. Porto, Ellen C. Souza, Maricê N. Oliveira, Ricardo P.S. Oliveira . **Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis* .** O artigo foi publicado na revista *Chemical Engineering Transaction*, vol.43, 2015.

Resumos :

Porto, M. C. W, Vitolo, M, Oliveira, R.P.S. **Effects of pH and polydextrose supplementation in *Pediococcus pentosaceus* growth and bioproducts synthesis during shaken growing.** Apresentado(out/2015) : XX semana farmacêutica de ciência e Tecnologia, tendo recebido melhor prêmio de apresentação á nível de mestrado.

Porto, M.C.W, Azevedo, P.O.S, Piazzentin. A.C.M, Oliveira, R.P.S. **Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* growth and bioproduction of antimicrobial compound in diferents growths supplemented by polydextrose, carbon source synthetic with prebiotic effect.** Apresentado (out.2015) : 28° Congresso brasileiro de microbiologia.

Porto, M.C.W, Farinha, L.R.W, Sabo, S.S., Oliveira, R.P.S. **Effect of prebiotics fructo-oligosaccharides and polydextrose on growth cells of *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 im semi-synthetic broth.** Apresentado(Nov.2014): XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia.

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo II- Declaração de dispensa de autorização de comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências farmacêuticas

Departamento de Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica

Av. Prof Lineu Prestes, n° 580, B 16
05508-000- Cidade Universitária- São Paulo/SP
Tel: 00 55 11 3091 0509
Fax: 55 11 3815 6386

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE AUTORIZAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA

São Paulo, 21 de setembro de 2015

Eu, Maria Carolina Wanderley Porto N° USP 8857293, aluna do Departamento de Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica na área de Tecnologia das fermentações, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira e Co- orientação do Prof. Dr. Tit. Michele Vitollo, venho por meio desta, afirmar que o projeto de pesquisa titulado como A produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o crescimento de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação de polidextrose, dispensa a autorização pelo Comitê de Ética visto que não serão envolvidos animais ou seres humanos para a realização dos experimentos.

Ass. Aluna:

Ass.Orientador:

Anexo III- Currículo. *Lattes*

Maria Carolina Wanderley Porto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/141508772033622>

Última atualização do currículo em 13/01/2016

Farmacêutica, mestranda na faculdade de ciências farmacêuticas da USP encontro-me na última fase do mestrado que consiste na otimização à nível industrial da síntese de peptídeo antimicrobiano por bactéria ácido-lática, utilizando a polidextrose como estimulante prebiótico. Com este trabalho busco fundamentar um cultivo simbiótico e determinar estatisticamente os fatores realmente consideráveis para a obtenção do produto. À priori sabe-se que a biomolécula estudada e sintetizada por *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200 possui alto valor agregado e uma variedade de aplicações. Como pesquisadora adquiri experiência em processos fermentativos industriais, microbiologia industrial destacando as principais funções das bactérias lácticas e sua importância. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Maria Carolina Wanderley Porto

Nome em citações bibliográficas

PORTO, M. C. W.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2009 - 2013

Graduação em Farmácia.
Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo Institucional

2014 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Regime: Dedicação exclusiva.

Atividades

02/2014 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, .

Linhas de pesquisa
Produção de peptídeo antimicrobiano por *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200
Produção de bacteriocina por bactérias ácido-láticas

Linhas de pesquisa

1.

Produção de peptídeo antimicrobiano por *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200

2.

Produção de bacteriocina por bactérias ácido-láticas

Projetos de pesquisa

2014 - Atual

Produção biotecnológica de peptídeo antimicrobiano e o crescimento de *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 em meio de cultivo com suplementação de polidextrose

Descrição: Ressalta-se a inovação científica e tecnológica do presente projeto no que tange à bioprodução de compostos antimicrobianos. Para isso, será proposto, no presente projeto, otimizar o processo biotecnológico através de um estudo de ampliação de escala baseado em parâmetros cinéticos. Além disso, é importante maximizar a eficiência das bactérias lácticas probióticas utilizando fontes alternativas de carbono, como no caso da polidextrose (Oliveira et al., 2009). O presente projeto contará com a orientação do Prof. Tit. Michele Vitolo, colaborador neste projeto, é pesquisador I B do CNPq, com vasta experiência em processos fermentativos operados nos regimes descontínuo, descontínuo-alimentado e contínuo ? para a obtenção de biomoléculas de interesse comercial. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Área avaliada: Microbiologia (14)

Integrantes: Maria Carolina Wanderley Porto - Integrante / Pamela oliveira de souza de Azevedo - Integrante / Ricardo Pinheiro de souza Oliveira - Coordenador / Michele Vitolo - Integrante.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

2.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada/Especialidade: Microbiologia Industrial e de Fermentação.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2015

Melhor apresentação em forma de pôster na categoria mestrado, Faculdade de ciências farmacêuticas FCF-USP.

Produções

Produção bibliográfica

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

28º Congresso brasileiro de microbiologia. Bioproduction of antimicrobial compound in different growths supplemented by polydextrose, carbon source synthetic with prebiotic effect. 2015. (Congresso).

2.

XX Semana farmacêutica de ciência e tecnologia. Effect of pH and polydextrose supplementation in *Pediococcus pentosaceus* ATCC43200 growth and bioproducts synthesis during shaken-growing. 2015. (Simpósio).

Anexo IV- Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 8857293/1 - Maria Carolina Wanderley Porto

Email: krolporto@usp.br
Data de Nascimento: 21/10/1991
Cédula de Identidade: RG - 34.314.831-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Presbiteriana Mackenzie - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Mestrado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 03/02/2014
Início da Contagem de Prazo: 03/02/2014
Data Limite para o Depósito: 03/08/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira - 03/02/2014 até o presente. Email: rpsolve@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Michele Vitolo - 21/01/2015 até o presente. Email: michenzi@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 06/03/2015

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

9134 - 8857293/1 - Maria Carolina Wanderley Porto

Sígl	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5733-5/6	Uso Industrial de Enzimas	03/02/2014	06/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBT5784-3/4	Aplicação de Catalise de Transferência de Fase na Síntese de Fármacos	18/02/2014	02/06/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBT5767-1/3	Aplicação Biotecnológica de Bactérias Láticas	04/03/2014	07/04/2014	45	3	100	A	N	Concluída
PSE5825-2/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	30	2	85	A	N	Concluída
FBT5700-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	03/04/2014	04/06/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIM5729-1/3	Análise Sistemática e Engenharia do Metabolismo Microbiano (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	23/04/2014	01/07/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBT5723-6/2	Conservação de Alimentos por Processos Térmicos	07/05/2014	08/07/2014	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	ativou a Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBT0525 - Purificação de Produtos Biotecnológicos, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2014	30/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBT5773-7/4	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	04/08/2014	12/10/2014	30	2	90	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5805-2/1	Desenho de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	87	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação Para depósito da dissertação		
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28