



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Peptídeos antimicrobianos aplicados no controle da contaminação bacteriana na produção de bioetanol

Priscila Peres Duarte Nogueira

Brasília

2018



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Molecular

Priscila Peres Duarte Nogueira

**Peptídeos antimicrobianos aplicados no controle da
contaminação bacteriana na produção de bioetanol**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nádia Skorupa Parachin

Brasília

2018

Trabalho desenvolvido no
Laboratório de Biologia Molecular da
Universidade de Brasília (UnB) sob a
orientação da Prof.^a Dr.^a Nádia Skorupa
Parachin.

Banca Examinadora

Presidente (orientadora):

Profª Dr.ª Nádia Skorupa Parachin
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Universidade de Brasília – UnB

Titulares:

Profª Dr.ª Ildinete Silva-Pereira
Departamento de Biologia Celular (CEL/IB)
Universidade de Brasília – UnB

Profª Dr.ª Márcia Renata Mortari
Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS/IB)
Universidade de Brasília – UnB

Suplente:

Dr.ª Juliana Davies de Oliveira
Laboratório de Fermentação em Escala Piloto (Lafep)
Universidade Católica de Brasília – UCB

O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.

(Cora Coralina)

Agradecimentos

Muitas pessoas foram essenciais durante minha trajetória e tenho um enorme sentimento de gratidão por elas. Quero agradecer especialmente à minha orientadora Nádia Parachin pela oportunidade que tive de trabalhar com ela, não somente sendo sua aluna de mestrado, mas também como aluna de PIBIC e integrante da empresa Artisan. Obrigada por acreditar em mim e por ter contribuído para o meu crescimento, aprendi muito com o seu exemplo de pessoa e de profissional e com certeza carregarei com carinho esses ensinamentos para a vida.

Minha família também foi fundamental na minha caminhada. Todo o incentivo, ajuda, apoio emocional e financeiro eu tive deles. Eles foram os meus maiores torcedores, sempre acompanhando minha trajetória e torcendo para que eu fosse uma pessoa realizada profissionalmente. Pai, mãe e vó, amo vocês! Devo tanto a vocês que nem sei por onde começar a agradecer, mais fácil agradecer a Deus por ter vocês na minha vida. Vó Pedrina, você e minha vizinha Celina foram os maiores exemplos que já tive na vida, te admiro muito e sei que ainda tenho muito o que aprender com você, obrigada por sempre me apoiar em qualquer decisão profissional que eu tomei. Mãe, meu amor por você é incondicional e a coisa mais pura que tenho, obrigada por existir. Pai, somos distantes, mas te vejo como referência na minha vida, sempre batalhando e buscando me fornecer o melhor em todos os aspectos, tenho muito a te agradecer. Agradeço aos meus demais familiares pelo apoio, amizade e carinho.

Meus amigos Benatos, Filipe, Carol e Gabi, saibam que tenho um carinho enorme por vocês, obrigada por sempre estarem ao meu lado e por me apoiarem nas sérias decisões que já tive que tomar na vida, aprendo muito com vocês. Um agradecimento mais do que especial ao meu amigo, colega de curso e irmão do coração, Fred. Sempre recorria a você quando tinha problemas, obrigada pela paciência e ajuda, meu amor por você só cresce. Companheiríssimo de graduação, sei que sofrerei com você 4 anos longe de mim, mas sei também que ainda vamos compartilhar muitos momentos juntos. Te desejo sucesso no doutorado!

Queria ter a oportunidade de agradecer também ao meu eterno amigo que se foi recentemente, mas que mora eternamente no meu coração, Guilherme Silva. Amigo de biotec, companheiro de laboratório, de almoço, academia, cinema,

simplesmente tudo era perfeito na sua companhia. O mais carinhoso, o mais amável, o mais companheiro, o mais sincero e o de coração mais puro, você era verdadeiro demais para esse mundo. Sua boa vontade em me ajudar era infindável. Saudade já não é suficiente para descrever a sua falta.

Quero agradecer também ao meu namorado, Lucas. Sua paciência, apoio e carinho foram essenciais nessa reta final. Obrigada por ser cada vez melhor pra mim, meus sentimentos por você só crescem.

Tive sorte de dividir bancada com pessoas brilhantes e super solícitas, agradeço de coração toda a ajuda do grupo Engenharia de Biocatalisadores e demais pessoas da UnB. Um agradecimento mais do que especial à Nadielle e Thaís, sempre solícitas, prestativas e amáveis, amei trabalhar com vocês. Gabi Carneiro, Fábio, Milton e Otávio, obrigada pelo ambiente descontraído e confortável que tive de trabalhar na presença de vocês. Nunca me esquecerei dessa jornada ao lado de todos vocês.

Um agradecimento muito grande à toda a UCB e equipe que além de terem me disponibilizado o espaço para trabalhar, também me receberam muito bem. O espírito de coletivo daquele lugar é referência, já sinto falta de tudo e todos. Obrigada, Ju, por me aguentar lá e pelas boas conversas que tivemos. Obrigada também, Márcia, por ceder gentilmente os peptídeos para a realização dessa pesquisa.

E finalmente o mais importante, gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades e conquistas que tive durante toda a minha vida, inclusive de ter feito mestrado em um programa de excelência acadêmica. Independente das lutas enfrentadas e dos resultados obtidos, hoje sei que cresci não somente profissionalmente, mas também como pessoa. O amadurecimento que obtive durante esses dois anos de curso é imensurável e eu só tenho a agradecer pela experiência e oportunidade. Uma etapa da minha vida que recordarei com muito carinho.

Resumo

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado em escala industrial tanto para produção de bioetanol quanto para produção de bebidas fermentáveis, como a cerveja. Tipicamente, nas dornas de fermentação, a levedura hidrolisa açúcares produzindo etanol, dióxido de carbono e biomassa. Como essas fermentações não são mantidas estéreis, contaminantes bacterianos são originados de diversas fontes e proliferam nos tanques de fermentação, causando diversos prejuízos como a redução da produtividade e do rendimento de etanol. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais frequentes dentro das dornas industriais. Essas competem pelo substrato e produzem ácidos orgânicos que limitam o crescimento das leveduras e reduzem o rendimento de etanol. Dessa forma, estratégias de controle microbiano de baixo custo são requeridas, uma vez que as tecnologias existentes afetam o metabolismo das leveduras, não são economicamente viáveis ou representam uma ameaça ao meio ambiente. Nesse contexto, o presente trabalho propõe o uso de peptídeos antimicrobianos (PAMs) para o controle de contaminações bacterianas em processos fermentativos. Para isso, os peptídeos antimicrobianos PR-39, PMAP-23 e Cecropin P1 foram adicionados em cultivos de diferentes cepas de leveduras industriais para avaliar qualquer interferência nos seus perfis de crescimento. Dos PAMs testados, PR-39 apresentou a menor interação, sendo escolhido para produção heteróloga em cepa recombinante de *S. cerevisiae*, porém nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada no sobrenadante do cultivo dessa cepa. Dessa forma, outros dois PAMs, X e Y, foram selecionados pela sua alta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. Assim, esses foram utilizados em cocultivos de espécies de *Lactobacillus* e cepas industriais de *S. cerevisiae*. Observou-se total inibição do crescimento das bactérias com 5 µg/mL desses peptídeos no meio de cultivo, além de terem apresentado pouca interferência no crescimento das leveduras. Dessa forma, eles são potenciais candidatos para serem aplicados contra contaminações bacterianas, sendo o presente trabalho a etapa inicial para o estabelecimento de uma nova tecnologia de controle bacteriano em dornas industriais de fermentação alcoólica.

Abstract

Brazil is the world's second largest producer of ethanol, using sugarcane as its raw material. The *Saccharomyces cerevisiae* yeast is the main microorganism used on industrial scale for bioethanol and fermentable beverages production, such as beer. Typically, in industrial fermenters, yeast hydrolyses sugars producing ethanol, carbon dioxide, and biomass. As these fermentations are not kept sterile, bacterial contaminants come from a variety of sources and proliferate in the fermentation tank, causing several losses, like the ethanol yield and productivity reduction. Bacteria of the genus *Lactobacillus* are the most common in industrial fermenters. They compete for the substrate and produce organic acids that limit the yeast growth and reduce the ethanol yield. Thus, low-cost microbial control strategies are required, since existing technologies affect yeast metabolism, are not economically feasible or pose a threat to the environment. In this context, the present work proposes the use of antimicrobial peptides (AMPs) for the control of bacterial contaminations in fermentative processes. For this, the antimicrobial peptides PR-39, PMAP-23 and Cecropin P1 were added in cultures of different industrial strains of yeasts to evaluate any interference in their growth profiles. From the AMPs tested, PR-39 presented the lowest interaction, being chosen for heterologous production in a recombinant strain of *S. cerevisiae*, however no antimicrobial activity was detected in the supernatant of the culture of this strain. In this way, two other AMPs, X e Y, were selected for their high antimicrobial activity against gram-positive bacteria. Thus, they were used in cocultures of *Lactobacillus* species and industrial strains of *S. cerevisiae*. Complete inhibition of bacterial growth was observed with 5 µg/ml of these peptides in the culture medium, presenting little interference in the yeast growth. In this way, they are potential candidates against bacterial contaminations and the present work is the initial stage for the establishment of a new bacterial control technology in industrial alcoholic fermentation.

Lista de Figuras

Figura 1. Produção de etanol no Brasil e nos EUA de 1975 até 2009 (Modificado de TORRES *et al.*, 2011).

Figura 2. Produção mundial de etanol de 2007 a 2015 (Modificado de RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2015).

Figura 3. Principais constituintes de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de WALKER e STEWART, 2016).

Figura 4. Via metabólica da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* (Modificado de BAI *et al.*, 2007).

Figura 5. Mapa do vetor pPR39. Promotor GPD (verde); sequência gênica do peptídeo PR-39 (amarelo); terminador CYC (laranja); ampR: gene de resistência à ampicilina; Leu2: gene codificador da leucina; 2-micron: origem de replicação de levedura.

Figura 6. Mapa do vetor pYIplacPR39. Promotor GPD (verde); sequência gênica do peptídeo PR-39 (amarelo); terminador CYC (laranja); URA3: gene codificar da uracila; URA3Pp: promotor do gene URA3; ampR: gene de resistência à ampicilina; ampRp: promotor do gene ampR; ori: origem de replicação; lacZ α : gene da β galactosidade ; lacp: promotor do gene lacZ α .

Figura 7. Perfis de crescimento das cepas industriais de *S. cerevisiae* BG-1 (A), SA-1 (B), JP-1 (C) e PE-2 (D) crescidas em YNB sacarose na ausência (●) e presença dos peptídeos PR-39 (○), PMAP-23 (x) e Cecropin P1 (+) a 100 μ g/mL.

Figura 8. Gel de agarose contendo o vetor pYIplacPR39 (5169 pb), obtido por miniprep de três colônias positivas (A, B e C). As amostras A', B' e C' representam essas minipreps digeridas com EcoRI, resultando em duas bandas: uma de 3797 pb (pYIplacPR39 sem o cassete GPC) e outra de 1372 pb (GPC). Marcador (M): 1 kb ladder plus da Invitrogen; controle negativo (C-): água.

Figura 9. PCR de colônia da cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK102-3A transformada por integração genômica com o vetor pYIplacPR39. Colônias positivas 1, 2, 3 e 4; controle negativo (C-): água; controle positivo (C+): vetor pPR39; marcador (M): 1 kb ladder plus da Invitrogen.

Figura 10. *Escherichia coli* ATCC 25922 plaqueada em meio MHA sobre a presença de três discos de difusão: um com ampicilina a 100 μ g/mL, correspondente ao controle positivo (C+); outro com o sobrenadante do cultivo da CEN.PK transformante (A) e o outro com o cultivo da CEN.PK parental (AL).

Figura 11. Média dos perfis de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 crescida em LB contendo 20% (v/v) de: concentrado do sobrenadante da CEN.PK transformante (●); concentrado do sobrenadante da CEN.PK parental (◇); água destilada (▪). **A:** colônia 2 recombinante CEN.PK102-3A; **B:** colônia 4 recombinante CEN.PK102-3A.

Figura 12. Visualização em microscopia óptica com lente objetiva 100x da colônia isolada da placa de Yakult® crescida em meio MRS após coloração de gram.

Figura 13. Visualização em microscopia óptica com lente objetiva 100x da colônia isolada da placa de Chamyto® crescida em meio MRS após coloração de gram.

Figura 14. Curvas de crescimento das cepas de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 na ausência e presença dos peptídeos X e Y. **A e B:** curvas de JP-1 (em A) e PE-2 (em B) crescidas em meio YNB com sacarose na ausência (●) e presença do peptídeo X a 10 µg/ml (△ cinza claro) e a 60 µg/ml (△ cinza escuro) e do Y a 10 µg/ml (□ cinza claro) e a 60 µg/ml (□ cinza escuro). **C e D:** curvas de JP-1 (em C) e PE-2 (em D) crescidas em meio MPEB na ausência (●) e presença do peptídeo X a 5 µg/ml (△ cinza claro) e a 10 µg/ml (△ cinza escuro) e do Y a 5 µg/ml (□ cinza claro) e a 10 µg/ml (□ cinza escuro).

Figura 15. Perfis de crescimento das bactérias *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* em meio MRS (A e B) e em MPEB (C, D, E e F) na ausência e presença dos peptídeos X e Y nas seguintes concentrações: **A e B:** (●) 0 µg/ml; (x) Y a 30 µg/ml; (▲) Y a 70 µg/ml; (+) X a 30 µg/ml; (▪) X a 70 µg/ml. **C (Y), D (X) e F (Y)** a (●) 0 µg/mL; (▪) 1 µg/mL; (▲) 2,5 µg/mL; (x) 5 µg/mL; (◆) 7 µg/mL; (○) 10 µg/mL; (+) 15 µg/mL; (□) 20 µg/mL. **E:** Y a (●) 0 µg/mL; (◆) 7 µg/mL; (○) 10 µg/mL; (+) 15 µg/mL. Sendo *Lactobacillus paracasei* (LP) nas imagens A, C e D e *Lactobacillus rhamnosus* (LR) nas imagens B, E e F.

Figura 16. Perfis fermentativos da cepa *S. cerevisiae* JP-1 e das *Lactobacillus paracasei* e *rhamnosus* crescidas em meio MPE modificado em fermentadores nas seguintes condições: **A:** JP-1 (JP) crescimento padrão; **B:** *Lactobacillus paracasei* (LP); **C:** *Lactobacillus rhamnosus* (LR); **D:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:5); **E:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:5) e sob presença do peptídeo X; **F:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:2,5) e sob presença do peptídeo Y; **G:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:3); **H:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:10) e sob presença do peptídeo X; **I:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:3) e sob presença do peptídeo Y. Ambos peptídeos foram adicionados na concentração de 5 µg/ml.

Figura 17. Perfis fermentativos da cepa *S. cerevisiae* PE-2 e das *Lactobacillus paracasei* e *rhamnosus* crescidas em meio MPE modificado em fermentadores nas seguintes condições: **A:** PE-2 (PE) crescimento padrão; **B:** *Lactobacillus paracasei* (LP); **C:** *Lactobacillus rhamnosus* (LR); **D:** PE em cocultivo com LP na proporção (1:3,5); **E:** PE em cocultivo com LP na proporção (1:5) e sob presença do peptídeo X

(A); **F**: PE em cocultivo com LP na proporção (1:4) e sob presença do peptídeo Y (P); **G**: PE em cocultivo com LR na proporção (1:3,7); **H**: PE em cocultivo com LR na proporção (1:3,3) e sob presença do peptídeo X; **I**: PE em cocultivo com LR na proporção (1:3) e sob presença do peptídeo Y. Ambos peptídeos foram adicionados na concentração de 5 µg/ml.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Microrganismos utilizados e suas referências.

Tabela 2. Plasmídeos e sequências nucleotídicas utilizados.

Tabela 3. Sequência e referência dos peptídeos utilizados.

Tabela 4. Enzimas utilizadas.

Tabela 5. Sequências dos iniciadores 425GPD *Forward*, 425CYC *Reverse*, 16S-27 *Forward* e 16S-1492 *Reverse*. As sequências em negrito correspondem aos cinco pares de bases que otimizam a atividade da enzima EcoRI, já as sublinhadas são referentes ao sítio de restrição da enzima EcoRI.

Tabela 6. Condições de crescimento dos cinco ensaios feitos em microplaca.

Tabela 7. Concentração em g/L dos dez padrões (P) das substâncias de fermentação quantificadas em HPLC.

Tabela 8. Resultado do alinhamento do DNA ribossomal 16S da colônia isolada do Yakult® no banco de dados de sequências RNAr 16S.

Tabela 9. Resultado do alinhamento do DNA ribossomal 16S da colônia isolada do Chamyto® no banco de dados de sequências RNAr 16S.

Tabela 10. Taxas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 em meio YNB sacarose e MPEB na ausência (padrão) e presença dos peptídeos X e Y em diferentes concentrações e as porcentagens relativas à redução nas taxas de crescimento padrão.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos obtidos dos cocultivos em erlenmeyers das leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e JP-1 com as bactérias *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*. PE: PE-2; JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; TD: tempo de duplicação; Y: rendimento.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos em fermentadores tanto na presença de 5µg/ml dos peptídeos X e Y, quanto na sua ausência. JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; Y: rendimento, g: grama; ND: não determinado; totais: açúcares totais

(maltose mais glicose). As horas das colunas $Y_{\text{EtOH/mal}}$ e $Y_{\text{Lac/mal}}$ representam o momento em que o etanol e o lactato começaram a ser detectados.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos em microplacas, frascos e fermentadores na ausência de peptídeos com desvios-padrão. JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; Y: rendimento, g: grama; N.A.: não analisado; N.D.: não determinado.

Lista de abreviaturas

- Aa's:** Aminoácidos
- ACK:** Acetato quinase
- ADH:** Álcool desidrogenase
- ADP:** Adenosina difosfato
- AMPs:** Peptídeos antimicrobianos
- AmpR:** Gene que confere resistência a ampicilina
- AmpRp:** Promotor do gene para resistência a ampicilina
- ATP:** Adenosina trifosfato
- B1:** Tiamina
- B6:** Piridoxina
- CIMA:** Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool
- C-:** controle negativo
- C+:** controle positivo
- CYC:** Gene para citocromo C
- CYC1t:** Terminador do gene para citocromo c
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- dNTP:** Desoxirribonucleotideo trifosfato
- EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético
- EMP:** Embden-Meyerhof-Parnas
- ENO:** Enolase
- EtOH:** Etanol
- EUA:** Estados Unidos da América
- FBPA:** Frutose bifosfato aldolase
- g/g:** Relação massa/massa
- GAL6:** Gene para Bleomicina hidrolase
- GAP:** Permease de aminoácidos gerais
- GAPDH:** Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- GHG:** Gases causadores do efeito estufa
- Gli:** glicose
- GLT1:** Gene para Glutamato sintase

GPD: Gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPD2: Gene para Glicerol-3-fosfato desidrogenase
GPDp: Promotor do gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GRAS: Geralmente Reconhecido Como Seguro
HK: Hexoquinase
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance
HXT: Transportador de hexose
IAA: Instituto do Açúcar e do Álcool
JP: cepa de *Saccharomyces cerevisiae* JP-1
Kpb: Mil pares de base
LAB: Bactéria ácido-lática
LACp: Promotor do operon lac
LB: Meio Luria-Bertani
Leu: Leucina
LEU2: Gene para 3-isopropilmalato desidrogenase
LP: *Lactobacillus paracasei*
LR: *Lactobacillus rhamnosus*
maIEFGK: transportador específico da maltose
m/m: Relação massa/massa
M: Molar
MIC: Concentração inibitória mínima
Miniprep: Minipreparação
mM: Milimolar
MPE: Meio Maltose Peptona Extrato de Levedura
MPEB: Meio Maltose Peptona Extrato de Levedura Bagaço
mRNA: RNA mensageiro
MRS: Meio deMan Rogosa e Sharp
NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
°C: Graus Celsius
OD: Densidade ótica
OD_i: Densidade ótica inicial
OD_{imin}: Densidade ótica inicial mínima
ORF: Fase Aberta de Leitura

ORI: Origem de replicação

p/p: Relação peso/peso

p/v: Relação peso/volume

P: Fosfato

PAMs: peptídeos antimicrobianos

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDC: Complexo da piruvato desidrogenase

PE: cepa de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

PEG: Polietilenoglicolico

PFK: fosfofrutoquinase 1

PGI: Fosfoglicose isomerase

PGK: Fosfoglicerato quinase

PGM: Fosfoglicerato mutase

pH: Potencial de hidrogênio

Pi: Fosfato inorgânico

POX: Piruvato oxidase

PTS: fosfoenolpiruvato: açúcar fosfotransferase

PYK: Piruvato quinase

R²: Coeficiente de determinação

RID: Índice de refração

rpm: Rotações por minuto

RNAr 16S: RNA ribossomal 16S

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOC: Meio Super Ótimo com Repressão Catabólica

TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA

TD: tempo de duplicação

TE: Tampão Tris-EDTA

TPI: Triosefosfato isomerase

U: Unidade

UFC: Unidades formadoras de colônia

UFC/mL: Unidades formadoras de colônia por mililitro

UnB: Universidade de Brasília

Ura: Uracila

URA3: Gene para Orotidina-5-fosfato descarboxilase

URA3p: Promotor do gene URA3

URA7: Gene para CTP sintase 1

UV: Ultravioleta

v/v: Relação volume/volume

X: Vezes

Y: Rendimento

Y_{Lac/glicose}: Rendimento de lactato a partir da glicose

Y_{Lac/maltose}: Rendimento de lactato a partir da maltose

Y_{EtOH/maltose}: Rendimento de etanol a partir da maltose

YNB: Meio Base de Nitrogênio para Levedura

YPD: Meio Extrato de Levedura Peptona Dextrose

ZAE Cana: Zoneamento Agroecológico de Cana-de-açúcar

μ: Taxa de crescimento específico

μ_{máx}: Taxa de crescimento específico máxima

μM: Micromolar

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Etanol	18
1.1.1	Definição, formas de produção e vantagens.....	18
1.1.2	Cenário brasileiro na produção de etanol	19
1.2	A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.2.1	Definição e caracterização.....	23
1.2.2	Fermentação alcoólica.....	26
1.2.3	Cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> para produção de etanol	28
1.3	Bactérias ácido-láticas (LABs), principais contaminantes da indústria de etanol	29
1.3.1	Definição e caracterização.....	29
1.3.2	O contaminante <i>Lactobacillus spp.</i>	30
1.3.3	Efeito da contaminação bacteriana na produção de etanol	31
1.3.4	Mecanismos para controle da contaminação bacteriana em usinas de etanol.....	34
1.4	Peptídeos antimicrobianos	36
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Microrganismos	40
4.2	Genes, plasmídeos e sequências.....	40
4.3	Métodos.....	43
4.4	Caracterização dos perfis de crescimento em microplaca	47

4.5	Montagem do vetor pYIplacPR39 e transformação de <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK102-3A.....	49
4.6	Inspeção de atividade antimicrobiana do sobrenadante do cultivo da cepa de <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 102-3A transformante.....	51
4.7	Isolamento de cepas de bactérias ácido-láticas dos leites fermentados Yakult® e Chamyto®	52
4.8	Avaliação do efeito da contaminação por <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> no cultivo em erlenmeyers das cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> JP-1 e PE-2.....	54
4.9	Quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência.....	55
4.10	Caracterização dos perfis fermentativos das cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> JP-1 e PE-2 e das cepas <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> , sozinhas ou em cocultivo, na presença e ausência dos peptídeos antimicrobianos X e Y em fermentadores	56
4.11	Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Perfis de crescimento das cepas de leveduras na ausência e presença dos peptídeos antimicrobianos PR-39, PMAP-23 e Cecropin P1	59
5.2	Montagem do vetor pYIplacPR39 e confirmação da transformação da cepa de <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK102-3A.....	60
5.3	Inspeção de atividade antimicrobiana do sobrenadante do cultivo da <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK102-3A transformante	63
5.4	Isolamento de cepas de bactérias ácido-láticas dos leites fermentados Yakult® e Chamyto®	65
5.5	Perfis de crescimento das cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> JP-1 e PE-2 na ausência e presença dos peptídeos antimicrobianos X e Y.....	69
5.6	Avaliação do efeito da contaminação por <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> no cultivo em erlenmeyers das cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> JP-1 e PE-2.....	74

5.7	Perfis fermentativos das cepas industriais de <i>S. cerevisiae</i> JP-1 e PE-2 e de <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> , em cocultivo e individualmente, na presença e ausência dos peptídeos X e Y, em fermentadores.....	77
5.8	Parâmetros cinéticos	86
6	CONCLUSÃO	88
7	BIBLIOGRAFIA.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 ETANOL

1.1.1 Definição, formas de produção e vantagens

O etanol também é conhecido como álcool etílico ou EtOH e possui fórmula química C_2H_5OH . Ele pode ser usado na sua forma pura ou misturado à gasolina (gasool), quando atua como aditivo substituindo alternativas tóxicas, como o tetraetil e o tetrametil-chumbo. Possui alta inflamabilidade e menor pressão de vapor se comparado à gasolina, resultando em emissões evaporativas reduzidas. Seu uso como substituinte da gasolina tem muitas vantagens, como biodegradabilidade, maiores octanagem (108), limites de inflamabilidade e calor de vaporização e menores níveis de toxicidade e poluência (MOHD AZHAR *et al.*, 2017; BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

A produção de etanol pode ser por síntese química ou biológica, sendo chamado de bioetanol nesse último caso. A rota de produção química é baseada na hidratação do etileno, já a biológica ocorre por meio de microrganismos produtores, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a mais empregada mundialmente. A rota biológica é a mais utilizada e é tipicamente conhecida como fermentação alcoólica (LOPES *et al.*, 2016; MOHD AZHAR *et al.*, 2017).

Os Estados Unidos (EUA) são os maiores produtores de etanol, seguido pelo Brasil. Juntos, respondem por 85% da produção mundial (MOHD AZHAR *et al.*, 2017). Contudo, esses países utilizam diferentes matérias-primas para a produção. No Brasil a cana-de-açúcar é a mais empregada, enquanto que nos EUA é o milho (LOPES *et al.*, 2016). O etanol derivado do milho produz 25% a mais de energia do que a utilizada para a sua produção e reduz 12% da emissão de gases causadores do efeito estufa (do inglês *greenhouse gases*, ou GHG) (HILL *et al.*, 2006). Já o produzido da cana-de-açúcar produz 93% a mais e reduz de 40 a 62% a emissão de GHG (LOPES *et al.*, 2016). Parte dessa diferença na balança energética é proveniente da sacarificação necessária dos grãos de milho por tratamento térmico

ou enzimático previamente à utilização, enquanto que a cana entra diretamente na etapa de moagem ou difusão do processo de produção industrial (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

Dentre os biocombustíveis, o etanol se destaca por possuir crescentes investimentos e uma alta demanda global. Seus benefícios ecológicos e a possibilidade de usar matérias-primas regionais e abundantes, como resíduos agroindustriais, denotam sua importância em relação a outros tipos de biocombustíveis (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015). A cana-de-açúcar é um material rico em açúcares, onde a sacarose é o mais abundante, correspondendo de 10 a 20% da cana. O processo de produção de etanol no Brasil começa com a seleção das canas seguido da extração dos açúcares por moagem ou difusão, tratamentos para a limpeza e redução da carga microbiana, fermentação, retificação e desidratação, resultando na produção do álcool anidro (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

A produção brasileira é baseada na reciclagem de células (processo Melle-Boinot), que consiste no reuso múltiplo das células de levedura pós-centrifugação. Antes do reuso, as células concentradas passam por um processo de descontaminação com ácidos orgânicos, normalmente ácido sulfúrico. As reciclagens são feitas entre 8h e 15h de cada fermentação e podem durar 210 dias consecutivos, resultando em 400 a 600 reusos (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

1.1.2 Cenário brasileiro na produção de etanol

No Brasil, o uso do etanol como um aditivo da gasolina surgiu em 1920, mas somente em 1931 que o etanol produzido a partir da cana oficialmente começou a ser misturado com a gasolina. Em 1975, após a primeira crise do petróleo, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional do Álcool (ProÁlcool) que viabilizou o desenvolvimento em larga escala da indústria do açúcar e do etanol com o objetivo de promover a independência energética. Um dos focos desse programa era introduzir no mercado uma mistura de gasolina e etanol hidratado e incentivar o desenvolvimento de veículos movidos exclusivamente a etanol (GREEN FACTS, 2017).

Em 1979, um programa mais ambicioso foi implementado após a segunda maior crise mundial do petróleo, promovendo o desenvolvimento das plantações de cana e da produção de veículos movidos a etanol. Para isso, foram introduzidos subsídios governamentais que, somados ao aumento do número de carros movidos a álcool, resultaram no rápido aumento da produção de etanol no país (GREEN FACTS, 2017), aumentando de 600 milhões de litros em 1975/76 para 11,9 bilhões em 1985 (Figura 1) (TORRES *et al.*, 2011).

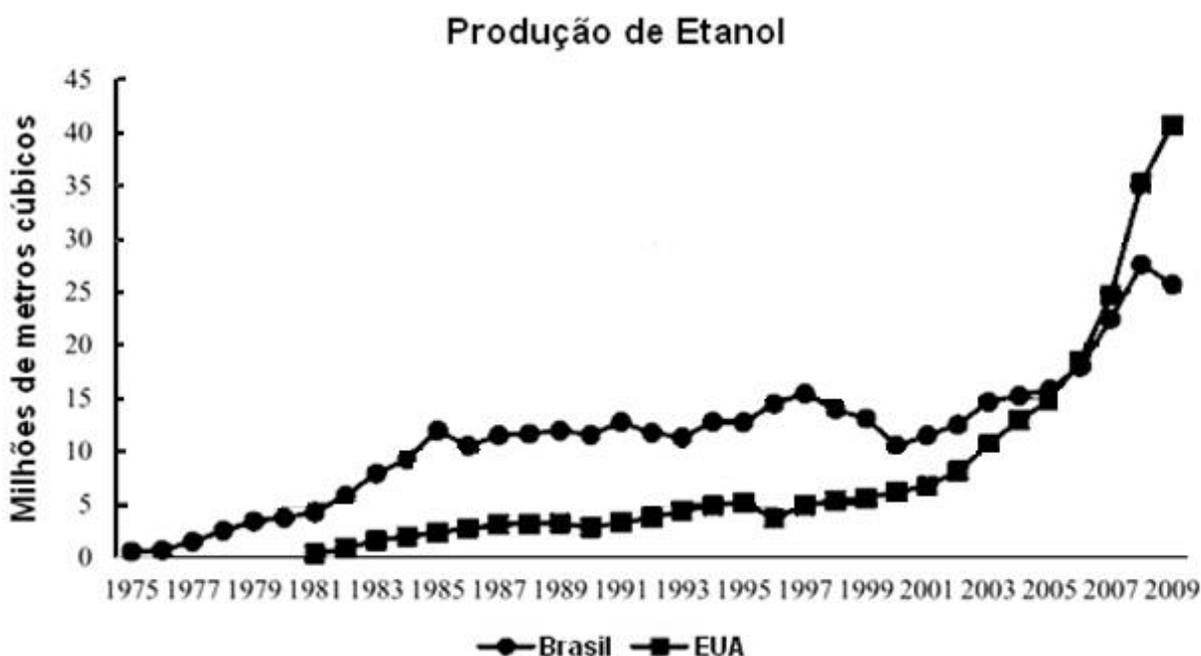


Figura 1. Produção de etanol no Brasil e nos EUA de 1975 até 2009 (Modificado de TORRES *et al.*, 2011).

Os incentivos fornecidos pelo programa ProÁlcool foram: financiamentos agrícolas e industriais, aquisição do produto garantida pelo Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA), preço máximo de venda do etanol equivalente a 66% do preço da gasolina e diminuição de impostos que afetavam os consumidores (TORRES *et al.*, 2011). Porém, esses subsídios eram temporários, já que era esperado que os altos preços do petróleo fizessem o etanol ser competitivo a longo prazo. Entretanto, o preço internacional do petróleo diminuiu consideravelmente em 1986 e, com o aumento do preço do açúcar, a produção do etanol combustível diminuiu drasticamente (GREEN FACTS, 2017).

Entre 1989 e 2000, o sistema de fornecimento de combustíveis no Brasil foi severamente afetado pela falta de incentivos financeiros pelo governo. Em 1999 o

IAA, que regulou a indústria do açúcar e do álcool por seis décadas, foi extinto e o planejamento e a implementação da produção industrial, assim como a distribuição e a comercialização, foram gradualmente transferidos para o setor privado (GREEN FACTS, 2017). Contudo, em 1993, passou a ser obrigatória a mistura de pelo menos 22% de etanol hidratado à gasolina. Recentemente a publicação da Resolução CIMA nº 1 de 2015 recomenda que pelo menos 27% de etanol anidro seja adicionado à gasolina (GREEN FACTS, 2017).

O cenário do etanol brasileiro começou a mudar nos anos 2000. A exportação do etanol aumentou como resultado do aumento do preço do petróleo e da conscientização internacional da importância dos biocombustíveis. Dessa forma, a indústria brasileira desse biocombustível modernizou as tecnologias empregadas e expandiu sua produção. Entretanto, nessa mesma época surgiram algumas preocupações sobre os biocombustíveis. Uma delas era o debate combustível *versus* alimento, o qual predizia que a produção de biocombustíveis estava impactando os preços dos alimentos e comprometendo a segurança alimentar, principalmente em países pobres que dependem substancialmente das importações de alimentos básicos. Outra dizia que a produção de biocombustíveis impactava negativamente o meio ambiente pelo efeito do uso indireto da terra (GREEN FACTS, 2017; TORRES *et al.*, 2011; WALTER *et al.*, 2008).

Contudo, foi relatado que a área usada para aumentar a produção de cana-de-açúcar substituíria áreas de pasto sem prejudicar a produção de alimentos básicos. Terras marginais e áreas de pastagem degradadas seriam áreas interessantes para acomodar a expansão da produção de alimentos e de biocombustíveis com baixos custos ambientais. De fato, em 2009 foi estabelecido o Zoneamento Agro-Ecológico de Cana-de-açúcar (ZAE Cana) que descrevia as regras para a expansão sustentável da plantação de cana para a produção de etanol e de açúcar no Brasil. Segundo as regras desse decreto, somente 7,5% do território brasileiro é passível para o plantio da cana (TORRES *et al.*, 2011).

Em 2003 a indústria automobilística lançou os carros “flex”, carros que são movidos por gasolina e etanol, e isso contribuiu notadamente para o desenvolvimento do mercado do etanol doméstico. Como resultado, em 2010 os carros flex perfizeram 86% dos veículos produzidos no país e hoje o Brasil é o maior exportador de etanol combustível produzido da cana-de-açúcar, destinando 20% da

sua produção para o mercado externo e alcançando em 2011 a substituição de 40% do consumo da gasolina pelo etanol (SU *et al.*, 2015; GREEN FACTS, 2017; TORRES *et al.*, 2011).

A importância do etanol para o Brasil revela-se também no fato de que atualmente um terço dos municípios do país tem uma pequena ou grande usina de etanol ou biodiesel e, desde 2012, a produção energética a partir do bagaço da cana aumentou em 65%. O etanol é a segunda maior fonte de energia do Brasil, atrás apenas das hidrelétricas, e seu uso é fundamental para o cumprimento do Acordo de Paris que prevê a redução das emissões de dióxido de carbono (CO₂) em 37% até 2025 (AGÊNCIA SENADO, 2017).

Considerando que um galão de etanol corresponde a 3,78541 litros, a produção mundial de etanol aumentou de 49,66 bilhões de litros em 2007 para 97,20 em 2015, como mostra Figura 2 (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2015).

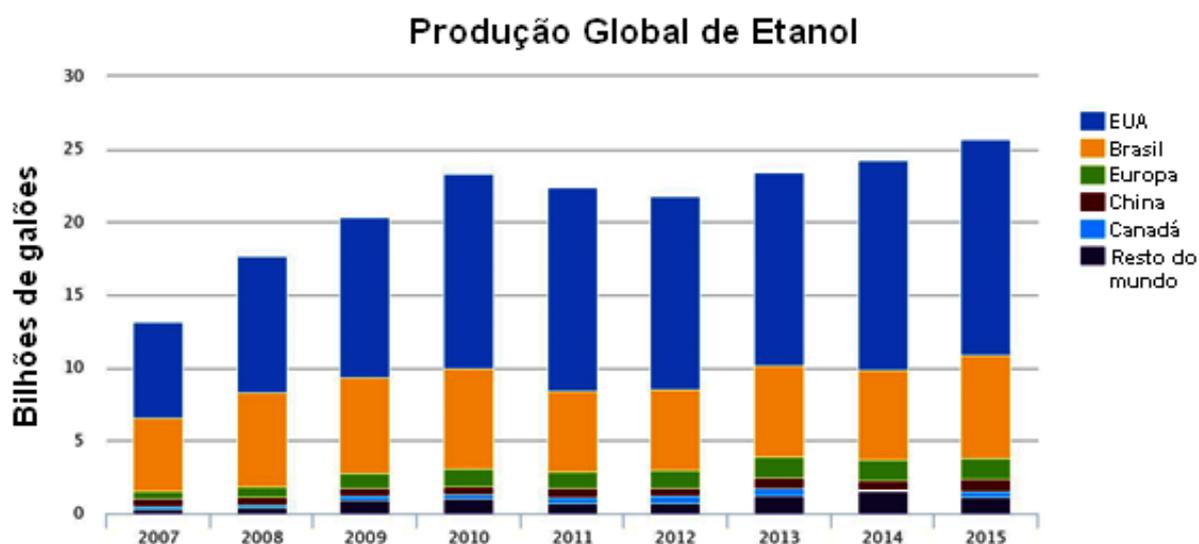


Figura 2. Produção mundial de etanol de 2007 a 2015 (Modificado de RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2015).

Em 2016 a produção foi de 97,4 bilhões de litros, já em 2017 a expectativa era de 98,3, aumentando para 100 bilhões de litros produzidos em 2018 (NGUYEN, 2017). Portanto, o Brasil é e continuará sendo um importante produtor de etanol nos próximos anos. Há alguns fatores locais favoráveis para a produção de etanol como o clima, a disponibilidade de terras, a longa experiência de produção, tecnologia comercial existente e o tamanho do mercado doméstico. Além disso, o etanol

produzido da cana é o que tem a melhor balanço energética, fazendo com que para cada unidade de energia fóssil consumida na sua produção 9,3 unidades de energia renovável são produzidas com potencial de alcançar 11,6 unidades em 2020 (LOPES *et al.*, 2016; WALTER *et al.*, 2008).

Recentemente o governo brasileiro está pleiteando o projeto de lei 9.086/2017, conhecido como RenovaBio, que consiste numa política de Estado cujo objetivo é traçar uma estratégia para reconhecer o papel de todos os tipos de biocombustíveis na matriz energética brasileira, reforçando a segurança energética e a mitigação da emissão de gases causadores do efeito estufa (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2017).

1.2 A LEVEDURA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1.2.1 Definição e caracterização

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular que tem características de células eucarióticas superiores constituindo-se de parede celular, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vacúolos, vesículas secretoras e membrana celular, como ilustrado na Figura 3 (WALKER e STEWART, 2016). As células geralmente são elípticas, perfazendo um diâmetro de 5-10 μm na sua parte mais larga e 5 μm na mais estreita. Se reproduzem assexuadamente por brotamento e fissão binária e sexuadamente pela formação de esporos. (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

S. cerevisiae é considerada aeróbica facultativa por ser capaz de utilizar o metabolismo respiratório e fermentativo. Além da produção de biomassa, etanol e CO_2 , a levedura também possui metabolismos alternativos para a produção de produtos secundários (ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, glicerol, succinato, álcoois superiores, ácidos orgânicos etc), que podem estar relacionados diretamente à adaptação e à sobrevivência, sendo produzidos aeróbica e anaerobicamente (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

As leveduras são quimiorganotróficas, o que significa que elas utilizam fontes orgânicas para obtenção de energia. Em meios de fermentação industrial de bebidas, as fontes de carbono mais comumente utilizadas são: maltose, sacarose, lactose e frutose. A levedura *S. cerevisiae* é considerada etanologênica por conseguir fermentar glicose, frutose, manose, galactose, sacarose, maltose e maltotriose em etanol e CO₂ (WALKER e STEWART, 2016).

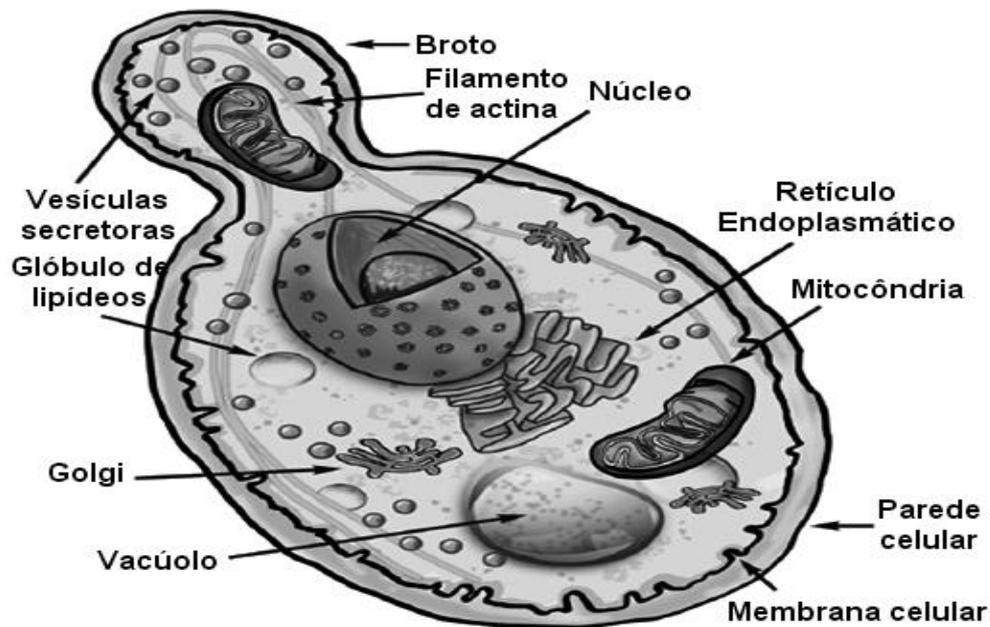


Figura 3. Principais constituintes de uma célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de WALKER e STEWART, 2016).

A *S. cerevisiae* necessita de água, temperatura e pH adequados ao crescimento (entre 20 e 30°C e 4,5 a 6,5, respectivamente), elementos traços, macro e micronutrientes. Os macronutrientes precisam ser fornecidos em concentração milimolar e constituem-se de fonte de carbono (açúcares), de nitrogênio (aminoácidos, pequenos peptídeos e sais de amônia), oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio. Já os micronutrientes só precisam ser fornecidos em concentração micromolar e compreendem elementos traços como o cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco. Além disso, as leveduras necessitam de pequenas concentrações de fatores de crescimento, a citar pelas vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleotídeos e nucleosídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Uma mistura de extrato de levedura, fosfato de amônia e minerais é o suficiente para fornecê-los (WALKER e STEWART, 2016).

Os nutrientes são transportados pela membrana plasmática para dentro da célula por alguns mecanismos: difusão simples (livre e sem gasto energético), difusão facilitada (catalisada), transporte ativo (com gasto energético) e por canais. A *S. cerevisiae* possui duas classes de sistema de captação de aminoácidos dependentes de energia: a permease de aminoácidos gerais (do inglês *General Aminoacid Permease*, ou GAP) que absorve todos os aminoácidos e os transportadores de aminoácidos específicos (WALKER e STEWART, 2016).

Em *S. cerevisiae* praticamente todos os açúcares são internalizados por difusão mediada por um transportador (VAN LEEUWEN *et al.*, 1992). O transporte de glicose ocorre por difusão facilitada, enquanto que o da maltose, principal açúcar presente no mosto cervejeiro, é por transporte ativo (WALKER e STEWART, 2016). A maltose pode ser hidrolisada extracelularmente através da enzima maltase (α -glucosidase), porém essa enzima possui pouca afinidade pela maltose e, portanto a maioria desse dissacarídeo é internalizado por transporte próton-simporte (VAN LEEUWEN *et al.*, 1992). Dentro da célula, a maltose é hidrolisada por uma maltase, gerando duas moléculas de glicose que são direcionadas à via glicolítica (NOVAK *et al.*, 2004).

A *S. cerevisiae* metaboliza a sacarose de duas formas. O mecanismo predominante ocorre através da hidrólise extracelular por uma invertase codificada pelo gene SUC2, resultando em uma molécula de glicose e outra de frutose. Essas moléculas entram na célula por difusão facilitada através de transportadores de hexose. O outro mecanismo ocorre por transporte ativo da sacarose através da internalização por próton-simporte e posterior hidrólise intracelular (BASSO *et al.*, 2011).

Em condição anaeróbica, a *S. cerevisiae* realiza fermentação alcoólica, quando ocorre a produção de etanol para manter o balanço redox (regeneração de NAD⁺) e de ATP para o crescimento celular. Apesar de ser caracterizada como anaeróbia facultativa, a *S. cerevisiae* necessita do oxigênio para a produção de ácidos graxos da membrana celular e para a biossíntese de esterol. Sob condições anaeróbicas, ela é auxotrófica para ácido oleico e ergosterol, necessitando de uma suplementação no meio de cultivo ou de uma breve oxigenação ao iniciar a fermentação (WALKER e STEWART, 2016).

1.2.2 Fermentação alcoólica

A produção de bebidas alcoólicas por meio da fermentação microbiana é uma das práticas biotecnológicas mais antigas da sociedade, sendo realizada em condições anaeróbicas ou aeróbicas, essa última somente em espécies Crabtree positivas. A *S. cerevisiae* domina essa produção tanto pelo seu alto poder fermentativo quanto pela produção de moléculas que influenciam o aroma e o sabor das bebidas, como os álcoois superiores, os polióis, ésteres, ácidos orgânicos, dicetonas vicinais e aldeídos (WALKER e STEWART, 2016).

Através da fermentação alcoólica, várias espécies de leveduras conseguem converter açúcares em etanol, CO₂ e outros coprodutos, como glicerol, acetato, succinato, piruvato, álcoois superiores, ésteres e biomassa (ALBERGARIA e ARNEBORG, 2016; BAI *et al.*, 2007). A via metabólica envolvida na fermentação do etanol em *S. cerevisiae* é a glicólise (via Embden-Meyerhof-Parnas, ou EMP), pela qual uma molécula de glicose é metabolizada em duas moléculas de piruvato (Figura 4) (WALKER e STEWART, 2016).

O ganho líquido energético da glicólise é de 2 ATPs, sendo a única fonte de energia durante o metabolismo fermentativo em *S. cerevisiae*, diferentemente do que ocorre no metabolismo respiratório, onde há o ganho de 38 ATPs (WALKER e STEWART, 2016). Esses 2 ATPs são direcionados para a produção de biomassa, fazendo com que a produção de etanol esteja intimamente acoplada ao crescimento celular. Sob condições anaeróbicas, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído e então reduzido a etanol com liberação de uma molécula de CO₂ e produção de uma de NAD⁺ para cada piruvato (BAI *et al.*, 2007; WALKER e STEWART, 2016) (Figura 4).

Como a maltose é constituída de duas moléculas de glicose e como o seu transporte gasta 1 ATP, o rendimento líquido de um mol de maltose são 3 moles de ATP. Assim, um déficit de 2,697 mmol de ATP ocorre na formação de 100 g de biomassa de uma quantidade equivalente de glicose. Portanto, a equação global para a formação de 100 g de biomassa em fermentação anaeróbica da maltose é: 3,596 mmol de maltose gera 100 g de biomassa; 1,102 mmol de glicerol; 11,836 mmol de etanol e 12,421 mmol de CO₂ (WEUSTHUIS *et al.*, 1993).

Durante a fermentação, as células acidificam o meio de cultivo ao secretarem prótons H^+ (resultante da atividade ATPase da bomba de prótons) e ácidos orgânicos (succinato e acetato), além de removerem agentes tamponantes e produzirem CO_2 que se dissolve acidificando o meio (WALKER e STEWART, 2016).

O rendimento teórico máximo de etanol assumindo a glicose como substrato ($Y_{max} EtOH/Gli$) é de 0,511 g/g, sendo 0,489 g/g o rendimento de CO_2 ($Y CO_2/Gli$). Em condições industriais, o rendimento de etanol chega a 90 – 93% do rendimento teórico máximo.

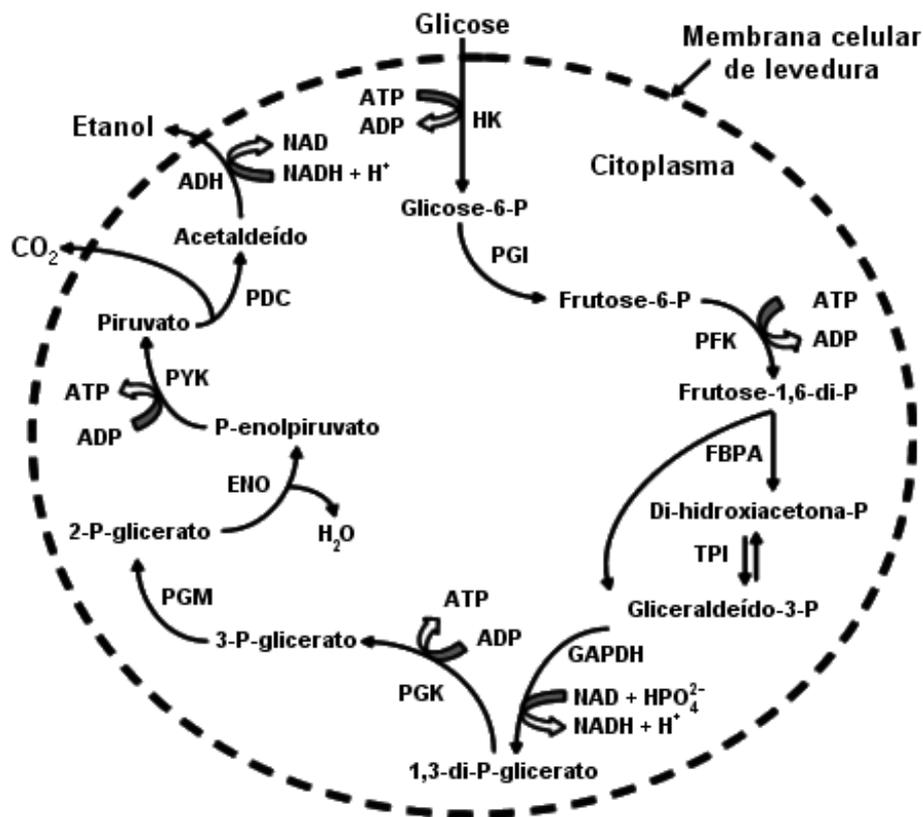


Figura 4. Via metabólica da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae* (Modificado de BAI *et al.*, 2007).

Após o etanol e o CO_2 , o glicerol é o metabólito secundário mais produzido, chegando a 1% (p/v) (BAI *et al.*, 2007). Ele é produzido em reações de balanço-redox ou em resposta ao estresse osmótico. Se há uma alta densidade celular ou carência de água, a célula responde a isso produzindo mais glicerol ou trealose, que protegem a membrana celular da dissecação (WALKER e STEWART, 2016).

Além de ser o principal microrganismo utilizado na produção de bebidas alcoólicas, a *S. cerevisiae* também é a preferida para a produção industrial de etanol

combustível (BAI *et al.*, 2007), isso graças ao seu alto poder fermentativo e por ser bem adaptada às condições de cultivo industriais, apresentando características desejáveis como: alta tolerância ao etanol e a alguns ácidos orgânicos; capacidade de crescimento em baixo pH e na ausência de oxigênio (ALBERGARIA e ARNEBORG, 2016); fermentações rápidas; osmotolerantes; resistentes a altas temperaturas; alta viabilidade celular após a reciclagem de células (SOARES-COSTA *et al.*, 2013); produção de etanol acima de 20% (v/v); produção de etanol mesmo na presença de oxigênio (efeito Crabtree) e altas taxas de consumo de substrato (COT *et al.*, 2007).

1.2.3 Cepas industriais de *S. cerevisiae* para produção de etanol

No Brasil, as usinas produtoras de etanol utilizam principalmente seis cepas de *S. cerevisiae*: PE- 2, CAT-1, FT858L, Fermel®, BG-1 e SA-1 (ALBERGARIA e ARNEBORG, 2016). Dentre essas, a cepa PE-2 foi responsável por 30% da produção nacional e 10% da mundial em 2009 e é um dos maiores exemplos de sucesso de leveduras selvagens isoladas de dornas de fermentação. Possui alta eficiência fermentativa e persistência prolongada no sistema de produção, além de apresentar uma alta plasticidade genômica, o que poderia explicar porque esta linhagem se adapta bem a diferentes tipos de processos fermentativos (SOARES-COSTA *et al.*, 2013; ABREU-CAVALHEIRO e MONTEIRO, 2013). Adicionalmente, as linhagens PE-2 e CAT-1 possuem mais cópias dos genes de biossíntese de tiamina (B1) e piridoxina (B6), permitindo que a sua eficácia fermentativa em um meio sem vitaminas seja superior ao de outras cepas (ALBERGARIA e ARNEBORG, 2016).

A cepa industrial JP-1 foi isolada em 2005 no nordeste brasileiro por possuir alta predominância sobre outras populações de leveduras. Ela é mais resistente às condições estressantes da produção de etanol e é altamente eficiente quando predomina o processo industrial, fazendo com que o rendimento da conversão de açúcar em etanol atinja 92%. Além disso, foi observado que ela possui especificidade de substrato, mostrando-se competitiva apenas em indústrias que utilizam cana-de-açúcar (DA SILVA FILHO *et al.*, 2005).

1.3 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (LABS), PRINCIPAIS CONTAMINANTES DA INDÚSTRIA DE ETANOL

1.3.1 Definição e caracterização

Historicamente as LABs foram definidas como ubíquas e formadas por várias famílias de microrganismos que conseguem fermentar uma variedade de nutrientes e produzir ácido láctico como produto principal. Além do ácido láctico, elas podem produzir outros produtos em menor quantidade, a citar pelo acetato, etanol, dióxido de carbono, formato e succinato. Seu habitat consiste de ambientes ricos em carboidratos como em alimentos, esgotos, plantas e nas cavidades de humanos e animais (LIU *et al.*, 2014).

As LABs são bactérias relacionadas filogeneticamente que possuem como características comuns: gram-positivas, catalase negativa, anaeróbicas ou microaerófilas, tolerantes a baixos pHs, podem ter forma de bastão ou de coco, não-formadoras de esporos e nutricionalmente fastidiosas (DOUILLARD *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; BROADBENT *et al.*, 2012). Elas não possuem uma cadeia transportadora de elétrons ativa e, apesar do metabolismo fermentativo ser o mais utilizado para geração de energia, algumas espécies possuem em seu genoma a informação necessária para realizar aerobiose e crescimento respiratório (IANNIELLO *et al.*, 2016). Dessa forma, as LABs obtêm energia por meio da fosforilação em nível do substrato. Esse grupo de bactérias pode ainda ter um comportamento homofermentativo, que produz somente ácido láctico como produto final; ou heterofermentativo, produzindo ácido láctico e também dióxido de carbono e etanol ou acetato (LIU *et al.*, 2014).

Para produzir energia em aerobiose, as LABs necessitam das enzimas piruvato oxidase (POX) e acetato quinase (ACK). Essas enzimas oxidam o piruvato em acetato, produzindo também CO₂, H₂O₂ e ATP. Entretanto, para a respiração aeróbica ser ativada, elas necessitam da via de biossíntese de heme e nenhuma espécie de *Lactobacillus* possui essa via completa. Sabe-se que uma suplementação exógena de heme e menaquinona ativa a formação de uma cadeia

respiratória mínima constituída de um doador de elétrons (NADH desidrogenase), uma quinona transportadora de elétrons (menaquinona) e uma redutase de oxigênio terminal (citocromo bd oxidase). O citocromo bd oxidase reduz o oxigênio em água, gerando uma força próton-motriz na membrana que produz ATP pela atividade da F_0F_1 ATPase (IANNIELLO *et al.*, 2016).

Os genes de captação de açúcar e metabolismo variam muito entre espécies. A presença ou ausência de alguns pode ser explicada por uma adaptação do crescimento a diversos nichos. Algumas cepas isoladas de laticínios, como *L. casei*, possuem menor número de cassetes envolvidos no metabolismo de substratos, o que se deve possivelmente ao fato do nicho em um laticínio ser rico, dispensando a necessidade de manter sistemas de captação para uma grande variedade de diferentes substratos. Há vários relatos de que a adaptação a laticínios é associada à deleção e inativação de genes que não são mais requeridos neste ambiente, resultando em um decaimento gênico com a perda de funções associadas com o metabolismo de carboidratos, de aminoácidos e com a biossíntese de cofatores (SMOKVINA *et al.*, 2013; DOUILLARD *et al.*, 2013).

1.3.2 O contaminante *Lactobacillus spp.*

O gênero *Lactobacillus* atualmente possui 224 espécies e é o mais diverso dentro do grupo das LABs. Caracteriza-se por células gram-positivas, em forma de bastão, não-esporulantes, catalase negativa quando crescidas sem fonte de heme, imóveis e ocasionalmente redutoras de nitrato (HAMMES e HERTEL, 2006). Muitas espécies possuem status GRAS (do inglês *Generally Recognized as Safe*) e são utilizadas como preservantes na produção de alimentos fermentados e como probióticos. A temperatura e o pH ótimos para o crescimento são 30-40 °C e 5,5-6,2, respectivamente (SALVETTI *et al.*, 2012).

O gênero *Lactobacillus* foi organizado em três grupos de acordo com o tipo de açúcar fermentado e dos produtos de fermentação: Grupo A - espécies homofermentativas obrigatórias; Grupo B - espécies heterofermentativas facultativas; Grupo C – espécies heterofermentativas obrigatórias (SALVETTI *et al.*, 2012).

O grupo A fermenta hexoses em ácido láctico (>85%) pela via EMP, enquanto pentoses e gluconato não são fermentados. Já o grupo B fermenta hexose em ácido láctico através da via EMP e consegue degradar pentoses e gluconato por uma fosfocetolase induzível (uma enzima da via das pentoses fosfato) produzindo ácido acético, etanol e ácido fórmico em limitação de glicose. O grupo C não possui a fosfocetolase, mas a frutose-1,6-bifosfato aldolase, e metaboliza pentoses e hexoses exclusivamente pela via fosfogluconato (primeira parte da via das pentoses fosfato) produzindo ácido láctico, etanol (ou ácido acético) e CO₂ (SALVETTI *et al.*, 2012).

Sua distribuição é ampla e podem ser encontradas espécies em vários produtos lácteos, no trato gastrointestinal de animais e em habitats diversos (SMOKVINA *et al.*, 2013). Algumas linhagens são predominantes no mercado de probióticos, como as das espécies *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* (DOUILLARD *et al.*, 2013).

A nomenclatura das espécies *Lactobacillus casei* e *L. paracasei* já sofreu diversas mudanças e a maioria das suas cepas são membros da mesma espécie, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (SMOKVINA *et al.*, 2013). Já foram feitas classificações de *Lactobacillus* baseadas nas sequências gênicas do RNAr 16S, dividindo o gênero em 3 grupos: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei-Pediococcus* e *Leuconostoc*. Douillard *et al.* (2013) e Salvetti *et al.* (2012) reportaram a existência de vários grupos, sendo que o grupo *Lactobacillus casei* consiste de três espécies: *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*.

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* já foi classificada como *L. casei subsp. rhamnosus*. É uma bactéria heterofermentativa facultativa com células em forma de bastão, podendo estar isoladas ou em cadeias curtas. Possuem capacidade de fermentar carboidratos como arabinose, celobiose, esculina, ribose, sorbitol e sacarose. Essa espécie é uma das mais estudadas e é amplamente utilizada como probiótico (FUQUAY *et al.*, 2011).

1.3.3 Efeito da contaminação bacteriana na produção de etanol

Um dos maiores gargalos dentro da indústria de bioetanol é a contaminação bacteriana (ABREU-CAVALHEIRO e MONTEIRO, 2013). Isso ocorre porque a

produção industrial é projetada para operar em condições não-estéreis, o que facilita o surgimento de contaminações microbianas crônicas (BECKNER *et al.*, 2011). Uma fermentação controlada apresenta até 10^5 UFC/mL de contaminantes. Acima de 10^7 há riscos de um significativo comprometimento da produção de bioetanol. Nas usinas brasileiras, quando a contaminação alcança de 10^7 a 10^8 UFC/mL, há perda de aproximadamente 20.000 litros de etanol por dia. Em casos extremos, o prejuízo no rendimento pode chegar a 30%, representando enormes perdas econômicas (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

Dentre os principais contaminantes, 98% são bactérias gram-positivas, sendo as LABs as predominantes. Os gêneros mais encontrados são *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Sporolactobacillus* e *Pseudomonas*. Entre seus efeitos adversos têm-se a diminuição da produtividade de etanol, aumento do tempo de fermentação e estresse oxidativo nas leveduras. Elas são prejudiciais principalmente por reduzirem a superfície de contato da levedura com o meio de cultivo, coagregando a elas e influenciando a floculação. Além disso, produzem metabólitos inibidores do crescimento, como os ácidos lático e acético, competem para a captação de substratos necessários ao crescimento e formam biofilme (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015; ABREU-CAVALHEIRO e MONTEIRO, 2013; BREXÓ e SANT'ANA, 2017). Apesar dos efeitos serem bem conhecidos, há pouco conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre leveduras e bactérias contaminantes (LIU *et al.*, 2015; BREXÓ e SANT'ANA, 2017). Finalmente, os metabólitos produzidos pelas bactérias contaminantes diminuem a viabilidade celular das leveduras e aumentam a produção de glicerol e outros coprodutos, resultando em perdas maiores no rendimento e produtividade de etanol (BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

Dentre as LABs, as espécies de *Lactobacillus* são as mais presentes em contaminações industriais. Há relatos de corresponderem de 44 a 60% da população total de contaminantes. Elas sobrevivem bem sob altas concentrações de etanol, ausência de oxigênio e pH ácido. Já foi reportado na literatura perda de 22% na produção de etanol causada pela espécie *Lactobacillus fermentum*. No Brasil, onde é realizada a reciclagem de células, o prejuízo causado pela contaminação com bactérias pode ser ainda maior. Foi detectada a presença de cepas de *L. fermentum*

e *L. vini* em dornas de produção industrial contendo 10% de etanol, demonstrando a seleção de bactérias mais tolerantes (BECKNER *et al.*, 2011). De modo geral, estima-se que o prejuízo dessas bactérias em uma indústria seja de 4 milhões de litros de bioetanol por mês (BECKNER *et al.*, 2011; CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015).

Muitas cepas de *S. cerevisiae*, inclusive PE-2, não são floculantes quando cultivadas isoladamente. Entretanto, esse fenótipo aparece em algumas fermentações devido à coagregação com bactérias contaminantes, principalmente cepas de *L. fermentum*, *L. vini* e *L. plantarum*. Carvalho-Netto e colaboradores (2015) reportaram que para concentrações acima de 10^5 células/mL de *L. fermentum*, as leveduras PE-2 apresentavam-se coagregadas e sedimentadas, produzindo 25% menos etanol do que produzem normalmente. Estima-se o prejuízo de 12 milhões de litros de etanol em três meses de fermentação da levedura PE-2 coagregada com *L. fermentum*.

Apesar de tolerante à acidez, a exposição de *S. cerevisiae* a altas concentrações de ácidos orgânicos reduz sua performance fermentativa. Isso porque esses ácidos são produzidos em sua forma não-dissociada e conseguem difundir livremente pela membrana celular, dissociando-se no citoplasma e conseqüentemente gerando prótons que acidificam o pH intracelular, inibindo diversas funções metabólicas. A dissociação também produz ânions que podem gerar radicais livres, resultando em estresse oxidativo. Na tentativa de restabelecer seu pH intracelular, as leveduras bombeiam prótons para o meio extracelular, mas com o consumo excessivo de ATP, o que pode levar à inibição de certas atividades por depleção energética (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015).

A espécie *S. cerevisiae* produz pouco ácidos orgânicos, por isso quando eles são detectados em produção industrial deduz-se que foi pela presença de bactérias contaminantes. Sob condições de laboratório, a cepa PE-2 produz 1,5 mg/L de ácido láctico e 2,4 mg/L de ácido acético. Em condições com contaminantes, a concentração de ácido láctico aumenta 3,5 vezes e a de ácido acético 6 vezes. Foi observado um efeito sinérgico dos ácidos láctico e acético a partir de 0,5% e 0,04% respectivamente, reduzindo a taxa de crescimento, a produção de etanol e a taxa de consumo de glicose em PE-2 (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015). Foi reportado que o ácido láctico a 4% teve prejuízo máximo na produção de etanol em uma fermentação

em pH 4, já o ácido acético mostrou-se benéfico na concentração de até 0,2% por acelerar a produção de etanol independente do pH. Com pH entre 5 e 5,5, a *S. cerevisiae* mostrou-se resistente a 0,8% de ácido acético. Porém, entre 4 e 4,5, a produção de etanol foi reduzida sob 0,4% de ácido acético (BECKNER *et al.*, 2011).

Mesmo tendo efeitos mais prejudiciais em pHs mais ácidos, as LABs também comprometem fermentações em pHs mais altos. Isso foi demonstrado em um trabalho que simulou uma contaminação por *Lactobacillus* em uma fermentação contínua de *S. cerevisiae* em pH 6. Em três dias, a população das bactérias aumentou 4,4 logs e a da levedura reduziu em 83%, a concentração de etanol diminuiu em 44% e a de ácido lático aumentou de 0,41% para 2%. Nessas condições, somente 0,01% de ácido lático está em sua forma não-dissociada e seria necessário no mínimo 3,4% para reduzir em 50% o número de leveduras, ressaltando o papel de outros mecanismos inibitórios envolvidos na interação entre *Lactobacillus* e *S. cerevisiae* (BECKNER *et al.*, 2011). A competição entre essas duas espécies por elementos traços, como a tiamina, também é um fator considerável para explicar a inibição de *S. cerevisiae*, além da produção de outros compostos pelas LABs, como o diacetil, reuterina, ácidos graxos hidroxilados, ácido butírico e peptídeos (BECKNER *et al.*, 2011).

1.3.4 Mecanismos para controle da contaminação bacteriana em usinas de etanol

Algumas estratégias já são utilizadas para controle da contaminação bacteriana na fermentação alcohólica, como o tratamento ácido das leveduras ao final de cada batelada, adição de antibióticos, de amônia e de peróxido de hidrogênio de ureia. Porém, muitas metodologias apresentam desvantagens, pois aumentam o custo de produção, contribuem para o estabelecimento de bactérias mais resistentes, algumas são danosas às leveduras e outras podem comprometer a qualidade do produto final (MURPHREE *et al.*, 2014; CARVALHO-NETTO *et al.*, 2015; BECKNER *et al.*, 2011, LOPES *et al.*, 2016; BREXÓ e SANT'ANA, 2017).

Além disso, o tratamento com ácido sulfúrico estimula mecanismos de reprogramação gênica pela levedura na tentativa de reparar os danos provocados

na parede celular para manter a viabilidade. Durante esse mecanismo, o crescimento celular é reprimido, a captação de glicose diminui, respostas ao estresse oxidativo são induzidas e uma rápida biossíntese de ATP é requerida para a manutenção das respostas anti-estresse (DE LUCENA *et al.*, 2015).

Os produtos mais comumente utilizados para controlar a contaminação bacteriana nas usinas de etanol são os antibióticos: penicilina, agindo na membrana celular, e a virginiamicina, inibindo a síntese protéica. Outros também são utilizados a citar pela estreptomicina, tetraciclina, monensina e uma mistura de vários antibióticos. A penicilina é considerada o antibiótico mais efetivo no controle das contaminações, porém sob pH ácidos sua meia-vida é reduzida e por isso a virginiamicina ganha destaque, pois sua atividade não é afetada pelo pH (MUTHAIYAN *et al.*, 2011).

Existem diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da resistência aos antibióticos, como o uso abusivo e inadequado. Esse problema está se agravando dentro das indústrias de etanol porque muitas vezes os antibióticos são utilizados profilaticamente ou em doses inapropriadas. As subdosagens podem levar à falta de eficácia e aumentar o risco do desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antibióticos, já a sobredosagem pode influenciar a taxa fermentativa da levedura e aumentar as chances de que a destilação não inative o antibiótico utilizado (MUTHAIYAN *et al.*, 2011).

A literatura já reportou que existem diferenças significativas na susceptibilidade para diversos antibióticos de espécies de *Lactobacillus* isoladas de usinas que não os utilizam e entre as que utilizam. O MIC₉₀ (µg/ml) da penicilina, por exemplo, aumentou de 1 para 8 e o da virginiamicina de 0,12 para 1. Especula-se que o uso da virginiamicina contribui também para a resistência a outros antibióticos. Ademais, é possível que as cepas resistentes de *Lactobacillus* possam transferir os genes de resistência para outras bactérias, incluindo patógenos humanos de relevância clínica. Isso ressalta a seleção de espécies cada vez mais resistentes e reforça a busca por antimicrobianos alternativos aos antibióticos que imponham menos pressão seletiva e que representem conseqüentemente uma menor ameaça à saúde pública e ao meio ambiente (MUTHAIYAN *et al.*, 2011).

1.4 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Com a evolução dos estudos sobre mecanismos de controle microbiano exercidos por organismos multicelulares, constatou-se a existência de inúmeros peptídeos antimicrobianos produzidos por diversos organismos, desde insetos a mamíferos e plantas (BOMAN *et al.*, 1993). Eles são pequenas moléculas oligopeptídicas de 4 a 50 aminoácidos que estão envolvidos na imunidade inata de organismos, sendo codificados por genes e sintetizados por ribossomos. Isso os distingue da maioria dos antibióticos peptídicos de bactérias e fungos, que são sintetizados por vias metabólicas especializadas e muitas vezes incorporam aminoácidos exóticos (GANZ, 2003). Sabe-se que eles interagem com a membrana plasmática possivelmente pela criação de poros, mas não há até o momento nenhuma elucidação do seu exato mecanismo de ação. Eles podem ter outros alvos celulares e inibir alguns processos, como a síntese protéica e nucleotídica, e romper vários complexos multienzimáticos, como o da síntese da parede celular e da cadeia transportadora de elétrons (KRASZEWSKA *et al.*, 2016).

As membranas plasmáticas microbianas são cobertas por uma parede celular firme e flexível composta de polissacarídeos, peptidoglicanos (em bactérias) e polímeros de glucosamina de quitinas e de β -glucanos (em fungos). A diversidade dos mecanismos de ação dos PAMs que atuam em membranas é dependente de vários fatores, como a composição de fosfolipídeos e de ácidos graxos das membranas. Além disso, alguns componentes das paredes celulares também podem interagir com os PAMs, como as moléculas lipídicas aniônicas, o ácido lipoteicoico e os lipopolissacarídeos presentes nas paredes de bactérias gram-positivas e na membrana externa das gram-negativas. Enquanto que a membrana de bactérias é carregada negativamente devido à presença de fosfolipídeos aniônicos, as de fungos são mais similares as de eucariotos por serem mais neutras e rígidas pela presença do ergosterol e aos constituintes dos fosfolipídeos zwitterionics (MALANOVIC e LOHNER, 2016).

O PR-39 é um peptídeo extraído do intestino de porco e pertence à família dos peptídeos antibacterianos ricos em prolina e arginina. Possui 39 resíduos de aminoácidos, dos quais 49% são prolinas e 26% são argininas (AGERBERTH,

1991). Esse peptídeo possui atividade bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (VUNNAM, 1997) e seu mecanismo de ação envolve inibição da síntese de proteínas e de DNA. Além disso, ele possui alta estabilidade em solução, baixa toxicidade em mamíferos, resistente a proteases de serina, elastase e aminopeptidases, refletindo em uma longa meia-vida. (VELDHUIZEN *et al.*, 2014).

O peptídeo PMAP-23 (do inglês *23-mer antimicrobial peptide*) derivado da mielóide do porco possui atividade antinematodal. Seu mecanismo de ação consiste em romper a estrutura da membrana celular pela formação de poros ou pela interação direta com a bicamada lipídica. O peptídeo Cecropin P1, assim como o PR-39, foi isolado do intestino do porco e seu mecanismo de ação envolve lise celular (BOMAN, 1993).

Existe descrito na literatura a expressão heteróloga de peptídeos antimicrobianos em *S. cerevisiae* para controlar as contaminações na produção de etanol, como as bacteriocinas. Essas são pequenas proteínas sintetizadas por ribossomos de bactérias gram-positivas e negativas. Esses peptídeos antibacterianos possuem atividade contra espécies que estão intimamente relacionadas filogeneticamente ou contra outros microrganismos. Os genes das bacteriocinas pediocina e plantaricina já foram clonados em *S. cerevisiae* sob controle do promotor TDH3. Apesar do rendimento de etanol ter aumentado em aproximadamente 1% no cultivo dessas cepas recombinantes com contaminantes, as bactérias ainda assim conseguiram proliferar (KLYACHKO *et al.*, 2015).

A bacteriocina nisina é amplamente utilizada como preservante de alimentos por possuir atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas. Seu uso se estende para o controle de bactérias ácido-láticas contaminantes de cervejas, vinhos e da produção de etanol, pois ela não afeta o crescimento de leveduras. Os genes de expressão da nisina de *Lactococcus lactis* subsp. foram introduzidos em uma cepa industrial de etanol juntamente com um sistema de secreção-sinal de leveduras. Para estar em sua forma madura é necessário a clivagem da proteína precursora, NisA, por isso as proteínas NisB, NisC e NisP são requeridas para essa modificação pós-traducional. Com a nisina A em sua forma ativa é possível reduzir os custos da produção de etanol por controlar a proliferação dos contaminantes e conseqüentemente por aumentar a produtividade de etanol (PENG *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Como o etanol é um biocombustível que desponta pela diversidade de seus benefícios na produção mundial, principalmente na brasileira, mais pesquisas focam na otimização da sua produção. Dentre todos os problemas a serem superados, a contaminação bacteriana é um dos mais prejudiciais e desafiadores. Apesar da variedade de estratégias de controle microbiano existentes, poucas apresentam simultaneamente facilidade de implementação; custo-benefício; especificidade para bactérias e pouco impacto ambiental pela menor geração de resistência bacteriana. Nesse contexto, o trabalho proposto objetiva apresentar uma estratégia que se enquadre nesse perfil, através do uso de peptídeos antimicrobianos inéditos. A literatura reforça os inúmeros benefícios da sua utilização em substituição a outros antimicrobianos, como os antibióticos. Alguns são altamente potentes contra grupos de microrganismos específicos, revelando-os como candidatos ideais no combate de contaminações microbianas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo avaliar a atividade de peptídeos antimicrobianos sobre cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Lactobacillus* em cocultivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização dos perfis de crescimento de cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* na ausência e presença dos peptídeos antimicrobianos PR-39, PMAP-23 e Cecropin P1;
- Construção de cepa de *S. cerevisiae* recombinante para a produção heteróloga do peptídeo PR-39;
- Isolamento de bactérias ácido-láticas de laticínios;
- Caracterização dos perfis fermentativos das cepas industriais de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 e das espécies isoladas de laticínios, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, em cocultivo e isoladamente, na ausência e presença dos peptídeos antimicrobianos X e Y.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados nesse estudo, assim como suas referências, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos utilizados e suas referências.

Microrganismos	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BG-1	Isolado da usina Barra Grande (REIS <i>et al.</i> , 2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SA-1	Isolado da usina Santa Adélia (REIS <i>et al.</i> , 2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2	Isolado da usina da Pedra (REIS <i>et al.</i> , 2017)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JP-1	Isolado da usina Japungu (DA SILVA FILHO <i>et al.</i> , 2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK 102-3A	(ENTIAN; KÖTTER, 2007)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Isolado do Yakult® nesse estudo
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Isolado do Chamyto® nesse estudo
<i>Escherichia coli</i> DH5α	(WOODCOCK <i>et al.</i> , 1989)
<i>Escherichia coli</i> EPI300	Epicentre

As cepas de *S. cerevisiae* BG-1, SA-1, PE-2 e JP-1 são utilizadas industrialmente na produção de bioetanol combustível (BASSO *et al.*, 2008; DA SILVA FILHO *et al.*, 2005).

4.2 GENES, PLASMÍDEOS E SEQUÊNCIAS

Para a etapa de expressão heteróloga do peptídeo antimicrobiano PR-39, utilizou-se o plasmídeo p425GPD (Figura 5; Tabela 2) para montagem do cassete de expressão e o YIplac211 (Figura 6; Tabela 2) como vetor integrativo. A sequência nucleotídica correspondente da conversão da sequência de aminoácidos do

peptídeo PR-39 foi inserida entre o promotor GPD e o terminador CYC1 do plasmídeo p425GPD após otimização para expressão em *S. cerevisiae*. Adicionou-se anteriormente à essa, para a secreção extracelular, a sequência sinal do fator α de secreção, obtida do vetor de expressão pPIC9 descrito no manual de *Pichia* da empresa *Thermo Fisher* (INVITROGEN, 2014), perfazendo o cassete de expressão GPC. O vetor resultante denominado pPR39 foi sintetizado pela empresa *GenOne* e encontra-se representado na Figura 5.

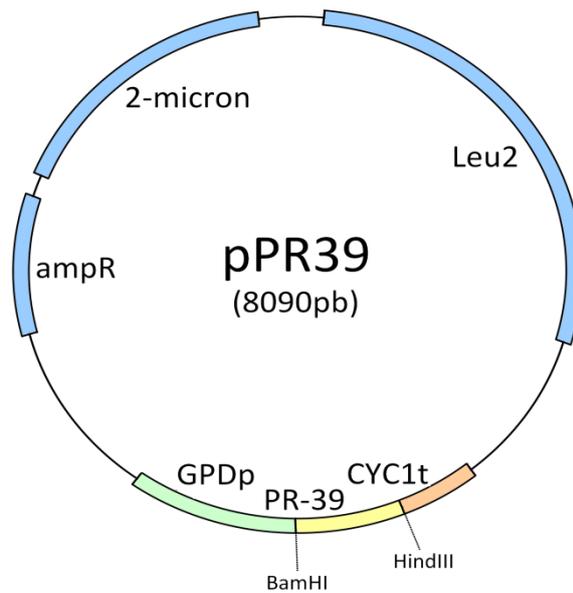


Figura 5. Mapa do vetor pPR39. Promotor GPD (verde); sequência gênica do peptídeo PR-39 (amarelo); terminador CYC (laranja); ampR: gene de resistência à ampicilina; Leu2: gene codificador da leucina; 2-micron: origem de replicação de levedura.

O cassete de expressão (gene mais promotor e terminador) GPC foi amplificado por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores desenhados para inserir o sítio de restrição de EcoRI flanqueando-o. Após digestão do cassete e do plasmídeo YIplac211 com a enzima EcoRI, sucedeu-se à clonagem e obtenção do vetor pYIplacPR39, representado na Figura 6. A construção final dos vetores foi confirmada e analisada por PCR e eletroforese, respectivamente.

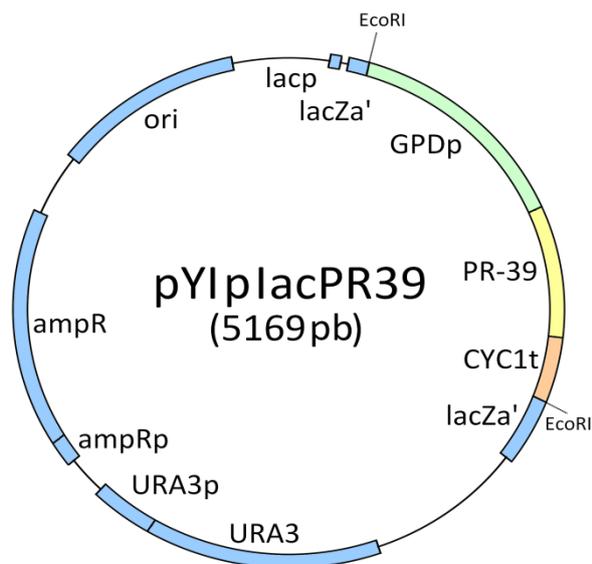


Figura 6. Mapa do vetor pYIplacPR39. Promotor GPD (verde); sequência gênica do peptídeo PR-39 (amarelo); terminador CYC (laranja); URA3: gene codificar da uracila; URA3p: promotor do gene URA3; ampR: gene de resistência à ampicilina; ampRp: promotor do gene ampR; ori: origem de replicação; lacZα: gene da β galactosidade ; lacp: promotor do gene lacZα.

Os plasmídeos e sequências nucleotídicas utilizados nesse estudo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Plasmídeos e sequências nucleotídicas utilizados.

Nome	Descrição	Tamanho (pb)	Referência
p425GPD	plasmídeo	7760	MUMBERG <i>et al.</i> , 1995
YIplac211	plasmídeo	3797	ATCC87593
pPR39	vetor epissomal	8090	comprado da GenOne
pYIplacPR39	vetor integrativo	5169	construído nesse estudo
GPC	cassete de expressão	1372	construído nesse estudo

Os peptídeos utilizados, assim como suas sequências e referências, estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Sequência e referência dos peptídeos utilizados.

Nome	Pureza (%)	Sequência peptídica	Número de aa's	Referência
PR-39	95,7	RRRPRPPYLPRPRPPFF PPRLPPRIPPGFPPRFPPR FP	39	AGERBERTH <i>et al.</i> , 1991
PMAP-23	95,11	RIIDLLWRVRRPQKPKFVT VWVR	23	ZANETTI <i>et al.</i> , 1994
Cecropin P1	95,75	SWLSKTAKKLENSAKKRIS EGIAIAIQGGPR	31	LEE <i>et al.</i> , 1989
X	> 95%			
Y	> 95%			

Um agradecimento especial ao professor Dr. Octávio Luiz Franco (UCB) pela doação dos peptídeos PR-39, PMAP-23 e Cecropin P1.

4.3 MÉTODOS

- **Esterilização dos meios**

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121° C por 15 min separando a fonte de nitrogênio da de carbono. Apenas o meio Yeast Nitrogen Base (YNB), a L-leucina e a uracila foram esterilizados por filtro de 0,22 µm.

- **Meios designados nesse estudo**

- Meio MPEB (Maltose Peptona Extrato de levedura e Bagaço), nomeado neste trabalho, é constituído de: 1% peptona, 1% extrato de levedura e 1% maltose, suspensos em liquor de extrato de bagaço de cana-de-açúcar 1% (m/m) pré-tratado a 170°C por 30 min;

- Meio MPE (Maltose Peptona Extrato de levedura) é equivalente ao meio MPEB sem o liquor de extrato de bagaço de cana;

- Meio MPE modificado: é equivalente ao meio MPE, alterando a concentração da maltose para 2%.

A maltose utilizada em todos os meios citados não é pura, constituindo-se de pelo menos 42% (p/p) de maltose e 10% de maltotriose, máximo de 12% de glicose e entre 23 a 28% de outros açúcares e foi comprada da empresa WE Consultoria.

- **Preparação de inóculos**

Os inóculos das bactérias *Escherichia coli* DH5 α e EPI 300 foram feitos utilizando 5 mL ou 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) contidos em um tubo de centrifugação de 15 mL ou 50 mL estéreis, respectivamente, sob agitação de uma incubadora rotacional a 200 rpm e 37° C por 12h.

Os inóculos das bactérias *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* foram crescidos em MRS (*de Man, Rogosa e Sharp*), MPE e MPEB e as condições foram descritas em cada técnica.

Os pré-inóculos e inóculos de leveduras dependem das condições de crescimento e portanto, foram descritos em cada técnica.

- **Estoque das cepas**

A colônia de *Escherichia coli* DH5 α transformada com o vetor pPR39 foi crescida em meio LB com ampicilina 0,01% e estocadas em glicerol 0,2% (v/v) a - 80 °C.

As colônias de *Escherichia coli* EPI 300 transformadas com o vetor pYIplacPR39 foram crescidas em meio LB com ampicilina 0,01% e estocadas em glicerol 0,2% (v/v) a - 80° C.

A colônia de CEN.PK 102-3A transformada por integração genômica com o vetor pYIplacPR39 foi crescida em meio YNB 6,7 g/L suplementado com 0,076 g/L de L-leucina e uracila e 20 g/L de glicose e estocada em glicerol 0,2% (v/v) a - 80° C.

As colônias *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* foram crescidas em meio MRS e estocadas em glicerol 0,2% (v/v) a - 80°C.

- **Minipreparação**

O procedimento de minipreparação (miniprep) consiste na extração do DNA plasmidial de células e foi feito utilizando o kit *GeneJET Plasmid Miniprep* da empresa *ThermoFisher*.

- **Purificação de DNA**

Para a purificação do DNA utilizou-se o kit *GeneJET PCR Purification* da *Thermo Fisher*.

- **Quantificação de DNA**

Para a quantificação de DNA utilizou-se o espectrofotômetro *spectraMax 190 microplate*, utilizando protocolo do programa *SpectraMax Pro*.

- **Tratamento com endonucleases de restrição e ligação**

As enzimas utilizadas e suas procedências estão listadas na Tabela 4. Tempo, concentração e temperatura de incubação de acordo com protocolo do fabricante.

Tabela 4. Enzimas utilizadas.

Enzima	Procedência
EcoRI <i>Fast Digest</i>	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
StuI	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Taq DNA polimerase	<i>Phoneutria</i>
DNA ligase	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
FastAP <i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> .	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Lisozima	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
RNAse A	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Proteinase K	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

- **Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores**

Sequências iniciadoras foram desenhadas para anelamento no início do promotor GPD e no final do terminador CYC do cassete de expressão GPC e estão descritas na Tabela 5. Precedente aos iniciadores adicionou-se o sítio de restrição da enzima EcoRI, visando a sua inserção no cassete por meio de PCR, também foi adicionado cinco pares de bases para otimizar a atividade enzimática de EcoRI. Os iniciadores 16S-27 *forward* e 16S-1492 *reverse* foram utilizados para a amplificação do DNA ribossomal 16S das colônias isoladas de laticínios, suas sequências também estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5. Sequências dos iniciadores 425GPD *Forward*, 425CYC *Reverse*, 16S-27 *Forward* e 16S-1492 *Reverse*. As sequências em negrito correspondem aos cinco pares de bases que otimizam a atividade da enzima EcoRI, já as sublinhadas são referentes ao sítio de restrição da enzima EcoRI.

Iniciador 425GPD <i>Forward</i>	5'- AATAT <u>GAATTC</u> GGAGCTCTCGAGTTTATC – 3'
Iniciador 425CYC <i>Reverse</i>	5'- ATTAT <u>GAATTC</u> GGCCGCAAATTAAAGC – 3'
Iniciador 16S-27 <i>Forward</i>	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'
Iniciador 16S-1492 <i>Reverse</i>	5'- GGTTACCTTGTTACGACT - 3'

Os iniciadores foram comprados da empresa *Integrated DNA Technologies®* (IDT).

- **PCR**

Para uma reação de PCR de 20 µl foram utilizados os seguintes reagentes: 20-30 ng DNA; iniciadores a 5 µM; desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) a 0,2 mM; tampão 1X com magnésio (composto de MgCl₂ a 1,5 mM, 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4 e 0,1% Triton X-100) ou o tampão 1X sem magnésio (composto de 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8,4 e 0,1% Triton X-100); magnésio a 2 mM (adicionado somente quando o tampão sem magnésio foi utilizado); enzima Taq DNA polimerase a 0,05 U/µl; água destilada para completar o volume da reação.

O dNTP e MgCl₂ foram comprados da *Thermo Fisher Scientific*, já os tampões e a Taq DNA polimerase da *Phonutria*.

Preparou-se também tubos sem DNA, como controle negativo, e outro com DNA de amplificação conhecida, como controle positivo.

As reações foram incubadas no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* da *Applied Biosystems* da seguinte forma: 95°C por 5 min, 30 ciclos de (95°C por 2 min, 50°C por 15 s, 72°C por 2 min) e uma extensão final de 72°C por 7 min.

Para a análise dos amplicons obtidos da reação de PCR, foi feita uma eletroforese utilizando gel de agarose.

- **PCR de colônia**

Para bactérias: a ponta de um palito de dente estéril foi encostada em uma colônia crescida das placas de transformação e imersa em 50 µl de água deionizada purificada estéril, incubando em seguida a 92° C por 5 min. Um µl dessa solução foi usada como DNA molde em uma reação de PCR. Os amplicons foram analisados em eletroforese.

Para leveduras: Um pouco de uma colônia crescida de uma placa de cultura foi adicionado a 100 µl de NaOH 0,02 M, essa solução foi incubada a 100° C por 10 min e em seguida centrifugada a 13.000 rpm por 1 min. Após, 1 µl dessa solução foi utilizado como DNA molde de uma reação de PCR. Os amplicons foram analisados em eletroforese.

- **Eletroforese em gel de agarose**

Utilizou-se gel de agarose a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) e brometo de etídeo a 10 mg/mL. O gel foi imerso em TBE e uma voltagem de 60 V foi aplicada até os fragmentos de DNA serem separados. O DNA foi visualizado através da incidência de luz ultravioleta (UV) no gel. Fotos foram tiradas utilizando câmera acoplada à câmara de incidência de UV.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE CRESCIMENTO EM MICROPLACA

Os perfis de crescimento das cepas de *S. cerevisiae* BG-1, SA-1, JP-1 e PE-2 (Tabela 1) foram analisados a partir da absorbância mensurada a 600 nm em intervalos de 1h no espectrofotômetro de microplacas EON™. Os valores de

absorbância obtidos correspondem à densidade óptica (OD) que é uma medida rápida para determinar a concentração celular (MEYERS *et al.*, 2013). As células foram previamente crescidas em pré-inóculos utilizando mesmo meio de cultivo do utilizado em microplacas. As amostras constituíam-se de células numa densidade óptica inicial (ODi) de 0,01 imersas em um meio de cultivo, adicionado ou não de peptídeos antimicrobianos. Cada amostra foi avaliada em replicatas técnicas, sendo uma replicata correspondente a 200 µl de amostra inserida em um poço de uma microplaca de 96 poços.

Foram feitos cinco ensaios em diferentes condições de crescimento com as seguintes amostras:

Ensaio 1) Cepas de leveduras *S. cerevisiae* BG-1, SA-1, JP-1 e PE-2 na ausência e presença dos peptídeos PR-39, PMAP-23 ou Cecropin P1;

Ensaios 2 e 3) Cepa de *S. cerevisiae* JP-1 ou PE-2 na ausência e presença dos peptídeos X ou Y;

Ensaios 4 e 5) *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus* na ausência e presença dos peptídeos X ou Y.

As condições de crescimento de cada ensaio estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6. Condições de crescimento dos cinco ensaios feitos em microplaca.

Condições	Ensaios				
	1	2	3	4	5
Meio de cultivo	1,34% YNB e 4% sacarose	1,34% YNB e 4% sacarose	MPEB	5,51% MRS	2X MPEB
Peptídeos utilizados	PR-39, PMAP-23 ou Cecropin P1	X e Y	X e Y	X e Y	X e Y
Concentração dos peptídeos (µg/mL)	0 e 100	10 e 60	5 e 10	0, 30 e 70	0; 1; 2,5; 5; 7; 10;15 e 20
Temperatura (°C)	30	30	30	37	30

Agitação	Orbital rápido	Orbital rápido*	Orbital rápido*	Orbital lento*	Orbital rápido*
Tempo total (h)	48	35	24	47	42
Número de replicatas técnicas	6	3	3	3	3

*Agitações em orbital rápido e lento de acordo com especificação do EON™.

Os seguintes programas foram utilizados para a análise dos dados: *Gen5™* da empresa *BioTek®* e o *Microsoft Office Excel* da empresa *Microsoft*.

4.5 MONTAGEM DO VETOR PYIPLACPR39 E TRANSFORMAÇÃO DE *S. CEREVISIAE* CEN.PK102-3A

A cepa DH5 α de *Escherichia coli* foi utilizada para ser transformada com o vetor pPR39 por choque térmico de acordo com o protocolo de Inowe *et al.* (1990), alterando os seguintes fatores: 50 μ l de células foram utilizados, após o choque as células descansaram em gelo por 2 min e foi adicionado 250 μ l de meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose).

Selecionou-se as cepas transformantes por crescimento em placa de LB com ampicilina a 0,1 g/L. As colônias positivas foram confirmadas por PCR de colônia (utilizando os iniciadores representados na Tabela 5 e o tampão sem MgCl₂) e eletroforese. Recuperou-se o pPR-39 da colônia positiva por miniprep, esse foi utilizado como DNA molde para amplificação do cassete de expressão GPC por PCR.

O cassete GPC obtido da PCR foi analisado por eletroforese e a banda correspondente a ele foi recortada do gel de agarose e purificada com kit. Digeriu-se o plasmídeo integrativo YIplac211 e o cassete GPC com a enzima EcoRI. Para evitar que as pontas coesivas do sítio de restrição de EcoRI do YIplac211 se religuem, uma desfosforilação foi feita utilizando a enzima *FastAP Thermosensitive Alkaline*

Phosphatase. Posteriormente montou-se um sistema de ligação seguindo protocolo da enzima T4 DNA ligase, sendo a concentração do cassete GPC (inserto) três vezes maior que a do plasmídeo. Após, a amostra da ligação foi dialisada em cima de uma membrana de 0,025 μm flutuando em água deionizada purificada por 30 min.

A ligação foi utilizada como DNA para a transformação de *E. coli* EPI 300 por eletroporação. Para isso, cuvetas de eletroporação de 0,2 cm foram descansadas em gelo juntamente com as células eletrocompetentes EPI300 e tubos de 1,5 mL estéreis. Transferiu-se 1 μL da ligação para os tubos de 1,5 mL descansados em gelo, adicionando em seguida 50 μL das células e pipetando três vezes para homogeneizar. Uma amostra sem a ligação também foi preparada como controle negativo. Os homogeneizados foram transferidos para as cuvetas de eletroporação e essas foram colocadas no eletroporador *Gene Pulser* da empresa *Bio-Rad* para que um pulso elétrico de 1.500 V fosse aplicado, foi adicionado imediatamente ao choque 1 mL de meio SOC nas cuvetas pipetando três vezes delicadamente. Transferiu-se o conteúdo das cuvetas para um tubo de 1,5 mL estéril e incubou-se a 37 °C por 1 h. Passado o tempo, 100 μL dessas transformações foram plaqueados em meio LB com ampicilina 0,1 g/L. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h.

Após o crescimento, confirmou-se as colônias positivas por PCR de colônia (iniciadores da Tabela 5 a 10 μM). Posteriormente, o vetor pYIplacPR39 foi recolhido das colônias recombinantes EPI300 por miniprep, sendo digerido com EcoRI em seguida e confirmado por eletroforese.

O vetor pYIplacPR39 obtido foi linearizado, por digestão com a enzima *StuI* a 37 °C por 16 h, dentro da região gênica de URA3 para gerar a homologia necessária à recombinação homóloga no gene de URA3 localizado no cromossomo da cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK102-3A durante a transformação, seguindo protocolo descrito por Hill *et al.* (1991). Transformantes foram selecionados a 30 °C em meio YNB 6,7 g/L suplementado com 0,076 g/L de L-leucina e uracila e 20 g/L de glicose. Realizou-se PCR de colônia com os iniciadores descritos na Tabela 5 para identificação da colônia positiva. Além da cepa CENPK, tentou-se também as transformações das cepas industriais de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2.

4.6 INSPEÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SOBRENADANTE DO CULTIVO DA CEPA DE *S. CEREVISIAE* CEN.PK 102-3A TRANSFORMANTE

Para a análise da secreção e atividade do peptídeo PR-39 pela cepa de *S. cerevisiae* transformante CEN.PK 102-3A foi feito o teste de difusão de disco em ágar (COYLE, 2005), que permite testar a atividade antimicrobiana de um composto em placa. Para isso, as cepas foram crescidas em 50 mL de meio YNB a 6,7 g/L sem aminoácidos suplementado com 0,076 g/L de L-leucina e uracila e 20 g/L de glicose por 16 h em uma incubadora rotacional a 30 °C e 200 rpm.

Placas contendo o meio Müller-Hinton (2 g/L infusão de carne; 17,5 g/L caseína hidrolisada; 1,5 g/L amido e 15 g/L ágar) foram preparadas e a cepa *E. coli* ATCC 25922 foi plaqueada com o auxílio de uma alça de Drigalski após crescimento em meio LB a 37 °C e 200 rpm por 16 h. Assim que as placas secaram, foram adicionados 3 discos de difusão de 6 mm em cada placa: um disco continha ampicilina a 100 µg/mL e foi utilizado como controle positivo, outro continha o sobrenadante da CEN.PK102-3A parental e o outro o sobrenadante da CEN.PK102-3A transformante. As placas foram incubadas a 37 °C (Figura 10).

Dois testes antimicrobianos em meio líquido também foram preparados (COYLE, 2005). Para isso, as cepas de CEN.PK transformante e parental foram crescidas em 50 mL de meio YNB a 6,7 g/L sem aa's suplementado com 0,076 g/L de L-leucina e de uracila e 20 g/L de glicose por 16 h em uma incubadora rotacional a 30 °C e 200 rpm. Alguns inóculos foram centrifugados e o precipitado descartado. Os sobrenadantes resultantes, juntamente com os outros inóculos não-centrifugados foram liofilizados por 48 h. Esses liofilizados foram suspensos em 2 mL de água destilada estéril e adicionados a um tubo de 15 mL estéril contendo 8 mL de meio LB. Assim, três amostras foram preparadas para uma curva de crescimento da bactéria *E. coli* 25922 crescidas em 8 mL de meio LB: uma amostra foi acrescida de 2 mL de água destilada; outra de 2 mL do liofilizado do sobrenadante da CEN.PK parental e a outra de 2 mL do liofilizado do sobrenadante da CEN.PK transformante.

4.7 ISOLAMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS DOS LEITES FERMENTADOS YAKULT® E CHAMYTO®

Foi retirado 100 µl dos leites fermentados das marcas Yakult® e Chamyto® após homogeneização e diluí-se mil vezes em água destilada estéril para plaqueamento em meio MRS ágar. As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 72 h. Após o crescimento, duas colônias foram escolhidas e estocadas, uma derivada do Yakult® e a outra do Chamyto®.

Para verificar se as colônias estocadas são bactérias gram-positivas, foi feita coloração de gram de acordo com o seguinte protocolo: uma lâmina de microscópio foi preparada com um esfregaço das colônias crescidas em meio MPE por 22 h. Assim que a lâmina secou, a fixação foi feita por calor utilizando bico de Bunsen. Em seguida, ela foi coberta com cristal violeta por 1 min, o excesso foi retirado e lugol adicionado por 1 min. Passado esse tempo, foi adicionado rapidamente álcool-acetona e esperou-se 4 segundos para lavá-la com água corrente. Adicionou-se fucsina e esperou-se 20 segundos para lavá-la novamente. Assim que as lâminas secaram elas foram observadas em microscópio óptico usando lente objetiva 100x com óleo de imersão.

Para amplificar o gene do RNAr 16S das colônias escolhidas, fez-se necessário a extração do DNA genômico, realizando os seguintes procedimentos: elas foram inoculadas em meio MPE e incubadas em agitadora magnética a 80 rpm e 30 °C por 48 h; em seguida essas amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 80 µl de solução de lise (acetato de amônia 0,375 M e EDTA 0,12M pH 8) e 157 µl de água destilada. Adicionou-se 40 µl de SDS 10% e 4 µl de lisozima e incubou-se a 37 °C por 30 min. Após, adicionou-se 3 µl de RNase A a 20 mg/ mL incubando em seguida a 37 °C por 30 min. Terminada a incubação, adicionou-se 40 µl de Proteinase K e agitou-se os tubos por inversão, incubando em seguida a 55 °C por 35 min. Foi adicionado 100 µl de acetato de amônia 7,5 M, homogeneizando os tubos por inversão e centrifugando-os a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado o dobro do volume de etanol 100% gelado,

homogeneizando por inversão e centrifugando a 13000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µl de etanol 70%, centrifugando novamente para descarte do sobrenadante. Os tubos secaram invertidos e em seguida foi adicionado 50 µl de TE (0,1 M NaCl; 0,01 M Tris-HCl pH 8; 0,001 M EDTA pH 8).

Em seguida, as extrações foram quantificadas usando o *Qubit Fluorometric Quantitation* da *Thermo Fisher Scientific*, seguindo protocolo do fabricante. O gene RNAr 16S foi amplificado por PCR utilizando tampão 1x com magnésio; dNTP a 1 mM; iniciadores 16S-27F e 16S-1492R a 5 µM; Taq DNA polimerase a 1 U/ 20 µl e 2 ng de DNA genômico das extração das colônias em 20 µl por reação.

O seguinte programa foi utilizado no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* da *Applied Biosystems*: 95 °C por 5 min; 30 ciclos de (94 °C por 1 min e 30 s, TA por 1 min e 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s); 72° C por 7 min e 10 °C por tempo indeterminado. As temperaturas de anelamento (TA) utilizadas para as colônias foram determinadas após gradiente de temperatura (55, 56 e 58 °C), sendo a do Yakult® 55 °C e a do Chamyto® 58 °C. Os amplicons foram analisados em eletroforese.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando kit. Em seguida, o DNA purificado das amostras foi quantificado usando o *Qubit Fluorometric Quantitation* da *Thermo Fisher Scientific*, seguindo protocolo do fabricante. Retirou-se 25 ng de DNA do amplicon purificado e adicionou-se com 0,70 µM dos iniciadores 16S-27F e 16S-1492R, perfazendo um volume de 7 µl que foi destinado para sequenciamento.

As sequências obtidas do sequenciamento foram analisadas por alinhamento a partir da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), plataforma blastn, disponível online em <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>, utilizando o banco de dados de sequências gênicas do RNA ribossomal 16S. As sequências foram alinhadas entre si utilizando a ferramenta *EMBOSS Needle*, disponível online em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html>.

4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR *LACTOBACILLUS PARACASEI* E *L. RHAMNOSUS* NO CULTIVO EM ERLLENMEYERS DAS CEPAS INDUSTRIAIS DE *S. CEREVISIAE* JP-1 E PE-2

Os perfis fermentativos das cepas industriais de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 foram avaliados em cocultivo com as cepas de bactérias ácido-láticas isoladas, *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*. Para isso, as células foram previamente crescidas, a partir do inóculo de várias colônias crescidas em placa em 100 mL de meio MPE contido em um frasco erlenmeyer aletado de 1 L estéril. Os frascos foram incubados em agitadora magnética a 180 rpm e 30 °C por 24 h (leveduras) ou 48 h (bactérias).

Após o crescimento, a OD de cada inóculo foi mensurada a 600 nm no espectrofotômetro *UV-Vis spectraMax 190 microplate* e calculou-se a quantidade de células necessária de cada espécie para atender diferentes proporções (levedura: bactéria): (1:0), (1:1), (1:2) e (1:4). A OD_i mínima de cada microrganismo foi 0,1 e concentrações superiores de bactérias atendendo às proporções estabelecidas. Dessa forma, objetiva-se avaliar o efeito do aumento da concentração bacteriana na velocidade de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e no rendimento de etanol ($Y_{\text{EtOH/maltose}}$ e $Y_{\text{EtOH/totais}}$) das leveduras.

Cada amostra preparada nas proporções estabelecidas foi avaliada em duplicatas técnicas. Antes da incubação, mensurou-se a OD_i de cada replicata, incubando em seguida em agitadora magnética a 180 rpm e 30 °C por 27 h. Retirou-se 1 mL de cada replicata em intervalos de 3 h para leitura da OD e posterior centrifugação a 13.000 rpm por 1 min para o sobrenadante ser armazenado a -20 °C, até ser analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.9 QUANTIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A quantificação dos produtos e substratos de fermentação (etanol, lactato, acetato, glicerol, glicose e maltose) foi feita em HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Para isso, a coluna de exclusão iônica Shim-Pack SCR 101H com fase estacionária de polímero de estireno sulfonado do tipo hidrogenado da empresa *Shimadzu* foi utilizada. Para a fase móvel foi empregado ácido sulfúrico a 5 mM operando em um fluxo de 0,6 mL/ min. Cada amostra foi diluída cinco vezes e injetada automaticamente, o tempo de quantificação de cada uma foi 26 min.

Dois detectores foram empregados: SPD-20A e RID-10A, ambos da empresa *Shimadzu*. O SPD-20A é um detector de ultravioleta (UV) capaz de detectar absorvância de 190 a 700 nm (Shimadzu, 2018) e foi utilizado para detectar o lactato e o acetato das amostras. Já o RID-10A é um detector de índice de refração que quantificou glicose, maltose, glicerol e etanol das amostras.

Para a quantificação, os picos de cada produto ou substrato foram integrados pela altura e o resultado fornecido em g/L. Foram preparados dez padrões, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Concentração em g/L dos dez padrões (P) das substâncias de fermentação quantificadas em HPLC.

Padrões	Maltose	Glicose	Glicerol	Etanol	Lactato	Acetato
P1	0,03125	0,03125	0,03125	0,0078125	0,0078125	0,00390625
P2	0,0625	0,0625	0,0625	0,015625	0,015625	0,0078125
P3	0,125	0,125	0,125	0,03125	0,03125	0,015625
P4	0,25	0,25	0,25	0,0625	0,0625	0,03125
P5	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	0,0625
P6	1	1	1	0,25	0,25	0,125
P7	2	2	2	0,5	0,5	0,25
P8	4	4	4	1	1	0,5
P9	8	8	8	2	2	1
P10	10	10	10	2,5	2,5	1,25

O programa *LabSolutions* da *Shimadzu* foi utilizado para a análise e obtenção dos cromatogramas.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS FERMENTATIVOS DAS CEPAS INDUSTRAIS DE *S. CEREVISIAE* JP-1 E PE-2 E DAS CEPAS *LACTOBACILLUS PARACASEI* E *L. RHAMNOSUS*, SOZINHAS OU EM COCULTIVO, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS X E Y EM FERMENTADORES

Com o objetivo de se determinar parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica na presença e ausência de contaminantes, bem como na presença e ausência dos peptídeos antimicrobianos X e Y foram realizados experimentos em biorreatores *BioFlo®/ CelliGen® 115* da empresa *New Brunswick™*.

Primeiramente foi avaliado o crescimento das leveduras e dos contaminantes isoladamente e em cocultivo. Para isso, pré-inóculos foram crescidos em frascos aletados de 1L utilizando meio MPE modificado e incubando em agitadora magnética. As leveduras foram crescidas por 16 h a 30 °C e 200 rpm e as bactérias por 46 h a 30 °C e 80 rpm, aumentando a agitação nas últimas 24 h para 200 rpm.

Após, fermentações foram realizadas em triplicatas técnicas com as seguintes condições de crescimento: temperatura 30 °C; pH 5,5 e sem oxigenação. O meio nutriente utilizado foi o MPE modificado. Para controlar a acidez do meio foi acoplado uma fonte básica constituída de hidróxido de potássio (KOH) 3M, na qual sua injeção era regulada por uma bomba que mantinha o pH em 5,5. A maltose foi autoclavada separadamente em uma garrafa de alimentação para evitar que a reação de Maillard acontecesse.

Foram retirados 4 mL de cada replicata em intervalos de 1 h, sendo que 2 mL foram retirados primeiro para serem descartados, já que eles constituíam o volume morto do amostrador, e os outros 2 mL utilizados como amostra para leitura da OD e quantificação dos produtos e substratos. Para obter os valores de OD, mensurou-se

a absorvância a 600 nm em espectrofotômetro. Após, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 1 min e o sobrenadante armazenado a – 20 °C, até ser analisado em HPLC.

4.11 CÁLCULO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos calculados nesse trabalho foram: taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\text{máx}}$), taxa de crescimento específico máxima total ($\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$) para os cocultivos de bactérias e leveduras, tempo de duplicação (TD), rendimento de etanol a partir da maltose ($Y_{\text{EtOH/maltose}}$), rendimento de etanol a partir da glicose e da maltose ($Y_{\text{EtOH/totais}}$), rendimento de lactato a partir da maltose ($Y_{\text{Lac/maltose}}$), rendimento de lactato a partir da glicose e da maltose ($Y_{\text{EtOH/totais}}$), rendimento de lactato a partir da glicose ($Y_{\text{Lac/glicose}}$). As produtividades volumétricas e específicas não foram determinadas, já que para esses cálculos a quantidade de célula de cada microrganismo é requerida em g/L.

Para o cálculo da taxa de crescimento específico máxima (unidade h^{-1}), os logaritmos naturais das leituras de densidade ótica foram calculados e plotados contra horas de crescimento a fim de se obter o perfil de crescimento do organismo. Da curva, os pontos que estavam formando uma reta e, portanto, representam a fase de crescimento exponencial, foram submetidos a uma regressão linear. Calculando o coeficiente angular das retas geradas pela regressão linear, obtém-se o valor da taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\text{máx}}$) para cada replicata. Calculou-se então a média e o desvio padrão de $\mu_{\text{máx}}$ para cada amostra analisada.

O tempo de duplicação corresponde a: $TD = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{max}}}$ e sua unidade é horas.

Os rendimentos foram obtidos calculando primeiramente o substrato consumido para cada intervalo, sendo o substrato a maltose, a glicose ou ambas. Para a maltose, por exemplo, a inicial (maior detectada) era subtraída da maltose detectada naquele intervalo de tempo. De posse desses valores, plotou-se na abscissa a maltose consumida e nas ordenadas a concentração do produto em g/L. Assim, uma reta era obtida e essa submetida à uma regressão linear. O coeficiente angular da equação da reta resultante representa o rendimento, sendo esse variável

entre 0 e 1. Os rendimentos são adimensionais e podem ser calculados em c-mol ou em massa (g/g), sendo esse último o empregado nesse trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIS DE CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LEVEDURAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS PR-39, PMAP-23 E CECROPIN P1

Os resultados do ensaio 1 em microplacas estão representados na Figura 7.

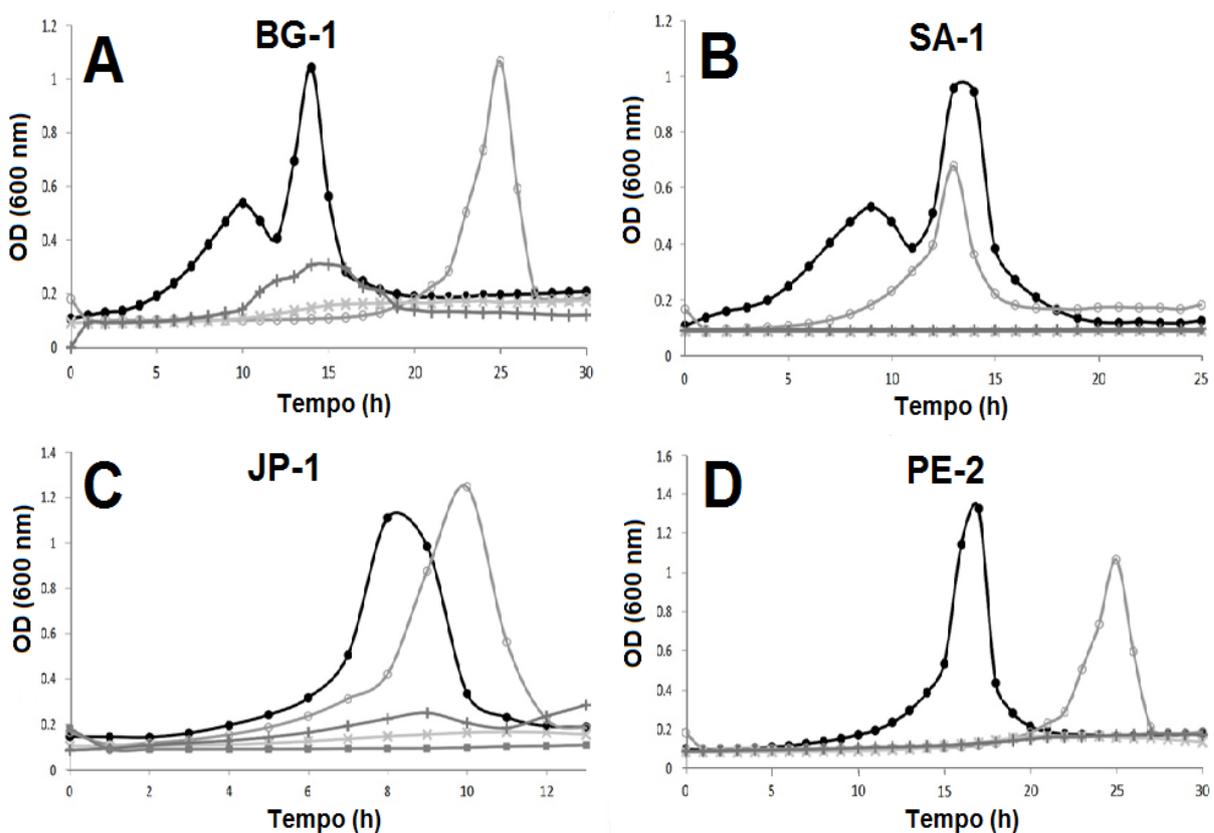


Figura 7. Perfis de crescimento das cepas industriais de *S. cerevisiae* BG-1 (A), SA-1 (B), JP-1 (C) e PE-2 (D) crescidas em YNB sacarose na ausência (●) e presença dos peptídeos PR-39 (○), PMAP-23 (□) e Cecropin P1 (+) a 100 µg/mL.

O ensaio 1 objetivou avaliar a vulnerabilidade de cepas de leveduras na presença dos peptídeos antimicrobianos PR-39, PMAP-23 e Cecropin P1. O peptídeo que menos interferiu no crescimento das leveduras foi o PR-39 e portanto ele foi escolhido para ser produzido heterologicamente em cepas industriais de *S. cerevisiae*. As leveduras *S. cerevisiae* BG-1, SA-1, JP-1 e PE-2 conseguiram crescer na presença do peptídeo PR-39, diferentemente do que aconteceu na presença dos

outros peptídeos avaliados, revelando uma menor vulnerabilidade das leveduras a esse antimicrobiano.

Entretanto, algumas cepas apresentaram um aumento na fase lag quando crescidas na presença do PR-39. Na Figura 7 letras A, C e D, observa-se um aumento aproximado de 10, 2 e 8 h na fase lag de *S. cerevisiae* BG-1, JP-1 e PE-2, respectivamente.

O crescimento das cepas industriais de *S. cerevisiae* com o PR-39 pode ter sido devido à sua maior robustez em relação a leveduras não-industriais. Isso porque as industriais são mais tolerantes a fatores estressantes, sendo portanto menos vulneráveis às condições adversas de crescimento (ARGUESO *et al.*, 2009). Isso reforça a importância da utilização de linhagens industriais, ao invés das laboratoriais, para modificações genéticas direcionadas à otimização da produção de etanol. Décadas de experiência no desenvolvimento de cepas industriais demonstrou que qualquer tentativa de introduzir linhagens modificadas geneticamente em larga escala para a produção de bioetanol será ineficaz, a não ser que seja baseada em cepas naturalmente adaptadas (ARGUESO *et al.*, 2009).

Tendo isso em vista e somado ao fato das cepas industriais JP-1 e PE-2 terem apresentado os efeitos mais moderados na presença do peptídeo PR-39 (Figura 7), elas foram escolhidas para tentativa de expressão heteróloga desse antimicrobiano e para a caracterização cinética na presença dos peptídeos X e Y.

5.2 MONTAGEM DO VETOR PYIPLACPR39 E CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DA CEPA CEN.PK102-3A

Após a extração do vetor pYIplacPR39 por miniprep das colônias positivas de EPI300 e posterior digestão com a enzima EcoRI, espera-se a presença de duas bandas de DNA, uma com 3797 pb (pYIplacPR39 sem o cassete GPC) e outra de 1372 pb (GPC). Esse padrão de bandas é exatamente o que é observado na Figura 8, confirmando a transformação e montagem do vetor pYIplacPR39.

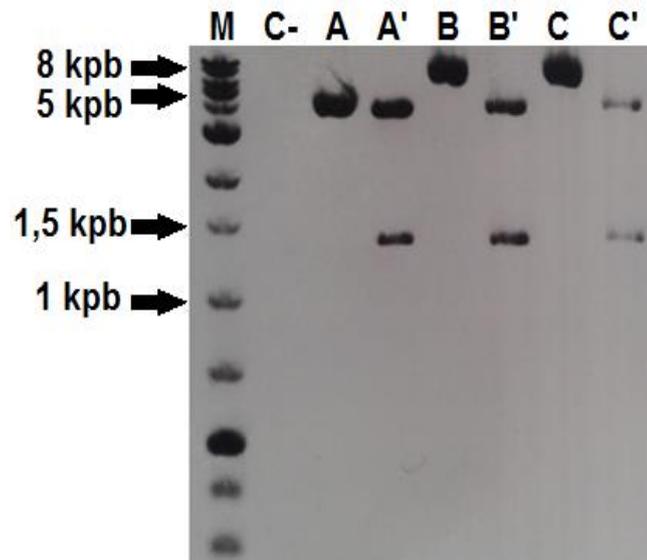


Figura 8. Gel de agarose contendo o vetor pYIplacPR39 (5169 pb), obtido por miniprep de três colônias positivas (A, B e C). As amostras A', B' e C' representam essas minipreps digeridas com EcoRI, resultando em duas bandas: uma de 3797 pb (pYIplacPR39 sem o cassete GPC) e outra de 1372 pb (GPC). Marcador (M): 1 kb ladder plus da Invitrogen; controle negativo (C-): água.

Percebe-se na Figura 8 que os fragmentos das digestões das três minipreps são correspondentes, já que as bandas estão na mesma altura no gel. Contudo, a miniprep A não estava em simetria com as outras, isso possivelmente a um menor grau de envelhecimento do DNA, fazendo com que essa banda percorresse o gel mais facilmente do que o das outras.

Após o crescimento das colônias transformantes da cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK102-3A, as colônias positivas foram identificadas por PCR de colônia (Figura 9) utilizando os iniciadores descritos na Tabela 5.

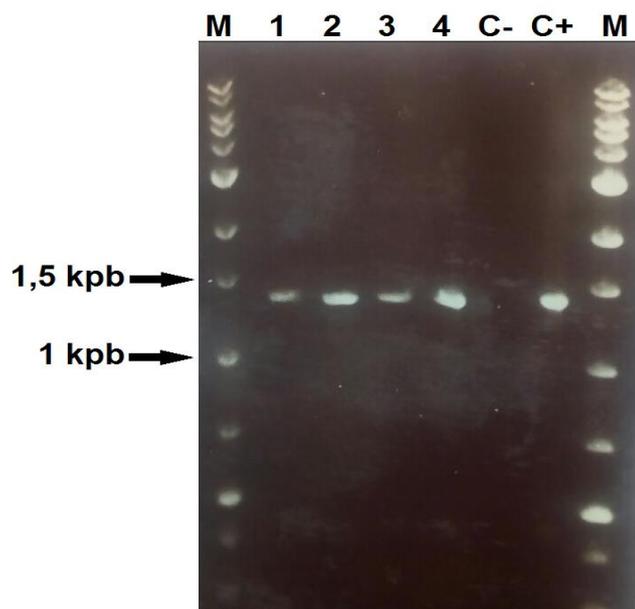


Figura 9. PCR de colônia da cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK102-3A transformada por integração genômica com o vetor pYIplacPR39. Colônias positivas 1, 2, 3 e 4; controle negativo (C-): água; controle positivo (C+): vetor pPR39; marcador (M): 1 kb ladder plus da Invitrogen.

Nota-se a presença de bandas de tamanho aproximado 1500 pb, o que é o esperado para a amplificação do cassete GPC que possui 1372 pb, confirmando a sua inserção no cromossomo da CEN.PK102-3A.

Além da cepa CEN.PK, tentou-se a transformação das cepas industriais JP-1 e PE-2, entretanto, após diversas PCRs de colônia, nenhum transformante positivo foi detectado. Isso possivelmente pela dificuldade em encontrá-lo sem uma marca de seleção. É desejável que cepas industriais não contenham sequências bacterianas derivadas de vestígios de vetores de expressão e nem marcas de resistência a antibióticos, tendo em vista o evento de transferência gênica entre microrganismos do ambiente industrial e a ameaça de bactérias cada vez mais resistentes a eles (LEITE, 2008).

As marcas de supressão de auxotrofia são baseadas na complementação nutricional de mutantes auxotróficos, assim quando esses são transformados com vetores contendo essa marca, a levedura torna-se capaz de crescer em meio de cultura sem o nutriente relativo ao gene marcador (PRONK, 2002; LEITE, 2008). Todavia, as cepas industriais de leveduras são predominantemente poliploides, contendo mais de uma cópia de genes conservados, o que inviabiliza o uso desse tipo de seleção (LUCENA *et al.*, 2007).

Além disso, as linhagens industriais são geneticamente mais complexas do que as de laboratório e não são estáveis em seu estado haploide (LUCENA *et al.*, 2007). Essa complexidade tem dificultado a aplicação de técnicas moleculares para modificações genéticas facilmente aplicáveis às linhagens laboratoriais (LEITE, 2008).

5.3 INSPEÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SOBRENADANTE DO CULTIVO DA CEN.PK102-3A TRANSFORMANTE

A Figura 10 mostra o resultado do teste antimicrobiano feito em placas com discos de difusão.

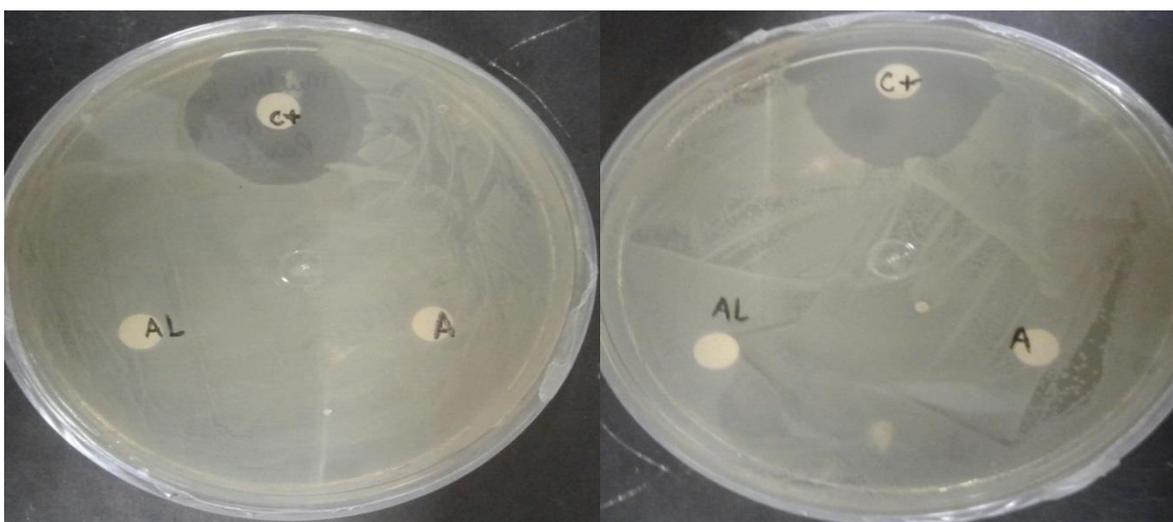


Figura 10. *Escherichia coli* ATCC 25922 plaqueada em meio MHA sobre a presença de três discos de difusão: um com ampicilina a 100 µg/mL, correspondente ao controle positivo (C+); outro com o sobrenadante do cultivo da CEN.PK transformante (A) e o outro com o cultivo da CEN.PK parental (AL).

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) do peptídeo PR-39 para a cepa *E. coli* ATCC 25922 é 4 µg/ml (FAN *et al.*, 2010). Percebe-se que houve o crescimento dessa cepa em ambas as placas, exceto nas regiões onde a ampicilina se dissolveu no ágar inibindo o crescimento delas. Conclui-se que nenhuma atividade antimicrobiana foi constatada dos sobrenadantes das CEN.PK, tanto a parental,

quanto a transformante. Isso possivelmente porque a cepa recombinante não produziu ou secretou o peptídeo PR-39 e se secretou, ele estava inativo.

A Figura 11 mostra os resultados dos testes antimicrobianos feitos em meio líquido.

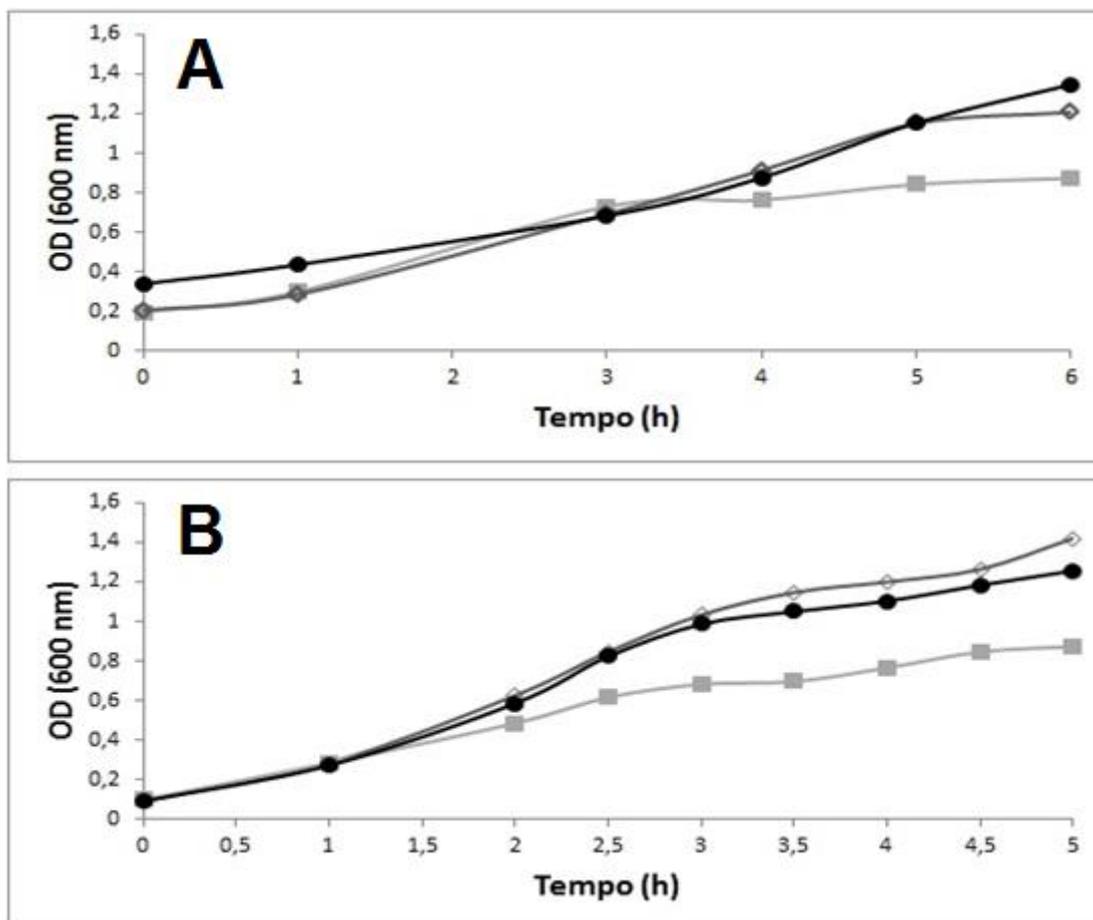


Figura 11. Média dos perfis de crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 crescida em LB contendo 20% (v/v) de: concentrado do sobrenadante da CEN.PK transformante (●); concentrado do sobrenadante da CEN.PK parental (◊); água destilada (◻). **A:** colônia 2 recombinante CEN.PK102-3A; **B:** colônia 4 recombinante CEN.PK102-3A.

Percebe-se que nenhuma atividade antimicrobiana que afetasse o crescimento da *E. coli* ATCC 25922 foi detectada no concentrado do sobrenadante da levedura CEN.PK recombinante, ratificando os resultados obtidos da metodologia de disco de difusão. Na verdade, a presença do sobrenadante do cultivo da CEN.PK102-3A estimulou o crescimento das bactérias, mais evidente no segundo gráfico (Figura 11B). PONOMAROVA *et al.* (2017) reportaram que as leveduras podem secretar aminoácidos para o meio e isso acontece principalmente em ambientes ricos em nitrogênio, favorecendo o crescimento das bactérias presentes.

Isso pôde ter acontecido nesses experimentos, explicando o melhor crescimento de *E. coli* nos sobrenadantes das CEN.PK.

Sugere-se que não houve a produção do peptídeo PR-39 a nível transcricional. Isso possivelmente por dificuldades em determinar a sequência gênica mais adequada para a expressão. Esse peptídeo é secretado das células de porco como prepropeptídeo, esse sofre modificação pós-traducional pela clivagem da porção N-terminal, resultando na forma madura de 39 aminoácidos da porção C-terminal (VELDHUIZEN *et al.*, 2014). Sendo assim, não se sabe determinar se a sequência completa do prepropeptídeo era necessária para a efetiva expressão ou secreção do PR-39 na sua forma ativa, levantando questionamentos sobre a funcionalidade do cassete GPC montado.

Além disso, a literatura não reportou muitas espécies de bactérias gram-positivas suscetíveis ao peptídeo PR-39 (VELDHUIZEN *et al.*, 2014), levando à predileção do teste com outros peptídeos antimicrobianos, o X e o Y, os quais serão os únicos utilizados adiante nesse trabalho. Objetivou-se testar a atividade antimicrobiana desses peptídeos em espécies de bactérias ácido-láticas e por isso procedeu-se ao isolamento delas dos leites fermentados Yakult® e Chamyto®.

5.4 ISOLAMENTO DE CEPAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS DOS LEITES FERMENTADOS YAKULT® E CHAMYTO®

As colônias isoladas do Yakult® e do Chamyto® foram observadas em microscopia óptica após coloração de gram e estão representadas nas Figuras 12 e Figura 13, respectivamente.



Figura 12. Visualização em microscopia óptica com lente objetiva 100x da colônia isolada da placa de Yakult® crescida em meio MRS após coloração de gram.

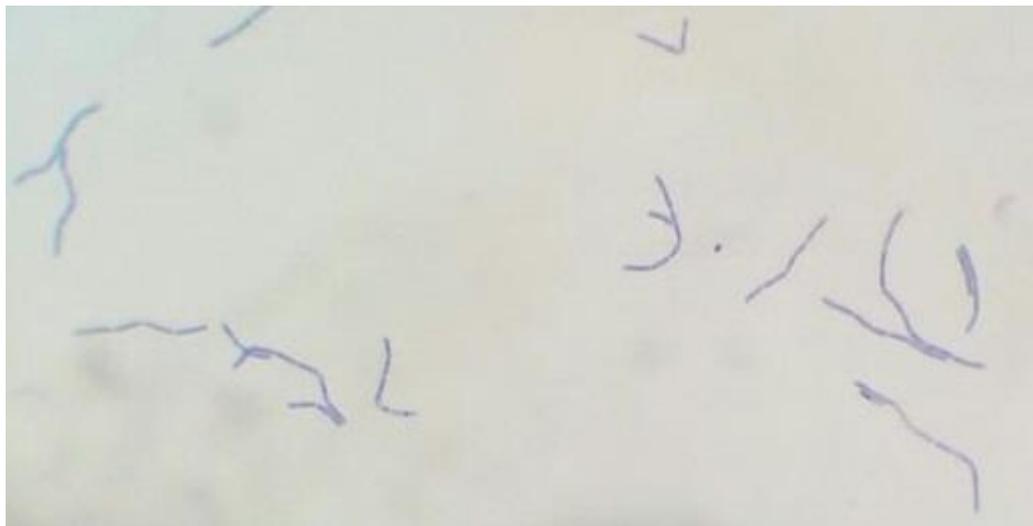


Figura 13. Visualização em microscopia óptica com lente objetiva 100x da colônia isolada da placa de Chamyto® crescida em meio MRS após coloração de gram.

Como a metodologia de coloração de gram permite diferenciar bactérias gram-positivas (azul violeta) das negativas (rosas), constata-se que todas as colônias analisadas são bactérias gram-positivas de formato bacilar, podendo estar agrupadas em cadeias curtas. Essas características morfológicas coincidem com as de bactérias ácido-lácticas (DOUILLARD *et al.*, 2013), porém para confirmar a identidade dessas colônias fez-se necessário a análise a nível molecular através do sequenciamento do DNA ribossomal 16S.

As sequências gênicas do DNA ribossomal são altamente conservadas entre organismos do mesmo gênero e espécie e diferem substancialmente entre divergentes gêneros, fazendo com que o sequenciamento dessa região seja comumente utilizado para a identificação de organismos (WOO *et al.*, 2008). Para a identificação das colônias isoladas, o DNA ribossomal 16S foi amplificado utilizando iniciadores universais.

Após sequenciamento dessas regiões e alinhamento (blastn) em banco de dados de sequências RNAr 16S, as colônias foram identificadas como *Lactobacillus*, porém não foi possível discerni-las a nível de espécie. As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos após o alinhamento para as colônias isoladas do Yakult® e do Chamyto®, respectivamente.

Tabela 8. Resultado do alinhamento do DNA ribossomal 16S da colônia isolada do Yakult® no banco de dados de sequências RNAr 16S.

Espécie	Score (pb)	Identidade (%)	Acesso
<i>Lactobacillus paracasei</i> NBRC 15889	1483	99	NR 113337.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 25302	1483	99	NR 117987.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> R094	1483	99	NR 025880.1
<i>Lactobacillus zeae</i> RIA 482	1480	99	NR 037122.1
<i>Lactobacillus casei</i> NBRC 15883	1478	99	NR 113333.1

Tabela 9. Resultado do alinhamento do DNA ribossomal 16S da colônia isolada do Chamyto® no banco de dados de sequências RNAr 16S.

Espécie	Score (pb)	Identidade (%)	Acesso
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136	1400	99	NR 043408.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> NBRC 15889	1399	99	NR 113337.1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> NBRC 3425	1399	99	NR 113332.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC 25302	1399	99	NR 117987.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> R094	1399	99	NR 025880.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> NBRC 15906	1395	99	NR 041054.1

Nota-se na Tabela 8 a identidade de 99% para espécies do gênero *Lactobacillus*, sendo que as cepas de *L. paracasei* (NBRC 15889, ATCC 25302 e R094) tiveram o maior número de pares de base alinhados à sequência da colônia do Yakult® (1483 pb), renunciando a identificação dessa colônia como *Lactobacillus paracasei*. Analogamente para a colônia isolada do Chamyto®, há a espécie *Lactobacillus rhamnosus* com 99% de identidade e score de 1400 pb.

Entretanto, a empresa Yakult® afirma que a espécie *Lactobacillus casei* Shirota está presente em seu leite fermentado. Assim como a empresa Nestlé afirma a presença da espécie *Lactobacillus paracasei* no Chamyto®, o que retifica os resultados obtidos no alinhamento. Isso pode ser explicado pelo fato de existir uma

ampla diversidade genômica dentro do gênero *Lactobacillus*, portanto várias espécies possuem genomas similares e são frequentemente reclassificadas taxonomicamente, o que é o caso das espécies *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, todas pertencentes ao grupo *Lactobacillus casei* (SMOKVINA *et al.*, 2013; SALVETTI *et al.*, 2012).

Além disso, uma comparação entre os resultados obtidos de ambas as sequências revela que três cepas foram candidatas comuns para a identidade de ambas colônias, sendo elas *Lactobacillus paracasei* NBRC 15889, *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302 e *Lactobacillus paracasei* R094. Um alinhamento entre as sequências obtidas do sequenciamento revelou a similaridade de 91,6% entre elas, mostrando um alto grau de parentesco entre as colônias isoladas do Yakult® e do Chamyto®.

Nesse estudo foi considerado que as colônias isoladas dos leites fermentados Yakult® e Chamyto® são respectivamente *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*.

5.5 PERFIS DE CRESCIMENTO DAS CEPAS INDUSTRIAIS DE *S. CEREVISIAE* JP-1 E PE-2 NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS X E Y

A Figura 14 representa os perfis de crescimento das amostras dos ensaios 2 e 3 feitos em microplaca, sendo cada curva a média aritmética das triplicatas biológicas.

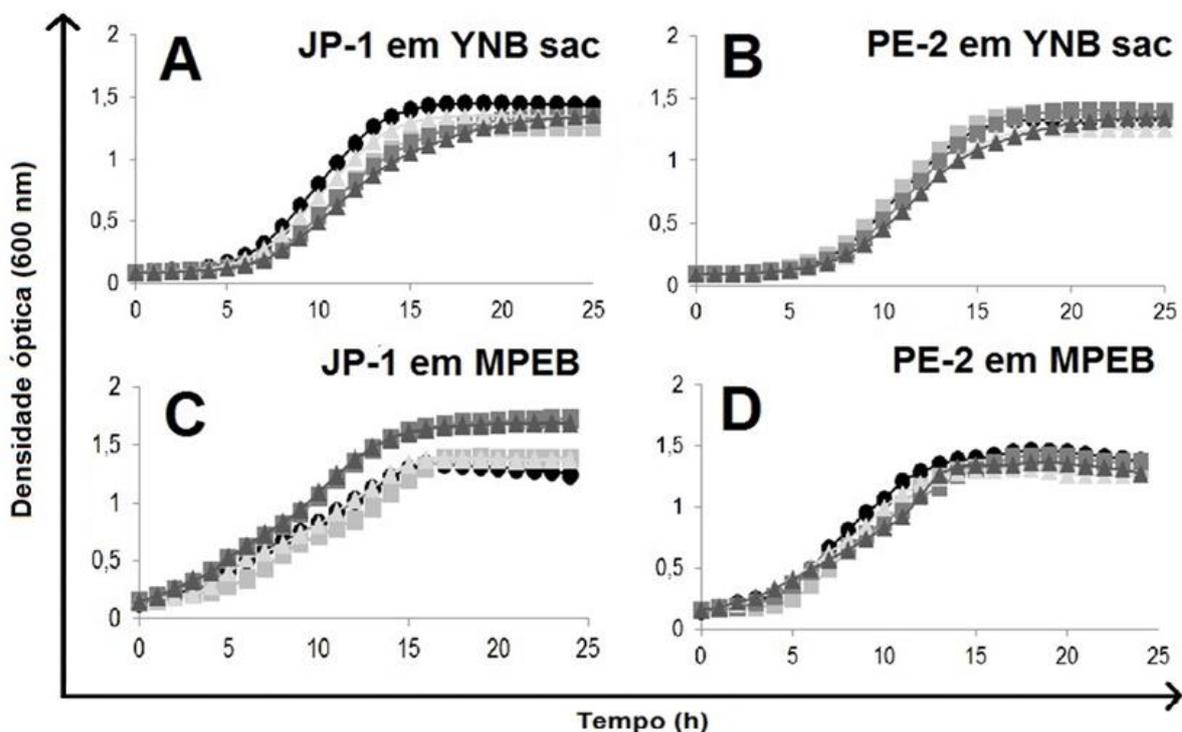


Figura 14. Curvas de crescimento das cepas de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 na ausência e presença dos peptídeos X e Y. **A e B:** curvas de JP-1 (em A) e PE-2 (em B) crescidas em meio YNB com sacarose na ausência (●) e presença do peptídeo X a 10 µg/ml (Δ cinza claro) e a 60 µg/ml (Δ cinza escuro) e do Y a 10 µg/ml (□ cinza claro) e a 60 µg/ml (□ cinza escuro). **C e D:** curvas de JP-1 (em C) e PE-2 (em D) crescidas em meio MPEB na ausência (●) e presença do peptídeo X a 5 µg/ml (Δ cinza claro) e a 10 µg/ml (Δ cinza escuro) e do Y a 5 µg/ml (□ cinza claro) e a 10 µg/ml (□ cinza escuro).

Percebe-se que as leveduras apresentaram perfis de crescimento semelhantes para todas as amostras testadas, revelando que os peptídeos X e Y não interferem no crescimento delas. As leveduras mantiveram sua cinética de crescimento mesmo sobre a presença de 60 µg/mL de peptídeo, revelando o potencial do uso desses peptídeos para estratégias de controle microbiano que não afetem cepas industriais da espécie *S. cerevisiae*.

Nota-se no ensaio feito com o meio MPEB que a atividade dos peptídeos não foi inibida ou comprometida pela presença do liquor de extrato de bagaço de cana-de-açúcar, indicando a possibilidade do uso desses peptídeos em processos com meios mais tóxicos, como possivelmente na produção de etanol de segunda geração.

Para melhor análise, as médias das taxas de crescimento das replicatas das cepas *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 desses ensaios estão representadas na Tabela 10.

Tabela 10. Taxas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 em meio YNB sacarose e MPEB na ausência (padrão) e presença dos peptídeos X e Y em diferentes concentrações e as porcentagens relativas à redução nas taxas de crescimento padrão.

Cepa de levedura	Meio	Peptídeo	Concentração do peptídeo (µg/ml)	Taxa de crescimento (h ⁻¹)	Redução na taxa de crescimento padrão (%)
JP-1	YNB sacarose	-	-	0,298	Padrão
		X	10	0,29	2,68
			60	0,265	11,07
		Y	10	0,271	9,06
			60	0,274	8,05
	MPEB	-	-	0,102	Padrão
		X	5	0,11	0
			10	0,112	0
		Y	5	0,117	0
			10	0,116	0
PE-2	YNB sacarose	-	-	0,278	Padrão
		X	10	0,255	8,27
			60	0,251	9,71
		Y	10	0,278	0
			60	0,266	4,31
	MPEB	-	-	0,148	Padrão
		X	5	0,144	2,70
			10	0,12	18,92
		Y	5	0,176	0
			10	0,138	6,75

As maiores interferências nas taxas de crescimento das leveduras pela presença dos peptídeos foi reportado nos cultivos com X, chegando a reduzir em aproximadamente 19% a taxa de crescimento de PE-2 em meio MPEB. Por outro lado, percebe-se que nenhum dos peptídeos testados a 5 e 10 µg/mL em meio

MPEB afetou a taxa de crescimento de JP-1. Comparativamente, somente o Y a 5 $\mu\text{g/mL}$ teve esse efeito na cepa PE-2.

A Figura 15 representa os perfis de crescimento das amostras do ensaio 4 e 5 feito em microplaca, sendo cada curva a média aritmética das triplicatas técnicas.

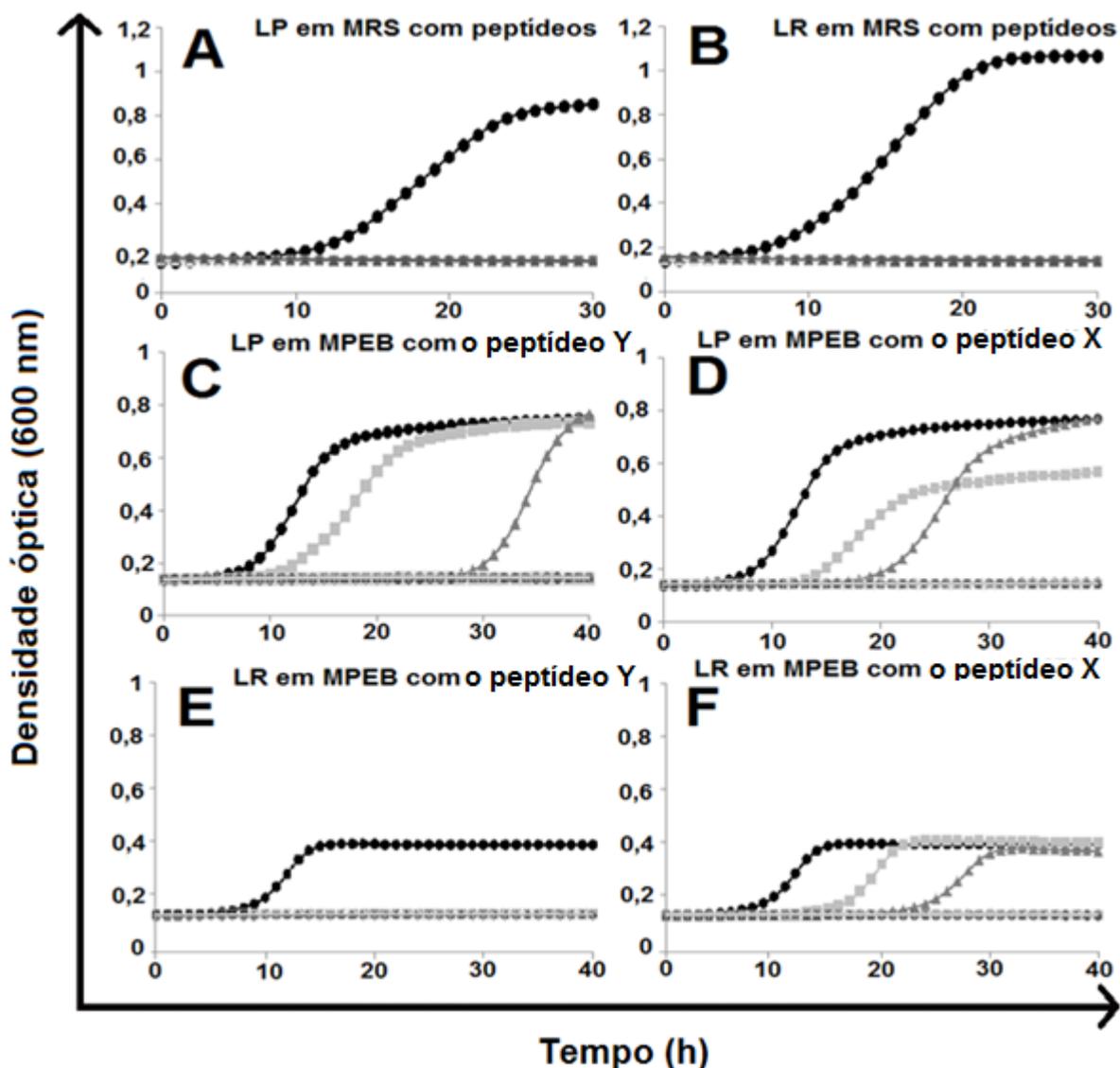


Figura 15. Perfis de crescimento das bactérias *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* em meio MRS (A e B) e em MPEB (C, D, E e F) na ausência e presença dos peptídeos X e Y nas seguintes concentrações: **A e B:** (●) 0 $\mu\text{g/mL}$; (x) Y a 30 $\mu\text{g/mL}$; (▲) Y a 70 $\mu\text{g/mL}$; (+) X a 30 $\mu\text{g/mL}$; (▪) X a 70 $\mu\text{g/mL}$. **C (Y), D (X) e F (X)** a (●) 0 $\mu\text{g/mL}$; (▪) 1 $\mu\text{g/mL}$; (▲) 2,5 $\mu\text{g/mL}$; (x) 5 $\mu\text{g/mL}$; (◆) 7 $\mu\text{g/mL}$; (◊) 10 $\mu\text{g/mL}$; (+) 15 $\mu\text{g/mL}$; (□) 20 $\mu\text{g/mL}$. **E:** Y a (●) 0 $\mu\text{g/mL}$; (◆) 7 $\mu\text{g/mL}$; (◊) 10 $\mu\text{g/mL}$; (+) 15 $\mu\text{g/mL}$. Sendo *Lactobacillus paracasei* (LP) nas imagens A, C e D e *Lactobacillus rhamnosus* (LR) nas imagens B, E e F.

Testou-se inicialmente o crescimento das espécies *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus* em um meio que satisfizesse todas as suas necessidades nutricionais, o MRS. Todas as condições ótimas de crescimento dessas cepas foram estabelecidas nesse experimento na tentativa de maximizar o crescimento delas para saber se mesmo nessas condições os peptídeos têm atividade antimicrobiana. Nota-se claramente a total inibição de ambas as cepas na presença dos peptídeos X e Y a 30 e 70 µg/mL.

Percebe-se na Figura 15 letras A, B, C, D e F que o MIC dos peptídeos X e Y que inibe completamente o crescimento das bactérias *L. paracasei* e *L. rhamnosus* é 5 µg/mL e na Figura 15 letra E é 7 µg/mL. Além disso, sobre concentrações menores que o MIC, as bactérias testadas sofreram um aumento na fase lag, ou seja, demoraram mais para começarem a se multiplicar. Isso é evidente mesmo a partir da menor concentração testada (1 µg/mL), aumentando em aproximadamente 5 h a fase lag. Na Figura 15 letra D, nota-se também que a espécie *L. paracasei* na presença de 1 µg/mL de X não conseguiu chegar na mesma densidade celular (OD 0,6) se comparado ao seu crescimento na ausência do peptídeo (OD 0,8). Com 2,5 µg/mL de peptídeos, a fase lag aumentou aproximadamente em 23, 14 e 16 h, como mostrado nas letras C, D e F, respectivamente.

Esse aumento na fase lag das bactérias pelos peptídeos é vantajoso para a produção industrial de etanol, pois permite o crescimento das leveduras antes da proliferação das bactérias contaminantes. Tendo em vista que uma fermentação industrial brasileira dura 12 h, sobre concentração menores que 5 µg/mL dos peptídeos, o atraso no crescimento das bactérias seria tal que a fermentação acabaria antes delas conseguirem proliferar.

Esses resultados confirmam o potencial do uso desses peptídeos para combater os contaminantes bacterianos. Além de não interferirem no crescimento das leveduras, os peptídeos apresentaram MICs baixos (5 e 7 µg/mL) para as bactérias, revelando sua especificidade e alta potência. Além disso, essas concentrações são próximas às dos antibióticos utilizados industrialmente (1,5 µg/mL de penicilina) (MUTHAIYAN *et al.*, 2011). Para efeitos comparativos, o MIC da virginiamicina para *Lactobacillus* varia de 0,1 a 5 µg/mL, entretanto, existem variações de susceptibilidade entre espécies desse gênero (MUTHAIYAN *et al.*,

2011). Isso reforça mais uma vez o potencial dos peptídeos avaliados e a possibilidade da aplicação industrial, tendo em vista os valores de MIC parecidos e o efeito antimicrobiano.

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR *LACTOBACILLUS PARACASEI* E *L. RHAMNOSUS* NO CULTIVO EM ERLLENMEYERS DAS CEPAS INDUSTRIAIS DE *S. CEREVISIAE* JP-1 E PE-2

Com o objetivo de verificar o efeito da presença das bactérias *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus* no crescimento das cepas industriais de *S. cerevisiae*, foram feitos cultivos em erlenmeyers aletados contendo diferentes concentrações bacterianas, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos obtidos dos cocultivos em erlenmeyers das leveduras *S. cerevisiae* PE-2 e JP-1 com as bactérias *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*. PE: PE-2; JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; TD: tempo de duplicação; Y: rendimento.

Microrganismos	Proporção (L : B)	$\mu_{\text{máx}}$ OU $\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$ (h⁻¹)	TD (h)	Y_{EtOH/maltose}	Y_{Lac/maltose}
PE-2	1:0	0,341 ± 0,005	2,03	0,246 ± 0,002	0
PE + LP	1:1	0,22 ± 0,001	3,15	0,302 ± 0,023	0,171 ± 0,045
	1:2	0,19	3,65	0,318	0,204
	1:4	0,146 ± 0	4,75	0,32 ± 0,008	0,262 ± 0,018
PE + LR	1:1	0,298 ±0,002	2,32	0,37 ± 0,007	0,171 ± 0,0007
	1:4	0,242 ± 0,004	2,86	0,386 ± 0,012	0,254 ± 0,024
JP	1:0	0,327 ±0,014	2,12	0,09 ± 0,017	0
JP + LP	1:1	0,303 ± 0,003	2,29	0,281 ± 0,003	0,352 ± 0,173
	1:2	0,298 ± 0,007	2,32	0,304 ± 0,009	0,370 ± 0,014
JP + LR	1:1	0,315 ±0,015	2,20	0,302 ± 0,003	0,36 ± 0,079

Sugere-se que o acetato não foi produzido pelas células por sua ausência no cromatograma e o glicerol não foi detectado adequadamente pela presença constante de um pré-pico que interferiu na quantificação desse produto. Calculou-se também os rendimentos a partir dos açúcares totais (glicose mais maltose), mas não houve nenhuma diferença dos valores obtidos dos rendimentos a partir da maltose.

Analisando a Tabela 11 verifica-se que quanto maior a concentração de bactéria, menores são as taxas de crescimento do cocultivo ($\mu_{\text{máx}}^{\text{total}}$) e conseqüentemente maiores os tempos de duplicação, revelando uma interferência no crescimento da levedura pela presença das bactérias. Durante os cultivos individuais das leveduras não foi detectado nenhuma produção de ácido láctico, sendo esse somente quantificado nos experimentos em cocultivos, onde seu rendimento aumentava com o aumento da concentração de bactérias.

Opostamente ao que se esperava, houve um aumento no rendimento de etanol quando as leveduras estavam em cocultivo com as bactérias, provavelmente pela produção de etanol pelas espécies *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*. Algumas espécies homofermentativas de *Lactobacillus* também conseguem produzir etanol e acetato numa fermentação mista (que é diferente da heterofermentação, pois essas espécies ainda utilizam a via EMP, alterando somente o produto final). Essa transição para fermentação mista acontece, por exemplo, em limitação de carbono, sob baixa taxa de crescimento ou por uma mudança na concentração de oxigênio. Na presença de oxigênio, a enzima NADH oxidase é ativada, sua alta afinidade pelo NADH o indisponibiliza para a enzima LDH, alterando a fermentação de homolática para mista em condições aeróbicas, onde o produto final depende do pH do cultivo (BOSMA *et al.*, 2017).

As espécies *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus* isoladas de laticínios apresentaram crescimentos diferentes quando cultivadas em meio MRS e MPE. Em meio MPE elas cresceram menos e mais lentamente do que em MRS, resultando em menores taxas de crescimento.

Além da competição por substratos e a produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, as espécies de *Lactobacillus* possuem mecanismos antimicrobianos que podem contribuir para explicar a redução da taxa de crescimento das leveduras nos cocultivos. Esses mecanismos são explorados na biopreservação de alimentos e incluem a síntese de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e

antimicrobianos de amplo espectro, como as reuterinas e as bacteriocinas. A espécie *L. reuteri* sintetiza reuterina a partir do glicerol e a excreta quando fermenta carboidratos. Esse antimicrobiano não é considerado uma bacteriocina por não ser naturalmente proteináceo e por possui um largo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de diversos organismos, como bactérias gram-positivas e negativas, fungos, leveduras e protozoários (FUQUAY *et al.*, 2011).

Contudo, a maioria das cepas de *L. rhamnosus* isoladas de laticínios possuem pouca atividade antimicrobiana, isso porque a diversidade e riqueza da microbiota em laticínios é modesta, refletindo em pouca competição (DOUILLARD *et al.*, 2013). Dessa forma, sugere-se que o principal efeito inibitório das *Lactobacillus* no crescimento das *S. cerevisiae* foi a competição por nutrientes e a produção de ácido láctico, resultando na redução da taxa de crescimento e conseqüentemente no aumento do tempo de duplicação. No cocultivo na proporção de ODi 1 de levedura para 1 de bactéria, a taxa de crescimento da cepa PE-2 em relação à obtida no cocultivo com *L. rhamnosus* foi reduzida em 12,6%, caindo para 35,4% quando em cultivo com *L. paracasei*. Esses valores para JP-1 são respectivamente 3,66% e 7,3%, evidenciando uma maior interferência do crescimento quando as leveduras foram cocultivadas com *L. paracasei*, sendo a cepa PE-2 a mais afetada.

5.7 PERFIS FERMENTATIVOS DAS CEPAS INDUSTRAIS DE *S. CEREVISIAE* JP-1 E PE-2 E DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* E *L. RHAMNOSUS*, EM COCULTIVO E INDIVIDUALMENTE, NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DOS PEPTÍDEOS X E Y, EM FERMENTADORES

Para os peptídeos X e Y serem aplicados em escala industrial é necessário primeiramente o estudo das suas atividades no cocultivo de contaminante e levedura. Com isso, objetiva-se analisar se eles mantêm o mesmo MIC, se são estáveis durante todo o processo produtivo, se interferem no crescimento e na produção de etanol e quanto tempo dura sua meia-vida.

As Figuras 16 e 17 mostram os perfis fermentativos das cepas industriais de *S. cerevisiae* JP-1 e PE-2 crescidas em cocultivo com as espécies de *Lactobacillus paracasei* e *rhamnosus* em fermentadores, assim como seus crescimentos individualmente. A Tabela 12 apresenta todos os parâmetros cinéticos obtidos desses cultivos.

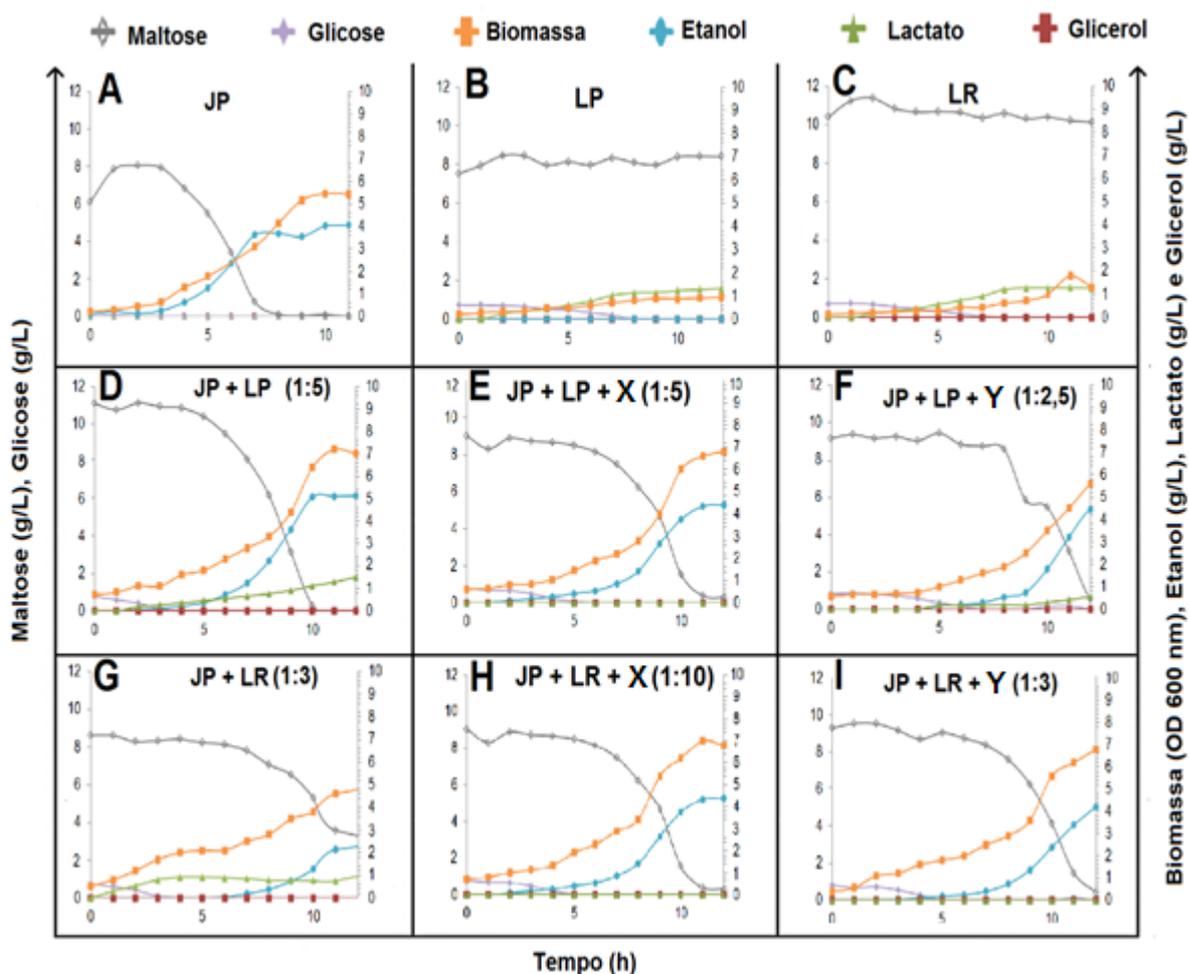


Figura 16. Perfis fermentativos da cepa *S. cerevisiae* JP-1 e das *Lactobacillus paracasei* e *rhamnosus* crescidas em meio MPE modificado em fermentadores nas seguintes condições: **A:** JP-1 (JP) crescimento padrão; **B:** *Lactobacillus paracasei* (LP); **C:** *Lactobacillus rhamnosus* (LR); **D:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:5); **E:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:5) e sob presença do peptídeo X; **F:** JP em cocultivo com LP na proporção (1:2,5) e sob presença do peptídeo Y; **G:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:3); **H:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:10) e sob presença do peptídeo X; **I:** JP em cocultivo com LR na proporção (1:3) e sob presença do peptídeo Y. Ambos peptídeos foram adicionados na concentração de 5 µg/mL.

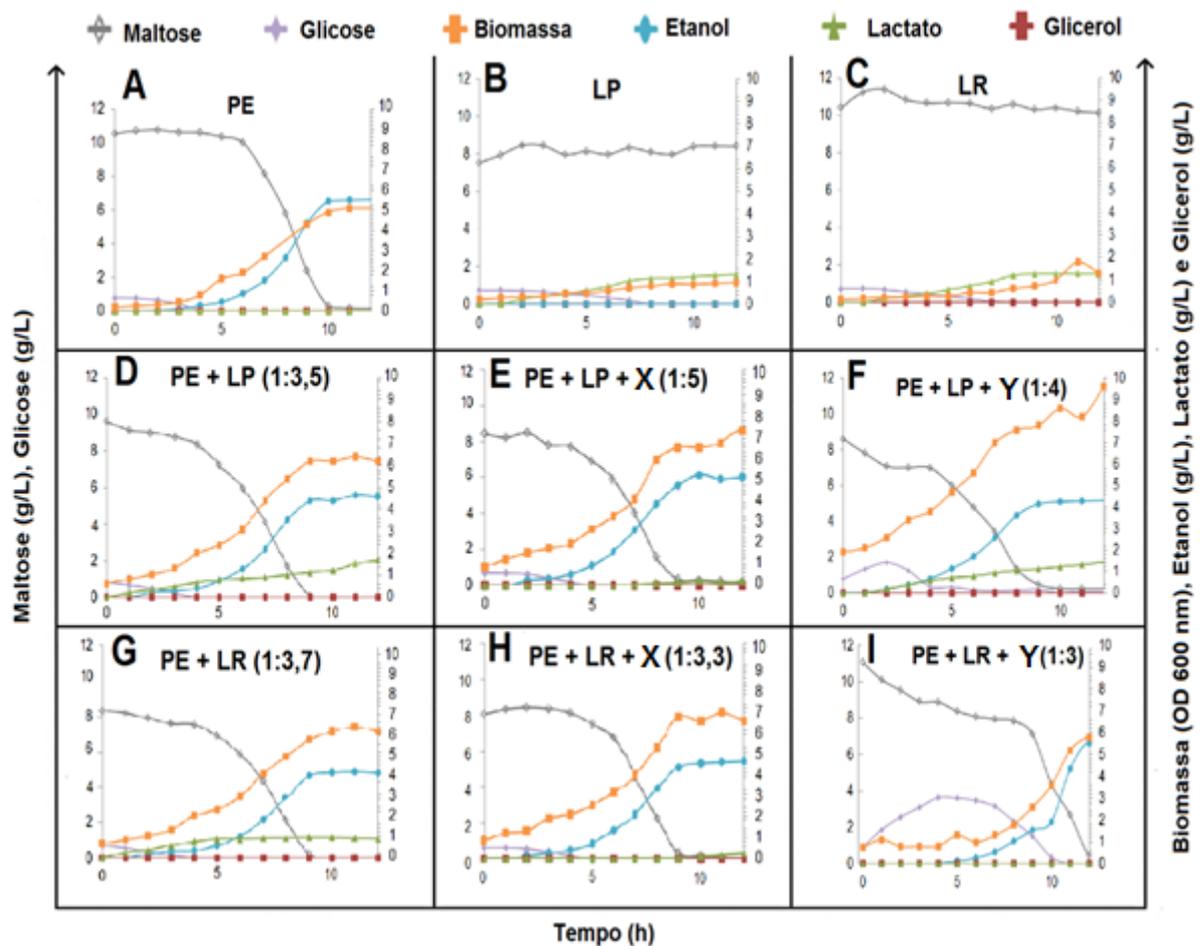


Figura 17. Perfis fermentativos da cepa *S. cerevisiae* PE-2 e das *Lactobacillus paracasei* e *rhamnosus* crescidas em meio MPE modificado em fermentadores nas seguintes condições: **A:** PE-2 (PE) crescimento padrão; **B:** *Lactobacillus paracasei* (LP); **C:** *Lactobacillus rhamnosus* (LR); **D:** PE em cocultivo com LP na proporção (1:3,5); **E:** PE em cocultivo com LP na proporção (1:5) e sob presença do peptídeo X; **F:** PE em cocultivo com LP na proporção (1:4) e sob presença do peptídeo Y; **G:** PE em cocultivo com LR na proporção (1:3,7); **H:** PE em cocultivo com LR na proporção (1:3,3) e sob presença do peptídeo X; **I:** PE em cocultivo com LR na proporção (1:3) e sob presença do peptídeo Y. Ambos peptídeos foram adicionados na concentração de 5 µg/mL.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos obtidos dos cultivos em fermentadores tanto na presença de 5µg/ml dos peptídeos X e Y, quanto na sua ausência. JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx, total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; Y: rendimento, g: grama; ND: não determinado; totais: açúcares totais (maltose mais glicose). As horas das colunas $Y_{\text{EtOH/mal}}$ e $Y_{\text{Lac/mal}}$ representam o momento em que o etanol e o lactato começaram a ser detectados.

Cultivos	Condição	Proporção (L : B)	$\mu_{\text{máx}}$ ou $\mu_{\text{máx, total}}$ (h^{-1})	Y EtOH/mal (g/g)	Y EtOH/totais	Y Lac/mal (g/g)	Y Lac/totais
JP	Sem peptídeo	1:0	0,364	0,491	0,491	0	0
JP+ LP	Sem peptídeo	1:5	0,231	0,462 (2h)	0,461	0,066 (2h)	0,066
	X	1:5	0,269	0,496 (2h)	0,479	0	0
	Y	1: 2,5	0,248	0,497 (4h)	0,489	N.D. (5h)	N.D.
JP + LR	Sem peptídeo	1:3,3	0,112	0,449 (6h)	0,449	N.D. (1h)	N.D.
	X	1:10,6	0,250	0,469 (2h)	0,454	0 (11h)	0
	Y	1: 5	0,228	0,455 (3h)	0,452	0 (11h)	0
PE	Sem peptídeo	1:0	0,460	0,493 (2h)	0,481	0	0
PE + LP	Sem peptídeo	1: 3,5	0,271	0,486 (2h)	0,477	0,584 (1h)	0,314
	X	1:5	0,220	0,574* (2h)	0,546*	N.D. (7h)	N.D.
	Y	1:3	0,189	0,546* (1h)	0,475	0,082 (2h)	0,079
	Sem	1: 3,7	0,253	0,488	0,478	N.D.	0,374

PE + LR	peptídeo			(2h)		(1h)	
	X	1: 3,3	0,216	0,502 (2h)	0,484	N.D. (8h)	N.D.
	Y	1: 5,5	0,306	0,712* (4h)	0,487	0	0

*Rendimento obtido acima do teórico máximo.

Pelos perfis fermentativos percebe-se que as células delongaram o consumo de maltose, tanto no cultivo isolado, quanto no cocultivo com contaminantes na presença e ausência dos peptídeos. Vaan Leeuwen e colaboradores (1992) relataram que existe uma relação entre o pH do meio e a velocidade do influxo da maltose e a taxa de acúmulo intracelular desse dissacarídeo. Quanto maior o pH, menor o influxo e acúmulo de maltose. Em pH 5,5 a taxa de captação de maltose é $8,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de fosfolipídeo, reduzindo para 1,3 em pH 6,7.

Sabe-se que o pH do meio MPE modificado após a autoclavagem e antes do inóculo de células é em média 6,5 e que as levedura JP-1 e PE-2 demoraram 8 h para reduzir o pH até 5,5. Pela Figura 17 letra A percebe-se que a PE-2 aumentou o consumo de maltose a partir de 6 h de crescimento. Diferentemente para a JP-1 que aumentou a partir de 3 h (Figura 16 letra A). Nota-se também que não houve detecção de glicose na fermentação de JP-1, opostamente à PE-2, onde foi detectado a presença inicial de 0,78 g/L de glicose.

Sabe-se ainda que o metabolismo da maltose em *S. cerevisiae* é controlado por três mecanismos regulatórios: repressão e inativação pela glicose e indução. Nesse microrganismo, a expressão de vários genes é controlada e regulada pela glicose. Além de agir em nível transcricional, a glicose também atua aumentando a taxa de degradação de mRNA e proteínas. A presença de maltose no meio de cultivo é necessária para a indução da síntese da maltase e dos transportadores de maltose. Porém, se hexoses, captadas por transportadores Hxt, ou galactose são adicionadas ao meio de cultivo, ocorre total inativação do sistema de transporte de maltose sem afetar, contudo a atividade da maltase (inativação catabólica) (NOVAK *et al.*, 2004).

Como a maltose utilizada nesse trabalho não possui um alto grau de pureza (correspondendo a pelo menos 42% p/p), outros açúcares também estão presentes

(até 12% glicose, pelo menos 10% maltotriose e entre 23 a 28% de outros açúcares) (WE CONSULTORIA, 2014). Por consequência, algumas bateladas possuíam diferentes composições de açúcares, dificultando a comparação dos rendimentos obtidos (considerando a maltose o único substrato) e a análise da interferência dessas hexoses na inativação catabólica. Visto isso, a influência do pH somado à presença de hexoses iniciais no meio MPE do cultivo de PE-2 podem ter contribuído para a inativação catabólica, interferindo na internalização da maltose e consequentemente no seu consumo.

Por outro lado, o mosto cervejeiro é composto de: 50-60% maltose, 15-20% maltotriose, 15-20% glicose, 1-2% frutose, 1-2% sacarose e de 20 a 30% material de dextrina (JUNIOR *et al.*, 2012). Sendo assim, essa composição é bastante similar à da fonte de carbono utilizada nesse estudo, reforçando a aplicabilidade desse estudo nas fermentações para cervejas.

Nas fermentações em cocultivo houve dificuldade para estabelecer proporções de levedura e bactéria iguais entre as replicatas. Isso porque na etapa de preparação do inóculo, uma parte das células concentradas restava na seringa inoculadora. Além disso, toda a biomassa foi determinada pela OD das amostras, porém existem variações e margens de erro no espectrofotômetro utilizado, fazendo com que em algumas leituras a mesma amostra ou diferentes diluições dela resultasse em valores distintos. Por mais que alguns deles fossem próximos, multiplicados pela diluição essa variação amplificava. Sendo assim, quando comparado os parâmetros cinéticos dos cocultivos com e sem peptídeo, deve-se levar em conta a proporção de cada experimento, já que quanto mais bactéria, maiores os efeitos prejudiciais.

Apesar dessa limitação, praticamente em todos os cocultivos analisados nas Figuras 16 e 17, o rendimento de etanol dos que foram inoculados com os peptídeos aumentou quando comparado aos mesmos cocultivos na ausência desses antimicrobianos (Tabela 12). O mesmo acontece para todas as taxas de crescimento dos cocultivos com a cepa JP-1. Percebe-se também pelos perfis fermentativos com peptídeos que não houve detecção de lactato nos cocultivos de *L. paracasei* na presença do X (detectado somente no final da fermentação no cocultivo com PE-2) e nos cocultivos de *L. ramosus* na presença do Y (Figura 16 letras E, H e I e Figura 17 E, H e I), sugerindo uma maior susceptibilidade de *L. paracasei* ao peptídeo

X e de *L. rhamnosus* ao Y e mostrando que a eficácia desses peptídeos é dependente em nível de espécie.

Na Figura 17 letras F e I é possível notar que a glicose aumenta sua concentração no decorrer da fermentação, sendo consumida horas depois. Diferentemente dos cocultivos de JP-1, onde a glicose só é consumida. Essa diferença pode ser devido à distinta expressão de genes relativos à maltase extracelular de JP-1 e PE-2.

Pelos dados da Tabela 12, nota-se que os peptídeos contribuíram para o aumento das taxas de crescimento e do rendimento de etanol em praticamente todos os cocultivos. Percebe-se também que a taxa de crescimento foi o parâmetro avaliado mais afetado nos cocultivos. O X permitiu o aumento em 14,12% na $\mu_{\text{máx}}$ total do cocultivo de JP-1 com *L. paracasei* e de 55,2% no com *L. rhamnosus*. Comparativamente, o Y permitiu o aumento em 6,85% na $\mu_{\text{máx}}$ total do cocultivo de JP-1 com *L. paracasei* e de 50,87% no com *L. rhamnosus*. Houve também um aumento em 17,32% da $\mu_{\text{máx}}$ total do cocultivo de PE-2 com *L. rhamnosus* na presença do Y. Apesar de mais pesquisa ser necessária, ratifica-se aqui que a espécie *L. paracasei* empregada nesse estudo é mais prejudicial do que *L. rhamnosus* no crescimento das cepas industriais analisadas.

Analisando os rendimentos de etanol obtidos nos cocultivos de JP-1 na presença dos peptídeos, tem-se que houve um aumento de 3,75% nos cocultivos com *L. paracasei* na presença do peptídeo X e de 7,04% na presença do Y. Nos cocultivos com *L. rhamnosus* aumentou-se em 1,10% quando cultivado na presença do X e 1,31% quando com Y, padrão diferente do obtido das taxas de crescimento, já que houve uma tendência de melhora maior para os cocultivos com *L. rhamnosus* do que para os de *L. paracasei*. Semelhantemente os rendimentos de etanol obtidos nos cocultivos de PE-2 na presença dos peptídeos também aumentaram. Aumentando em 3,75% e 6,85% nos cocultivos com *L. paracasei* na presença dos peptídeos X e do Y, respectivamente, e também no cocultivo com *L. rhamnosus* com Y em 1,84%.

Lee e colaboradores (1995) conduziram estudos para avaliar a produção de etanol por *S. cerevisiae* em meio misto de glicose e maltose. Eles utilizaram 100 g/L de concentração inicial de açúcares e obtiveram diferentes taxas de crescimento e rendimento de etanol calculados a partir da glicose e da maltose. Para a glicose a

$\mu_{\text{máx}}$ determinada foi $0,401 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{\text{EtOH/glicose}}$ $0,429$. Já para a maltose foi $0,353 \text{ h}^{-1}$ e $0,451$, respectivamente. Mesmo utilizando cepas diferentes, esses parâmetros são similares aos obtidos no presente estudo (JP-1: $\mu_{\text{máx}}$ $0,364$; $Y_{\text{EtOH/maltose}}$ $0,491$; PE-2: $\mu_{\text{máx}}$ $0,460$; $Y_{\text{EtOH/maltose}}$ $0,493$).

Para determinar a meia-vida do peptídeo, a sua estabilidade durante a fermentação e se o MIC obtido em microplacas é mantido, mais estudos são necessários. Sugere-se que a sua eficácia em inibir o crescimento das LABs começa a diminuir a partir do momento que o lactato passa a ser detectado nos cocultivos, já que a presença desse produto indica a fermentação das *Lactobacillus*.

Esses resultados ressaltam o valor desses peptídeos como uma nova estratégia de controle bacteriano, demonstrando aqui a sua eficácia na inibição do crescimento das *Lactobacillus* avaliadas isoladamente e em cocultivo com cepas industriais de leveduras. É essencial encontrar novos antimicrobianos para prevenir e controlar as contaminações nas fermentações industriais de bioetanol. Nessa busca, há alguns critérios a serem considerados: atóxicos para as leveduras, amplo espectro e alta atividade antimicrobiana contra a maioria ou todas as bactérias contaminantes, mínimas oportunidades para o desenvolvimento de resistência, facilidade econômica de administração, eco-amigável com baixa toxicidade para plantas, animais e humanos (MUTHAIYAN *et al.*, 2011).

Nesse sentido e tendo em vista os resultados da implementação dos peptídeos X e Y nos cocultivos. Os antimicrobianos tiveram pouca interferência no crescimento das leveduras; possuem não somente atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas, mas também para gram-negativas, fungos e vírus; podem ser facilmente administrados em indústrias, ainda mais se forem sintetizados por produção heteróloga; são mais seguros que os antibióticos na geração de mecanismos de resistência e finalmente não são tóxicos para o meio ambiente e nem para animais e humanos, podendo ser usados inclusive no tratamento de infecções por micobactérias (SILVA *et al.*, 2017).

Percebe-se pelos perfis fermentativos das *Lactobacillus* analisadas (Figura 16 ou 17 letras B e C) que houve um acúmulo de maltose durante toda a fermentação. A habilidade em utilizar carboidratos é baseada na presença de uma maquinaria transportadora funcional e de vias metabólicas intactas. As cepas de *L. rhamnosus* encontradas em laticínios possuem o locus da maltose em estado não-

funcional, devido à inserção de um gene conservado (LGG_00950) entre o gene codificante do transportador específico da maltose (malEFGK) e o da hidrolase (DOUILLARD *et al.*, 2013).

O mecanismo regulatório do metabolismo de maltose também acontece em espécies de *Lactobacillus* que são capazes de fermentá-la. Quando a cepa *L. casei* BL23 está transportando maltose ativamente, a adição de glicose ou outra fonte de carbono de rápida absorção ativa a exclusão do indutor, bloqueando imediatamente o transporte do dissacarídeo. Isso acontece porque o sistema fosfoenolpiruvato:açúcar fosfotransferase (PTS) desfosforilado interage e regula alostericamente as permeases não-PTS e interage com o transportador ABC da maltose, inibindo a sua atividade ATPase e portanto, bloqueando o transporte desse dissacarídeo (MONEDERO *et al.*, 2007).

Dessa forma, sugere-se que ambas as espécies de *Lactobacillus* não foram capazes de consumir maltose ou também sofreram repressão catabólica pela presença de hexoses, explicando as suas baixas taxas de crescimento (0,156 h⁻¹ a de *L. paracasei* e 0,173 h⁻¹ a de *L. rhamnosus*). Vale ressaltar também que como ambas foram domesticadas a viverem em laticínios, elas se especializaram a viver nesse nicho. Estudos com *Lactobacillus* encontrados em laticínios revelaram a presença incomum de muitos pseudogenes nos genomas de várias cepas, reflexo da perda de vias metabólicas e de sistemas de transporte que não são essenciais nesse nicho (DOUILLARD *et al.*, 2013).

Assim como a variedade de açúcares no meio MPE interferiu na precisão dos rendimentos obtidos, o cálculo desse parâmetro para as bactérias não foi possível. Isso porque como as *Lactobacillus* não consumiram a maltose, não se sabe a procedência da sua fonte de energia, provavelmente algum outro açúcar, como a glicose. Entretanto, somente a glicose não é suficiente para explicar a produção de lactato dessas espécies, visto que os rendimentos em massa obtidos ultrapassaram 1, sendo o $Y_{Lac/glicose}$ 1,23 o de *L. rhamnosus* e 1,38 o de *L. paracasei*. Isso sem contar que uma parte da energia obtida foi direcionada para a produção de biomassa.

As espécies de *Lactobacillus* heterofermentativas derivadas de laticínios conseguem obter energia suplementar pelo catabolismo da arginina. Além do ATP produzido na glicólise, há outro sistema gerador de ATP envolvendo a quebra da

arginina pela via da arginina deiminase. Nela o ATP é produzido do carbamoil fosfato pela ação da enzima carbamato cinase, juntamente com a produção de amônia e CO₂ (FUQUAY *et al.*, 2011). Como já foi discutido anteriormente, as leveduras podem secretar aminoácidos para o meio de cultivo e isso acontece principalmente em ambientes ricos em nitrogênio (PONOMAROVA *et al.*, 2017). Assim, as *Lactobacillus* tinham uma vantagem quando cocultivadas com as leveduras, pois se aminoácidos foram secretados para o meio, as bactérias poderiam utilizá-los para atender às suas necessidades de nitrogênio e também para a geração de ATP através do catabolismo da arginina.

5.8 PARÂMETROS CINÉTICOS

Para efeito de comparação, a Tabela 13 apresenta as taxas de crescimento, os rendimentos em massa de etanol e de lactato dos experimentos em microplacas, em erlenmeyers e fermentadores na ausência de peptídeos. Os desvios-padrão das replicatas foram calculados e também estão representados.

Tabela 13. Parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos em microplacas, frascos e fermentadores na ausência de peptídeos com desvios-padrão. JP: JP-1; LP: *Lactobacillus paracasei*; LR: *Lactobacillus rhamnosus*; L: levedura; B: bactéria; $\mu_{\text{máx}}$: taxa de crescimento específico máxima; $\mu_{\text{máx, total}}$: taxa de crescimento específico máxima total; Y: rendimento, g: grama; N.A.: não analisado; N.D.: não determinado.

Microrganismos	Método	Proporção (L : B)	$\mu_{\text{máx}}$ ou $\mu_{\text{máx, total}}$ (h⁻¹)	Y_{EtOH/mal} (g/g)	Y_{Lac/mal} (g/g)
JP	Microplacas	1:0	0,102	N.A.	N.A.
	Frascos	1:0	0,327 ± 0,014	0,086 ± 0,017	0
	Fermentadores	1:0	0,364 ± 0,005	0,491 ± 0,039	0
JP + LP	Frascos	1:2	0,298 ± 0,007	0,304 ± 0,009	0,369 ± 0,014
	Fermentadores	1:5	0,231	0,462	0,066
JP + LR	Frascos	1:1	0,315 ± 0,015	0,302 ± 0,003	0,36 ± 0,079
	Fermentadores	1:3,3	0,112	0,449	N.D.
PE	Microplacas	1:0	0,148	N.A.	N.A.
	Frascos	1:0	0,341 ± 0,005	0,246 ± 0,002	0
	Fermentadores	1:0	0,460 ± 0,007	0,493 ± 0,009	0
PE + LP	Frascos	1:4	0,146 ± 0	0,32 ± 0,008	0,262 ± 0,018
	Fermentadores	1:3,5	0,271	0,486	0,584
PE + LR	Frascos	1:4	0,242 ± 0,004	0,386 ± 0,012	0,272
	Fermentadores	1:3,7	0,253	0,488	N.D.

N.A.: não analisado;

N.D.: não determinado.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os prejuízos das contaminações bacterianas em processos fermentativos alcóolicos e a importância econômica do etanol e de bebidas fermentadas, novas metodologias de controle microbiano são cada vez mais requeridas. Isso porque as tecnologias convencionalmente empregadas apresentam diversas desvantagens, como alto custo, toxicidade às leveduras e risco ambiental. Nesse sentido, os inúmeros benefícios da utilização de peptídeos antimicrobianos e a diversidade de sua aplicabilidade têm aumentado o interesse dos pesquisadores na descoberta e caracterização de peptídeos de diversas fontes, como de vespas sociais. Com isso, o presente estudo contribui para a literatura por apresentar, pela primeira vez, a aplicação dos peptídeos X e Y como metodologia de controle bacteriano em processos fermentativos com cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia dos peptídeos na inibição das espécies de *Lactobacillus* avaliadas, apresentando MIC de 5 µg/mL e aumentando a fase lag dessas bactérias em concentrações inferiores. Além disso, houve um aumento de até 50,87% na taxa de crescimento e 7% no rendimento de etanol quando o peptídeo Y foi adicionado aos cocultivos de leveduras e contaminantes, sendo que em muitos casos, os parâmetros cinéticos obtidos das condições na presença de contaminantes e dos peptídeos eram similares aos cultivos das leveduras sem contaminantes. Semelhantemente, o peptídeo X aumentou a taxa de crescimento em até 55,2% e o rendimento de etanol em até 15,33% nos cocultivos. Portanto, esses antimicrobianos revelam-se promissores para o controle das contaminações industriais por *Lactobacillus*, sendo o presente trabalho o passo inicial para o estabelecimento dessa tecnologia em escala industrial. Esse trabalho me foi de muita valia e aprendizado, além de todo o conhecimento e maturidade profissional que obtive durante esses dois anos de curso, há uma patente em redação e sob análise do CDT, sendo os resultados aqui apresentados posteriormente depositados em patente.

7 BIBLIOGRAFIA

ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 665-671, 2013.

AGEITOS, J. M. *et al.* Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 117-138, 2016.

AGÊNCIA SENADO. Potencial dos biocombustíveis e RenovaBio são tema de audiência no Senado. 2017. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/politica/potencial-biocombustiveis-renovabio-tema-audiencia-senado-011117/>>. Acesso em: 05 jan 2018.

AGERBERTH, B. *et al.* Amino acid sequence of PR-39: Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 3, p. 849-854, 1991.

ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035-2046, 2016.

ARGUESO, J. L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2258-70, 2009.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2007.

BASSO, L. C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.

BASSO, T. O. *et al.* Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694-703. 2011.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n.4, p. 387-394, 2011.

BOMAN, H.G. *et al.* Mechanisms of action on *Escherichia coli* of Cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2978-2984, 1993.

BOSMA, E. F. *et al.* *Lactobacilli* and *pediococci* as versatile cell factories – Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 419-442, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role?. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 231-244, 2017.

BROADBENT, J. R. *et al.* Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. **BioMed Central Genomics**, v. 13, n. 533, p 1-18, 2012.

CARVALHO-NETTO, O. V. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1-13, 2015.

COT, M. *et al.* Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentations. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 22-32, 2007.

COYLE, M. B. Manual of antimicrobial susceptibility testing. Washington: American Society for Microbiology, 2005.

DA SILVA FILHO, E. A. *et al.* Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *S. cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005.

DE LUCENA, R. M. *et al.* Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1147-1160, 2015.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Comparative genome analysis of *Lactobacillus casei* strains isolated from Actimel and Yakult products reveals marked similarities and points to a common origin. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 576-587, 2013.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. **PLOS Genetics**, v. 9, n. 8, p. 15, 2013.

DOUILLARD, F. P. *et al.* Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marked as probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1923-1933, 2013.

ENTIAN, K. D.; KÖTTER, P. Yeast genetic strain and plasmid collections. **Methods in Microbiology**, v. 36, p. 629–666, 2007.

FAN, F.; WU, Y.; LIU, J. Expression and purification of two different antimicrobial peptides, PR-39 and Protegrin-1 in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 73, n. 2, p. 147-151, 2010.

FUQUAY, J. W. *et al.* Encyclopedia of Dairy Science. In: MISSISSIPPI. Elsevier, 2011.

GANZ, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. **Integrative e Comparative Biology**, v. 43, n. 2, p. 300-304, 2003.

GREENFACTS. Box 3: Biofuel policies in Brazil. 2017. Disponível em: <<https://www.greenfacts.org/en/biofuels/figtableboxes/biofuel-brazil.htm>>. Acesso em: 04 jan 2018.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. **The Prokaryotes Volume 4**. Heidelberg: Springer Nature, 2006. p. 320–403.

HILL, J. *et al.* DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 20, p. 5791, 1991.

HILL, J. *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **PNAS**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HIRASAWA, T. *et al.* Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 131, n. 1, p. 34-44, 2007.

IANNIELLO, R. G. *et al.* Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p 1-19, 2016.

INOWE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, p. 23-28, 1990.

INVITROGEN. *Pichia* expression Kit: For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Carlsbad, p. 97, 2014.

JUNIOR, M. M. *et al.* Evaluation of Brazilian ethanol production yeasts for maltose fermentation in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 1, p. 82-88, 2012.

KLYACHKO, E. V. *et al.* Distiller yeasts producing antibacterial peptides. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 585-590. 2015.

KRASZEWSKA, J. *et al.* Comparative analysis of the antimicrobial activities of plant defensin-like 2 and ultrashort peptides against food-spoiling bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 14, p. 4288-4298, 2016.

LEE, J. *et al.* Antibacterial peptides from pig intestine: Isolation of a mammalian cecropin. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 86, n. 23, p. 9159-62, 1989.

LEE, Y. *et al.* Modelling of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from a glucose and maltose mixture. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 8, p. 791-791, 1995.

LEITE, F. C. B. Construção de vetores para modificações genéticas de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese apresentada na Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

LIU, W. *et al.* Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice**. Dordrecht: Springer Science+Business, 2014. p. 103-203.

LIU, Y. *et al.* Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 856-873, 2015.

LOPES, M. L. *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LUCENA, B. T. *et al.* Chromosome instability in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* batch cultivated under laboratory conditions. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 4, p. 1072-84. 2007.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1858, n. 5, p. 936-46. 2016.

MEYERS, J. A.; CURTIS, B. S.; CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. **BMC Biophysics**, v. 6, n. 1, p. 4, 2013.

MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA. RenovaBio: Nota explicativa. Brasília, p. 138, 2017.

MOHD AZHAR, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

MONEDERO, V. *et al.* Maltose transport in *Lactobacillus casei* and its regulation by inducer exclusion. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 94-102, 2008.

MUMBERG, D.; MULLER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, n. 1, p. 119–122, 1995.

MURPHREE, C. A.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. **Current Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 277-285, 2014.

MUTHAIYAN, A. *et al.* Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351-370. 2011.

NGUYEN, L. World ethanol production growth may accelerate in 2018. 2017. Disponível em: <<https://knect365.com/cleantechandrenewables/article/bb855c8d-460e-4185-a2a1-14ce8800f56b/world-ethanol-production-growth-may-accelerate-in-2018>>. Acesso em: 04 jan 2018.

NOVAK, S. *et al.* Maltose transport and metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 3, p. 213–218. 2004.

PENG, J. *et al.* The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 55, n. 2, p. 128-134. 2012.

PONOMAROVA, O. *et al.* Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, p. 345-357, 2017.

PRONK, J. T. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095-100. 2002.

REIS, V. R. *et al.* Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 268-274, 2017.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Fuel ethanol trade measurements and conversions. 2015. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2015/12/Fuel-Ethanol-Trade-Measurements-and-Conversions_RFA.pdf>. Acesso em: 04 jan 2018.

SALVETTI, E. *et al.* The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, n. 4, p. 217-226, 2012.

SCHULLER, D.; CASAL, M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 292-304, 2005.

SHIMADZU. SPD-20A / 20AV / M20A. Columbia, p. 4, 2018.

SMOKVINA, T. *et al.* *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-18, 2013.

SOARES-COSTA, A. *et al.* Industrial PE- 2 strain of *Saccharomyces cerevisiae*: from alcoholic fermentation to the production of recombinant proteins. **New Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 90-97, 2013.

SU, Y.; ZHANG, P.; SU, Y. An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 991-1003, 2015.

TORRES, D. *et al.* The Brazilian ethanol industry: an overview of its production, technology, location, land use, regulations, and future prospects. In: ICABR CONFERENCE "SUSTAINABILITY AND THE BIOECONOMY", n. 15, 2011, Roma, 2011.

VAN LEEUWEN, C. C. M. *et al.* Maltose/proton co-transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Biochemical Journal**, v. 284, n. 2, p. 441-445. 1992.

VELDHUIZEN, E. J. A. *et al.* Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4. 2014.

VUNNAM, S. *et al.* Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. **Journal of Peptide Research**, v. 49, n. 1, p. 59-66, 1997.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. **Beverages**, v. 2, n. 4, p. 1-30, 2016.

WALTER, A. *et al.* A sustainability analysis of the brazilian ethanol. Campinas: UNICAMP, 2008.

WE Consultoria. HIGH MALTOSE. 2014. Disponível em: <<http://loja.weconsultoria.com.br/high-maltose-p126/>>. Acesso em: 08 fev 2018.

WEUSTHUIS, R. A. *et al.* Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 9, p. 3102-09, 1993.

WOO, P. C. Y. *et al.* Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

WOODCOCK, D. M. *et al.* Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 9, p. 3469-78, 1989.

YAZAWA, H.; IWAHASHI, H.; UEMURA, H. Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 24, p. 551-560, 2007.

ZANETTI, M. *et al.* Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 7855-58, 1994.