



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

GABRIELA CHRISTINA KUHL

**DETERMINANTES GENÉTICOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO EM *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230**

Florianópolis
2021

Gabriela Christina Kuhl

DETERMINANTES GENÉTICOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO
CONJUGADO EM *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Alimentos da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do
Título de doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Dr. Juliano De Dea Lindner

Coorientador: Dr. Ricardo Ruiz Mazzon

Florianópolis
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kuhl, Gabriela Christina
DETERMINANTES GENÉTICOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO EM *Lactobacillus delbrueckii* subsp.
bulgaricus LBP UFSC 2230 / Gabriela Christina Kuhl ;
orientador, Juliano De Dea Lindner, coorientador, Ricardo
Ruiz Mazzon, 2021.
123 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Bactéria Ácido Láctica.
3. Ácido Linoleico Conjugado. 4. Biohidrogenação. 5. Oleato
Hidratase. I. De Dea Lindner, Juliano . II. Ruiz Mazzon,
Ricardo . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV.
Título.

Determinantes genéticos para a produção de ácido linoleico conjugado em
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Brenda Lee Simas Porto, Dr.(a)
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof.(a) Jane Mara Block, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) José Gregorio Cabrera Gomez, Dr.(a)
Universidade de São Paulo

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Ciência dos Alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Rubens Adalberto Kuhl pelo apoio, incentivo e amor incondicional. À minha mãe Dalva de Oliveira Kuhl pelo suporte e conforto. Aos meus amores Carolina Fernanda Kuhl e Jéssica Daniela Kuhl pela força e companheirismo.

Ao meu orientador Professor Juliano De Dea Lindner por se fazer presente nesta jornada de aprendizado, pela paciência, companheirismo e por acreditar em mim.

Ao meu co-orientador Professor Ricardo Ruiz Mazzon, por partilhar seu conhecimento e pelas inúmeras contribuições na realização deste trabalho. Agradeço pela orientação e amizade desenvolvida durante a realização desse trabalho.

À Professora Catherine Stanton (Principal Investigator, APC Microbiome Ireland) por seu incentivo e ao Professor Paul Ross (Director of APC Microbiome Ireland) por seus comentários perspicazes e, a ambos por permitirem a oportunidade de realização de estágio em seus grupos, o qual se fez fundamental para a concretização desta pesquisa.

À Professora Brenda Lee Simas Porto (Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais), pelo envolvimento e interesse à pesquisa e pela parceria essencial para os experimentos de cromatografia realizados neste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias (GeMBac) e Laboratório de Bioprocessos (LBP) da UFSC, pelo apoio e amizade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Imunobiologia (LiDI) da UFSC, em especial Dr. Daniel de Oliveira Patricio, pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos de taxa de crescimento e tolerância ao ácido linoleico e ensaios de Western Blotting; Dr. Lucas Mascarin pelo auxílio na purificação da proteína oleato hidratase com o equipamento ÄKTA™ e Dra. Greicy Malaquias, pela disposição e auxílio dedicados durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas dos laboratórios APC-2, APC-1, Vision-1 e FHI do TEAGASC, em especial MSc. Elaine Lawton, Dr. Ronan Strain e Dr. Conal Strain, pela colaboração e dedicação à pesquisa; Dra. Taís Kuniyoshi, Dr. Miguel Ullivarri e Dr. Harsh Mathur pela colaboração no desenvolvimento dos clones e Sra. Grace Aherne e Sr. Kevin Linehan pelo auxílio com as análises cromatográficas.

Às colegas Fabiana Andrea Hoffmann Sarda, Sarah Schulz e Samantha Pinho pela amizade e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC pelos ensinamentos e amparo, sobretudo àqueles que contribuíram para a concretização desse trabalho, Professor Daniel Mansur e Professor André Báfica.

Ao Professor Rubens Tadeu Delgado Duarte (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UFSC) pela colaboração com as análises de sequenciamento genômico.

Ao Professor Guilherme Razzera (Departamento de Bioquímica, UFSC) pelo auxílio com os ensaios de modelagem da proteína.

Ao Dr. Brian Healy (APC Microbiome Ireland), pelos comentários pertinentes e direcionamento à pesquisa.

Ao Sr. Heitor Daguer, chefe da Seção Laboratorial Avançada São José (SLAV/SC) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela colaboração e parceria ao disponibilizar a estrutura e equipamentos necessários para as análises lipídicas.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilidade e auxílio na utilização dos equipamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

"Irish Proverb: Your feet will bring you to where your heart is."

RESUMO

O ácido linoleico conjugado (CLA) é um produto intermediário da via de biohidrogenação do ácido linoleico (LA) em bactérias. Diversas espécies bacterianas capazes de converter eficientemente o LA em CLA foram amplamente relatadas na literatura, dentre elas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2330. Pesquisas recentes propuseram a hipótese de um sistema enzimático multi-componente constituído por três enzimas envolvidas no processo de biohidrogenação do LA em *Lactobacillus*. Neste trabalho, foi descrita a identificação taxonômica da bactéria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2330 tanto por técnicas bioquímica como moleculares. O genoma foi sequenciado, obtendo uma versão rascunho com 135 contigs. Os dados genômicos foram utilizados para uma melhor classificação taxonômica da bactéria com base em dados multi-locus, bem como para uma análise do perfil de resistência a antibióticos. O genoma foi ainda anotado com relação à genes relacionados a diferentes subsistemas celulares. A busca no genoma por genes relacionados à síntese de CLA, identificou apenas um (putativamente codificando uma oleato hidratase), dentre os descritos na literatura. O gene *oleH* de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi identificado, clonado em vetores de expressão e introduzidos nas linhagens receptoras *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, sob controle de promotor constitutivo e *Escherichia coli* BL21(DE3), sob controle de um promotor induzível. A construção inserida em *E. coli* foi utilizada para ensaios *in vivo* de expressão heteróloga, bem como para a purificação da proteína recombinante utilizada em ensaios *in vitro* para caracterização da atividade enzimática. O efeito biológico da enzima OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 na hidratação de LA e desidratação do ácido ricinoleico e seu possível papel na produção de CLA foram investigados. Verificou-se que a enzima é uma hidratase / desidratase, levando à transformação reversível entre LA e ácido ricinoleico demonstrando atividade na presença de FAD. Além disso, os resultados mostraram que a proteína OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 desempenha um papel na tolerância ao estresse em *E. coli*. Em conclusão, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 catalisa a etapa inicial do metabolismo de saturação do ácido linoleico, embora não tenha convertido os substratos diretamente em CLA.

PALAVRAS-CHAVE: Oleato Hidratase; Biohidrogenação; Bactéria Ácido Láctica.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is an intermediate product of the biohydrogenation pathway of linoleic acid (LA) in bacteria. Several bacterial species capable of efficiently converting linoleic acid to CLA have been widely reported in the literature, among them Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LBP UFSC 2230. Recent researches have proposed a hypothesis of a multi-component enzymatic system consisting of three enzymes involving the biohydrogenation process of LA in Lactobacillus. In the present work, the taxonomic identification of the bacterium Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LBP UFSC 2230 by both biochemical and molecular techniques was described. The genome was sequenced, obtaining a draft version with 135 contigs. The genomic data were used for a better taxonomic classification of the bacterium based on multi-locus data, as well as for an analysis of the antibiotic resistance profile. The genome was also noted with respect to genes related to different cellular subsystems. The search in the genome for genes related to CLA synthesis, identified only one (putatively encoding an oleate hydratase), among those described in the literature. The L. bulgaricus LBP UFSC 2230 oleH gene was identified, cloned into expression vectors and introduced into the receptor strains Lactobacillus paracasei NFBC 338, under the control of a constitutive promoter and Escherichia coli BL21 (DE3), under the control of an inducible promoter. The construct inserted in E. coli was used for in vivo assays of heterologous expression, as well as for the purification of the recombinant protein used in in vitro assays to characterize the enzymatic activity. The biological effect of the OleH enzyme of L. bulgaricus LBP UFSC 2230 on the hydration of LA and dehydration of ricinoleic acid and its possible role in the production of CLA were investigated. It was found that the enzyme is a hydratase / dehydratase, leading to a reversible transformation between LA and ricinoleic acid showing activity in the presence of FAD. In addition, the results showed that L. bulgaricus LBP UFSC 2230 OleH protein plays a role in stress tolerance in E. coli. In conclusion, the OleH of L. bulgaricus LBP UFSC 2230 catalyzes the initial stage of saturation metabolism of linoleic acid, although it has not converted the substrates directly into CLA.

KEY-WORDS: *Oleate Hydratase; Biohydrogenation; Lactic Acid Bacteria.*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Visão geral das vias de fermentação de carboidratos pelos *Lactobacillus*.....28
- Figura 2. Metabolismo de galactose em *Lactobacillus*.....30
- Figura 1. Estrutura química do ácido linoleico (A) e dos isômeros *c*9, *t*11-C18:2 (B); *t*10, *c*12-C18:2 (C); *t*9, *t*11-C18:2 (D).....36
- Figura 2. Biohidrogenação do ácido linoleico.....40
- Figura 3. Via metabólica de ácidos graxos poli-insaturados.....41
- Figura 4. Os ácidos graxos insaturados C18 mais comumente catalisados pela oleato hidratase.....45
- Figura 5. Estrutura do monômero e dímero de LAH.....46

CAPÍTULO II

- Figura 1. Estatística de subsistema gerada por anotação automática RAST.....63
- Figura 2. Comparação da região do genoma entre as espécies de BAL.....68
- Figura 3. Relação evolutiva entre genomas de *L. bulgaricus* pelo método MLE.....70

CAPÍTULO III

- Figura 1. Efeito da concentração de ácido linoleico na taxa de crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.....91

Figura 2. Susceptibilidade antibacteriana ao antibiótico eritromicina pela cepa <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	92
Figura 3. Análise SDS-PAGE da proteína OleH de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230 purificada na coluna HisTrapTM FF.....	94
Figura 4. Modelagem de homologia 3D e <i>docking</i> molecular de OleH de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	98
Figura 5. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em caldo LB com suplementação de LA.....	100
Figura 6. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) superexpressando OleH em caldo LB com suplementação de 0,5 mg/mL de LA.....	101
Figura 7. Curva de crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) superexpressando OleH em caldo LB com suplementação de 1,0 mg/mL de LA.....	102
Figura 8. Crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE) superexpressando OleH em meio LB na presença de diferentes concentrações de ácido linoleico.....	103
Figura 9. Curva de crescimento de <i>L. paracasei</i> NFBC 338 superexpressando OleH em caldo MRS com suplementação de LA.....	104
Figura 10. Cursos de tempo da formação de RA a partir de LA durante a reação enzimática de OleH de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	106
Figura 11. Reação reversível ente LA e RA proposta pela OleH de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC.....	106
Figura 12. Via proposta de produção de CLA a partir do ácido ricinoleico (RA).....	108
Figura 13. Via proposta de produção de CLA a partir de 10-HOE.....	109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico conjugado.....35

Tabela 1. Atividades biológicas dos isômeros de CLA.....37

Tabela 2. Produção de CLA durante a fermentação láctica por diferentes BAL.....42

CAPÍTULO II

Tabela	1.	Cepas	bacterianas	utilizadas	neste
trabalho.....					53
Tabela	2.	Oligonucleotídeos		utilizados	neste
trabalho.....					54
Tabela	3.	Plasmídeos		utilizados	neste
trabalho.....					54
Tabela 4. API 50 CH fermentation profile of <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			LBP		UFSC
2230.....					60
Tabela 5. Sequências genômicas completas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> disponíveis no Genbank.....					64
Tabela 6. Perfil de resistência antimicrobiana obtido por meio do método de difusão em disco.....					70

CAPÍTULO III

Tabela	3.	Cepas	bacterianas	utilizadas	neste
trabalho.....					78
Tabela	2.	Oligonucleotídeos		utilizados	neste
trabalho.....					79
Tabela	3.	Plasmídeos		utilizados	neste
trabalho.....					80
Tabela 4. Composição das soluções eritromicina/solvente para rastreabilidade da concentração inibitória mínima do antibiótico sobre o crescimento de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....					81
Tabela 5. Comparação entre os valores de absorvância correspondente ao crescimento bacteriano da linhagem LBP UFSC 2230.....					93
Tabela 6. Estimativa de ΔG e interações de resíduos da análise de <i>docking</i> molecular no modelo de homologia 3D de OleH.....					96
Tabela 4. Produtos de reação enzimática de OleH de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....					105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AR – Resistência a Antibióticos (do inglês, *Antibiotic Resistance*)
- ATP – Adenosina Trifosfato (do inglês, *Adenosine Triphosphate*)
- BAL – Bactérias Ácido Láticas (LAB – do inglês, *Lactic Acid Bacteria*)
- BLAST – Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*)
- BLASTn – BLAST Nucleotídeo
- CG – Cromatografia a Gás
- CLA – Ácido Linoleico Conjugado (do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*)
- CLA-DC – Isomerase
- CLA-DH – Desidrogenase
- CLA-ER – Enona Redutase
- CLA-HY – Hidratase/Desidratase
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- DFM – Aditivos *microbianos* para inclusão *direta* (do inglês, *Direct-Fed Microbials*)
- DHAP – Di-hidroxiacetona Fosfato (do inglês, *Dihydroxyacetone Phosphate*)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)
- D.O. – Densidade Óptica
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)
- EFFCA – Associação Europeia de Alimentos e Rações (do inglês, *European Food and Feed Cultures Association*)
- EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (do inglês, *European Food Safety Authority*)
- EM – Embden-Meyerhof
- EMP – Embden-Meyerhoff-Parnas
- EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural
- EUA – Estados Unidos da América
- FAD – Dinucleótido De Flavina Adenina (do inglês, *Flavin Adenine Dinucleotide*)
- FA-HY1 – Hidratase Ácido Graxo 1 (do inglês, *Fatty acid hydratase 1*)
- FA-HY2 – Hidratase Ácido Graxo 2 (do inglês, *Fatty acid hydratase 2*)
- FAME – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (do inglês, *Fatty Acid Methyl Ester*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GAP – Gliceraldeído-3-Fosfato (do inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate*)

GLB – Tampão de Carregamento (do inglês - *Gel Loading Buffer*)

GRAS – Geralmente reconhecido como seguro (do inglês, *Generally Recognized As Safe*)

10-HOE – Ácido 10-hidroxioléico

12-HOE – Ácido 12-hidroxi-octadecenóico

ICNB – Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (do inglês, *International Code of Nomenclature of Bacteria*)

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LA – Ácido Linoleico (LA – do inglês, *Linoleic Acid*)

LAH – Oleato Hidratase de *Lactobacillus acidophilus*

LAI – Linoleato Isomerase

LB – Lysogeny Broth

LBP – Laboratório de Bioprocessos

MCL – Máxima Verossimilhança Composta (do inglês, *Maximum Composite Likelihood*)

MCRA - Antígeno Reativo Cruzado De Miosina (do inglês, *myosin-cross-reactive antigen*)

MLE – Estimativa Máxima Verossimilhança (do inglês, *Maximum Likelihood Estimation*)

MLST – Tipagem de Sequência Multi-Locus (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*)

MRS – Man Rogosa Sharpe

NADH – Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*)

NCBI – Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*)

ORF – Fases de Leitura Aberta (do inglês, *Open Reading Frame*)

OGM – Organismos Geneticamente Modificados

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PMF – Impressão Digital do Peptídeo (do inglês *Peptide Mass Fingerprinting*)

PTS – Sistema de Fosfotransferase Fosfoenol-piruvato (do inglês, *Phosphotransferase System*)

QPS – Status qualificado de presunção de segurança (do inglês, *Qualified Presumption Of Safety*)

RA – Ácido ricinoleico (do inglês, *Ricinoleic Acid*)

RAST – Anotações rápidas usando tecnologia de subsistemas (do inglês, *Rapid Annotations using Subsystems Technology*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

STs – Tipos de Sequência (do inglês, *Sequence Types*)

TBE – Tris Borato EDTA

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNIPR – Universidade de Parma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	Objetivo Geral.....	22
1.1.2	Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....		24
1	INTRODUÇÃO.....	25
2	GÊNERO <i>Lactobacillus</i>.....	26
2.1	TAXONOMIA.....	26
2.1.1	Fermentação e metabolismo.....	27
2.2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	31
2.3	<i>Lactobacillus</i> COMO FÁBRICAS CELULARES.....	33
3	ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	35
3.1	ISÔMEROS DE CLA E BENEFÍCIOS À SAÚDE.....	36
3.2	SÍNTESE DE ISÔMEROS DE CLA POR BIOHIDROGENAÇÃO.....	39
3.3	CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSSÍNTESE DE CLA.....	44
3.3.1	Oleato hidratase.....	44
3.3.2	Linoleato isomerase.....	47
4	CONCLUSÃO.....	48
CAPÍTULO II - SEQUÊNCIA-RASCUNHO DO GENOMA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230, UMA FERRAMENTA PARA IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE CLA.....		50
1	INTRODUÇÃO.....	51
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	53

2.1	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	53
2.2	OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.....	54
2.3	PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	54
2.4	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	54
2.4.1	Análise do perfil de fermentação de carboidratos.....	54
2.5	CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA.....	55
2.5.1	Extração do DNA genômico.....	55
2.5.2	Amplificação do gene 16S rRNA.....	56
2.5.3	Preparo de células eletrocompetentes para transformação.....	57
2.5.4	Transformação de <i>E. coli</i> com os produtos de ligação.....	57
2.5.5	Extração de DNA plasmidial.....	58
2.5.6	Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	58
2.6	Sequenciamento genômico.....	58
2.6.1	Árvore filogenética.....	59
2.7	Susceptibilidade antimicrobiana.....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	60
3.2	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO.....	62
3.2.1	Via da biohidrogenação do ácido linoleico.....	67
3.2.2	Árvore filogenética.....	69
3.3	Susceptibilidade antimicrobiana.....	70
4	CONCLUSÃO.....	74
CAPÍTULO III – caracterização da ENZIMA OLEATO HIDRATASE catalisando a conversão reversível entre ácido linoleico e ácido ricinoleico em <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....		
1	INTRODUÇÃO.....	77
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	78

2.1	CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	78
2.2	OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS.....	79
2.3	PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	80
2.4	ENSAIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO E TOLERÂNCIA AO LA.....	80
2.5	TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	81
2.6	TESTE PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PUTATIVA OLEATO HIDRATASE.....	82
2.6.1	Desenho dos iniciadores.....	82
2.6.2	Construção dos plasmídeos.....	82
2.7	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PUTATIVA DE <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230 Oleh RECOMBINANTE DE <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	85
2.7.1	Immunoblotting.....	86
2.7.2	Sequenciamento da proteína.....	86
2.8	Modelagem de homologia e <i>docking</i> molecular da proteína Oleato hidratase de <i>L.</i> <i>bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	87
2.9	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO LINOLEICO POR <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e <i>L. paracasei</i> NFBC 338 SUPEREXPRESSANDO Oleh.....	88
2.10	EFEITOS DA TEMPERATURA E DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA.....	88
2.11	ANÁLISES ENZIMÁTICAS.....	89
2.12	BIOTRANSFORMAÇÃO DE LA E RA.....	89
2.13	ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	89
3	RESULTADOS.....	90
3.1	ENSAIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO E TOLERÂNCIA AO LA	90
3.2	TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	92
3.3	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA OLEATO HIDRATASE PUTATIVA DE <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	93
3.4	SEQUENCIAMENTO DA PROTEÍNA.....	94

3.5	Modelagem de homologia e <i>docking</i> molecular da proteína Oleato hidratase de <i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230.....	95
3.6	TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO LINOLEICO PELAS CEPAS RECOMBINANTES.....	99
3.6.1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) superexpressando OleH.....	99
3.6.2	<i>L. paracasei</i> NFBC 338 superexpressando OleH.....	103
3.7	ENSAIO DE ATIVIDADE DA OLEATO HIDRATASE.....	104
4	DISCUSSÃO.....	107
5	CONCLUSÃO.....	110
	PERSPECTIVA FUTURA.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

O ácido linoleico conjugado (CLA - do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*) vem despertando o interesse da indústria farmacêutica e alimentícia devido à suas propriedades biológicas e fisiológicas (PHILIPPAERTS et al., 2011), incluindo atividades anticarcinogênica, antidiabética, antiobesidade, entre outras (KUHL; DE DEA LINDNER, 2016). O termo CLA corresponde a um grupo heterogêneo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico (*c*-9, 12-C18: 2, LA - do inglês, *Linoleic Acid*) encontrados principalmente na fração gordurosa de produtos lácteos de animais ruminantes (RENES et al., 2017).

Dentre os possíveis isômeros de CLA, os efeitos benéficos são atribuídos exclusivamente aos isômeros *c*9, *t*11-C18:2; *t*10, *c*12-C18:2 e *t*9, *t*11-C18:2. Portanto, a produção de CLA como aditivo em alimentos funcionais, bem como o seu consumo para fins de promoção da saúde requer um processo seletivo dos isômeros (YANG et al., 2017).

A maioria das misturas complexas de isômeros de CLA comercializados é produzida por isomerização alcalina do LA (OGAWA et al., 2001), resultando em subprodutos (SEHAT et al., 1998) indesejados (PHILIPPAERTS et al., 2011). Uma abordagem alternativa é a produção de CLA microbiano (YANG et al., 2017). Vários gêneros de bactérias ácido lácticas (BAL), incluindo algumas espécies de *Lactobacillus*, foram apontadas como potenciais bioprodutoras dos isômeros *c*9, *t*11-C18:2 e *t*10, *c*12-C18:2 (KUHL et al., 2017; KUHL; DE DEA LINDNER, 2016; TABASHSUM et al., 2018).

As BAL são utilizadas em todo o mundo na produção de alimentos devido ao seu *status* GRAS (do inglês - *Generally Recognized as safe*) (LEVIT et al., 2017). A fermentação por BAL além de agregar nutrientes (vitaminas e aminoácidos essenciais) e concentrá-los nos alimentos de uma forma natural, também é capaz de preservar os produtos fermentados, e melhorar a qualidade sensorial de sabor, aroma, textura, consistência e aparência dos alimentos (WATERS et al., 2015).

O papel destes micro-organismos na fermentação vai além das propriedades tecnológicas. Existem dois mecanismos capazes de atribuir benefícios à saúde por meio das BAL. O primeiro deles é o consumo das células microbianas vivas (conhecido como efeito probiótico), o segundo é através dos efeitos indiretos durante a fermentação, em

que esses micro-organismos atuam como fábricas celulares para a síntese de metabólitos secundários com propriedades promotoras de saúde (HAYES et al., 2007).

Os *Lactobacillus* spp. têm chamado atenção para o uso como fábricas celulares devido sua diversidade metabólica e potencial biossintético (WATERS et al., 2015). Em estudo anterior, nosso grupo avaliou 35 BAL quanto à sua capacidade de produzir CLA a partir de LA e selecionou a cepa *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 por sua habilidade em sintetizar o isômero *c9, t11*-C18:2 (KUHLE et al., 2017). Uma vez que a bactéria láctica *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 é capaz de sintetizar CLA, esta se torna um organismo de interesse a ser estudado de modo a avaliar seu potencial emprego como fábrica celular bacteriana para a bioprodução de CLA.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos desta tese.

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de genes relacionados a rotas conhecidas de produção de CLA em *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 fenotipicamente;
- Sequenciar o genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230;
- Determinar o intervalo de concentração de LA permissivo ao crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230;
- Clonar o gene que codifica a putativa oleato hidratase de *L. bulgaricus* e expressar a enzima em *Escherichia coli* BL21(DE3);
- Extrair, purificar e sequenciar a enzima para análises de atividade enzimática;
- Realizar a modelagem molecular por homologia da oleato hidratase de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230;

- Avaliar as possíveis interações com substratos lipídicos e FAD, utilizando estudos de *docking*;
- Construir uma fusão de *oleH* com o promotor constitutivo de *hblA*, clonar em vetor replicativo e transformar nas linhagens selvagens de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 e *Lactobacillus paracasei* NFBC 338;
- Determinar se a superexpressão de *oleH* pelas cepas recombinantes *E. coli* BL21 (DE3) e *L. paracasei* NFBC 338, aumenta sua tolerância ao LA;
- Investigar potencial de síntese de CLA por meio de testes de biocatálise utilizando ácido linoleico e ácido ricinoleico como possíveis substratos.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MÉTODO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO
POR *Lactobacillus*: UM-ESTADO-DA-ARTE

RESUMO

Os *Lactobacillus* são geralmente aplicados na fabricação de lácteos fermentados, *sourdough*, carne e alimentos vegetais ou como probióticos. Em condições ideais de processamento, as cepas de *Lactobacillus* contribuem para a funcionalidade dos alimentos por meio de seu portfólio de enzimas e da liberação de metabólitos. Devido à sua importância econômica, o metabolismo, a genética e a filogenia dos *Lactobacillus* têm sido amplamente estudados. A caracterização genômica de bactérias ácido lácticas disparou e atualmente mais de 100 genomas completos ou quase completos estão disponíveis, muitos dos quais servem como paradigmas científicos. Esta revisão aborda soluções de sistemas com uma visão geral do estado da arte dos paradigmas atuais que se relacionam ao uso de *Lactobacillus* para a produção de ácido linoleico conjugado (CLA), desde os métodos clássicos de melhoria de cepas até o uso da tecnologia de DNA recombinante para melhorar o desempenho microbiano. Como resultado, o foco para melhorar a produção de CLA deve se basear em estudos sobre as vias bioquímicas do ácido linoleico para melhor compreensão e caracterização do mecanismo metabólico por trás desse processo, desvendando os produtos gênicos que podem estar envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus*; Ácido Linoleico Conjugado; Fábrica Celular

ABSTRACT

Lactobacillus are largely used for the manufacture of fermented dairy, sourdough, meat, and vegetable foods or used as probiotics. Under ideal processing conditions, *Lactobacillus* strains contribute to food functionality through their enzyme portfolio and the release of metabolites. Mandatory to their economic importance, the metabolism, genetics, and phylogeny of *Lactobacillus* have been extensively studied. Genomic characterization of lactic acid bacteria has rocketed and today more than 100 complete or almost complete genomes are available, many of which serve as scientific paradigms.

*This review addresses system solutions with a a-state-of-the-art overview of current paradigms that relate to the use of *Lactobacillus* for the production of conjugated linoleic acid (CLA), from classic strain improvement methods to the use of DNA technology recombinant to improve microbial performance. As a result, the focus for the production of CLA must be based on studies on the biochemical pathways of linoleic acid (LA) to better understand and characterize the metabolic mechanism behind this process, unraveling the gene products that may be involved.*

KEY-WORDS: *Lactobacillus; Conjugated Linoleic Acid; Cellular Factory*

1 INTRODUÇÃO

O ácido linoleico conjugado (CLA - do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*) tem chamado a atenção nas últimas décadas devido aos seus benefícios à saúde. Como por exemplo, modulação da gordura corporal, efeitos anticarcinogenico, antidiabético, antihipertensivo, entre outros (KOBA; YANAGITA, 2014). O CLA é um produto intermediário da via de biohidrogenação do ácido linoleico (*c*-9, 12-C18: 2, LA - do inglês, *Linoleic Acid*) em bactérias (LEE; JENKINS, 2011). Acredita-se que a biohidrogenação dos ácidos graxos poliinsaturados seja um mecanismo de defesa da bactéria frente a toxicidade dessas moléculas à membrana celular (VOLKOV et al., 2010). Diversas espécies bacterianas capazes de converter o LA em CLA têm sido amplamente relatadas na literatura, entre elas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (KUHL et al., 2017; KUHL; DE DEA LINDNER, 2016).

Por meio de sua atividade metabólica, os *Lactobacillus* podem atuar como "fábrica celular" para a geração de metabólitos secundários (HAYES et al., 2007). Neste sentido, a implementação de *Lactobacillus* para a produção de CLA requer compreensão detalhada dos aspectos metabólicos relacionados à espécie, bem como da maquinaria enzimática envolvida no processo. Além disso, as questões regulatórias relativas ao emprego destas bactérias para o consumo humano devem ser abordadas.

Nos últimos anos, têm sido proposta a hipótese de um sistema enzimático multicomponente constituído por três enzimas que envolvem o processo de biohidrogenação do LA, se tratando de uma hidratase, uma

desidrogenase e uma isomerase (KISHINO et al., 2011). Entretanto, os detalhes do metabolismo, as características das enzimas envolvidas e sua organização gênica não foram claramente delineados. Mais estudos são necessários para elucidar a conversão de LA em CLA por *Lactobacillus*.

Esta revisão tem como objetivo resumir as contribuições mais importantes para a síntese de isômeros de CLA por *Lactobacillus*, as possíveis reações enzimáticas por trás desses processos metabólicos e as informações disponíveis sobre as proteínas envolvidas na produção de CLA por esse grupo de bactéria.

2 GÊNERO *Lactobacillus*

O valor econômico dos *Lactobacillus* é substancial. Segundo Campedelli et al. (2019) os mercados de probióticos para uso humano e de *Direct-Fed Microbials* (DFM), que engloba micro-organismos vivos que ocorrem naturalmente, incluindo bactérias, fungos e leveduras, nos quais os *Lactobacillus* desempenham um papel fundamental, devem atingir um valor de US\$ 64 bilhões e US\$ 1,4 bilhão, respectivamente, até 2022.

Do ponto de vista regulatório, 84 espécies de *Lactobacillus* são certificadas para uso seguro, tecnológico e benéfico pela Associação Européia de Alimentos e Rações (EFFCA – do inglês, *European Food and Feed Cultures Association*), 36 espécies têm status qualificado de presunção de segurança (QPS – do inglês, *Qualified Presumption Of Safety*) de acordo com a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA – do inglês *European Food Safety Authority*), e 12 espécies são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – do inglês, *Generally Recognized As Safe*) de acordo com a (FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*) (CAMPEDELLI et al., 2019).

2.1 TAXONOMIA

O gênero *Lactobacillus* foi originalmente descrito por Beijerinck em 1901 (BERNARDEAU et al., 2008). Pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e família Lactobacillaceae (DE ANGELIS et al., 2016). *Lactobacillus* é o maior e mais diversificado gênero de BAL, possui mais de 250 espécies (261 espécies

em março de 2020) capazes de adaptarem-se a variados nichos ecológicos (DUAR et al., 2017; STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017; ZHENG et al., 2020). Compartilham as características comuns de BAL, incluindo baixo conteúdo de GC, tolerância a ácidos e, produção de ácido láctico como um dos principais produtos do metabolismo de carboidratos (SUN et al., 2015; TRIGUEROS; BARBER; SENDRA, 2015). As diversas espécies são extremamente diversas nos níveis fenotípicos, ecológicos e genotípicos.

Em 1919 o grupo dos *Lactobacillus* foi subdividido por Orla-Jensen de acordo com suas propriedades metabólicas e fenotípicas. São bactérias Gram-positivas, catalase-negativa, não esporulantes e, a maioria não móveis (REZAUL et al., 2017). Assumem a forma de haste e as células são muitas vezes organizadas em estreptobacilos (GIRAFFA, 2012). A temperatura de crescimento pode variar de 2 a 53°C, embora a temperatura ótima seja de 30 a 40°C. A faixa de pH para o crescimento está entre 3 e 8 (TAALE et al., 2016). Em geral toleram oxigênio, mas crescem idealmente em condições anaeróbias por isso são classificados como anaeróbios facultativos (KÖNIG; FRÖHLICH, 2017). Recentemente, Zheng et al. (2020) avaliaram a taxonomia de Lactobacillaceae e Leuconostocaceae com base nas sequências do genoma completo usando uma abordagem polifásica. Proporam uma reclassificação do gênero *Lactobacillus* em 25 gêneros.

Devido à sua importância biotecnológica e alegação terapêutica, as características genômicas do gênero vêm sendo amplamente exploradas (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017). Os genomas dos *Lactobacillus* variam de 1,23 Mb (*L. sanfranciscensis*) a quatro vezes maiores (4,91 Mb; *L. parakefiri*) em extensão. O conteúdo do GC também varia consideravelmente de 31,93 a 57,02 % (SUN et al., 2015).

Os *Lactobacillus* geram energia metabólica (ATP) através das vias metabólicas de Embden-Meyerhof (EM) e/ou fosfoctolase (KANDLER, 1983). Podem sintetizar D (-) ou L (+) ácido láctico ou uma mistura racêmica dos isômeros a partir de fontes de carboidrato (KÖNIG; FRÖHLICH, 2017). Dependendo do micro-organismo a fermentação pode ocorrer através da via homofermentativa ou heterofermentativa (SILVA, 2011).

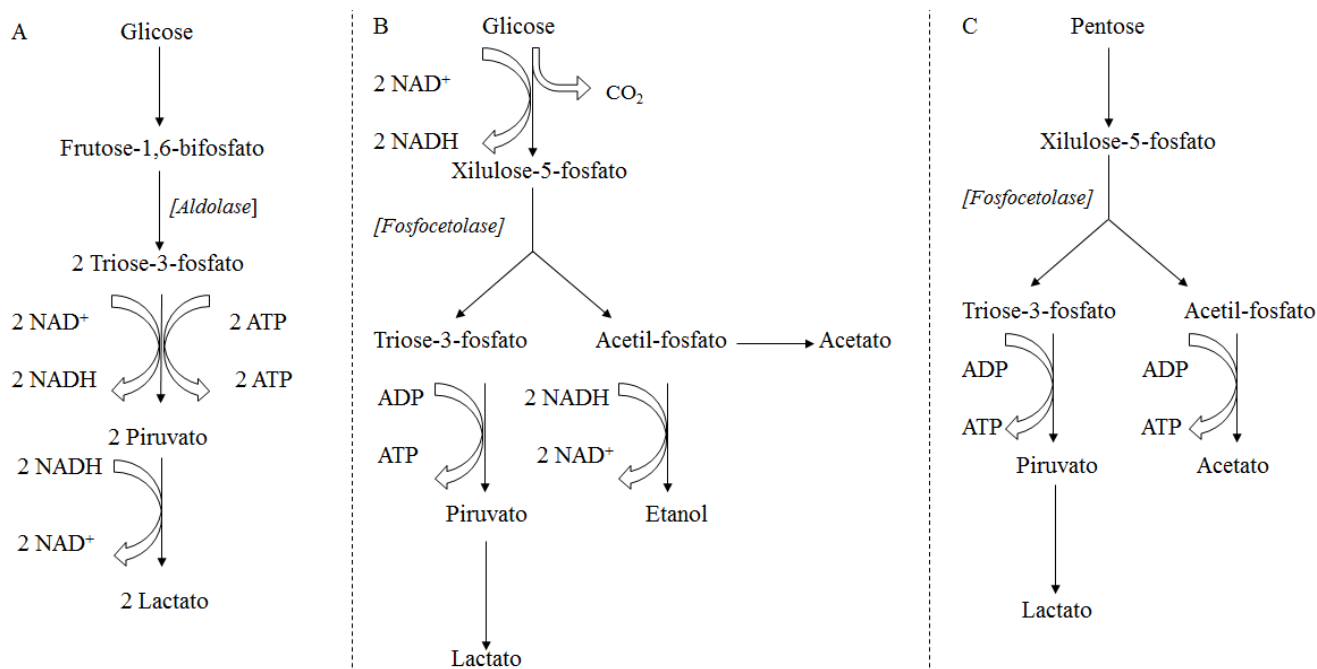
2.1.1 Fermentação e metabolismo

Em 1986, o gênero foi subdividido taxonomicamente em três grupos por Kandler e Weiss de acordo suas características fermentativas (GORBEÑA; SÁENZ, 2017). A classificação da fermentação láctica é feita com base nos produtos finais do metabolismo da glicose. As espécies do grupo I são *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios. Os micro-organismos deste grupo utilizam a via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para fermentar hexoses em ácido láctico (FIGURA 1A) (REZAUL et al., 2017).

Os *Lactobacillus* do grupo II são os heterofermentativos facultativos que fermentam hexoses pela via EMP. Todavia, em condições limitantes de glicose, são capazes de degradar pentoses através de uma fosfocetolase induzível, resultando na produção de ácido láctico e/ou ácido acético (FIGURA 1C) (POT et al., 2014).

Finalmente, o grupo III é composto pelos *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios. As espécies heterofermentativas obrigatórias, utilizam a via fosfocetolase para a fermentação de hexoses (FIGURA 1B). Em condições de anaerobiose, hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (GORBEÑA; SÁENZ, 2017). Inicialmente ocorre a oxidação da glicose, que sofre uma descarboxilação. Em seguida há a degradação da xilulose-5-fosfato em triose-3-fosfato e acetilfosfato. A triose-3-fosfato dá origem ao ácido láctico, enquanto o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos distintos, formando etanol ou acetato (GÄNZLE, 2015).

Figura 6. Visão geral das vias de fermentação de carboidratos pelos *Lactobacillus*.



Legenda: A= Metabolismo homofermentativo de hexoses através da via de Emden-Meyerhoff-Parnas; B= Metabolismo heterofermentativo de hexoses através da via da fosfocetolase; C= Metabolismo heterofermentativo das pentoses através da via da fosfocetolase. **Fonte:** Adaptado de Gänzle (2015).

A maioria dos *Lactobacillus* heterofermentativos são capazes de fermentar pentoses através da enzima fosfocetolase. Geralmente transportadas para o interior da célula através de permeases, as pentoses são fosforiladas e convertidas a Xilulose-5-fosfato. A partir dessa molécula originam-se quantidades equimolares de lactato e acetato (SILVA, 2011).

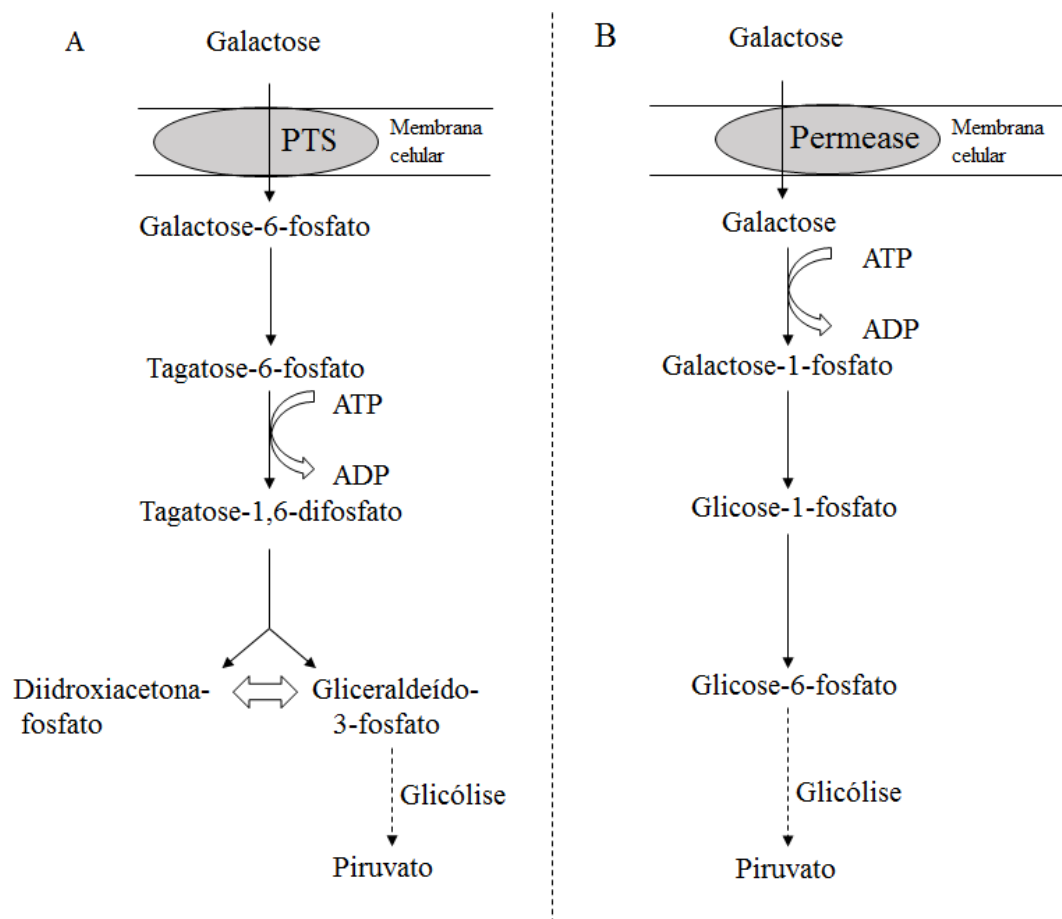
As diferenças genéticas entre os *Lactobacillus* homofermentativos e heterofermentativos podem também determinar a preferência pelas vias utilizadas para o metabolismo de lactose e frutose (DUAR et al., 2017). O metabolismo da lactose pelos *Lactobacillus* inicia com a absorção da molécula, facilitada por um carreador (permease) ou por meio do sistema de fosfotransferase fosfoenol-piruvato dependente (PTS – do inglês, *phosphotransferase system*). Em seguida ocorre clivagem da lactose gerando glicose e galactose-6-fosfato. A primeira é fosforilada e metabolizada através das vias fosfocetolase ou EMP (glicólise), resultando em dois moles de ácido láctico e rendimento energético de dois moles de ATP por mole de glicose (DUAR et al., 2017; POT et al., 2014). A galactose-6-fosfato, por sua vez, sofre uma fosforilação formando

diacetil-hidroxiacetona via homofermentativa ou heterofermentativa (FORSYTHE, 2013).

As vias EMP e fosfocetolase são normalmente utilizadas para o metabolismo de frutose. Durante o metabolismo homofermentativo da frutose, a molécula é convertida em frutose 1,6-difosfato, que em seguida é degradada pela enzima frutose 1,6-difosfato aldose em duas trioses fosfato [di-hidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP)]. A DHAP é convertida em GAP pela enzima triosefosfato isomerase e posteriormente metabolizada em ácido láctico com produção de ATP. Na fermentação heteroláctica a frutose é absorvida por uma permease. Em seguida a molécula é convertida em glicose-6-fosfato pelas enzimas frutoquinase e glicose 6-fosfato isomerase e, metabolizada pela via da fosfocetolase produzindo dois intermediários: GAP e acetil fosfato. O GAP segue pela via EMP, enquanto o acetil fosfato é metabolizado em ácido acético e etanol (KANDLER, 1983).

A galactose pode ser metabolizada pela via tagatose-6-fosfato se transportada através da membrana celular pelo sistema PTS (FIGURA 2 A). Quando a galactose é transportada por permease, ela é metabolizada por uma combinação das vias Leloir e glicolítica (FIGURA 2 B) (ENDO; DICKS, 2014).

Figura 7. Metabolismo de galactose em *Lactobacillus*.



Legenda: A= Rota metabólica tagatose-6-phosphate; B= Rota metabólica Leloir.

Fonte: Adaptado de Endo e Dicks (2014).

Os *Lactobacillus* contêm um grande número de genes envolvidos no transporte e utilização de carboidratos (DUAR et al., 2017). Espécies com genomas maiores (*L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus*) são capazes de utilizar uma ampla gama de carboidratos complexos, como os prebióticos, enquanto aquelas com genomas menores (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *L. sanfranciscensis*) utilizam estritamente açúcares simples, como lactose, galactose e maltose (DE ANGELIS et al., 2016).

Frente às diferentes propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas que compõem o gênero, a variação no conteúdo de Guanina + Citosina do genoma (32 a 54%) dentre as espécies determina a heterogeneidade do grupo. Devido a essa diversidade do gênero, uma combinação de testes genotípicos e fenotípicos se faz necessária para a identificação dos micro-organismos (MISHRA et al., 2017).

A EFSA recomenda a análise de sequência de pelo menos dois marcadores taxonômicos robustos (isto é, a sequência do gene 16S rRNA) ou a análise de sequência

do genoma completo totalmente montada e validada, para a identificação das espécies (SALVETTI; O'TOOLE, 2017).

Em 1990 os *Lactobacillus* foram classificados em três grupos a partir de análises filogenéticas das sequências do gene rRNA 16S/23S, *Lactobacillus casei* - *Pediococcus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Leuconostoc* (COLLINS et al., 1991). Mais tarde o grupo *L. delbrueckii* foi renomeado, passando a se chamar grupo *L. acidophilus*. Composto majoritariamente por espécies homofermentativas, além do *L. acidophilus*, o grupo inclui demais espécies de interesse industrial, como *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gass* e *L. delbrueckii* com as subespécies *delbrueckii*, *lactis*, *indicus* e *bulgaricus* (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010). Em 2020 foi proposta uma reclassificação do gênero com base nas sequências do genoma completo usando uma abordagem polifásica.

2.2 *Lactobacillus delbrueckii*

L. delbrueckii é a espécie mais antiga do gênero e também a espécie *type* [entende-se por *type* a designação específica que define o nome de um táxon, regulamentada pelo Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (ICNB - do inglês *International Code of Nomenclature of Bacteria*)]. Em termos de morfologia, trata-se de bactérias em forma de haste, medindo 0.5–0.8 μm \times 2.0–9.0 μm . São geralmente isoladas a partir de leite, queijo, levedura, grãos e vinho. Dentre os nutrientes necessários para o crescimento desta espécie, destacam-se o ácido pantotênico e a niacina. Algumas cepas requerem riboflavina, ácido fólico, cobalamina e timidina (KÖNIG; FRÖHLICH, 2017).

Esta espécie compreende cinco subespécies, dentre elas o *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*; *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*; *L. delbrueckii* ssp. *lactis*; *L. delbrueckii* ssp. *indicus* e *L. delbrueckii* ssp. *sunkii*. As cinco subespécies compartilham pelo menos 78% de similaridade em seu DNA (POT et al., 2014). *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* é típico de vegetais fermentados, enquanto *L. delbrueckii* ssp. *lactis* e *L. delbrueckii* ssp. *pbulgaricus* são geralmente associados a produtos lácteos, como iogurte e queijos (ZANNI et al., 2017).

L. bulgaricus é uma das espécies de *Lactobacillus* com maior importância econômica, com aplicação mundial na fabricação de iogurte. Trata-se de um micro-

organismo Gram positivo, termófilo, anaeróbio facultativo, não-flagelado e não formador de esporos. Seu metabolismo de carboidratos é homofermentativo obrigatório (ALEXANDRAKI et al., 2017).

A acidificação do leite sob a ação desta espécie confere a preservação e desenvolvimento de sabor, textura e vitaminas tipicamente presentes nos laticínios. Esta bactéria é também explorada pela produção de ácido láctico para uso nos setores de alimentos, cosméticos e químicos (MENEGHEL et al., 2016).

Além da conversão de lactose em ácido láctico mediante fermentação láctica, *L. bulgaricus* desempenham outras conversões bioquímicas dos componentes do leite. Estes micro-organismos dispõem de atividades proteolíticas, como a hidrólise de peptídeos em aminoácidos livres (proteólise), e degradação da gordura do leite em ácidos graxos livres (lipólise) (SETTACHAIMONGKON, 2014). Os efeitos benéficos desta BAL nos produtos lácteos fermentados também foram atribuídos à sua capacidade protetiva de suprimir o crescimento de agentes patogênicos (PANESAR, 2011).

Entretanto, a aplicação de *L. bulgaricus* na produção de alimentos não está estritamente associada às propriedades tecnológicas, mas também às propriedades promotoras de saúde bem como, a síntese de nutracêuticos, o melhoramento da digestibilidade de proteínas e carboidratos, além da síntese de vitaminas essenciais (POT et al., 2014; WATERS et al., 2015).

Na produção do iogurte, por exemplo, *L. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* interagem entre si através de um processo conhecido como protocooperação, sendo capazes de produzir ácido fórmico, ácido fólico e dióxido de carbono (LIU et al., 2016). Além disso, o sistema proteolítico destas culturas iniciadoras pode contribuir para a liberação de peptídeos bioativos, estimular o sistema imunológico, exercer efeitos anti-hipertensivos e antitrombóticos, desempenhar atividade antimicrobiana e atuar como transportadores de minerais, especialmente cálcio (LIU et al., 2012; REZAUL et al., 2017).

As propriedades desejadas são geralmente obtidas pela seleção de cepas específicas. Algumas dessas cepas, estão sendo propostas como potencialmente probióticas, por serem capazes de resistir a baixos valores de pH, promovendo sua sobrevivência no trato gastrointestinal superior e inferior, garantindo sua função probiótica em termos de crescimento e sobrevivência (SURAWEERA; CHANDRASEKARA; MENDIS, 2014).

O consumo de cepas probióticas a partir de lácteos fermentados pode levar à síntese de nutrientes *in vivo*, pela colonização intestinal destes micro-organismos além da ingestão de metabólitos secundários provenientes da fermentação (SILVETTI; MORANDI; BRASCA, 2017).

Devido aos seus potenciais atributos tecnológicos, terapêuticos e profiláticos, o *L. bulgaricus* é destaque nas indústrias de biotecnologia e alimentos (ALEXANDRAKI et al., 2017; MENEGHEL et al., 2016). Com o objetivo de aprimorar o seu emprego comercial, diversas pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de caracterizar a diversidade de cepas de *L. bulgaricus* (MENEGHEL et al., 2016).

Nesta perspectiva a fermentação láctica é reconhecida como uma abordagem pioneira para a inovação de produtos (SILVETTI; MORANDI; BRASCA, 2017). As culturas iniciadoras com importância industrial estão sendo desenvolvidas continuamente (DE DEA LINDNER, 2016), com o intuito de agregar atributos nutricionais e de promoção da saúde, além de segurança, textura e sabor único de forma natural e econômica (SILVETTI; MORANDI; BRASCA, 2017).

Apesar do metabolismo láctico ser alvo de pesquisas há mais de um século, somente nos últimos anos o uso apropriado da genômica permitiu a elucidação de vias metabólicas promissoras, capazes de alterar a composição dos alimentos (GÄNZLE, 2015). Abordagens experimentais empregadas a partir de sequências completas do genoma de determinadas cepas de *L. bulgaricus* oferecem a vantagem de explorar esses micro-organismos como potenciais fábricas celulares para a produção de biomoléculas funcionais (LIU et al., 2012; SETTACHAIMONGKON, 2014).

2.3 *Lactobacillus* COMO FÁBRICAS CELULARES

Auxiliada pela expansão das ferramentas de engenharia metabólica e biologia sintética, a biotecnologia industrial têm apostado fortemente em fábricas celulares. A engenharia metabólica representa uma ferramenta alternativa na busca de novas cepas com características biotecnológicas aprimoradas, uma vez que permite otimizar processos genéticos e regulatórios da célula (GIRAFFA, 2014; GOMES, 2016). Devido ao cultivo fácil e barato, esta alternativa fornece uma pluralidade metabólica, além de biossegurança nos produtos obtidos (FERRER-MIRALLES; VILLAVERDE, 2013).

A tecnologia do DNA recombinante é considerada ideal para melhorar o desempenho microbiano, devido à sua precisão e versatilidade (DERKX et al., 2014). Com o surgimento desta tecnologia na década de 1970, descobriu-se que uma proteína recombinante poderia ser produzida por *Escherichia coli* de forma robusta e econômica (HUANG; LIN; YANG, 2012). De fato, *E. coli* é o hospedeiro mais utilizado para a expressão de genes heterólogos, no entanto, outros micro-organismos podem ser utilizados para a produção de proteínas heterólogas (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Os *Lactobacillus* vêm sendo amplamente explorados para esse propósito, graças à sua diversidade metabólica e potencial biossintético, oriundos da adaptação a ambientes extremamente diversos (BOSMA; FORSTER; NIELSEN, 2017; KRISTJANSDOTTIR et al., 2019; STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017; WATERS et al., 2015). Reconhecida como GRAS, segundo o FDA essa espécie é considerada segura e até mesmo benéfica para o consumo humano (CAMPEDELLI et al., 2019).

A implementação de *Lactobacillus* como fábricas celulares, expande seu emprego industrial para a produção de biomoléculas funcionais e ingredientes alimentares (FERRER-MIRALLES; VILLAVERDE, 2013). Para a produção de ácido láctico em escala industrial, por exemplo, os micro-organismos da espécie *L. delbrueckii* são os preferíveis (ZHANG et al., 2016).

A indústria global de laticínios explora constantemente novas formas de melhorar os produtos para satisfazer a demanda dos consumidores, seja realçando o sabor e textura, ou reduzindo aditivos, açúcar, gordura e teor calórico. Isso impulsiona o desenvolvimento constante de novas culturas iniciadoras com diferentes propriedades (DERKX et al., 2014). Neste aspecto o *L. bulgaricus*, dentre outras BAL, oferece oportunidade para o desenvolvimento de nutracêuticos, sendo capaz de atingir diferentes nichos de mercado (WATERS et al., 2015).

Diversos produtos de importância industrial podem ser produzidos por este micro-organismo, como vitaminas, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos, enzimas, ácido láctico (FRIAS; MARTINEZ-VILLALUENGA; PEÑAS, 2017) e ácido linoleico conjugado (CLA - do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*) (KUHL et al., 2017).

3 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

Desde as últimas duas décadas, os ácidos graxos conjugados dietéticos vêm despertando considerável interesse, sobretudo os isômeros do CLA (ANDRADE et al., 2017). O LA é uma molécula de ácido graxo que consiste em 18 átomos de carbono, com duas duplas ligações *cis* localizadas no carbono 9 e 12, respectivamente, denotadas como *c9*, *c12*-C18:2 (PHILIPPAERTS et al., 2011).

Diferente das ligações duplas do LA, que estão separadas por um grupo metileno, os dienos conjugados derivados do LA ocorrem quando há duas ligações duplas alternadas separadas por uma ligação simples, em diferentes isomerias (posicionais e geométricas) ao longo da cadeia carbônica (GARCIA et al., 2017).

De acordo com a posição e configuração das duplas ligações, há 56 possíveis isômeros de CLA. Contando dos carbonos 2, 4 aos carbonos 15, 17 - C18:2 são 14 isômeros posicionais e, cada isômero posicional possui quatro isômeros geométricos (*cis, cis*; *cis, trans*; *trans, cis*; *trans, trans*) (ROACH et al., 2002). Dentre os possíveis isômeros de CLA, 27 têm sido identificados em produtos naturais (TABELA 1) (LUCATTO; BRANDÃO; DRUNKLER, 2014).

Tabela 5. Isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico conjugado.

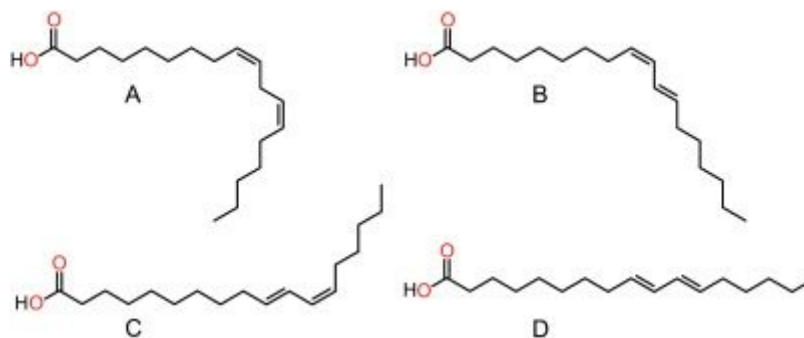
<i>cis, trans</i>	<i>trans, cis</i>	<i>cis, cis</i>	<i>trans, trans</i>
<i>c13, t15</i>	<i>t12, c14</i>	<i>c12, c14</i>	<i>t13, t15</i>
<i>c12, t14</i>	<i>t11, c13</i>	<i>c11, c13</i>	<i>t12, t14</i>
<i>c11, t13</i>	<i>t10, c12</i>	<i>c10, c12</i>	<i>t11, t13</i>
<i>c10, t12</i>	<i>t9, c11</i>	<i>c9, c11</i>	<i>t10, t12</i>
<i>c9, t11</i>	<i>t8, c10</i>	<i>c8, c10</i>	<i>t9, t11</i>
<i>c8, t10</i>	<i>t7, c9</i>	<i>c7, c9</i>	<i>t8, t10</i>
<i>c7, t9</i>	<i>t6, c8</i>		<i>t7, t9</i>

Fonte: Lucatto; Brandão; Drunkler (2014).

8

Até o presente, apenas os isômeros *t*9, *t*11-C18:2; *c*9, *t*11-C18:2 e *t*10, *c*12-C18:2 apresentam efeitos bioativos comprovados (YANG et al., 2017). A estrutura química destes isômeros, bem como do LA estão ilustrados na Figura 3.

Figura 8. Estrutura química do ácido linoleico (A) e dos isômeros *c*9, *t*11-C18:2 (B); *t*10, *c*12-C18:2 (C); *t*9, *t*11-C18:2 (D).



Fonte: Philippaerts et al. (2011).

3.1 ISÔMEROS DE CLA E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Devido ao seu potencial bioativo relevante para a saúde humana, esses isômeros têm sido alvo de numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 2017). Conforme estudos revisados por Kuhl; De Dea Lindner (2016), vários ensaios foram conduzidos para determinar as propriedades físicas, bioquímicas e fisiológicas dos isômeros de CLA.

As primeiras observações que despertaram interesse nos efeitos biológicos dos isômeros de CLA surgiram no final da década de 1970, após as descobertas de Pariza et al. (1979). Os autores associaram o consumo de alimentos ricos em CLA com a inibição de câncer induzido em modelos animais (PARIZA et al., 1979; PARIZA et al., 1983; PARIZA; BENJAMIN; HARGRAVES, 1985). Depois disso, diversas revisões abordaram a relação dos isômeros de CLA com efeitos anticarcinogênicos (BELURY, 2002; GEBAUER et al., 2011; IP, 1997; YANG et al., 2015). Apesar disso, há relatos de efeitos prejudiciais da ingestão de CLA em camundongos, devido principalmente ao isômero *t*10, *c*12-C18:2. Sugestões de possíveis efeitos deletérios em humanos devido a um aumento nos produtos lipídicos oxidativos (isoprostanos) com ingestão desse isômero requerem comprovação (WAHLE; HEYS; ROTONDO, 2004).

Recentemente Polidori et al. (2018) listaram os principais estudos publicados na literatura experimental abordando os efeitos do CLA na inibição de câncer colorretal, câncer de mama, pele e próstata. A atividade anticarcinogênica do CLA já está bem elucidada (ARAB et al., 2016; STACHOWSKA et al., 2012).

Além das citadas acima, os isômeros de CLA têm sido relacionados a diversas propriedades funcionais, bem como atividades antidiabética (BALCI YUCE et al., 2017; MALINSKA et al., 2015), antiobesidade (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012) e anti-inflamatória (OLSON et al., 2017). Apesar de compartilharem estrutura química semelhante, os isômeros de CLA podem apresentar atividades biológicas distintas (TABELA 2). Os efeitos relacionados ao consumo da grande maioria destes isômeros e a interação entre eles ainda estão sendo estudados.

Tabela 6. Atividades biológicas dos isômeros de CLA.

Efeitos na saúde	Isômero
Anticarcinogênico	<i>c9, t11-C18:2 e t10, c12-C18:2</i> <i>c9, t11-C18:2</i> <i>t10, c12-C18:2</i> <i>t9, t11-C18:2</i>
Decréscimo no desenvolvimento de câncer de mama	<i>c9, t11-C18:2 e t10, c12-C18:2</i>
Efeitos inibitórios em diversos tipos de câncer como, mama, pele, estômago, intestinos e ovário	<i>c9, t11-C18:2 e t10, c12-C18:2</i>
Modulação da resposta inflamatória	<i>c9, t11-C18:2 e t10, c12-C18:2</i> <i>c9, t11-C18:2</i> <i>t9, t11-C18:2</i>
Melhora do sistema imunológico	<i>c9, t11-C18:2 e t10, c12-C18:2</i> <i>c9, t11-C18:2</i>

Aumento na atividade antioxidante	<i>t10, c12-C18:2</i> <i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i>
Decréscimo dos níveis de glicose	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i>
Diminuição da massa adiposa	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i> <i>t10, c12-C18:2</i>
Diminuição do diâmetro abdominal sagital (cm)	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i>
Diminuição da relação cintura-quadril	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i>
Aumento da massa corporal magra	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i> <i>t10, c12-C18:2</i>
Efeito anti-aterosclerótico	<i>c9, t11-C18:2 e t10,</i> <i>c12-C18:2</i> <i>t9, t11-C18:2</i>
Influência positiva nos marcadores bioquímicos associados à doença de Alzheimer	<i>c9, t11-C18:2</i>
Efeito anti-osteoporótico	<i>c9, t11-C18:2</i>
Redução sintomatológica da asma	<i>c9, t11-C18:2</i>
Efeitos inibitórios no desenvolvimento de câncer de ovário	<i>t10, c12-C18:2</i>
Efeitos inibitórios no câncer de próstata	<i>t10, c12-C18:2</i>
Redução de hipertensão arterial	<i>t10, c12-C18:2</i>

Fonte: Adaptado de Kuhl; De Dea Lindner (2016); Philippaerts et al. (2011).

Devido a essa relação entre o consumo de CLA na dieta e seus potenciais benefícios à saúde humana, o aumento das concentrações de CLA nos alimentos tornou-se foco nas pesquisas envolvendo nutrição animal (POLIDORI et al., 2018) e tecnologia de alimentos (GORISSEN et al., 2015).

O isômero *c*9, *t*11-C18:2, também conhecido como ácido rumênico, é o mais abundante na dieta, constituindo mais de 90% do teor de CLA total presente na fração gordurosa do leite (VILLAR-TAJADURA et al., 2014). Além dos produtos lácteos, a carne de ruminantes também é fonte natural de ácido rumênico (MILLER, 2017).

Os isômeros de CLA podem ser formados por bactérias anaeróbias no rúmen, como um produto intermediário da biohidrogenação do LA (KEPLER; HIRONS; TOVE, 1966; SIURANA et al., 2018). Junto com CLA, a biohidrogenação ruminal incompleta do LA também resulta na síntese de *t*11-C18:1 (ácido vacênico) (KAMEL et al., 2018).

3.2 SÍNTESE DE ISÔMEROS DE CLA POR BIOHIDROGENAÇÃO

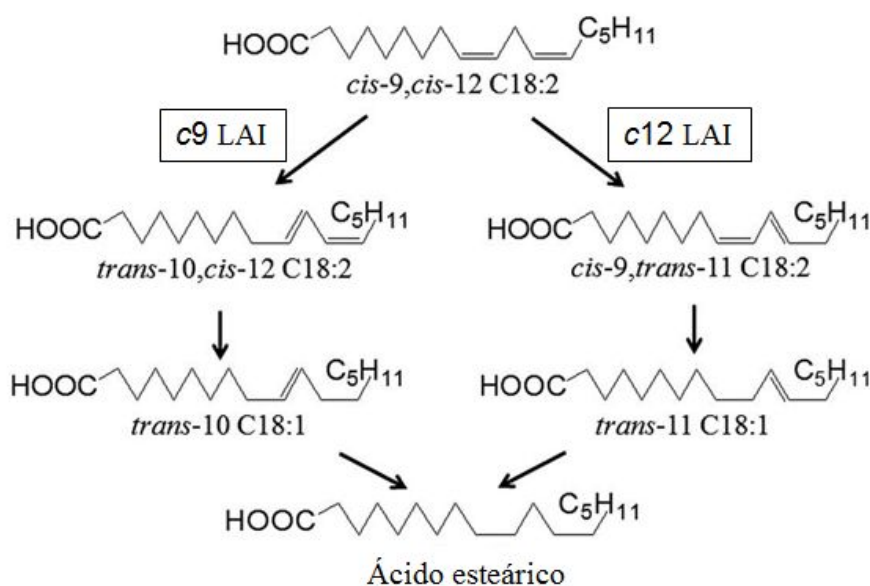
Ácidos graxos insaturados podem ser tóxicos para muitas bactérias devido ao seu efeito prejudicial à membrana citoplasmática. Determinadas enzimas são capazes de desempenhar um mecanismo de desintoxicação e adaptação fisiológica ao ambiente colônico por meio da hidratação destes ácidos graxos insaturados (O'CONNELL et al., 2013). Neste sentido, uma preferência pela incorporação de isômeros de CLA ao LA na membrana, pode estar relacionada à natureza menos tóxica desses ácidos graxos conjugados (GORISSEN et al., 2011).

A via de biohidrogenação do LA foi demonstrada pela primeira vez por Kepler; Hirons; Tove (1966) utilizando a bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. Os autores sugeriram o envolvimento de pelo menos dois sistemas na completa hidrogenação do LA (poli-insaturado) em ácido esteárico (saturado). Primeiro ocorre a isomerização da dupla ligação *c*12 para configuração *t*11, formando um ácido graxo dienóico conjugado. Em seguida a reação de redução da dupla ligação *c*9, forma um ácido graxo monoenoíco, o ácido vacênico. Finalmente, uma segunda reação de redução catalisada por micro-organismos secundários, hidrogeniza a ligação *t*11 do ácido vacênico, que é reduzido a ácido graxo saturado (C18:0) formando o ácido esteárico (KEPLER; HIRONS; TOVE, 1966).

Há relativamente poucas informações sobre o mecanismo desta reação. Sabe-se que a biotransformação do LA para sua forma conjugada depende da atividade da enzima linoleato isomerase (LAI, EC 5.2.1.5), que catalisa a primeira reação da biohidrogenação (KEPLER, TUCKER, TOVE, 1970; ANDRADE et al., 2017). Duas

categorias de LAI foram caracterizadas em uma variedade de bactérias, a *c9* LAI e a *c12* LAI. A primeira, encontrada principalmente em bactérias da espécie *Propionibacterium*, catalisa a reação de conversão do LA para *t10*, *c12*-C18:2. A segunda, predominantemente encontrada em espécies de *Lactobacillus*, é responsável pela conversão do LA em *c9*, *t11*-C18:2 (DENG et al., 2007; GORISSEN et al., 2015; LUO et al., 2013). A Figura 4 ilustra a conversão enzimática do LA para os isômeros *c9*, *t11*-C18:2 e *t10*, *c12*-C18:2, pelas enzimas *c12* LAI e *c9* LAI, respectivamente.

Figura 9. Biohidrogenação do ácido linoleico.

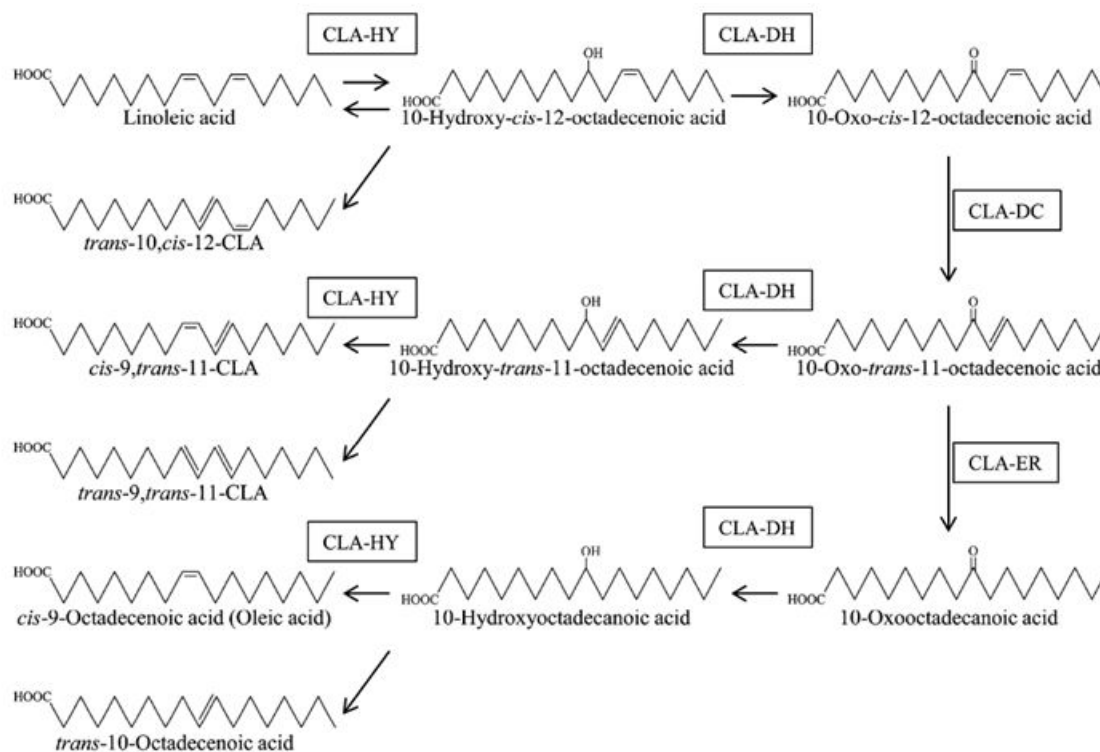


Fonte: Adaptado de Deng et al. (2007); Zhang et al. (2016).

De acordo com Kishino et al. (2011) a LAI de *Lactobacillus plantarum* trata-se de um sistema multienzimático composto por três enzimas hidratase/desidratase (CLA-HY), desidrogenase (CLA-DH) e isomerase (CLA-DC). Além disso, os genes *cla-dh* e *cla-dc* foram encontrados em um agrupamento de genes (*cluster*) com outro gene, *cla-er* (KISHINO et al., 2013). Juntas as quatro enzimas desempenham um papel no metabolismo da saturação de ácidos graxos poliinsaturados. A CLA-HY funciona como um catalisador para a hidratação do LA e desidratação do ácido 10-hidroxi-*cis*-12-octadecenóico, a CLA-DH desempenha um papel na oxidação dos grupos hidroxila e na redução dos grupos oxo, a CLA-DC está envolvida na migração de ligações duplas e, a etapa final de saturação é realizada pela enzima enona redutase (CLA-ER) (KISHINO et

al., 2013). O sistema de múltiplas reações composto pelas quatro enzimas identificadas por Kishino et al. (2013) a partir de extratos celulares de *Lactobacillus plantarum* AKU 1009^a, está ilustrado na FIGURA 5.

Figura 10. Via metabólica de ácidos graxos poli-insaturados.



Fonte: Kishino et al. (2013).

A primeira reação é a hidratação da ligação dupla carbono-carbono na posição $\Delta 9$ catalisada pela enzima CLA-HY (hidratase/desidratase), formando o ácido graxo 10-hidroxi. A segunda reação é a desidrogenação do grupo hidróxi no carbono C10 catalisada pela enzima CLA-DH (desidrogenase), formando o ácido graxo 10-oxo. A terceira reação é a isomerização da ligação dupla carbono-carbono na posição $\Delta 12$ catalisada pela enzima CLA-DC (isomerase), formando a estrutura de enona conjugada, o ácido graxo 10-oxo-*trans*-11. A quarta reação é a hidrogenação da ligação dupla carbono-carbono na posição $\Delta 11$ catalisada pela enzima CLA-ER (enonaredutase), formando a ligação simples carbono-carbono. A quinta reação é a hidrogenação do grupo oxo no carbono C10 catalisada pela enzima CLA-DH, formando o ácido graxo

10-hidroxi. A última reação é a desidratação do grupo hidróxi no carbono C10 catalisada pela enzima CLA-HY, formando os ácidos graxos monenóicos *cis*-9 e *trans*-10 (KISHINO et al., 2013; YANG et al., 2014).

O mecanismo de produção de CLA através do complexo LAI multicomponente pode ser compartilhado por diferentes espécies de *Lactobacillus*, inclusive *L. bulgaricus* (YANG et al., 2014). Métodos biotecnológicos e técnicas de engenharia molecular têm sido empregados com o intuito de aprimorar a síntese de CLA por *Lactobacillus* (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2008), através de extratos enzimáticos (LIN, 2006) ou por meio de fermentação láctica (KUHL et al., 2017; RENES et al., 2017). Por exemplo, vários estudos revisados por Kuhl; De Dea Lindner (2016) relataram a produção de CLA durante a fermentação láctica por BAL (TABELA 3).

Tabela 7. Produção de CLA durante a fermentação láctica por diferentes BAL.

Micro-organismo	Concentração de CLA	Referências
<i>Micro-organismos isolados</i>		
<i>Lc. lactis</i>	8,5 mg/g ^a	Kim e Liu (2002)
<i>L. casei</i>	0,175 mg/mL ^a	Van-Nieuwenhove et al. (2007)
<i>L. rhamnosus</i>	0,190 mg/mL ^a	
<i>S. thermophilus</i>	0,199 mg/mL ^a	
<i>L. bulgaricus</i>	0,860 mg/mL ^b	Lin, Lin e Lee (1999)
<i>L. acidophilus</i>	0,107 mg/mL ^b	
<i>S. thermophilus</i>	0,825 mg/mL ^b	
<i>L. plantarum</i>	0,240 mg/mL ^c	Khosravi et al. (2015)
<i>L. bulgaricus</i>	1,150 mg/mL ^a	Kuhl et al. (2017)
<i>S. thermophilus</i>	1,02 mg/mL ^a	
<i>L. rhamnosus</i>	0,310 mg/g ^a	Xu, Boylston e Glatz (2005)
<i>L. acidophilus</i>	0,450 mg/g ^a	
<i>L. casei</i>	0,480 mg/g ^a	
<i>L. plantarum</i>	0,510 mg/g ^a	
<i>P. shermani</i>	0,1450 mg/g ^a	

Micro-organismos em co-cultura

S.

thermophilus 0,710 mg/g^a Xu, Boylston e Glatz (2005)*L. bulgaricus*

S.

*thermophilus**L. bulgaricus* 11,03 mg/g^a Khosravi-Darani, Reihani e Feili (2014)*L. acidophilus,**B. bifidum**P. freudenerchii**L. bulgaricus* 70,41 mg/g^b; 24,18 mg/g^d Kuhl et al. (2017)*S. thermophilus*

Legenda: CLA total^a; isômero *c*9, *t*11-C18:2^b; não especificado^c; *t*10, *c*12-C18:2^d.

Fonte: Adaptado de Kuhl; De Dea Lindner (2016).

Diversas LAI putativas foram expressas em *E. coli* para produção de CLA. Todavia, em vez de CLA os pesquisadores relataram a produção de ácido 10-hidroxi-*cis*-12-octadecenóico (ADAMCZAK; BORNSCHEUER; BEDNARSKI, 2008). Os dois principais mecanismos para a conversão do LA são a hidratação de ligações duplas que conduzem à formação de ácidos graxos hidroxí e, a isomerização de uma ligação *cis*-dupla em uma ligação *trans*-dupla (FIBINGER et al., 2016). Há poucos dados disponíveis sobre os mecanismos de ação das enzimas envolvidas nestes processos. Entretanto, há relatos de enzimas isoladas a partir das espécies *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Ptilota filicina* e *Propionibacterium acnes* (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008). Apesar disso, o sistema enzimático das BAL na produção de CLA ainda não está claramente descrito (KISHINO et al., 2011).

Uma vez que todas as cepas devem ser testadas quanto a produção de CLA, as triagens para encontrar cepas produtoras caracterizam estudos de tentativa e erro. Portanto, ao considerar uma estratégia de seleção, uma abordagem mais rápida, padronizada e econômica faz-se necessária. Nesse sentido, uma abordagem genética buscando a presença de enzimas envolvidas pode ser uma estratégia útil para melhorar o processo de seleção. Através desta abordagem, apenas cepas potencialmente produtoras, contendo as enzimas envolvidas, seriam selecionadas para o seguinte teste de produção.

Esta etapa pode minimizar o tempo e também os recursos usados para o ensaio. Dada esta abordagem, a seção a seguir é dedicada às enzimas descritas e propostas envolvidas no metabolismo de LA para produzir CLA.

3.3 CARACTERÍSTICAS DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE DE CLA

Fibinger e colaboradores (2016) identificaram os genes codificantes para uma oleato hidratase (EC 4.2.1.53) e uma linoleato isomerase (EC 5.2.1.5) em *Lactobacillus acidophilus* (código de acesso GenBank AAV42528.1 e ABB43157.1, respectivamente). Os genes apresentam 99,5% de identidade de sequência diferindo apenas por três resíduos de aminoácidos (E157G, F286C e V506A).

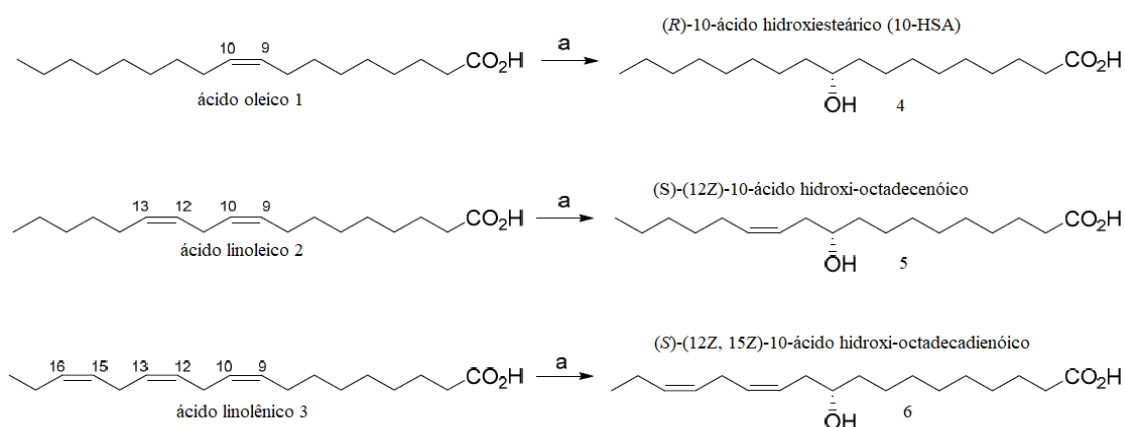
O cofator intrínseco dinucleótido de flavina adenina (FAD) é encontrado em ambas as classes de enzimas, mas parece desempenhar diferentes funções. Para a linoleato isomerase o FAD exerce um mecanismo redox, enquanto para hidratase foi sugerida uma função estrutural ou de estabilização de carga (FIBINGER et al., 2016). A hipótese de uma relação evolutiva entre a hidratase e a isomerase é uma possível explicação do porquê das hidratases possuírem FAD sem usá-la para hidroxilação, mas por motivos estruturais (FIBINGER et al., 2016).

3.3.1 Oleato hidratase

Os ácidos graxos insaturados são tóxicos para muitas bactérias devido ao seu efeito prejudicial à membrana citoplasmática. A hidratação de ácidos graxos insaturados por bactérias tem sido sugerida como um mecanismo de desintoxicação e, uma estratégia de sobrevivência em ambientes ricos em ácidos graxos (VOLKOV et al., 2010).

Hidratases são enzimas que catalisam reações de (des)hidratação de ligações duplas (FIGURA 6) (CASTAGNA et al., 2020). A etapa inicial do metabolismo de saturação do LA (hidratação do LA e desidratação do ácido 10-hidroxi-*cis*-12-octadecenóico) é catalisada por uma hidratase / desidratase, que demonstra atividade na presença de FAD e dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) (TAKEUCHI et al., 2015).

Figura 11. Os ácidos graxos insaturados C18 mais comumente catalisados pela oleato hidratase.



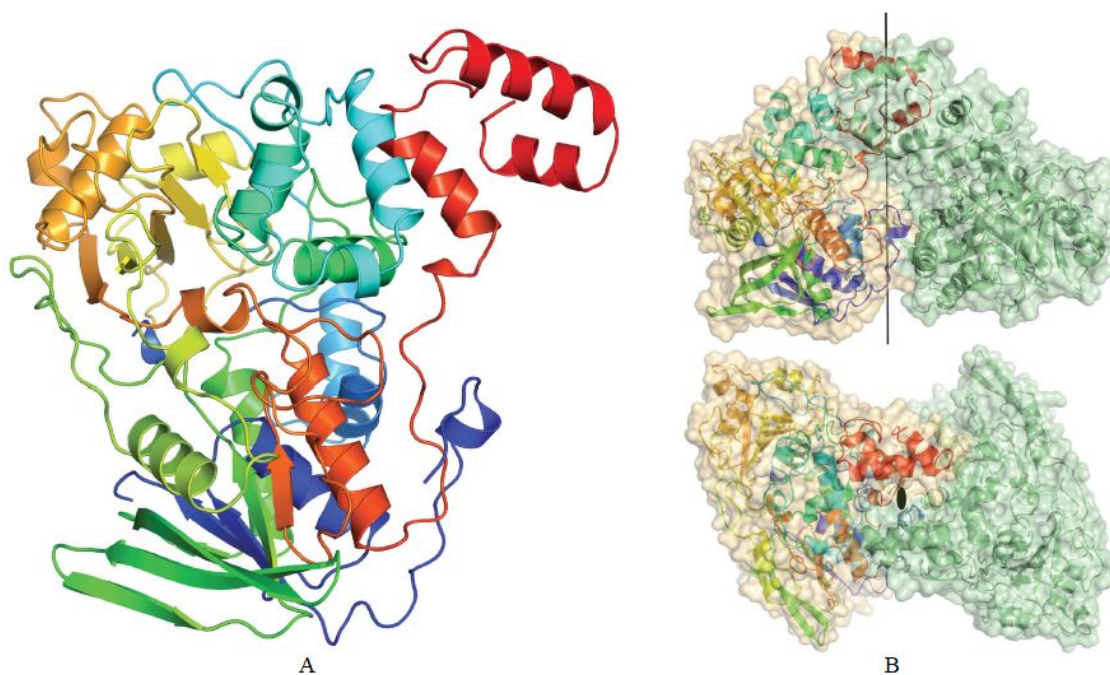
Legenda: ácidos graxos insaturados C18: ácido oleico (1), linoleico (2) e linolênico (3) e sua transformação em (R)-10-ácido hidroxiesteárico (4), (S)-(12Z)-10-ácido hidroxi-octadecenóico (5) e (S)-(12Z, 15Z)-10-ácido hidroxi-octadecadienóico (6), respectivamente. **Fonte:** Adaptado de Castagna et al. (2020).

Recentemente duas hidratases de *L. acidophilus* NTV001 foram identificadas, hidratase ácido graxo 1 (FA-HY1) e FA-HY2. A primeira produziu ácido 13-hidroxi-*cis*-9-octadecenóico a partir de LA, enquanto FA-HY2, catalisou a produção de ácido 10-hidroxi-*cis*-12-octadecenóico. De acordo com sua classificação, ambas pertencem à família de proteínas antígeno reativo cruzado de miosina (MCRA - do inglês, *myosin-cross-reactive antigen*) e apresentam sítios de ligação de FAD em suas regiões N-terminais (HIRATA et al., 2015). Segundo Park et al. (2015), a oleato hidratase isolada de *L. acidophilus* (LAH) é responsável pela adição de água seletivamente na posição *c*12. Entretanto a maioria das oleato hidratases adiciona água exclusivamente à ligação dupla *c*9, sendo o grupo hidroxilo introduzido no átomo de C10 (SCHMID et al., 2016; VOLKOV et al., 2013; YANG et al., 2013).

A estrutura em cristal da enzima de *L. acidophilus* revelou uma estrutura em homodímero e, cada protômero consiste em quatro domínios intrinsecamente

conectados (FIGURA 7). Três deles formam os sítios de ligação do substrato e FAD, de estrutura semelhante aos domínios de várias enzimas dependentes de flavina (FIBINGER et al., 2016; VOLKOV et al., 2013). O quarto domínio localiza-se no terminal C e consiste em três hélices, abrange a entrada do substrato hidrofóbico ao canal que o conduz da superfície da proteína até o sítio ativo. LAH é uma proteína composta por 591 resíduos, de peso molecular calculado de 67,7 kDa. A reação de LAH com LA levou à formação de 10-hidroxioléico (10-HOE) como único produto da reação (VOLKOV et al., 2013).

Figura 12. Estrutura do monômero e dímero de oleato hidratase isolada de *Lactobacillus acidophilus* (LAH).



Legenda: A = Diagrama de fita do protômero de LAH (de azul no terminal N a vermelho no terminal C). B = Dímero de LAH; o eixo duplo de simetria intradímero é descrito como um bastão preto (VOLKOV et al., 2013).

Ortega-Anaya e Hernández-Santoyo (2015), caracterizaram uma forma homotrimérica da proteína de 64,7 kDa nativa de *L. plantarum*. Um modelo estrutural da oleato hidratase de *L. plantarum* foi proposto pelos autores, baseando-se na sequência de aminoácidos para identificar os sítios de ligação putativos com LA. O sítio 1, localiza-se em um bolso hidrofóbico externo na extremidade C-terminal da proteína e

o sítio 2, localiza-se no núcleo e em contato com uma molécula FAD. Além disso, a molécula de LA fornece resíduos de amidina em torno de ambos os sítios (Met154 e Met81, respectivamente) atuando como um pólo rígido, desempenhando assim um papel fundamental na ligação de ácidos graxos insaturados.

Apesar do conhecimento adquirido até o presente, a relação entre o CLA e a formação de ácidos graxos hidroxilados ainda é escassa. Portanto, estudos focados na expressão de proteínas recombinantes podem ser muito úteis (SALSINHA et al., 2018).

3.3.2 Linoleato isomerase

A enzima de *Butyrivibrio fibrisolvens*, que catalisa a isomerização de LA em ácido rumênico, foi descrita por Kepler e Tove em 1967. Estudos posteriores demonstraram que a enzima linoleato isomerase foi responsável pela transformação desse ácido graxo, bem como do ácido linolênico, em suas formas conjugadas (NIEUWENHOVE; TERÁN; GONZÁLEZ, 2012; PALMQUIST et al., 2005).

Existem relatos sobre duas formas existentes da linoleato isomerase: uma enzima solúvel e uma proteína ligada à membrana (MACOUZET; LEE; ROBERT, 2010). A linoleato isomerase associada à membrana de bactérias lácticas e probióticas, é menos estudada em função da baixa estabilidade desta enzima quando recuperada em forma solúvel pela ação de detergentes (IRMAK et al., 2006). Devido à sua relativa estabilidade e maior facilidade de purificação, a linoleato isomerase solúvel de *P. acnes* tem sido mais intensamente estudada (ROSBURG-CODY et al., 2007).

A linoleato isomerase isolada de *P. acnes* pertence ao grupo das flavoenzimas (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008). Segundo Liavonchanka et al. (2006), a enzima compreende três domínios intrinsecamente conectados. O domínio 1 (resíduos 1-77, 196-275 e 371-424) integra um sítio de ligação de FAD misto, o domínio 2 (resíduos 78-195) apresenta uma estrutura secundária em α -hélice, e o domínio 3 (resíduos 276-370) compreende uma folha- β pregueada intercalada com duas α -hélices.

Um canal estreito em forma de C de um comprimento de 30 Å é formado pelos domínios 2 e 3 e se estende da superfície enzimática em direção ao anel de isoaloxazina de FAD. Assim, enquanto o domínio 1 se liga ao FAD, os domínios 2 e 3 são responsáveis pela especificidade do substrato e sua ligação ao sítio ativo (LIAVONCHANKA et al., 2006).

Além disso, um mecanismo de dois passos foi postulado para a reação da isomerase. O substrato LA é convertido em um carbocátion intermediário ou em um radical, por remoção de hidrogênio ou anion de hidreto, respectivamente, na posição C-11 do substrato, resultando em FAD reduzido. O anion hidrogênio ou hidreto, respectivamente, é então transferido de volta ao FAD para o substrato na posição C-9, devido à estabilização preferencial da estrutura mesomérica, com uma carga positiva parcial ou um elétron em C-9, por Phe168 (LIAVONCHANKA et al., 2006).

Em contraste com 9,11-isomerase, o ciclo de reação da 10,12-isomerase não resulta em troca de prótons entre o solvente e (10E, 12Z) - CLA. Em vista da baixa semelhança de sequência entre as três isomerases de *L. acidophilus*, *P. filicina* e *P. acnes*, é provável que, apesar da conservação do sítio de ligação do FAD, as geometrias globais dos sítios ativos em 9,11-isomerase e em 10,12-isomerase sejam diferentes. A presença de moléculas de água ou resíduos de aminoácidos polares no sítio ativo da 9,11-isomerase pode ser uma explicação plausível para a troca de prótons entre o ácido graxo intermediário e o solvente. Assim, a deuteração em C-13 poderia ser mediada pela ligação N-H na posição N-5 no FAD reduzido, uma vez que os grupos amino terciários trocam prótons facilmente com o solvente. Juntos, esses dados apontam para a possibilidade de um mecanismo de reação comum para todas as 9,11-isomerases. Infelizmente, até agora nenhuma dessas enzimas bacterianas foi isolada como um complexo de proteína ou proteína pura adequado para análise espectroscópica e estrutural (LIAVONCHANKA et al., 2006).

4 CONCLUSÃO

Para concluir, sugere-se que o sistema enzimático multicomponente aponta para diferentes desafios que precisam ser abordados. O primeiro deles, a confirmação e sustentação de que um sistema multienzimático é mesmo responsável pela transformação de LA, enquanto que o segundo seria a caracterização dos parâmetros cinéticos das enzimas supostamente envolvidas. Isso permitiria entender, por exemplo, por que algumas cepas têm maior capacidade de isomerizar LA para CLA do que outras. Além disso, vários estudos sobre *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sugerem que a caracterização dessas enzimas não pode ser realizada de acordo com a homologia, mas

deve considerar a especificidade da cepa, uma vez que a inibição do crescimento por LA é dependente da cepa e não da espécie (SALSINHA et al., 2018).

O esclarecimento dos mecanismos de ação destas enzimas na síntese de CLA pelas BAL favorece o emprego destes micro-organismos como fábricas celulares na produção dos isômeros de CLA. A utilização de *L. bulgaricus* para escalar a produção de CLA em produtos alimentares é uma oportunidade desafiadora.

CAPÍTULO II - SEQUÊNCIA-RASCUNHO DO GENOMA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230, UMA FERRAMENTA PARA IDENTIFICAÇÃO PRELIMINAR DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DE CLA

RESUMO

Diversos estudos apontam *Lactobacillus* spp. como potenciais produtores de ácido linoleico conjugado (CLA). Em estudo prévio, relatamos a capacidade de uma variedade de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para produzir CLA em leite de ovelha fermentado. Em destaque, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa LBP UFSC 2230, isolada de queijo italiano Grana Padano, mostrou-se uma forte produtora de CLA e candidata para aplicação na cadeia alimentar de lácteos fermentados. Este estudo relata a sequência rascunho do genoma e os padrões de suscetibilidade antimicrobiana de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230. Um total de 4.310.842 leituras pareadas das extremidades (*paired-end reads*) foram originados. As sequências obtidas foram cortadas nos pontos de adaptadores (*trimming*), avaliadas por qualidade e montadas em 135 *contigs* com um comprimento total de 604.745.873 bp, incluindo 2.086 genes codificadores de proteínas e um conteúdo médio de GC de 49,7%. A sequência rascunho do genoma apresentou-se uma ferramenta importante para a identificação da putativa oleato hidratase, enzima presente na via da biohidrogenação do ácido linoleico e possivelmente envolvida no metabolismo do CLA desta cepa. Além disso, de acordo com os dados, esta cepa tem cinco *open-reading-frames* que codificam sistemas de efluxo envolvidos na resistência a antibióticos (AR).

PALAVRAS-CHAVE: Alimentos funcionais; Bactérias ácido lácticas; *Lactobacillus* spp.; Oleato hidratase; *cis*-9, *trans*-11 CLA

ABSTRACT

Several Lactobacillus spp. are recognized as potential conjugated linoleic acid (CLA) producers. We have previously reported the ability of a range of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strains to produce CLA in fermented milk, being a

potential candidate for the fermented dairy food chain. This study reports the draft genome sequence and antimicrobial susceptibility patterns of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LBP UFSC 2230, isolated from Italian Grana Padano cheese. Draft genome sequence originated in 4,310,842 paired-end reads that were quality trimmed and assembled into 135 contigs with a total length of 604,745,873 bp, including 2086 protein-coding genes and an average GC content of 49.7%. Draft genome sequence represents an important tool to identify the enzymes involved in this strain's CLA metabolism. We identified a gene encoding an enzyme putatively involved in the biohydrogenation of the linoleic acid pathway, oleate hydratase. Furthermore, according to the data, this strain has five open reading frames encoding efflux systems potentially involved in antibiotic resistance (AR).

KEY-WORDS: *Functional Food; Lactic Acid Bacteria; Lactobacillus ssp.; Oleate hydratase; cis-9, trans-11 CLA*

1 INTRODUÇÃO

Certos alimentos consistem em um número relevante de espécies microbianas funcionais. Entre elas, as bactérias ácido lácticas (BAL) desempenham um papel essencial no desenvolvimento de culturas iniciadoras (DE DEA LINDNER et al., 2008). BAL são um grupo importante de micro-organismos usados para a fermentação de uma variedade de alimentos. A maioria delas adquirem o status de “Presunção de Segurança Qualificada” (QPS – do inglês, *Qualified Presumption of Safety*) ou “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS – do inglês, *Generally Recognized As Safe*) pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA – do inglês, *European Food Safety Authority*) e pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*) dos EUA, respectivamente (RICCI et al., 2017).

Em particular, as BAL normalmente constituem um grupo diverso de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos e não móveis, produzindo ácido láctico como o principal metabólito primário (REZAUL et al., 2017). Há séculos, as BAL têm sido utilizadas para a fermentação de produtos lácteos com o intuito de promoção da saúde. Isto se deve ao fato destes micro-organismos atuarem como fábricas celulares para a síntese de metabólitos com propriedades funcionais, como a produção de ácido

linoleico conjugado (CLA - do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*) (HAYES et al., 2007; KUHL et al., 2017; TABASHSUM et al., 2018).

CLA é um termo coletivo usado para designar uma sequência de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (*c*-9, 12-C18: 2, LA - do inglês, *Linoleic Acid*) com ligações duplas conjugadas. Em particular, *c*9, *t*11-C18:2 (ácido rumêmico) é o principal isômero de CLA entre as espécies de *Lactobacillus* e, tem sido implicado como o isômero mais importante em termos de atividade biológica, como anticarcinogênico (PARIZA; HA, 1990), aterosclerótico (LEE; KRITCHEVSKY; PARIZAA, 1994) e modulação da gordura corporal (PARK; PARIZA, 2007). Os potenciais efeitos bioativos atribuídos ao CLA aliado a crescente procura dos consumidores por alimentos capazes de oferecer benefícios extras à saúde, requer a necessidade de alternativas para atender à esta demanda.

Nesse aspecto, a biossíntese microbiana de CLA, especialmente a partir de *Lactobacillus* spp. mostra-se uma abordagem estratégica promissora (WATERS et al., 2015), pois além de o processo de preparação comercial de CLA por catálise enzimática através de lipase e isomerização alcalina ter alto custo de produção, o produto desta reação resulta em alguns isômeros indesejados, fazendo-se necessário o desenvolvimento de um processo mais seguro, específico e economicamente viável (DAHIYA; PUNIYA, 2017).

Diversos pesquisadores evidenciaram os principais parâmetros capazes de influenciar a produção de CLA em *Lactobacillus* spp., conforme listados por Kuhl e De Dea Lindner (2016) em recente revisão. No entanto, os resultados obtidos até o presente não atendem às expectativas de eficiência de produção, o que leva à necessidade do desenvolvimento de pesquisas para melhoramento no processo de produção de CLA mediado por atividade microbiana (GORISSEN et al., 2013).

Em estudo prévio nosso grupo identificou a linhagem *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 de alta eficiência de produção do isômero *c*9, *t*11-C18:2 (KUHL et al., 2017). Diante disso, foi realizada uma análise genômica para identificar os genes responsáveis pela expressão da enzima ácido linoleico isomerase de três componentes, consistindo de hidratase (CLA-HY), desidrogenase / oxidoreductase (CLA-DH) e isomerase (CLA-DC), relacionada ao metabolismo de CLA em *Lactobacillus* e identificada previamente em *Lactobacillus plantarum* para converter LA em CLA (KISHINO et al., 2013).

Neste estudo, relatamos a caracterização fenotípica e a sequência rascunho do genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 isolada de queijo italiano Grana Padano. Esta cepa demonstrou habilidade em produzir CLA a partir de matrizes lácteas e, portanto, alto potencial biotecnológico para o emprego em alimentos enriquecidos com CLA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.

Espécies bacteriana	Cepa	Referência/Fonte
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LBP UFSC 2230	UNIPR ¹
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Hanahan (1983)

¹Proveniente da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da UNIPR (Parma - Itália), gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Erasmo Neviani.

A cepa *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 2230 empregada é considerada potencial cultura iniciadora para fermentação láctea com capacidade de sintetizar isômeros de CLA (KUHL et al., 2017). A reativação e crescimento da bactéria ocorreu em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Alemanha), com incubação a 37 °C por 18 h sob condições anaeróbias. As cepas de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C em meio Lysogeny Broth (LB, triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) ou 2 X TY (triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,5), sob agitação a 200 rpm. Quando necessário os meios de cultura foram suplementados com o antibiótico ampicilina (100 μ g/mL).

2.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS

A Tabela 2 lista todos os oligonucleotídeos utilizados nos processos de amplificação da região 16S e síntese de DNA realizados neste trabalho.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência Nucleotídica 5', 3'	Referência/Fonte
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Duarte (2010); Yu et al. (2013)
1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC	

2.3 PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Os plasmídeos utilizados nas clonagens realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos	Características	Fonte/Referência
pGEM T-Easy	Vetor parental para clonagem de produtos de PCR. O sítio de inserção é flanqueado pelos sítios de <i>Bst</i> ZI, <i>Eco</i> RI e <i>Not</i> I.	Promega, São Paulo, Brasil

2.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230

2.4.1 Análise do perfil de fermentação de carboidratos

A identificação microbiana preliminar e a caracterização fenotípica quanto ao metabolismo das fontes de carbono, foram realizadas por meio do sistema API 50 CH (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França). A eficiência do teste foi confirmada pelo ensaio com a cepa controle *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (CCT 0580). As culturas foram inoculadas em MRS ágar, incubadas a 37 °C, durante 12 h, em anaerobiose.

Antes de isolar as colônias, as células foram reativadas em meio líquido sob as mesmas condições de cultivo.

As colônias foram transferidas para tubos contendo 5 mL de água Mili-Q estéril, formando uma suspensão densa (SI). Em seguida, uma alíquota desta suspensão foi gotejada em tubos contendo 2 mL de água Mili-Q estéril até atingir uma opacidade equivalente a 2 da escala de McFarland (SII). Para o preparo do inóculo, a SII foi transferida à ampola contendo meio API 50 CHL Medium, num volume equivalente a 2 vezes o número de gotas (2n), previamente registrado. Utilizando pipetas estéreis, adicionou-se o inóculo homogeneizado para cada um dos 50 poços nas tiras API 50 CH. Todos os poços foram sobrepostos com óleo mineral estéril para conferir anaerobiose, e incubadas a 37°C. As tiras foram umedecidas e cobertas, conforme recomendado pelo fabricante.

A leitura dos poços foi monitorada após 24, 48 e 72 h de incubação. A interpretação dos resultados foi caracterizada pela alteração da cor violeta do bromocresol contido no meio, devido à acidificação produzida. A mudança na cor foi representada por um sinal positivo (+), e os testes que não apresentaram variação de cor, foram representados por um sinal negativo (-).

2.5 CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA

2.5.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico da cepa de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi isolado de acordo com Chen e Kuo (1993), a partir das seguintes adaptações no pré-preparo do precipitado celular: antes de aplicar o protocolo de extração, o precipitado (obtido por centrifugação) foi ressuspendido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) 50 mM. Em seguida, a suspensão bacteriana foi tratada com lisozima 10 mg/mL a 37 °C por 30 min. Esta adaptação teve o objetivo de otimizar a ruptura das células. Após a extração, o DNA foi purificado e concentrado utilizando o kit comercial Gen Elute™ (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) para um volume final de 10 µL.

2.5.2 Amplificação do gene 16S rRNA

Para a confirmação da espécie foi realizado o sequenciamento do RNA da subunidade ribossômica 16S. A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando o kit de reação Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, EUA) num volume total de 25µL, contendo 1 µL do DNA genômico (molde), 1,25 µL de um cada dos iniciadores 27F e 1401R, correspondentes às regiões 8 até 27 e 1401 até 1417 do gene codificante para o 16S rRNA de *E. coli*, respectivamente (DUARTE, 2010). As condições de reação incluíram uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 45 s e 72 °C por 1 min 45 s, e extensão final a 72 °C por 5 min.

A amplificação do fragmento esperado (1400 pb) foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v). O processo de eletroforese foi conduzido através da aplicação da solução contendo o produto de PCR e 2,5 µL de tampão de carregamento GLB (do inglês - *Gel Loading Buffer*) no gel. O aparato de eletroforese (Consort EV-22 2, Cleaver Scientific Ltd) foi programado em condições de 100 V por 30 – 40 min. Como referência, foi utilizado o marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Rockford, EUA). As bandas correspondentes ao fragmento esperado foram isoladas e purificadas a partir do kit de extração GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Após purificação, os produtos foram submetidos à reação de adição de um nucleotídeo sobressalente de adenosina nas extremidades (*A-Tailing*) do fragmento purificado. A reação foi preparada num volume final de 10 µL contendo 6 µL de DNA purificado, 0,5 µL de MgCl₂ 25mM, 0,5 µL de dATP 5mM, 0,5 µL de Taq DNA-polimerase (5U), 1 µL de Tampão de PCR 10X, 1,5 µL de água ultra pura para PCR livre de DNase, RNase e Protease (HyClone, GE Helthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

Os produtos de PCR adicionados de um nucleotídeo de adenosina, foram clonados em plasmídeo pGEM®-T Easy Vector System (Promega, Madison, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

2.5.3 Preparo de células eletrocompetentes para transformação

Células competentes foram preparadas de acordo com Sambrook; Russell (2006), a partir de uma colônia isolada de células de *E. coli* da linhagem DH5 α . As células de *E. coli* DH5 α foram cultivadas em caldo LB a 37 °C sob agitação (200 rpm), até a fase exponencial (DO 0,4 – 0,6). Após este procedimento as células foram sedimentadas por centrifugação a 4000 rpm, 15 min, 4 °C, seguido por duas lavagens com água MilliQ refrigerada estéril e, uma lavagem com glicerol 10% refrigerado estéril. Em seguida, o precipitado celular foi ressuscitado em glicerol 10% refrigerado estéril em um volume de 0,1% da cultura inicial. Em seguida, as células foram distribuídas em alíquotas de 50 μ L e armazenadas a -80 °C.

2.5.4 Transformação de *E. coli* com os produtos de ligação

Após as clonagens, os vetores foram inseridos nas células competentes por eletroporação (SAMBROOK; RUSSEL, 2006). A transformação dos produtos de ligação com células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α foi realizada adicionando-se alíquotas de 50 μ L de células competentes e 2 μ L de produto de ligação em eletrocubetas, com espaço de 0,1 cm, previamente refrigeradas. A condição de eletroporação aplicada pelo eletroporador *MicroPulser Electroporator* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) foi Ec1 (V = 1.8 kV, 200 Ω e 25 μ F).

Imediatamente após o pulso, a suspensão bacteriana foi inoculada em 2 mL de meio LB e incubada durante 1h a 37 °C com rotação de 200 rpm, para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes introduzidos durante a transformação. Posteriormente, as células foram distribuídas em placas contendo meio LB e ampicilina (100 μ g/mL) acrescido de 0,5 μ L de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG, 200 mg/mL) e 0,5 μ L de X-Gal (50 mg/mL), e incubadas a 37 °C por 18 h. As colônias obtidas foram selecionadas pelo sistema de alfa-complementação do gene da β -galactosidase. As colônias brancas, clones portadores dos plasmídeos com insertos, foram inoculadas em meio LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C por 18 h sob agitação (200 rpm). Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 12000 rpm, 3 min e os precipitados armazenados a -80 °C.

2.5.5 Extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Para as análises de restrição foram usados 5 µL da *Mini-Prep*. As digestões foram feitas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, durante um período de 1 h a 37 °C. Os produtos da digestão foram analisados em um gel de agarose 0,8% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 1X. Um volume de 500 µL da suspensão bacteriana, referente às amostras testadas, foi inoculado em 2 mL de meio LB e incubado por 18 h a 37 °C. Em seguida, a extração do DNA plasmidial ocorreu com o auxílio do kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante, e as amostras armazenadas a 4 °C até o sequenciamento.

2.5.6 Sequenciamento do gene 16S rRNA

A análise da sequência do gene 16S rRNA foi realizada pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coreia do Sul). Os *amplicons* para as sequências de rRNA 16S foram gerados usando os oligonucleotídeos universais 1401R e 27F (DUARTE, 2010; YU et al., 2013) em ambas as fitas. A sequência de consenso de comprimento de 1110 bp foi comparada usando a ferramenta de busca de alinhamento local básico (BLAST – do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) no Centro Nacional de Informação de Biotecnologia (NCBI – do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) dos EUA, *Nucleotide Blast* (BLASTn).

2.6 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

O sequenciamento do genoma foi realizado pela empresa WemSeq (Curitiba, Brasil). O DNA genômico foi extraído com o kit UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation (Mo Bio, Carlsbad, EUA) e sua integridade foi verificada visualmente por eletroforese em gel de agarose 1%, enquanto a pureza e quantificação do DNA foram estabelecidas usando Nanodrop (ThermoScientific, Waltham, EUA) e Qubit (Invitrogen, Waltham, EUA), respectivamente.

As amostras foram preparadas com o kit de preparação de biblioteca Nextera XT (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas genômicas foram sequenciadas usando o sistema Miseq 500v2, incluindo clusterização, sequenciamento e chamada de base avaliada por qualidade com leitura de superfície dupla para um par de bases 2×250 . Em seguida, foi feita a etapa de *trimming*, a qual consistiu na remoção dos adaptadores e sequências identificadoras, seguida da seleção de sequências segundo o tamanho e qualidade. Após o *trimming*, foi feita uma nova análise de qualidade das sequências. As leituras pareadas das extremidades (*paired-end reads*) resultantes foram montadas usando CLCBio Genomics Workbench 8.5 (QIAGEN, Arhus, Dinamarca) (BARUZZO et al., 2017). A anotação automática dos *contigs* resultantes foi realizada usando o servidor Anotações Rápidas Usando Tecnologia de Subsistemas (RAST - do inglês, *Rapid Annotations using Subsystems Technology*) (AZIZ et al., 2019).

2.6.1 Árvore filogenética

A história evolutiva foi inferida usando o método de Estimativa Máxima Verossimilhança (MLE - do inglês, *Maximum Likelihood Estimation*) baseado no modelo de Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-17867,84) foi apontada. As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente pela aplicação dos algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL - do inglês, *Maximum Composite Likelihood*). Em seguida, selecionou-se a topologia com valor de log de verossimilhança superior. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de galhos medidos em número de substituições por local. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013).

2.7 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A susceptibilidade antimicrobiana de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi testada pelo método de disco de difusão em ágar (CHARTERIS et al., 2001) para azitromicina, cefoxitina, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina,

estreptomicina, gentamicina, neomicina, linezolida, oxacilina, penicilina, rifampicina, sulfazotrim, tetraciclina e vancomicina (DME, São Paulo, Brasil).

O inóculo foi preparado a partir de uma colônia bacteriana isolada de uma placa de MRS ágar após 24 h a 37 °C, em anaerobiose. A colônia foi transferida para um tubo de ensaio contendo meio MRS líquido. A suspensão bacteriana foi incubada a 37 °C em anaerobiose, até atingir turbidez equivalente ao padrão 0,5 de McFarland (Nefelobac, Probac, São Paulo, Brasil). Placas contendo 4 mm de espessura de MRS foram utilizadas para o repique das cepas. O inóculo foi espalhado em toda extensão da placa uniformemente com *swab* estéril umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas, os discos foram distribuídos sob o cultivo com o auxílio de pinça estéril. As placas foram imediatamente incubadas a 37 °C, em anaerobiose. O experimento foi realizado em triplicata. Os diâmetros da zona de inibição foram mensurados após incubação anaeróbica por 24 h a 37 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DE *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230

O perfil fenotípico foi impreciso, uma vez que a fermentação de carboidratos não esteve totalmente em conformidade com os padrões discriminados pelo fabricante do sistema API. O percentual de identidade foi de 36% para *Lactobacillus acidophilus* e 27,5% para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Os valores de índice T foram de 0,73 e 0,69, respectivamente. A caracterização fenotípica da fermentação de carboidratos está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. API 50 CH fermentation profile of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230.

Galeria	Carboidrato	Resultado	Galeria	Carboidrato	Resultado
0	Controle	-	25	Esculina	+
01	Glicerol	-	26	Salicina	-
02	Eritritol	-	27	D-Celobiose	-
03	D-Arabinose	-	28	D-Maltose	+

04	L-Arabinose	-	29	D-Lactose	+
05	D-Ribose	-	30	D-Melibiose	-
06	D-Xilose	-	31	D-Sacarose	+
07	L-Xilose	-	32	D-Trealose	+
08	D-Adonitol	-	33	Inulina	-
09	Metil- β D-Xilopiranosida	-	34	D-Melezitose	-
10	D-Galactose	+	35	D-Rafinose	-
11	D-Glicose	+	36	Amido	I
12	D-Frutose	+	37	Glicogênio	-
13	D-Manose	+	38	Xilitol	-
14	L-Sorbose	-	39	Gentiobiose	-
15	L-Ramnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lixose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	D-Manitol	I	43	D-Fucose	-
19	D-Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	Metil- γ D-Manopiranosida	-	45	D-Arabitol	-
21	Metil- γ D-Glicopiranosida	-	46	L-Arabitol	-
22	N-AcetilGlicosamina	+	47	Gluconato de potássio	-
23	Amigdalina	-	48	2-CetoGluconato de potássio	-
24	Arbutina	+	49	5-CetoGluconato de potássio	-

Legenda: (-) Sem fermentação até 48 h de incubação; (+) Fermentação até 48 h de incubação; (I) inconclusivo.

De acordo com o Manual Bergey de Bacteriologia Determinativa (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*), a subspécie *bulgaricus* é caracterizada pela fermentação de frutose, galactose, glicose, maltose, manose, sacarose, e algumas cepas são capazes de fermentar manitol (BERGEY; BUCHANAN; GIBBONS, 1974). A

linhagem testada distinguiu por fermentar, além destes açúcares, N-acetilglicosamina, arbutina, amido, trealose, esculina e lactose. Os dois últimos também metabolizados pelas cepas de *L. bulgaricus* estudadas por Nyambane et al. (2014). Os achados de Giraffa, De Vecchi e Rossetti (1998) revelaram que a cepa *L. bulgaricus* LB5, isolada de produtos lácteos, também foi capaz de fermentar trealose.

Essa variabilidade no perfil de fermentação de carboidratos intra-subespécie foi observada também no experimento de Kafsi et al. (2014), no qual todas as quatro linhagens de *L. bulgaricus* caracterizadas apresentaram capacidade em fermentar lactose e manose, duas das linhagens metabolizaram glicose e, apenas uma delas mostrou-se eficaz na fermentação de esculina.

Uma vez que a identificação fenotípica da cepa não foi bem-sucedida, a identificação molecular foi realizada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A análise BLAST revelou que a sequência consenso do produto de PCR retornou uma cobertura do alinhamento de 98% com 96,22% de identidade para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa LGM2 (acesso GenBank no. AY675257.1).

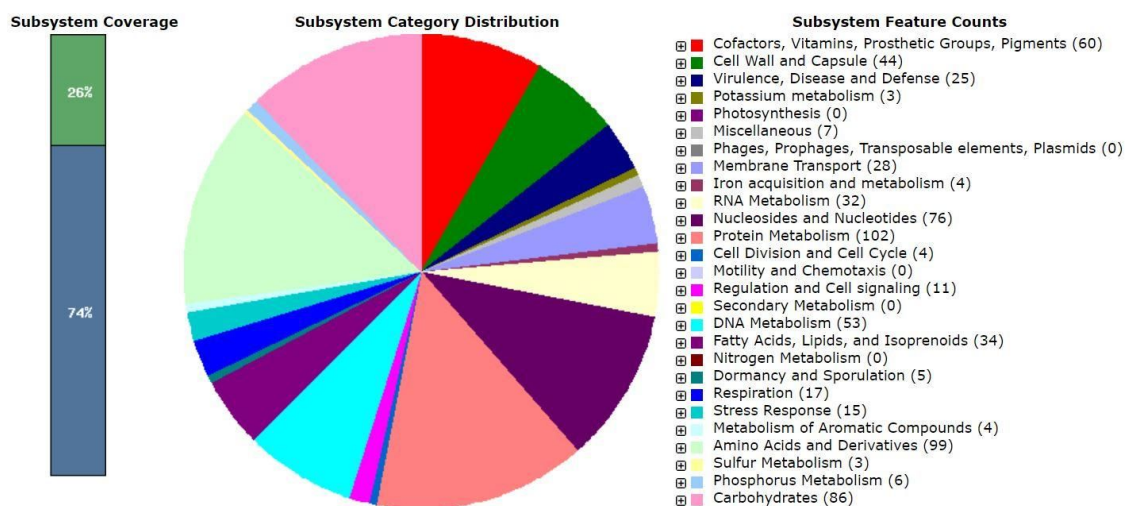
3.2 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Um total de 4.310.842 *paired-end reads* (bibliotecas de 500 pb, 2.000 pb e 6.000 pb) foram geradas usando a plataforma Illumina HiSeq 2000. A cobertura média do genoma foi de cerca de 300x e as sequências obtidas foram cortadas nos pontos de adaptadores (*trimming*) avaliada por qualidade e montadas em 135 *contigs* com um comprimento total de 604.745.873 bp, incluindo 2.086 genes codificadores de proteínas e um conteúdo médio de GC de 49,7%.

O N_{50} de *contig* do genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 é 39.590 bp, e o *contig* mais longo 192.104 bp. A anotação automática dos *contigs* resultantes apresentou 2.165 fases de leitura aberta (ORF – do inglês, *open reading frame*), sendo 2.086 sequências codificadoras de proteínas e 79 RNAs codificadores. De acordo com as estatísticas de subsistema de RAST mostradas na Figura 1, 26% dos recursos foram categorizados em subsistemas, enquanto a maioria do genoma não pôde ser relacionada a nenhum subsistema por evidência. Neste cálculo, existem 25 ORFs implicados na categoria “Virulência, Doença e Defesa”, no entanto, todos os elementos estão presentes

na subcategoria “Resistência a antibióticos e compostos tóxicos”, dos quais apenas 5 estão relacionados com antibióticos.

Figura 1. Estatística de subsistema gerada por anotação automática RAST.



A computação do subsistema por RAST cobriu apenas 26% de todos os recursos presentes, incluindo genes não hipotéticos e hipotéticos em subsistemas predefinidos. De acordo com o pipeline de anotação automática, a maioria dos recursos presentes no genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 permanece com funcionalidade incerta relacionada às categorias acima. Atualmente (março de 2021), existem 27 genomas de *L. delbrueckii* completos disponíveis no banco de dados GenBank. Entre eles, 12 pertencem à subespécie *bulgaricus*, todas isoladas de iogurte ou leite fermentado, enquanto a cepa LBP UFSC 2230, isolada de queijo. Há pequenas discrepâncias entre as cepas de *L. delbrueckii* em relação ao conteúdo de GC, mas os números de genes anotados são amplamente variáveis entre elas, variando de 1905 a 2297 genes (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências genômicas completas de *Lactobacillus delbrueckii* disponíveis no Genbank.

GeneBank nº BioProjeto	Micro-organismo	Cepa	Tamanho do genoma (Mb)	GC (%)	Genes	Proteínas
PRJNA591475	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	TS1-06	1.854	49.8	1928	1567
PRJNA607413	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LJJ	1.891	49.5	1948	1604
PRJNA545627	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	KLDS1.1011	1.887	49.8	1992	1634
PRJNA304935	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	MN-BM-F01	1.875	49.7	1933	1585
PRJNA491249	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	KLDS1.0207	1.869	49.8	1974	1607
PRJNA354491	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DSM 20080	1.868	49.8	1942	1564
PRJNA327771	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ND04	1.862	49.6	1932	1538
PRJEB21527	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ACA-DC 87	1.856	49.8	1928	1579
PRJNA331039	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	L99	1.848	49.7	1944	1592
PRJNA16120	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	2038	1.873	49.7	1941	1562
PRJNA16871	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	1.865	49.7	1940	1561
PRJNA403	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC BAA-365	1.857	49.7	1965	1579
PRJNA49147	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ND02	2.132	49.59	2139	2011
PRJNA615231	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LBP UFSC 2230	2.009	49.7	2165	2086

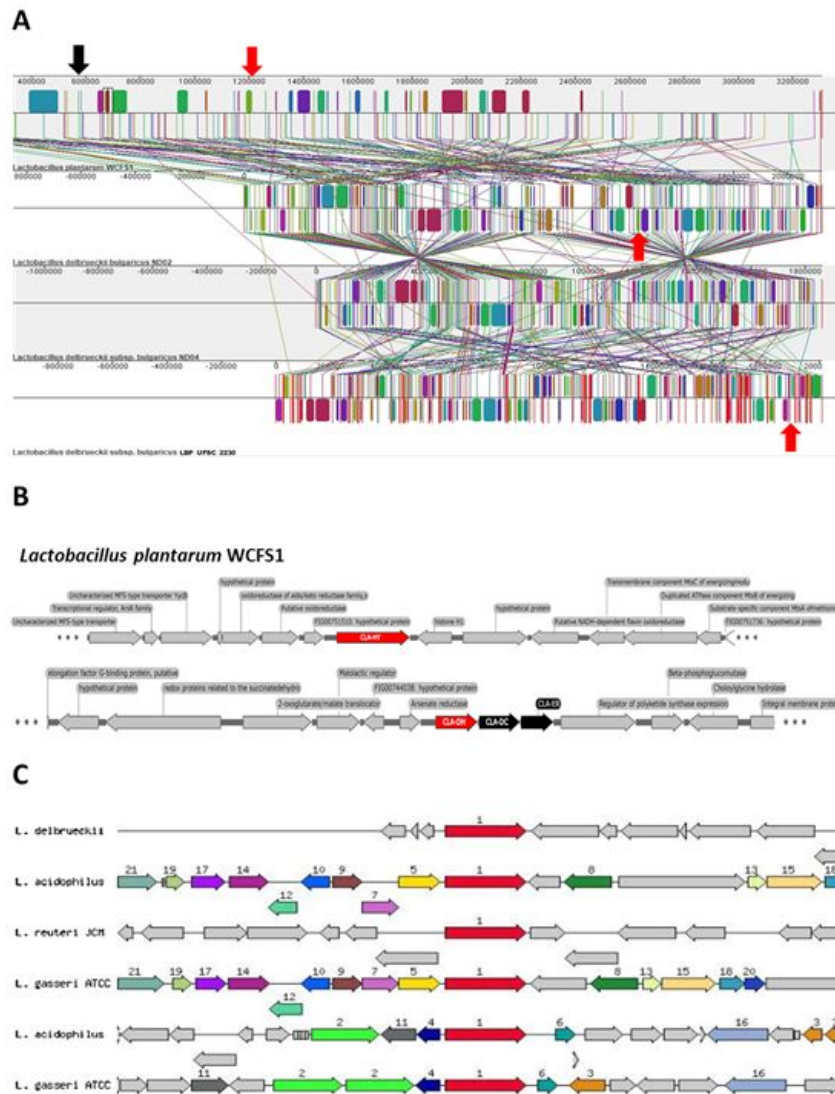
PRJDB5979	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	NBRC 3202	1.91	50.1	1930	1653
PRJNA383854	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	TUA4408L	2.012	49.9	1999	1718
PRJNA355324	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	KCTC 13731	1.911	50	1905	1600
PRJNA354490	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	DSM 20074	1.954	49.6	1965	1577
PRJNA355325	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>indicus</i>	JCM 15610	2.022	49.37	2066	1939
PRJNA355248	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>jakobsenii</i>	DSM 26046	1.892	50.1	1941	1614
PRJNA355327	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	KCCM 34717	2.263	49.1	2270	1905
PRJNA398581	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	KCTC 3034	2.238	49	2240	1889
PRJEB25625	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1	2.05	49.6	2072	1694
PRJNA350761	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	KCTC 3035	1.973	50	1982	1697
PRJNA454439	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	NWC_1_2	2.26	48.58	2297	2176
PRJNA398701	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20072	2.166	49	2141	1793
PRJNA355244	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>sunkii</i>	JCM 17838	2.004	50.1	1975	1726
PRJNA356	<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	3.308	44.5	3042	3059

3.2.1 Via da biohidrogenação do ácido linoleico

Em relação à biohidrogenação do LA, foi descrita uma possível via metabólica envolvendo quatro enzimas, três das quais estão em um operon (KISHINO et al., 2013). Múltiplos parâmetros foram testados em reações de PCR sem sucesso na amplificação dos fragmentos esperados. Considerando que os oligonucleotídeos degenerados foram projetados com base na sequência das proteínas referência de uma espécie distinta (*Lactobacillus acidophilus*, Gene ID: DQ239438.1), procedeu-se com o sequenciamento completo do genoma da linhagem *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.

Dos quatro genes descritos pelos autores, apenas hidratase está presente no genoma sequenciado da cepa LBP UFSC 2230. A comparação da organização genômica e principalmente da região relacionada ao *locus* em que o gene da oleato hidratase é colocado na cepa LBP UFSC 2230 (Figura 2), nos leva a crer que os genomas das espécies e subespécies de *Lactobacillus* toleram amplos rearranjos. Na verdade, o mesmo foi sugerido por Song et al. (2016) que relataram haver evidências significativas de recombinação frequente em toda a subespécie.

Figura 2. Comparação da região do genoma entre as espécies de BAL.



Legenda: A= Alinhamento do genoma e comparação entre *Lactobacillus plantarum* cepa WCSF1, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa ND02, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa ND04 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa LBP UFSC 2230 desenvolvido com auxílio do software MAUVE (do inglês, *Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements*). A seta preta indica a posição dos genes CLA-DH, CLA-DC e CLA-ER. As setas vermelhas indicam a posição de CLA-HY. B= Genoma de *Lactobacillus plantarum* WCSF1 indicando as posições CLA-HY, CLA-DH, CLA-DC e CLA-ER. A seta vermelha indica ambas as enzimas pertencentes à superfamília da oleato hidratase (DH: desidrogenase, HY: Hidratase / Desidratase), enquanto as setas pretas indicam outras classes de enzimas (DC: isomerase, ER: dessaturase) envolvidas na

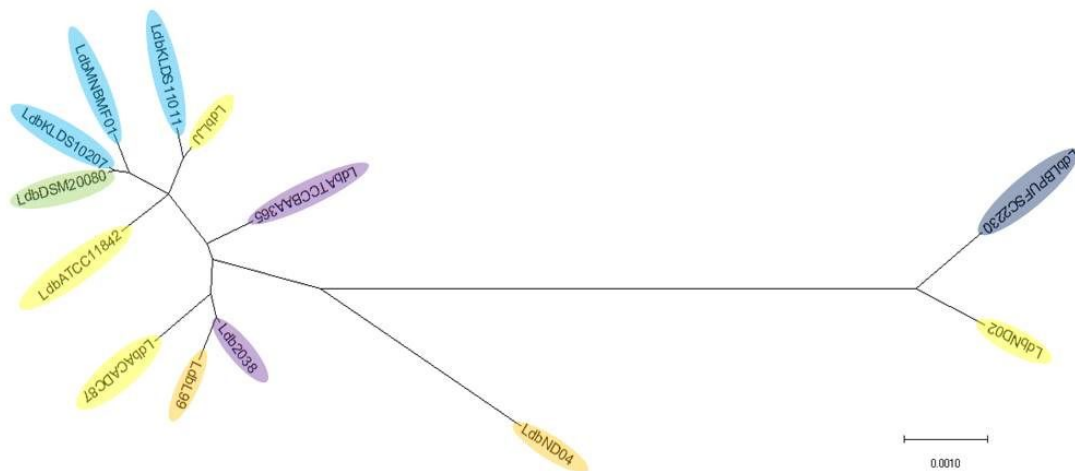
biohidrogenação do LA. C= Oleato hidratase (setas vermelhas) encontrada no genoma da cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 (primeiro genoma) em comparação com *Lactobacillus acidophilus* NCFM (duas regiões), *Lactobacillus reuteri* JCM 1112, *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323323 (duas regiões), disponíveis na base de dados RAST.

3.2.2 Árvore filogenética

Usando um método de tipagem de sequência multi-locus (MLST – do inglês, *Multilocus Sequence Typing*) (8 genes), Song et al. (2016) estudaram uma coleção com 298 cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* obtidas a partir de produtos fermentados naturalmente. Os autores observaram 106 tipos de sequência (STs – do inglês, *Sequence Types*) agrupados em 6 linhagens (L) e 5 complexos clonais (CC). Os genes que codificam as seguintes proteínas foram escolhidos para análise: protease dependente de ATP, subunidade de ligação de ATP ClpX (*clpX*), proteína de iniciação de replicação cromossômica (*dnaA*), CTP sintetase (*pyrG*), chaperon em GroEL (*groEL*), UDP-N-acetilmuramoo -L-alanil-D-glutamato-L-lisina ligase (*murE*), subunidade alfa da fenilalanil-tRNAsintetase (*pheS*), recombinase A (*recA*) e subunidade beta da RNA polimerase dirigida por DNA (*rpoB*).

Utilizando os genes descritos por Song et al. (2016) realizou-se uma análise de MLST, a fim de verificar a similaridade entre os genomas disponíveis da subespécie *bulgaricus* e a cepa LBP UFSC 2230 estudada no presente trabalho. O gene *murE* foi excluído da análise porque estava presente em apenas metade dos genomas analisados. Uma árvore filogenética foi construída a partir das sequências concatenadas (cerca de 11,6 kb) usando o método de MLE (Figura 3). De acordo com a árvore gerada, as unidades taxonômicas foram agrupadas independentemente da região de isolamento das cepas (por exemplo, DSM20080 da Bulgária e KLDS10207 da China em vez de KLDS10207 e KLDS11011 ambos da China). Por ser a única cepa obtida de queijo, a LBP UFSC 2230 isolada na Itália apresentou maior similaridade com o ND02, obtido a partir de iogurte e isolado na Região Autônoma da Mongólia Interior.

Figura 3. Relação evolutiva entre genomas de *L. bulgaricus* pelo método MLE.



3.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A recente preocupação com a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos, tem afetado a cadeia alimentar. Para determinar o perfil de sensibilidade a 17 antimicrobianos (DME®, São Paulo, Brasil), a cepa LBP UFSC 2230 foi submetida a testes de disco de difusão em ágar (CHARTERIS et al., 2001). *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 mostrou resistência à ciprofloxacina e *L. plantarum* ATCC 8014 para cefoxitina, ceftriaxona, oxacilina, penicilina e vancomicina. Além disso, a resistência bacteriana à estreptomicina, gentamicina, neomicina e sulfazotrim foi observada para ambas as cepas testadas. Os resultados da análise estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Perfil de resistência antimicrobiana obtido por meio do método de difusão em disco.

Antimicrobiano		<i>L. bulgaricus</i> LBP UFSC 2230	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014
Nome	Concentração (µg)		
Azitromicina	15	S	S
Cefoxitina	30	S	R

Ceftriaxona	30	S	R
Cloramfenicol	30	S	S
Ciprofloxacina	5	R	MS
Clindamicina	2	S	S
Eritromicina	15	S	S
Streptomicina	10	R	R
Gentamicina	10	R	R
Neomicina	30	R	R
Linezolida	30	S	S
Oxacilina	1	MS	R
Penicilina	10	MS	R
Rifampicina	5	S	S
Sulfazotrim	25	R	R
Tetraciclina	30	S	S
Vancomicina	30	S	R

Legenda: Faixas dos diâmetros da zona de inibição (halo) exibidos por bactérias consideradas suscetíveis (S), moderadamente suscetíveis (MS) ou resistentes (R) a cada antibiótico, conforme descrito por Charteris et al. (2001) e Sharma et al. (2016).

Ao contrário de outras bactérias lácticas, plasmídeos são raramente encontrados em *Lactobacillus delbrueckii* (LEE et al., 2007). Uma vez que nenhum plasmídeo foi observado na montagem do genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 os fenótipos de resistência evidenciados pela linhagem do presente trabalho são provavelmente o resultado da atividade de produtos codificados por genes cromossômicos. No entanto, há relatada a presença de plasmídeos crípticos em algumas cepas de *Lactobacillus* spp., apesar disso, tais plasmídeos normalmente não carregam genes de resistência nesses organismos (AZCÁRATE-PERIL; RAYA, 2002; BOURNIQUEL et al., 2002).

De acordo com os dados obtidos, essa cepa possui cinco genes que codificam sistemas de efluxo potencialmente envolvidos na resistência a antibióticos (AR – do inglês, *Antibiotic resistance*). Três deles codificam proteínas supostamente pertencentes à família de efluxo MATE, que foram anteriormente relacionadas à resistência a múltiplas drogas e

potencialmente responsáveis pela resistência aos aminoglicosídeos (KURODA; TSUCHIYA, 2009).

Os *Lactobacillus* spp. são frequentemente relatados como amplamente resistentes aos aminoglicosídeos (especialmente em relação à gentamicina, canamicina e estreptomicina), mas geralmente são suscetíveis a outros inibidores da síntese de proteínas de diferentes classes de antibióticos (AMMOR; BELÉN FLÓREZ; MAYO, 2007; ZHOU et al., 2005). Assim como bem observado neste trabalho, a suscetibilidade ao cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, linezolida e tetraciclina.

Outro gene codifica um sistema de efluxo putativo pertencente ao transportador de efluxo de múltiplas drogas da família MFS. O produto desse sistema pode contribuir para a resistência à ciprofloxacina, de maneira semelhante desempenhada por Bmr3 de *Bacillus subtilis*, contra levofloxacina e norfloxacina (OHKI; MURATA, 1997), LmrA de *Streptococcus pneumoniae*, contra ciprofloxacina e norfloxacina (GILL; BRENWALD; WISE, 1999) ou NorA de *Staphylococcus aureus*, contra ciprofloxacina e norfloxacina (COSTA et al., 2013). A última ORF codifica putativamente para um componente ligador de ATP (ATP-binding) de um sistema transportador do tipo ABC de multirresistência. Em estudo prévio, Poelarends; Mazurkiewicz; Konings (2002) associaram um elemento do sistema transportador ABC LmrA de *Lactococcus lactis*, à extrusão e resistência a aminoglicosídeos como gentamicina e neomicina, além de quinolonas como ciprofloxacina.

Além disso, a resistência às fluorquinolonas pode ser resultado de alterações de aminoácidos na girase e topoisomerasas, conforme descrito por Pestova et al. (1999). Os autores descreveram resíduos críticos para resistência à ciprofloxacina nas proteínas ParC, ParE, GyrA e GyrB em *Streptococcus pneumoniae*. Dentre os resíduos descritos, *L. bulgaricus* LPB UFSC 2230 apresentou N91D e D83G em ParC, I460L e I493V em ParE e S114R em GyrA, os quais de alguma forma poderiam contribuir para a resistência às quinolonas nesta cepa.

Anisimova; Yarullina (2019) demonstraram em seu trabalho que, 95% dos isolados de *Lactobacillus* spp. analisados eram resistentes à vancomicina, todos portando o gene *vanX*. Não foram encontrados no presente estudo o gene *vanX*, ou genes semelhantes relacionados a resistência à vancomicina, conforme esperado de acordo com a suscetibilidade observada nesta cepa em particular. Existem anotadas no genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC

2230 quatro putativas hidrolases de serina clássicas que, de acordo com a Beta-Lactamase DataBase (NAAS et al., 2017) podem ser descritas como:

1. Beta-lactamase de amplo espectro, Grupo 2c, Subclasse A, envolvida na hidrólise de carbenicilina, compartilha 28,89% de identidade com CARB-3 de *P. aeruginosa* (WP_063859105.1);

2. Cefalosporinase de amplo espectro, Subclasse C, compartilha 22,13% de identidade com ESC-226 de *Escherichia coli* (EMW70182.1);

3. Beta-lactamase pertencente à Subclasse C, compartilha 26,37% de identidade com PAC-1 de *Pseudomonas aeruginosa* (APM84516) putativamente, descrita como associada com o determinante 16S rRNA metilase rmtF2, que confere resistência a pan-aminoglicosídeo (BOUR et al., 2019);

4. A beta-lactamase pertencente à subclasse C, compartilha 29,72% de identidade com SEC-1 de *Serratia marcescens* (BAA23130) envolvida na hidrólise da oxiiimino cefalosporina (MATSUMURA; MINAMI; MITSUHASHI, 1998).

Embora haja quatro genes que codificam beta-lactamases putativas presentes no genoma, essas beta-lactamases não estão envolvidas na resistência dos beta-lactâmicos testados, uma vez que esta cepa é sensível a estas cefalosporinas. Um estudo anterior descreveu uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade FmtA de *Staphylococcus aureus* pertencente à mesma classe de beta-lactamase SEC-1, que confere suscetibilidade à meticilina e oxacilina reduzida (ZHAO et al., 2012), corroborando nossos dados.

Sulfazotrim é um antibiótico da classe das sulfonamidas que, atua na via de biossíntese do ácido fólico inibindo a dihidropteroato sintase, evitando desta forma, a síntese do 7,8-dihidropteroato a partir do 4-aminobenzoato, que por sua vez é transformado em 7,8-dihidrofolato. A cepa LBP UFSC 2230 tem anotado em seu genoma um transportador putativo de folato. Portanto, esta cepa é capaz de ingerir folato do ambiente e convertê-lo em 7,8-Diidrofolato sem envolvimento da diidropteroato sintase, mas em vez disso, usando diidrofolato redutase para converter folato em 5,6,7,8-Tetraidrofolato ou 7,8-Diidrofolato. Assim, a presença deste suposto transportador de folato e da enzima diidrofolato redutase descrita acima, poderia explicar o fenótipo de resistência ao sulfazotrim, que já foi descrito para outras bactérias lácticas no que diz respeito à resistência às sulfonamidas (KARAPETKOV et al., 2011).

Embora existam genes envolvidos na AR no genoma apresentado, a linhagem não apresentou plasmídeos, indicando que todos os determinantes da resistência estão localizados no cromossomo. Além disso, nenhum transposon clássico foi encontrado no genoma, mas duas transposases que codificam genes foram encontradas a 300 kb uma da outra com *fmtA-like* e várias ORFs codificando proteínas hipotéticas colocadas entre elas.

Esta não é a primeira vez em que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolado de alimentos, mostrou resistência a antibióticos. Campedelli et al. (2019) realizaram uma avaliação de amplo-gênero (*genus-wide assessment*) de AR em *Lactobacillus* spp. Os autores descreveram características de múltipla resistência e o envolvimento de elementos móveis, corroborando com nosso estudo em vários aspectos.

A base genética da AR permanece desconhecida, pois não foram identificados genes conhecidos que explicassem o fenótipo associado. Fatores intrínsecos, como a estrutura do envelope celular, podem explicar a insensibilidade inerente de algumas cepas a um determinado antibiótico. Segundo o estado da arte, a grande maioria dos *Lactobacillus* reprovou para as diretrizes da EFSA no que diz respeito à AR (TROEGELER-MEYNADIER; ENJALBERT, 2005). A cepa estudada neste trabalho é um desses casos. Juntos, estes dados, além da presença de inúmeros genes (pelo menos 40) que codificam proteínas de elementos móveis, indicam que o uso da cepa LBP UFSC 2230 como cultura iniciadora requer cautela.

4 CONCLUSÃO

A via metabólica responsável pela síntese de CLA em *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 permanece desconhecida, uma vez que apenas identificamos um gene que codifica uma das enzimas envolvidas na via da biohidrogenação do LA. Novos estudos serão realizados a fim de estabelecer o papel da oleato hidratase na produção de CLA nesta cepa. O uso de BAL como fonte de enzimas ou como hospedeiro heterólogo pode apresentar vantagens significativas na indústria de alimentos. Compreender essas BAL e suas enzimas permite a geração de novos produtos funcionais, apresentando uma grande oportunidade para a pesquisa e a indústria.

Em face do interesse na compreensão geral do metabolismo único de ácidos graxos em *Lactobacillus* spp., este trabalho contribuiu para o melhor entendimento da maquinaria responsável pela síntese de CLA em *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230. Nossos achados indicam

que *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 possui um sistema enzimático claramente distinto dos previamente relatados para a síntese de CLA em *Lactobacillus* spp., o que permitiria novas aplicações dessa bactéria nas áreas médica, nutricional e industrial.

No entanto, de acordo com o estudo de AR feito neste trabalho, o uso da cepa LBP UFSC 2230 como cultura iniciadora requer cautela, pois existe a possibilidade da existência de elementos móveis capazes de transferir determinantes de resistência para outros microorganismos, incluindo aqueles de importância médica.

**CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA OLEATO HIDRATASE
CATALISANDO A CONVERSÃO REVERSÍVEL ENTRE ÁCIDO LINOLEICO E
ÁCIDO RICINOLEICO EM *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC
2230**

RESUMO

Diversas espécies bacterianas capazes de converter eficientemente o LA em CLA têm sido amplamente relatadas na literatura, entre elas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230. Nos últimos anos, foi proposta a hipótese de um sistema enzimático multicomponente constituído por três enzimas que envolvem o processo de biohidrogenação do LA em *Lactobacillus*. Em trabalho recente, o sequenciamento do genoma de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 revelou apenas o gene capaz de codificar uma das enzimas, a oleato hidratase (OleH), ao contrário da presença de vários genes normalmente encontrados em cepas semelhantes. Este estudo investigou a função biológica da OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 e seu possível papel na produção de CLA. A OleH foi clonada, expressa, purificada e caracterizada. As análises de ácidos graxos foram feitas pelo método de padrão interno usando um sistema GC-FID. No presente estudo, foram investigados o efeito biológico da OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 e seu possível papel na produção de CLA. Verificou-se que a enzima é uma hidratase / desidratase, levando à transformação reversível entre LA e ácido ricinoleico demonstrando atividade na presença de FAD. Além disso, os resultados mostraram que a proteína OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 desempenha um papel na tolerância ao estresse em *E. coli*. Em conclusão, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 catalisa a etapa inicial do metabolismo de saturação do ácido linoleico, embora não tenha convertido os substratos diretamente em CLA.

ABSTRACT

Several bacterial species capable of efficiently converting LA into CLA have been widely reported in the literature, amongst them Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LBP UFSC 2230. Over the last few years, a multi-component enzymatic system consisting of three

enzymes involved in the biohydrogenation process of LA has been proposed. Sequencing the genome of L. bulgaricus LBP UFSC 2230 revealed only one gene capable of encoding an oleate hydratase (OleH), unlike the presence of multiple genes typically found in similar strains. This study investigated the biological function of OleH from L. bulgaricus LBP UFSC 2230 and its possible role in CLA production. The OleH was cloned, expressed, purified, and characterized. Fatty acids measurements were made by an internal standard method using a GC-FID system. The biological effect of the OleH enzyme of L. bulgaricus LBP UFSC 2230 on the hydration of LA and dehydration of ricinoleic acid and its possible role in the production of CLA were investigated. It was found that the enzyme is a hydratase / dehydratase, leading to a reversible transformation between LA and ricinoleic acid showing activity in the presence of FAD. In addition, the results showed that L. bulgaricus LBP UFSC 2230 OleH protein plays a role in stress tolerance in E. coli. In conclusion, the OleH of L. bulgaricus LBP UFSC 2230 catalyzes the initial stage of saturation metabolism of linoleic acid, although it has not converted the substrates directly into CLA.

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, as bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido utilizadas para a fermentação de produtos lácteos com o intuito de promoção da saúde (ALI, 2010). Isto se deve ao fato destes micro-organismos atuarem como fábricas celulares para a síntese de metabólitos secundários com propriedades funcionais, como a produção de ácido linoleico conjugado (CLA - do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*) (HAYES et al., 2007; KUHL et al., 2017; TABASHSUM et al., 2018).

CLA refere-se a um termo coletivo que descreve um grupo de isômeros posicionais e geométricos de ácido linoleico (*c*-9, 12-C18: 2, LA – do inglês, *Linoleic Acid*) com ligações duplas conjugadas (GARCIA et al., 2017). Existem 28 possíveis isômeros do CLA (TVRZICKA et al., 2011), dos quais a forma predominante é *c*9, *t*11-C18: 2 (JENSEN, 2002). Foi demonstrado que o isômero *c*9, *t*11-C18: 2 exerce efeitos biológicos no metabolismo humano, tais como anticarcinogênico, antidiabético, antiaterosclerótico, antiosteoporótico e estimulação do sistema imunológico (ANDO et al., 2016; PHILIPPAERTS et al., 2011).

Encontrados principalmente em produtos lácteos de ruminantes (RENES et al., 2017), os isômeros de CLA são produtos intermediários da biohidrogenação do LA em ácido esteárico (SERAFEIMIDOU et al., 2012). A biohidrogenação de LA em isômeros CLA foi relatada como um sistema enzimático multicomponente codificado no genoma dos *Lactobacillus* (KISHINO et al., 2011). Em estudo prévio, o sequenciamento do genoma de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230 mostrou apenas o gene capaz de codificar uma oleato hidratase (*oleH*) (KUHL et al., no prelo).

Em estudo anterior, nosso grupo rastreou uma variedade de BAL quanto à sua capacidade de produzir CLA a partir de LA. Selecionamos *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, uma vez que esta cepa apresentou potencial habilidade para sintetizar o isômero *c*9, *t*11-C18: 2 (KUHL et al., 2017). O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da proteína oleato hidratase (EC 4.2.1.53) de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 na biossíntese do isômero *c*9, *t*11-C18: 2, por meio da análise da atividade enzimática (*in vivo* e *in vitro*) da proteína expressa por hospedeiro heterólogo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 8. Cepas bacterianas utilizadas neste trabalho.

Espécie bacteriana	Cepa	Referência/Fonte
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LBP UFSC 2230	UPR ¹
<i>Lactobacillus paracasei</i>	NFBC 338	TEAGASC ²
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Hanahan (1983)
	BL21(DE3)	Studier e Moffatt (1986)
	One Shot TM TOP10	Invitrogen, Waltham, EUA

¹Proveniente da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da UNIPR (Parma - Itália), gentilmente cedidas

pelo grupo de pesquisa do Prof. Erasmo Neviani.² Proveniente da coleção de culturas do Centro de Pesquisa de Alimentos (*Food Research Centre*) do TEAGASC, Moorepark, Cork, Ireland, gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa da Prof.a Catherine Stanton.

L. bulgaricus LBP UFSC 2230 e *L. paracasei* NFBC 338 foram reativadas em caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 18 h a 37 °C sob condições anaeróbias. Quando necessário, o meio de cultura foi suplementado com eritromicina (7,5 µg/mL para *L. bulgaricus* e 0,5 µg/mL para *L. paracasei*). As cepas de *E. coli* foram cultivadas a 37 °C em meio Lysogeny Broth (LB, triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) ou 2 X TY (triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,5), sob agitação (200 rpm). Quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com os antibióticos canamicina (50 µg/mL) e/ou eritromicina (300 µg/mL).

2.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS

A Tabela 2 lista todos os oligonucleotídeos utilizados nos processos de amplificação e síntese de DNA realizados neste trabalho.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência Nucleotídica 5', 3'
OLEH_fw	TTTCATATGTATTATTCAAACGGTAATTACGAAGC
OLEH_rv01	TTTGTCGACTGACCAAAGAAAAGAGAAGCAATTTGC
OLEH_rv02	TTTGGGCCCTGACCAAAGAAAAGAGAAGCAATTTGC
HLBA_fw	TCTCGAGACTTCACCGGGACCCC
HLBA_rv	TAATTACCGTTTGAATAATACATGGAATTCACCTCCTATAAATTAGACTC
HLBA_Seq	CCATGTTTGCCTTTGAAAAGTGG

Nota: Os nucleotídeos sublinhados representam sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição *NdeI*, *SalI*, *ApaI*, e *XhoI* que foram adicionados aos oligonucleotídeos.

2.3 PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Os plasmídeos utilizados nas clonagens realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Característica	Fonte/Referência
pLEM415	Vetor replicativo em <i>Lactobacillus</i>	Serror et al. (2002)
pET-28a	Vetor bacteriano para expressão de proteínas marcadas com 6xHis N-terminal	Novagen, Darmstadt, Alemanha

2.4 ENSAIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO E TOLERÂNCIA AO LA

A taxa de crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi mensurada pelo aumento máximo na densidade óptica (D.O.) ao longo do tempo, durante o crescimento exponencial. O ensaio ocorreu em microplaca de microtitulação 96 poços fundo chato estéril (Kasvi, Curitiba, Brasil). O inóculo foi previamente reativado em meio MRS líquido a 37 °C até uma D.O. (600 nm) de 0,5. Para detectar a sensibilidade de exposição da bactéria às concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL de LA, 200 µL de suspensão bacteriana contendo LA foi inoculado em diferentes poços. Culturas sem suplementação de LA serviram como controle. As placas foram incubadas 37 °C em multileitor de placas (Spectramax Paradigm Molecular Devices, Sunnyvale, USA). O crescimento bacteriano foi avaliado por absorvância no comprimento de onda de 600 nm em intervalos de 1 hora.

A curva de crescimento microbiano foi expressa como o logaritmo Neperiano (ln) da concentração celular, expressos em absorvância (D.O. 600 nm) em função do tempo (h). A duração da fase exponencial de crescimento foi determinada como o intervalo de tempo correspondente ao trecho linear desta curva. Em seguida, aplicando-se regressão linear aos dados deste trecho, foi possível obter o valor do coeficiente angular desta reta, que representa o valor de velocidade específica máxima de crescimento [$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$] (AZAMBUJA, 2016). Para avaliar comparações múltiplas entre duas variáveis contínuas, uma regressão linear múltipla foi ajustada (funções lm e ANOVA em R) para dados de resposta contínua. O ajuste

e a análise da curva foram realizados no software GraphPad Prism, versão 7.00 (GraphPad software Inc, California, EUA).

2.5 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Antes de aplicar o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para determinar a CIM do marcador de seleção plasmidial (pLEM415) eritromicina, para *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, avaliou-se a solubilidade do antibiótico submetendo-o a quatro solventes distintos. Cinco diferentes concentrações (7,5 µg/mL; 15 µg/mL; 30 µg/mL; 60 µg/mL; 120 µg/mL) do antibiótico eritromicina foram testadas, a partir de soluções preparadas com os solventes acetona, etanol, metanol e ácido clorídrico (HCl) 2M (TABELA 4).

Tabela 4. Composição das soluções eritromicina/solvente para rastreabilidade da concentração inibitória mínima do antibiótico sobre o crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.

Volume de Eritromicina solução (µL)	Volume de solvente Solução (µL)				Concentração Eritromicina solução (µg/µL)	Concentração final de Eritromicina (µg/mL)	Volume de solvente em 1 µL de solução (µL)
	Acetona	Etanol	Metanol	HCl 2M			
4,5	145,5	145,5	145,5	145,5	1,5	7,5	0,97
9	141	141	141	141	3	15	0,94
18	132	132	132	132	6	30	0,88
36	114	114	114	114	12	60	0,85
72	78	78	78	78	24	120	0,71

Nota: Controle positivo = inóculo sem antibiótico. Controle negativo = MRS estéril.

Para determinar a CIM do marcador de seleção plasmidial (pLEM415) eritromicina para *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, uma única colônia foi inoculada em 5 mL de MRS líquido para preparo do pré-inóculo. Em seguida, placas de noventa e seis poços foram preparadas com 200 µL de inóculo a D.O. 0,1 (600nm), contendo o antibiótico nas concentrações 7,5; 15; 30; 60 e 120 µg/mL. Duzentos microlitros de inóculo sem antibiótico e

meio MRS estéril foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Três replicatas foram incubadas em multileitor de placas (Spectramax Paradigm Molecular Devices, Sunnyvale, EUA), por 18 h a 37 °C. A CIM foi definida como a concentração mais baixa com absorvância semelhante ao controle negativo.

2.6 TESTE PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PUTATIVA OLEATO HIDRATASE

2.6.1 Desenho dos iniciadores

As sequências dos oligonucleotídeos foram desenhadas utilizando o padrão específico de uso preferencial de códons pelas spp. *L. bulgaricus* (POUWELS; LEUNISSEN, 1994) e a construção dos oligonucleotídeos degenerados com base no Código IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) para especificação incompleta de ácido nucleico (JOHNSON, 2010). Para conseguir desenhar pares de oligonucleotídeos específicos, localizados numa região onde o molde de PCR não compartilhasse semelhança com alvos não intencionais, a sequência do molde de PCR foi submetida ao BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) para uma busca que permitisse identificar regiões altamente similares às sequências não intencionais no banco de dados especificado (YE et al., 2012).

2.6.2 Construção dos plasmídeos

O DNA genômico de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi isolado pelo Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Cinco oligonucleotídeos foram utilizados, com base na sequência genômica de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 (TABELA 2), para amplificar o gene *oleH* que codifica a putativa oleato hidratase (OleH) e o promotor *phlBA*, apropriado para expressão gênica constitutiva em *L. bulgaricus* (CHOUAYEKH et al., 2009). Para os ensaios de expressão heteróloga e homóloga, o gene *oleH* foi amplificado por PCR com os iniciadores OLEH_fw / OLEH_rv01 e OLEH_fw / OLEH_rv02 respectivamente. Os primers HLBA_fw / HLBA_rv foram usados para a amplificação por PCR do promotor *phlBA*. Um gene de fusão com *phlBA* e *oleH* foi construído por PCR usando os primers HLBA_fw / OLEH_rv02.

As reações de PCR ocorreram com a enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, EUA). A amplificação do gene que codifica a putativa oleato hidratase ocorreu num volume total de 25 µL contendo, 1 µL de DNA genômico como molde; 1,5 µL de MgCl₂ 25mM; 0,15 µL de enzima; 2,5 µL de tampão 10X; 0,5 mM de dNTPs 10mM e 0,5 µL de cada oligonucleotídeo. Os microtubos foram posicionados no termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e, as condições de reação estão descritas a seguir. Um ciclo de desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, anelamento de 45 s (T_m de acordo com cada combinação de iniciadores), extensão de 1 min 45 s a 72 °C e, por fim extensão final de 5 min a 72 °C.

As bases sublinhadas nas sequências dos oligonucleotídeos (TABELA 2) indicam os locais de reconhecimento de enzimas de restrição. Os produtos amplificados foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição correspondentes, seguidos por uma reação de ligação a 16 °C com T4 DNA ligase (Roche, Dublin, Irlanda) nos vetores de expressão pET-28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha) e pLEM415 (SERROR et al., 2002), resultando nas construções pOLEH e pLEM415-oleH.

Os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar *Escherichia coli* One Shot® TOP10 quimio-competente (Invitrogen, Waltham, EUA). A transformação da bactéria *E. coli* One Shot® TOP10 com os vetores pOLEH e pLEM415-oleH ocorreu por choque térmico seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Descongelou-se, em gelo, um tubo de 50 µL de células One Shot® TOP10 para cada transformação. Cinco microlitros de cada reação de ligação foram transferidos diretamente para o tubo contendo de células competentes. Após 30 minutos incubados em gelo, os tubos foram transferidos para um banho-maria a 42 °C, onde permaneceram incubados por 30 s. Em seguida os frascos foram novamente incubados em gelo por 2 min. Após o choque térmico, 250 µL de meio S.O.C. (2% p/v tryptone, 0.5% p/v de extrato de levedura, 8.56 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM de MgSO₄, 20 mm de glicose) pré-aquecido foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora a 225 rpm. A suspensão bacteriana foi espalhada em placas contendo LB ágar e os antibióticos de seleção de cada plasmídeo, e incubadas a 37 °C por 18h. As células positivas foram rastreadas em ágar LB com canamicina [50 µg/mL] e eritromicina [300 µg/mL] para selecionar pOLEH e pLEM415-oleH, respectivamente. O Kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda) foi

usado para isolar plasmídeos recombinantes de *E. coli* Top10, de acordo com as instruções do fabricante. A autenticidade dos clones foi verificada por sequenciamento (Genewiz, Alemanha).

O plasmídeo pOLEH possui no final do seu sítio múltiplo de clonagem a região para síntese de cauda de poli-histidina (His-Tag) que codifica para a formação de um bloco de seis histidinas em sequência, desta forma a proteína recombinante foi clonada fusionada com 6xHis-Tag (N-terminal). O plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) quimio-competente (SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Para o preparo das células competentes, 1 mL de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) previamente reativada, foi inoculado em 100 mL de meio de LB e incubado a 37 °C sob agitação (200 rpm) por aproximadamente 4 h, até que a cultura atingisse uma D.O. (600 nm) entre 0,2 - 0,4. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada (4000 rpm por 15 min, a 4 °C), o sedimento celular ressuspensionado em 5 mL de solução CaCl₂ 0,1 M e, mantido em banho de gelo. Após 2 - 4 h essa suspensão foi centrifugada a 4000 rpm, por 15 min a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspensionado em 5 mL de solução CaCl₂ contendo 15% de glicerol até que atingisse uma D.O. (600 nm) de 200 - 250. Alíquotas de 400 µL foram armazenadas a -80 °C. O choque térmico ocorreu conforme descrito anteriormente.

O plasmídeo pLEM415-oleH recombinante foi transformado em *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 eletrocompetente e *L. paracasei* NFBC 338. Células *Lactobacillus* spp. eletrocompetentes foram preparadas de acordo com Ryan et al. (2017) usando tampão de eletroporação SMEB 3,5X (sacarose 1 M, MgCl₂ 3,5 mM, pH 7,0). Um por cento v/v de um pré-inóculo previamente reativado foi adicionado à 100 mL de MRS e incubado a 37 °C por aproximadamente 5 h, até que atingisse uma D.O. (600 nm) de 0,5 - 0,8. Em seguida a suspensão bacteriana foi submetida a centrifugação (6000-8000 rpm por 15 min) e lavada 3 vezes com 100 mL de tampão de eletroporação SMEB. Antes da última centrifugação, o sedimento celular ressuspensionado em 40 mL de tampão permaneceu 20 min em banho de gelo. Após a centrifugação as células foram ressuspensionadas em 1 mL de tampão. Uma alíquota de reação de ligação (1/10 do volume celular) foi adicionada à 200 µL de células eletrocompetentes e transferidas para uma cubeta de 0,2 cm resfriada.

A transformação ocorreu em eletroporador Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As amostras foram submetidas a um pulso de 2,45 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1,5 mL de meio MRS foi acrescido às

células e incubado a 37°C em anaerobiose, por 18h. Diluições de 10⁻², 10⁻⁴ e 10⁻⁶ foram semeadas em meio MRS ágar suplementado com eritromicina (7,5 µg/mL ou 0,5 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 48 h, sob condições de anaerobiose.

2.7 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA PUTATIVA DE *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 OLEH RECOMBINANTE DE *E. coli* BL21 (DE3)

Para os ensaios enzimáticos, a proteína OleH putativa recombinante foi produzida em *E. coli* BL21 (DE3) como uma fusão N-terminal 6x-His-tag. Caldo LB (100 ml) contendo canamicina (50 µg/ml), foi inoculado com uma cultura recém-cultivada de *E. coli* BL21 (DE3) hospedando o plasmídeo de expressão de oleato hidratase. Depois de cultivada a 37 °C até que atingisse uma D.O. de 0,6, a cultura foi induzida com IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) 0,5 mM a 37 °C e agitação (200 rpm). Após 4 h de tempo de indução, as células foram precipitadas por centrifugação (10 min a 6.000 × g).

Para a extração da proteína, as células foram lavadas duas vezes com 20 mL de tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,0). Os lisados foram obtidos suspendendo o sedimento celular em 16 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, 0,1 mg/mL de lisozima, 0,1 mg /mL de DNase). Após 1h de incubação a 4 °C, a suspensão celular foi sonicada com rajadas de 10 × 30 s em amplitude de 16 µm e, precipitada por centrifugação (6.000 × g a 4 °C por 10 min). O sobrenadante foi filtrado através de filtros de membrana de 0,45 µm e a proteína OleH recombinante marcada com His-Tag foi purificada por cromatografia de afinidade usando cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC – do inglês, *Fast protein liquid chromatography*, purificador AKTA, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) carregado em uma coluna HisTrap™ FF (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Um gradiente linear de tampão de eluição (Kit His-Buffer, fosfato de sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 500 mM, pH 7.4, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foi aplicado para 25 volumes de coluna. As frações de pico contendo a proteína desejada foram reunidas e analisadas por SDS-PAGE. Um gel de SDS pré-moldado TruPAGE a 10% (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda) foi usado para separação de proteínas e as amostras foram coradas com corante Coomassie Brilliant Blue G250 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanha). As frações ativas foram coletadas e dialisadas contra tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). A etapa de diálise foi realizada em câmara fria a 4 °C utilizando o sistema Pur-A-Lyzer Mega

Dialysis Kit (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda). Após a diálise, a solução foi usada como enzima purificada. A concentração de proteína foi determinada pelo procedimento Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda), de acordo com as informações do produto.

2.7.1 Immunoblotting

A proteína purificada foi submetida a SDS PAGE seguida pela transferência da proteína para a membrana de nitrocelulose a 25V por 2h. A membrana foi lavada com tampão TBS-T (1X TBE, Tween 20 0,1%) e bloqueada durante uma hora em tampão TBS-T contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. As proteínas marcadas com His-Tag foram detectadas usando anticorpo anti-His-Tag (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em combinação com um anticorpo secundário, ambos diluídos em tampão BSA (1X TBE, 0,1% Tween 20, 5% BSA). A membrana foi lavada três vezes com tampão TBS-T e duas vezes com tampão TBS (1X TBE). As bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência usando o Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

2.7.2 Sequenciamento da proteína

A protease de tripsina de grau MS (Pierce, Rockford, EUA) foi dissolvida em ácido acético 50 mM a uma concentração final de 10 ng/ μ L. A reação de digestão foi realizada a 37 °C por 16 h e consistiu em 3 μ L de solução de tripsina, 10 μ L de OleH, seguido pela adição de 10 μ L de bicarbonato de amônio 0,5 mM. A espectrometria de massa foi realizada na OleH digerida com um espectrômetro de massa Axima TOF2 MALDI-TOF (Shimadzu Biotech, Manchester, Reino Unido). Uma alíquota de 0,5 μ L de solução tampão [ácido α -ciano 4-hidroxicinâmico, 10 mg/ml em 50% de acetonitrila-0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético] foi depositada na proteína alvo e deixada por 5 segundos antes de ser removida. A solução residual secou ao ambiente e 0,5 μ L da solução de amostra foi depositado no ponto de amostra pré-revestido. Uma alíquota de 0,5 μ L de solução tampão foi adicionada à amostra depositada e deixada secar ao ambiente. A amostra foi subsequentemente analisada no modo de refletor de íon positivo. A identificação da proteína foi realizada por meio de Impressão Digital do Peptídeo (PMF – do inglês *Peptide Mass Fingerprinting*) usando o mecanismo de

busca Mascot (<http://www.matrix-science.com>). Os dados de íon positivo monoisotópico +/- 0,25 Da foram pesquisados usando os seguintes parâmetros: banco de dados NCBIInr ou Swiss Prot, taxonomia de todas as entradas, digestão de tripsina com uma clivagem perdida.

2.8 MODELAGEM DE HOMOLOGIA E *DOCKING* MOLECULAR DA PROTEÍNA OLEATO HIDRATASE DE *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230

O modelo 3D da oleato hidratase de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi obtido por modelagem de homologia usando o servidor SWISS-MODEL (WATERHOUSE et al., 2018), com base na estrutura cristalográfica da hidratase de *Lactobacillus acidophilus* ligada ao LA [PDB (do inglês, *protein data bank*) ID: 4IA6, resolução: 1,80 Å] com identidade de sequência de 72,3%. Com a finalidade de avaliar a qualidade da estrutura do modelo, foram considerados os parâmetros QMEAN4 (máximo: -3,5), GMQE (valores próximos de 1), cobertura maior que 95% e valores de C β , solvatação e torção (mais positivo ou próximo de zero). PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) foi usado para verificar a confiabilidade dos modelos 3D. O programa CASTp (TIAN et al., 2018) foi usado para calcular os sítios das cavidades no modelo 3D com uma sonda de raio de 1,3 angstroms. Túneis e acessos foram mapeados usando o software CAVER 3.0 (CHOVANCOVA et al., 2012).

Após o cálculo das conformações 3D e padronização da estrutura enzimática, foi realizado um experimento de *docking in silico* no programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2009). Para tanto, as caixas foram construídas no *software* Chimera (PETTERSEN et al., 2004), com base nas previsões de cavidades e bolsos atribuídos por Volkov et al. (2013). Os ligantes testados foram obtidos a partir do banco de dados ZINC (Sterling; Irwin, 2005), ácido linoleico (ZINC4474613) carga líquida -1, ácido ricinoleico (RA, ácido 12-hidroxi-octadecenóico, 12-HOE), (ZINC3875925) carga líquida -1 e, FAD (ZINC8215434) carga líquida -3. A posição de encaixe mais estável (para cada ligante) foi selecionada de acordo com sua posição no bolso de ligação, a energia mais baixa, aptidão total e ΔG no programa Chimera (versão 1.12.2). As posições de *docking* analisadas foram selecionadas considerando afinidade de ligação, ΔG e posição no bolso de ligação, usando o programa PyMOL (SCHRÖDINGER, 2017). As interações entre os resíduos e os ligantes foram identificadas por meio do programa LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). As posições de encaixe foram comparadas com a localização do ligante correspondente

na estrutura experimental e teve o RMSD (desvio médio quadrático – do inglês, *root-mean-square deviation*) de posições encaixadas calculado pelo servidor DockRMSD (BELL; ZHANG, 2019) e programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

2.9 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO LINOLEICO POR *E. coli* BL21 (DE3) E *L. paracasei* NFBC 338 SUPEREXPRESSANDO OleH

O LA foi preparado como solução *stock*, de acordo com Van Nieuwenhove et al. (2007). A solução foi preparada com uma concentração de 30 mg/mL de LA 99% puro (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda) em 40 mL de LB com adição de 1% (v/v) de Tween 80 (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda), para melhor solubilização. Para avaliar o potencial inibitório e habilidade da cepa *E. coli* BL21 (DE3) superexpressando a enzima OleH, em crescer na presença de LA, uma alíquota da cultura previamente reativada foi inoculada em caldo LB até atingir uma D.O. de 0,5. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de LA (0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL) e canamicina (50 µg/mL) e, incubados durante 12h a 37°C, sob agitação (200 rpm). A cultura foi induzida com IPTG 0,5 mM. Por sua incapacidade de produzir *c9, t11-C18:2*, a cepa recombinante de *L. paracasei* NFBC 338, foi avaliada pelo potencial inibitório e habilidade em crescer na presença de LA, sob as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL. Uma alíquota da cultura previamente reativada foi inoculada em caldo MRS contendo eritromicina até atingir uma D.O. de 0,5. Os meios foram suplementados com as diferentes concentrações de LA e incubados durante 12h a 37°C, sob condições anaeróbias.

O crescimento das cepas foi determinado por espectrofotometria (D.O. 600 nm). A curva de crescimento microbiano, o ajuste e a análise da curva foram realizados no software GraphPad Prism, versão 7.00 (GraphPad software Inc, California, USA).

2.10 EFEITOS DA TEMPERATURA E DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA

O efeito do pH na estabilidade da proteína OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi avaliado por troca de tampão, dialisando a proteína purificada contra tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 150 mM, pH 7,5 ou tampão fosfato de

sódio 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 8,0. Para investigar o efeito da temperatura na estabilidade da OleH, a enzima foi incubada em diferentes temperaturas variando de 25 a 37 °C.

2.11 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

A capacidade dos isolados de converter LA e RA (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda) em CLA foi realizada em triplicata conforme descrito a seguir. As condições de reação consistiram em 1 mL de mistura de reação (tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0) contendo 0,75 mg/mL de OleH purificada, FAD 20 µM, ácido graxo insaturado individual 10 mM e 2% (v/v) de etanol. As reações foram incubadas anaerobicamente a 37°C por 15, 30, 45 e 60 min. Dois controles negativos foram usados consistindo em todos os componentes exceto substratos e todos os componentes exceto a proteína purificada. Para determinar o efeito do potencial cofator FAD, como controles, as mesmas reações descritas acima foram realizadas sem FAD.

2.12 BIOTRANSFORMAÇÃO DE LA E RA

A biocatálise de células inteiras foi realizada com base no trabalho de Fibinger et al. (2016), com modificações. A *E. coli* BL21 (DE3) recombinante foi cultivada em meio LB (50 µg/mL de canamicina) a 37 °C com agitação a 200 rpm. A expressão do gene alvo foi induzida conforme descrito anteriormente. Dois mililitros das culturas de células foram lavados com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 [esterilizado por filtro (0,22 µm)] e ressuspendidos em 1 mL do mesmo tampão. As reações de biotransformação foram conduzidas incubando suspensões de células com 10 mM LA ou RA emulsionados com 2% (p/v) de Tween 80 a 37°C. Para fins de controle negativo, *E. coli* BL21 (DE3) carregando o vetor vazio foi submetido às mesmas condições de reação.

2.13 ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Antes da extração de lipídios, o ácido tridecanóico C13:0 (99% puro; Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda) foi adicionado à mistura de reação como um padrão interno. Os lipídios foram extraídos de 1 mL das misturas de reação usando hexano:isopropanol de acordo com

Coakley et al. (2003) e, então concentrada sob uma corrente de nitrogênio a 45°C. Os lipídios resultantes foram metilados conforme descrito por Stanton et al. (1997), com 4% de HCl metanólico em metanol (v/v) a 50°C por 20 min. Após adição de 2 mL de água saturada com hexano, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – do inglês, *fatty acid methyl ester*) resultantes foram extraídos com 5 mL de hexano.

A análise dos FAME foi realizada por cromatografia gasosa (CG) em um cromatógrafo de gás Agilent 7890B, equipado com uma coluna capilar Select FAME (100 m × 250 µm I.D., espessura de fase de 0,25 µm, número da peça: CP7420, Agilent Technologies), um amostrador automático GC80 (Agilent Technologies, Little Island, Cork, Ireland) e um detector de ionização de chama. O injetor foi mantido a 250 °C durante toda a execução e modo *split* com razão 1:10, e o volume de injeção foi de 1 µL. O forno da coluna foi mantido a 80 °C durante 8 min e aumentado para 200 °C a 8,5 °C/min e mantido durante 55 min. O tempo total de execução foi de 77,12 min.

O detector de ionização de chama foi operado a 300 °C. O gás de arraste foi o hélio e foi mantido a um fluxo constante de 1,0 mL/min. Os resultados foram processados usando o *software* OpenLab CDS Chemstation edition versão Rev.C.01.05 (Agilent Technologies). Curvas padrão para análise FAME junto com amostras de controle de qualidade em execução foram preparadas usando um instrumento Agilent 7696A Sample Prep Workbench (Agilent Technologies). A mistura padrão de CLA *c*-9, *t*-11 C18: 2 e *t*-10, *c*-12 C18: 2 (nº cat. UC-59M) foi adquirida a Nu-Chek Prep Inc. (Elysian, MN). A mistura padrão de triglicéridos FAME contendo ésteres metílicos C18: 0 a C20: 0 (nº cat. 18916-1 AMP) e o ácido tridecanóico padrão interno (nº cat. T0502), foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

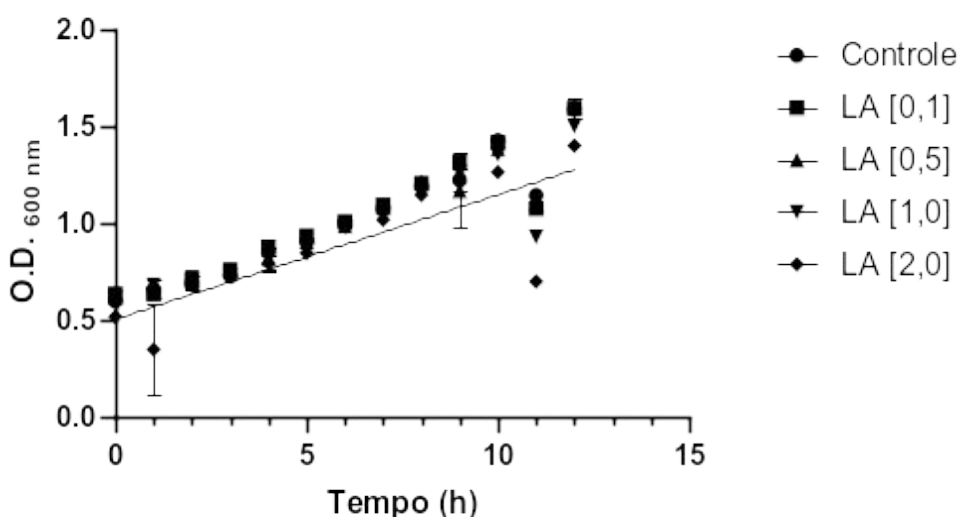
3 RESULTADOS

3.1 ENSAIOS DE CRESCIMENTO BACTERIANO E TOLERÂNCIA AO LA

O objetivo deste ensaio foi caracterizar os parâmetros da taxa de crescimento específico máximo (μ_{max}) e detectar a concentração de LA que influencia a taxa de crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230. De acordo com o μ_{max} , houve uma interferência parcial do LA no crescimento bacteriano em todas as concentrações testadas. Apesar disso, a diferença na taxa de crescimento entre a concentração máxima (2 mg/mL LA)

e o controle, foi estatisticamente significativa (ANOVA, $P < 0,0001$). O efeito da concentração de LA na taxa de crescimento está ilustrado na Figura 1. O μ_{max} diminuiu ligeiramente quando a concentração de LA aumentou de 0 para 2 mg/mL.

Figura 1. Efeito da concentração de ácido linoleico na taxa de crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.



Legenda: LA = ácido linoleico; Controle = sem adição de LA. Equações de regressão linear, em que: Controle, $Y = 0,07519 \cdot X + 0,5536$, $r = 0,9118$; [0,1], $Y = 0,07298 \cdot X + 0,5801$, $r = 0,8733$; [0,5], $Y = 0,07203 \cdot X + 0,5663$, $r = 0,8698$; [1,0], $Y = 0,06338 \cdot X + 0,5948$, $r = 0,7962$; [2,0], $Y = 0,06446 \cdot X + 0,5071$, $r = 0,6422$.

O nível de tolerância aos ácidos graxos poliinsaturados livres é diferente dependendo do micro-organismo e suas condições de crescimento (SALSINHA et al., 2018) e, segundo Coakley et al. (2003) as cepas podem variar em sua tolerância. Com relação à tolerância ao LA por *Lactobacillus* sp., alguns autores relataram diferentes concentrações inibitórias do crescimento bacteriano, variando de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 5 mg/mL (COAKLEY et al., 2003; FONTES et al., 2018; TAPIA et al., 2019; VAN NIEUWENHOVE et al., 2007).

Embora os resultados tenham mostrado que o LA adicionado não inibiu por completo o crescimento de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, vários estudos relataram que o LA (além de outros ácidos graxos poliinsaturados) pode ser tóxico e fator de estresse para muitas células bacterianas, causando inibição do crescimento e deterioração da membrana celular e

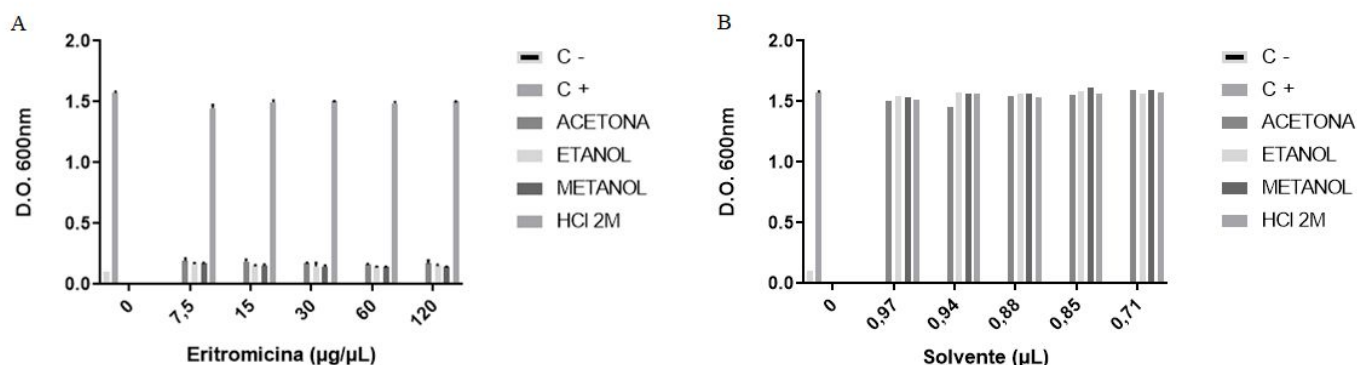
bloqueando a biossíntese de ácidos graxos nativos por meio da inibição da enzima enoil-ACP redutase (COAKLEY et al., 2003; GREENWAY; DYKE, 1979). Neste sentido, Liu et al. (2011) sugeriram uma triagem para identificar cepas bacterianas mais tolerantes ao LA, como um parâmetro para considerar a síntese de CLA.

3.2 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O objetivo deste experimento foi determinar a CIM do antibiótico eritromicina, devido a marca de seleção do plasmídeo pLEM415 conter o gene de resistência a este antibiótico (SERROR et al., 2002). O sistema automatizado de espectrofotômetro com multileitor de placas permitiu testar todas as concentrações propostas, monitorando a acumulação de biomassa em um período de 18 h.

Todos os solventes testados demonstraram ação diluente sobre o antibiótico eritromicina, exceto o HCl 2M. A susceptibilidade antibacteriana foi testada usando diferentes concentrações do antibiótico (7,5 µg/µL; 15 µg/µL; 30 µg/µL; 60 µg/µL; 120 µg/µL) (FIGURA 2 A) e solventes (0,97 µL; 0,94 µL; 0,88 µL; 0,85 µL; 0,71 µL) (FIGURA 2 B). A atividade antibacteriana mostrou-se presente desde a menor concentração de eritromicina, e não houve inibição do crescimento bacteriano a partir dos solventes testados puros.

Figura 2. Sensibilidade antibacteriana ao antibiótico eritromicina pela cepa *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.



Legenda: A = Crescimento bacteriano em função da concentração de eritromicina. B = Crescimento bacteriano em função da concentração de solvente. Onde, C - = Branco (meio MRS estéril); C + = Controle positivo (inóculo sem antibiótico).

Ao comparar as diferentes concentrações do antibiótico, quando diluído pelo mesmo solvente, os valores de crescimento bacteriano não apresentaram diferenças significativas. No entanto, comparando-se a mesma concentração entre soluções preparadas com solventes distintos, o HCl 2M revelou uma diferença significativa ($P < 0,0001$) em relação aos demais solventes testados, em todas as doses aplicadas. Quanto aos grupos controle, ao comparar as D.O. dos solventes às do controle positivo (C +), todas as concentrações de cada solvente (exceto HCl 2M) apresentaram diferenças significativas ($P < 0,0001$). Em contrapartida, quando comparadas ao controle negativo (C -), o comportamento foi o inverso (TABELA 5).

Tabela 5. Comparação entre os valores de absorvância correspondente ao crescimento bacteriano da linhagem LBP UFSC 2230.

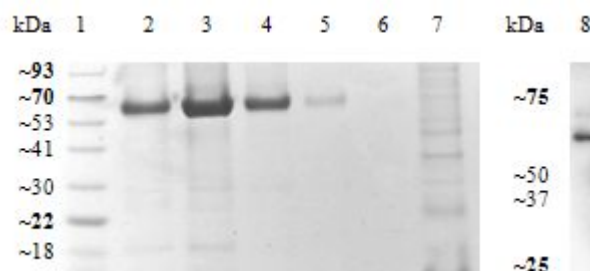
Eritromicina ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Acetona	Etanol	Metanol	HCl 2M
7,5	0,194 \pm 0,018 ^{Aa}	0,170 \pm 0,006 ^{Aa}	0,173 \pm 0,005 ^{Aa}	1,449 \pm 0,027 ^{Bb}
15	0,189 \pm 0,013 ^{Aa}	0,156 \pm 0,001 ^{Aa}	0,157 \pm 0,006 ^{Aa}	1,500 \pm 0,011 ^{Bb}
30	0,175 \pm 0,005 ^{Aa}	0,148 \pm 0,030 ^{Aa}	0,148 \pm 0,009 ^{Aa}	1,502 \pm 0,003 ^{Bb}
60	0,166 \pm 0,003 ^{Aa}	0,142 \pm 0,004 ^{Aa}	0,143 \pm 0,002 ^{Aa}	1,487 \pm 0,011 ^{Bb}
120	0,171 \pm 0,026 ^{Aa}	0,154 \pm 0,006 ^{Aa}	0,143 \pm 0,003 ^{Aa}	1,501 \pm 0,002 ^{Bb}

Legenda: Médias de duas repetições \pm DP seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem ($p < 0,0001$) pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. C+ (inóculo sem antibiótico) = 1,572 \pm 0,010^{Bb}, média de quatro repetições \pm DP. C- (MRS estéril) = 0,100 \pm 0,000^{Aa}, média de quatro repetições \pm DP.

3.3 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA OLEATO HIDRATASE PUTATIVA DE *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230

A ORF da putativa oleato hidratase foi clonada no plasmídeo pET28a (Novagen, Darmstadt, Alemanha) e expresso em *E. coli* BL21 (DE3) usando o sistema T7. A sequência de nucleotídeos completa de 1776 pb de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 codificou uma proteína de 591 aminoácidos. A comparação do banco de dados de sequências de aminoácidos revelou que a proteína putativa OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 é 100% idêntica à sequência homóloga de *L. bulgaricus* KW14_3 (GenBank: WP_129335718.1). A fração solúvel do extrato bruto foi eluída através da coluna HisTrap™ FF por um gradiente linear de imidazol (Figura 3). A proteína purificada exibiu uma única banda de aproximadamente 67 kDa correspondendo ao peso molecular esperado da proteína putativa OleH. A detecção por imunotransferência da proteína marcada com His-Tag através de anticorpo anti-His-Tag confirmou a presença de proteína solúvel (FIGURA 3). A OleH purificada foi usada para o sequenciamento da proteína.

Figura 3. Análise SDS-PAGE da proteína OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 purificada na coluna HisTrap™ FF.



Legenda: Coluna 1= marcador de peso molecular; Coluna 2= proteína OleH marcada com His eluída, imidazol 100 mM; Coluna 3= proteína OleH marcada com His eluída, imidazol 200 mM; Coluna 4= Proteína OleH marcada com His eluída, imidazol 300 mM; Coluna 5= proteína OleH marcada com His eluída, imidazol 400 mM; Coluna 6= proteína OleH marcada com His eluída, imidazol 500 mM; Coluna 7= extrato bruto de cultura controle de *E. coli* BL21 (DE3) não induzida por IPTG; Coluna 8= Falta de degradação proteolítica em OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 purificada e precisão do immunoblot com análise de anticorpo anti-His-Tag.

3.4 SEQUENCIAMENTO DA PROTEÍNA

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-ToF MS) foi aplicada para identificação da proteína. De acordo com o banco de dados NCBIprot, a proteína recombinante foi identificada como oleato hidratase de *Lactobacillus delbrueckii*, com massa molecular de 67,560 kDa, ponto isoelétrico (pI) 5,25, cobertura de sequência de 34% (a proporção da sequência da porção coberta pelo peptídeo correspondente para o comprimento total da sequência da proteína), PMF 17 (o número de peptídeos correspondentes resultantes da impressão digital em massa de peptídeos), pontuação 201 [pontuação é $-10 * \text{Log}(P)$, onde P é a probabilidade de que a correspondência observada é um evento aleatório] o valor de P é $p < 0,05$.

3.5 MODELAGEM DE HOMOLOGIA E DOCKING MOLECULAR DA PROTEÍNA OLEATO HIDRATASE DE *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230

Para avaliar as propensões de ligação do ligante à OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, um modelo de homologia 3D foi construído usando o melhor resultado de PDB como um modelo (PDB ID 4IA6 de *Lactobacillus acidophilus*) com 73% de identidade de sequência. Uma sobreposição do modelo de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 com o modelo 4IA6, mostrou um modelo de alta qualidade com um desvio quadrado médio da raiz do esqueleto de 0,29 Å. O modelo 3D foi submetido à avaliação da qualidade estrutural e validado para as posições dos ângulos de torção *psi* (ψ) e *phi* (ϕ) (que determinam a conformação do esqueleto) usando o gráfico de Ramachandran. A análise revelou que 90,3% dos resíduos do modelo construído foram alocados nas regiões mais favorecidas, indicando alta qualidade da estrutura prevista.

O modelo estrutural foi usado para previsão de ligação ao ligante por meio de análise de *docking* molecular. A interação de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 com os ácidos graxos (LA e RA) e FAD foi avaliada pela estimativa de ΔG (dados de energia livre, Tabela 6). Duas cavidades foram mapeadas no modelo da proteína OleH 3D (denominado como cavidade A e B, Figura 4A). Os locais de ligação dos ácidos graxos foram identificados nas duas cavidades e o local de ligação do FAD foi encaixado apenas na cavidade B. Quando os

locais de ligação dos ácidos graxos foram analisados, a afinidade geral na cavidade B (Tabela 6; Figura 4C, F) apresentou valores ΔG mais baixos (-6,9 kcal/mol) do que na cavidade A (cerca de -5 kcal/mol). Os valores mais baixos de ΔG foram relacionados às interações polares entre o doador de hidrogênio Y411 e os grupos de cabeça polar do ácido graxo (Figura 4C, F). Além do ΔG inferior, sem contatos polares para ligação de ácidos graxos na cavidade A, os valores encontrados foram semelhantes ao controle LA na estrutura cristalizada 4IAG (Tabela 6). Ao comparar LA e RA, não foram observadas diferenças relevantes no ΔG . O sítio de ligação FAD de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 mapeado apresentou ΔG semelhante à estrutura de cristal de controle de FAD 2B9W (em torno de -11 kcal/mol). O sítio de ligação envolveu interações polares com os resíduos T²⁸⁸ e S³¹⁴ (relacionados ao anel de açúcar); L³², ligação de hidrogênio com flavina em isoaloxazina oxigênio; I²⁹² e Q²²⁴ foram associados à fração de fosfato FAD, e T⁵⁰⁸ e N⁴⁹⁶ ligação de hidrogênio à ponte entre a flavina e os fosfatos.

Tabela 6. Estimativa de ΔG e interações de resíduos da análise de *docking* molecular no modelo de homologia 3D de OleH.

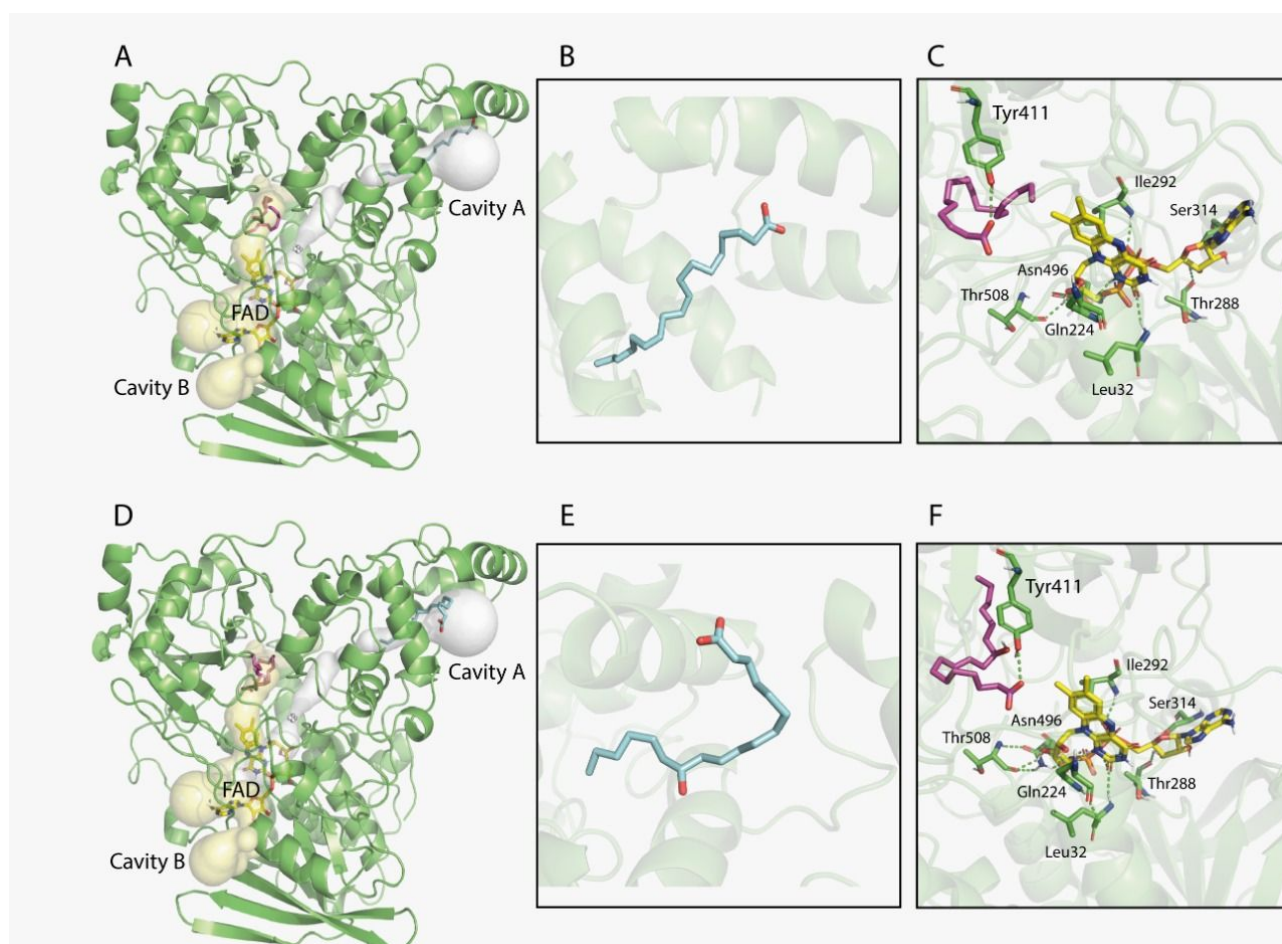
Ligante	Nome da cavidade	ΔG (kcal/mol)	Contatos polares	Contatos apolares
	Ca			
LA (4IA6)*	controle A	-5.5 **	-	I ¹⁴⁹ , I ¹⁵³ , M ¹⁵⁴ , I ²⁰⁵ , M ⁵⁴⁷ , M ⁵⁵⁰
FAD (2B9W)*	controle B	-11.5 **	A ¹⁷ , K ⁴⁵ , M ⁶² , F ⁴⁰⁸	I ¹² , G ¹³ , A ¹⁴ , G ¹⁵ , P ¹⁶ , L ³⁶ , E ³⁷ , R ³⁸ , T ³⁹ , G ⁴⁴ , M ⁵⁸ , G ⁵⁹ , A ⁶⁰ , Y ⁶⁷ , V ²⁵⁴ , Y ²⁸¹ , V ²⁸³ , W ³⁶⁸ , Y ³⁷⁰ , Y ³⁸² , G ⁴⁰⁰ , E ⁴⁰¹ , G ⁴⁰⁶ , N ⁴⁰⁷ , V ⁴¹¹
Ácido Linoleico	A	-5.1	-	I ¹⁴⁹ , V ¹⁵⁰ , I ¹⁵³ , A ²⁰¹ ,

(LA)				I ²⁰⁵ , I ²⁰⁸ , L ⁵⁴³ , T ⁵⁴⁷ , L ⁵⁵⁰ , I ⁵⁵⁶ , V ⁵⁶⁸ , A ⁵⁷¹ , M ⁵⁷²
	B	-6.9	Y ⁴¹¹	G ⁸⁰ , R ⁸¹ , E ⁸² , T ¹⁸⁴ , M ¹⁸⁵ , A ¹⁸⁷ , F ²¹⁹ , W ³⁴³ , I ³⁷⁸ , H ³⁹³ , W ⁴⁰⁹ , F ⁵⁰⁷
Ácido ricinoleico (RA)	A	- 5.0	-	I ¹⁴⁹ , V ¹⁵⁰ , K ¹⁵¹ , I ¹⁵³ , M ¹⁵⁴ , A ²⁰¹ , I ²⁰⁵ , I ²⁰⁸ , A ⁵⁴⁶ , L ⁵⁵⁰ , L ⁵⁶¹ , P ⁵⁶⁴
	B	-6.9	Y ⁴¹¹	G ⁸⁰ , R ⁸¹ , E ⁸² , T ¹⁸⁴ , M ¹⁸⁵ , L ²¹⁷ , F ²¹⁹ , W ³⁴³ , G ³⁷⁷ , I ³⁷⁸ , T ³⁹¹ , H ³⁹³ , L ⁴¹³
FAD	B	-11.1	L ³² , Q ²²⁴ , T ²⁸⁸ , I ²⁹² , S ³¹⁴ , N ⁴⁹⁶ , T ⁵⁰⁸	G ³¹ , A ³³ , E ⁵⁷ , G ⁷⁹ , I ⁷⁶ , I ⁷⁷ , G ²⁹⁰ , S ²⁹¹ , V ²⁹³ , Y ⁴⁷¹ , G ⁴⁹⁵ , T ⁵⁰⁹ , S ⁵¹²

* Os contatos de interação apresentados foram mapeados a partir das estruturas cristalinas 4IA6 e 2B9W usando LigPlot (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

** Os valores de afinidade foram estimados a partir do *re-docking* do ligante usando as estruturas cristalinas 4IA6 e 2B9W.

Figura 4. Modelagem de homologia 3D e *docking* molecular de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.



Legenda: Os painéis A, B e C representam a ligação do ácido linoleico (LA) e D, E e F, a ligação do ácido ricinoleico (RA). Em A e D, o modelo 3D geral mostra a dobra de oleato hidratase. As cavidades A e B foram representadas por túneis de acesso interno mapeados pelo *software* CAVER (Gora et al., 2012) em branco e amarelo, respectivamente. No painel B, uma visão aproximada do LA ligado à cavidade A (ΔG -5,1 kcal/mol). Em C, visão ampliada do LA (magenta) e FAD (amarelo) ligados à cavidade B (ΔG -6,9 e -11,1 kcal/mol,

respectivamente). Resíduos de contato polar foram representados em limites verdes e de hidrogênio por linhas tracejadas. O *software* PyMol (SCHRÖDINGER, 2017) foi usado para gerar imagens de estrutura 3D.

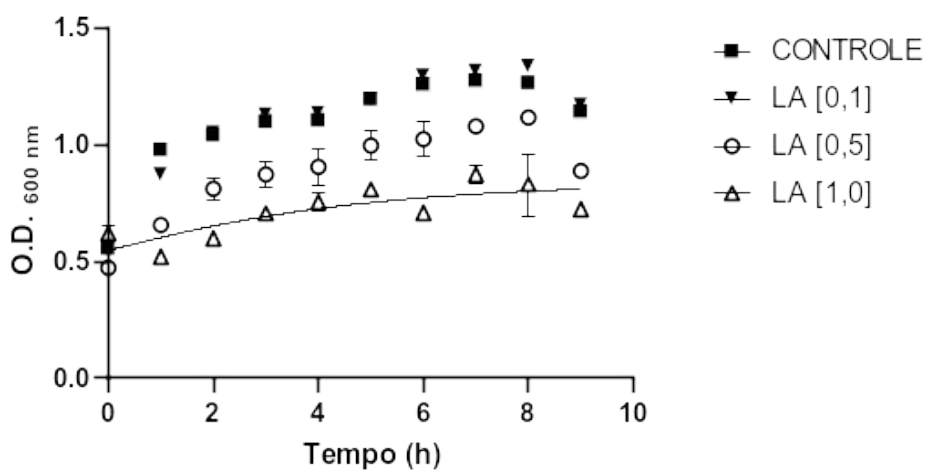
3.6 TESTE DE TOLERÂNCIA AO ÁCIDO LINOLEICO PELAS CEPAS RECOMBINANTES

Este ensaio foi realizado para avaliar a cinética de crescimento das cepas recombinantes que superexpressam a enzima OleH em meio enriquecido com LA. Para determinar se a superexpressão de *oleH* pelas cepas *E. coli* BL21 (DE3) e *L. paracasei* NFBC 338 aumentou sua tolerância ao LA, investigou-se a capacidade das bactérias em crescer na presença de diferentes concentrações de LA. As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) não induzida por IPTG, e *L. paracasei* NFBC 338 com o plasmídeo vazio, serviram como controles negativos. As culturas sem suplementação de LA serviram como controle positivo.

3.6.1 *E. coli* BL21 (DE3) superexpressando OleH

Para avaliar a tolerância de *E. coli* BL21 (DE3) superexpressando OleH ao LA, a capacidade de crescimento da cultura foi avaliada em caldo LB suplementado com 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL de LA. Durante esta experiência preliminar, em que não houve a indução por IPTG, verificou-se que o crescimento em meio enriquecido com 0,1 mg/mL de LA não apresentou diferença significativa em comparação com o controle positivo. No entanto, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL de LA, o crescimento foi significativamente diferente ($p < 0,0001$) em comparação com o controle positivo, indicando que a concentração inibitória começa na concentração de 0,5 mg/mL de LA (FIGURA 5).

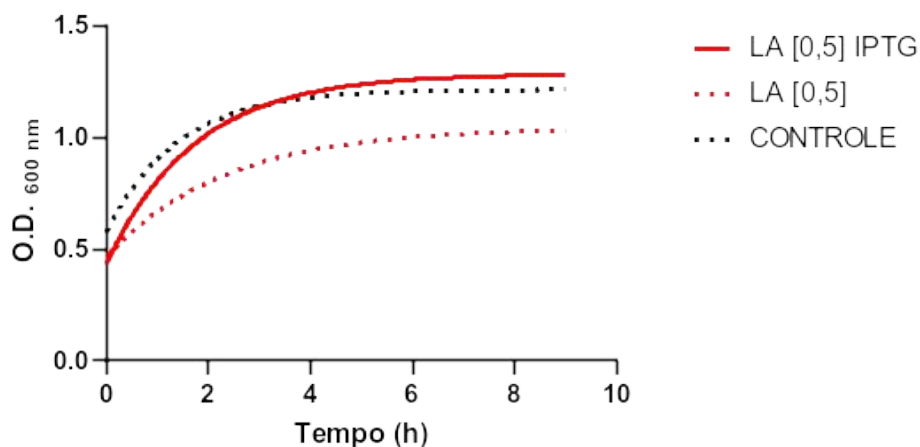
Figura 5. Curva de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) em caldo LB com suplementação de LA.



Legenda: LA = ácido linoleico; Controle = sem adição de LA.

Quanto às amostras induzidas com IPTG, ou seja, superexpressando a oleato hidratase, no cultivo contendo 0,5 mg/mL de LA. A variação de crescimento entre os tratados com IPTG e o controle positivo não diferiu significativamente. Em comparação com o controle negativo, a diferença foi significativa ($p < 0,0001$). Esses dados sugerem que a presença de OleH no meio aumentou a tolerância ao LA pela cultura nesta concentração (FIGURA 6).

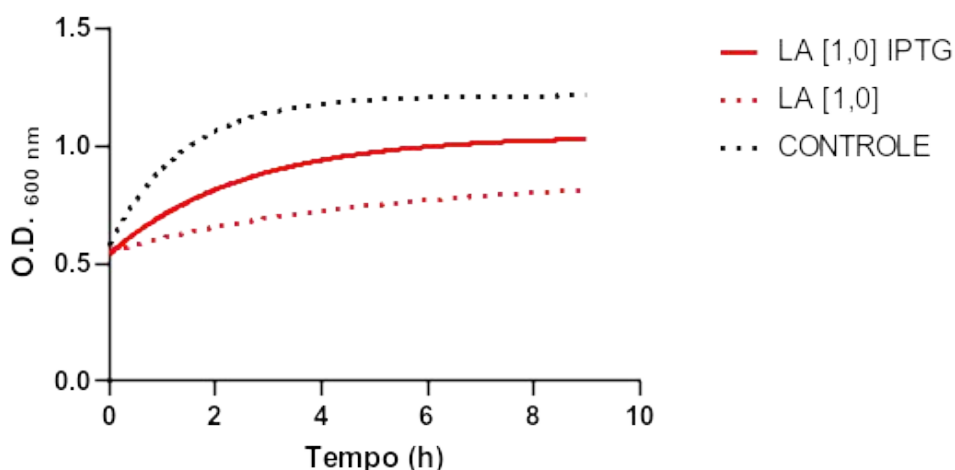
Figura 6. Curva de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) superexpressando OleH em caldo LB com suplementação de 0,5 mg/mL de LA.



Legenda: LA = ácido linoleico; IPTG = Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo; Controle = sem adição de LA.

Embora a cultura tratada com IPTG tenha mostrado ser significativamente ($p < 0,0001$) tolerante ao LA na concentração de 1,0 mg/mL, o crescimento celular parece ter sido parcialmente inibido. Pois, apesar do substancial crescimento celular em relação ao controle negativo, ao comparar com o controle positivo, a variação do crescimento também apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) (FIGURA 7).

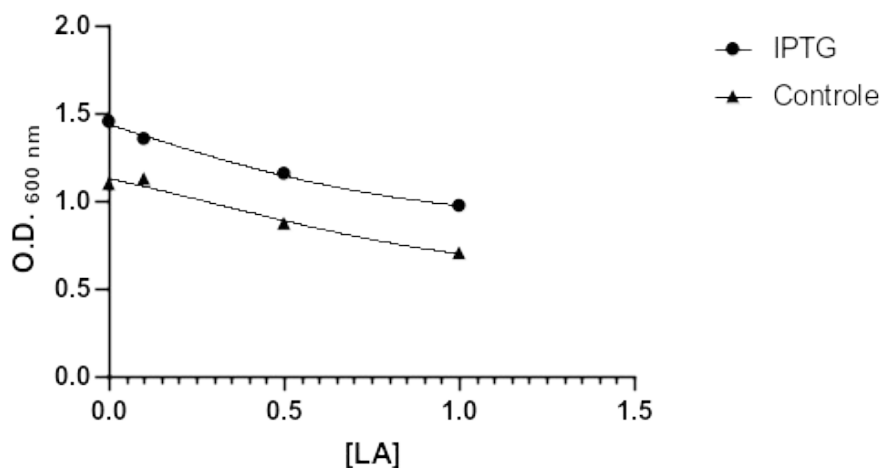
Figura 7. Curva de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) superexpressando OleH em caldo LB com suplementação de 1,0 mg/mL de LA.



Legenda: LA = ácido linoleico; IPTG = Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo; Controle = sem adição de LA.

Uma vez que a indução da expressão da proteína alvo foi útil para manter a tolerância na concentração de 0,5 mg/mL LA, a parcial inibição na concentração 1,0 mg/mL pode não estar atribuída à ocasional toxicidade da proteína alvo para a célula (STUDIER, 2014). Nesse caso, a queda na taxa de crescimento parece estar associada a inibição da resposta à dose de LA. A natureza da atividade inibitória do LA permanece desconhecida. No entanto, alguns autores a associaram a um aumento na permeabilidade da membrana celular de bactérias (LV et al., 2020; RAYCHOWDHURY; GOSWAMI; CHAKRABARTI, 1985). Há especulações de que a hidratação dos ácidos graxos insaturados seria um mecanismo de desintoxicação das bactérias frente ao efeito prejudicial dos ácidos graxos insaturados na membrana citoplasmática (VOLKOV et al., 2010). Neste ensaio, os resultados experimentais mostraram que o efeito da oleato hidratase no crescimento bacteriano diminuiu com o aumento da concentração de LA no meio (FIGURA 8).

Figura 8. Crescimento de *E. coli* BL21(DE) superexpressando OleH em meio LB na presença de diferentes concentrações de ácido linoleico.



Legenda: LA = ácido linoleico; IPTG = Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo; Controle = cultura não induzida por IPTG.

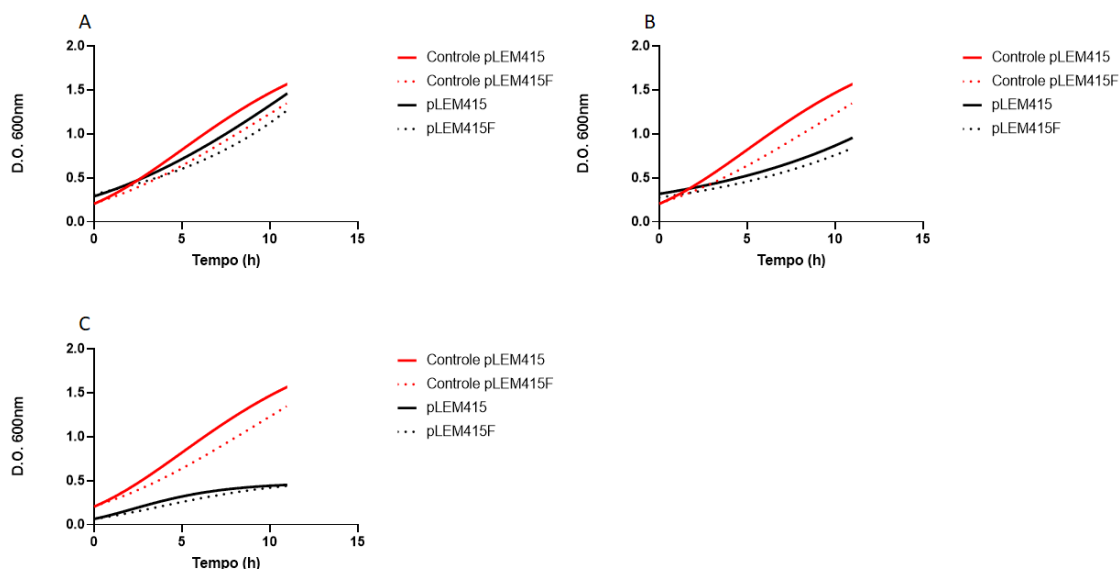
3.6.2 *L. paracasei* NFBC 338 superexpressando OleH

Para avaliar a tolerância de *L. paracasei* NFBC 338 ao LA, a capacidade de crescimento da cultura foi avaliada em caldo MRS suplementado com 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL de LA. Ao comparar o controle-pLEM415 (cultura com o plasmídeo vazio inoculado sem adição de LA) com o controle-pLEM15F (cultura com o plasmídeo carregando a fusão *phlBA-oleH*, inoculado sem adição de LA), o crescimento bacteriano foi significativamente diferente ($<0,0001$) em todas as concentrações testadas (FIGURA 9A, 9B e 9C). Este resultado indica que a própria presença do inserto, ou seja, a expressão de OleH nesta linhagem por si só tem efeito retardatório no crescimento da bactéria independente da presença de LA no meio.

O crescimento bacteriano não apresentou diferença significativa entre pLEM415 (cultura com o plasmídeo vazio inoculado com adição de LA) e pLEM415-oleH (cultura com o plasmídeo carregando a fusão *phlBA-oleH*, com adição de LA) nas concentrações 1,0 e 2,0 mg/mL (FIGURA 9B e 9C). Esta observação sugere melhor adaptação na presença de LA pela linhagem recombinante expressando OleH, embora a comparação entre o controle-pLEM415 e pLEM415-oleH mostrou-se significativamente diferente ($<0,0001$) em todas as

concentrações testadas, indicando que expressão de OleH não teve influência direta no crescimento bacteriano.

Figura 9. Curva de crescimento de *L. paracasei* NFBC 338 superexpressando OleH em caldo MRS com suplementação de LA.



Legenda: Controle = Sem adição de ácido linoleico (LA); pLEM415 = Plasmídeo sem inserto; pLEM415-oleH = Construção pLEM415 mais fusão *phlBA-oleH*. A = Teste concentração de LA a 0,5 mg/mL. B = Teste concentração de LA a 1,0 mg/mL. C = Teste concentração de LA a 2,0 mg/mL.

Este comportamento pode estar relacionado à capacidade desta linhagem em produzir ϵ 10, $c12$ -C18:2. Uma vez que esta linhagem possui uma maquinaria enzimática capaz de catalisar LA, a expressão de OleH parece não responder de forma satisfatória ao crescimento bacteriano na presença do substrato. Além disso, mesmo na falta do substrato, a expressão de OleH parece sobrecarregar o metabolismo bacteriano gerando um atraso no crescimento.

3.7 ENSAIO DE ATIVIDADE DA OLEATO HIDRATASE

Em estudo anterior, a cepa *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 mostrou maior habilidade em produzir CLA dentre 13 testadas da mesma espécie (KUHLE et al., 2017).

No presente estudo, avaliamos a capacidade da OleH *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 em produzir CLA. A atividade enzimática da OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 foi examinada usando LA ou RA como substratos. A enzima mostrou-se mais estável em pH 6,0 e temperatura de 37 °C. Células de *E. coli* totalmente lavadas induzidas por IPTG, seus lisados celulares e a enzima purificada foram incubadas em reações únicas contendo cada ácido graxo. Os produtos foram analisados por CG.

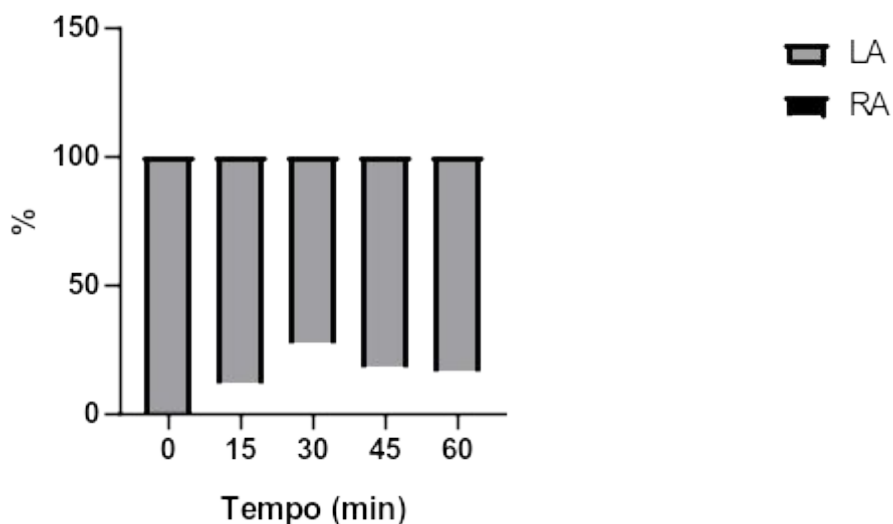
Nenhum dos substratos investigados foi convertido em CLA em um nível detectável (TABELA 7). No entanto, a enzima recombinante foi usada com sucesso para a produção do ácido graxo hidroxilado, ácido 12-hidroxi-9-*cis*-octadecenóico, a partir de LA através da hidratação da ligação dupla *cis* na posição Δ 12. O tempo de reação não teve influência para a formação de RA ($> 0,9999$, ANOVA) (FIGURA 10). Além disso, o mesmo produto também foi obtido através de biocatálise de células inteiras.

Tabela 9. Produtos (ácido ricinoleico – RA e ácido linoleico – LA) de reação enzimática de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.

Substrato	Produto ($\mu\text{g/g}$)	
	RA	LA
LA ¹ (15 min)	11,03	-
LA ¹ (30 min)	32,31	-
LA ¹ (45 min)	21,08	-
LA ¹ (60 min)	33,57	-
LA ² (60 min)	32,24	-
RA ¹ (60 min)	-	4,23
RA ² (60 min)	-	3,70
Tempo de retenção	37,93	39,51

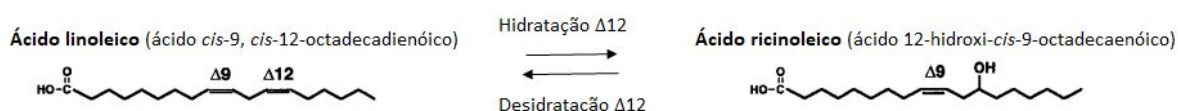
¹ Reação de proteína recombinante purificada, ² Reação de biocatálise.

Figura 10. Cursos de tempo da formação de ácido ricinoleic (RA) a partir de ácido linoleico (LA) durante a reação enzimática de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230.



A reação de OleH purificada e/ou biocatálise usando RA como substrato, levou à formação do ácido graxo correspondente com ligação dupla *cis* na posição $\Delta 12$, sugerindo que o produto do gene *oleH* atua como uma hidratase que também é responsável pela reação reversível ente LA e RA (FIGURA 11). Durante a reação enzimática de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 purificada, houve a formação de 25% de LA, e durante a biocatálise da enzima expressa por células inteiras de *E. coli* BL21(DE3), a formação de 23% de LA usando RA como substrato.

Figura 11. Reação reversível ente LA e RA proposta pela OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC.



Enquanto algumas enzimas oleato hidratase são seletivas para ligações duplas na posição $\Delta 9$, a OleH de *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, catalisa a hidratação de ligações duplas *cis* em ambas as posições $\Delta 9$ e $\Delta 12$ (VOLKOV et al., 2010). Neste estudo, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 parece ser seletiva para hidratação de ligações duplas *cis* na posição $\Delta 12$. Além disso, a OleH *Elizabethkingia meningoseptica* catalisa a hidratação reversível da ligação dupla *cis* do ácido oleico (*cis* 9-18: 1) em 10 (R) -hidroxi-18: 0, que também pode ser convertido em *trans*10- 8: 1 ou *cis*9- 18:1 por uma desidratação reversa (ENGLEDER et al., 2015; VOLKOV et al., 2013), corroborando nossos dados de reação reversa.

As reações enzimáticas que identificamos, embora não tenham levado à produção de CLA, podem ser úteis na modulação das propriedades dos ácidos graxos em alimentos. Como por exemplo, a reação de desidratação catalisada por OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC poderia aumentar a *cis*-desidratação, reduzindo as quantidades de ácidos graxos *trans* em alimentos.

4 DISCUSSÃO

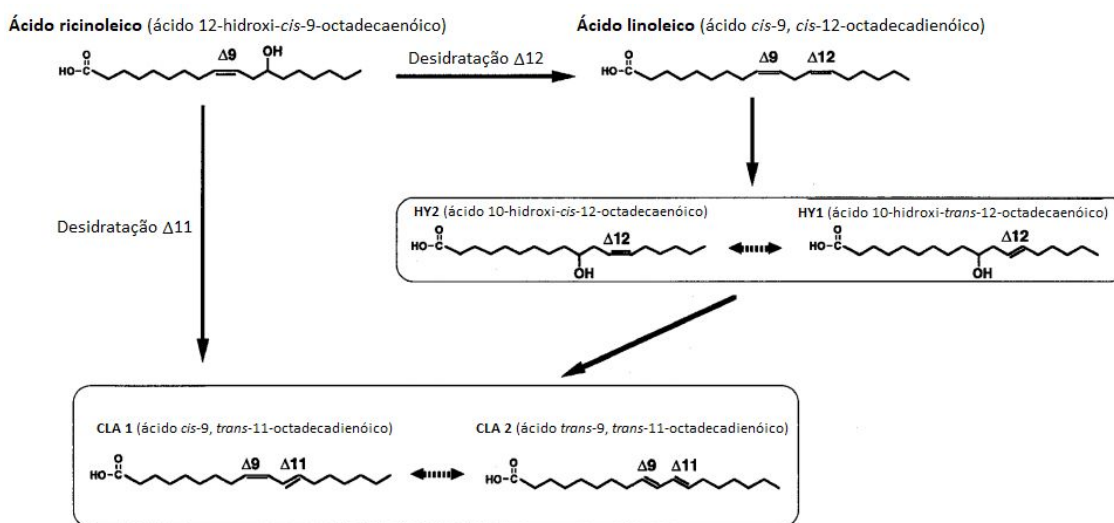
Pesquisadores propuseram a hipótese de um sistema enzimático multicomponente composto por quatro enzimas que envolvem o processo de biohidrogenação de LA (KISHINO et al., 2013). No entanto, o sequenciamento do genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 identificou apenas o gene *oleH*, capaz de codificar uma enzima oleato hidratase. Em um estudo anterior, nosso grupo identificou que a produção dos isômeros de CLA em co-cultura de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 e *Streptococcus thermophilus* LBP UFSC St. 360, está condicionada à espécie bacteriana predominante na cultura inicial. Nossos dados indicaram que a medida em que a cultura de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 se sobrepôs à de *S. thermophilus* LBP UFSC St. 360, a cultura demonstrou capacidade para sintetizar o isômero *c*9, *t*11-C18: 2, porém a produção de *t*10, *c*12-C18: 2 não foi detectada. No entanto, na condição oposta ocorreu significativa produção deste último isômero (KUHL et al., 2017).

De acordo com a via metabólica sugerida por Rodríguez-Alcalá et al. (2013), a produção do isômero *t*10, *c*12-C18: 2 é atribuída à enzima linoleato isomerase, o que corrobora com os dados genômicos apresentados acima, sugerindo que o *L. bulgaricus* LBP

UFSC 2230 da co-cultura foi responsável pela produção de isômero *c*9, *t*11-C18: 2, por meio de uma via metabólica alternativa. A atividade da hidratase tem sido associada à primeira etapa da biohidrogenação do LA, levando à formação de ácidos graxos hidroxi como intermediários na via do CLA (KISHINO et al., 2009; RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2013). Além disso, uma possível via de síntese de CLA a partir de RA por transformação direta em isômeros de CLA foi relatada nos últimos anos (FIGURA 12) (ANDO et al., 2004; KISHINO et al., 2002).

Esses dados nos levaram a especular o papel de OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 na produção de CLA como um possível processo de duas etapas, no qual o RA é produzido seguido pela síntese de isômeros de CLA pela mesma enzima. No entanto, fica evidente neste estudo que o gene que codifica OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 não participa diretamente na conversão de LA em CLA, e que esta bactéria segue uma via bioquímica diferente para produzir CLA.

Figura 12. Via proposta de produção de CLA a partir do ácido ricinoleico (RA).

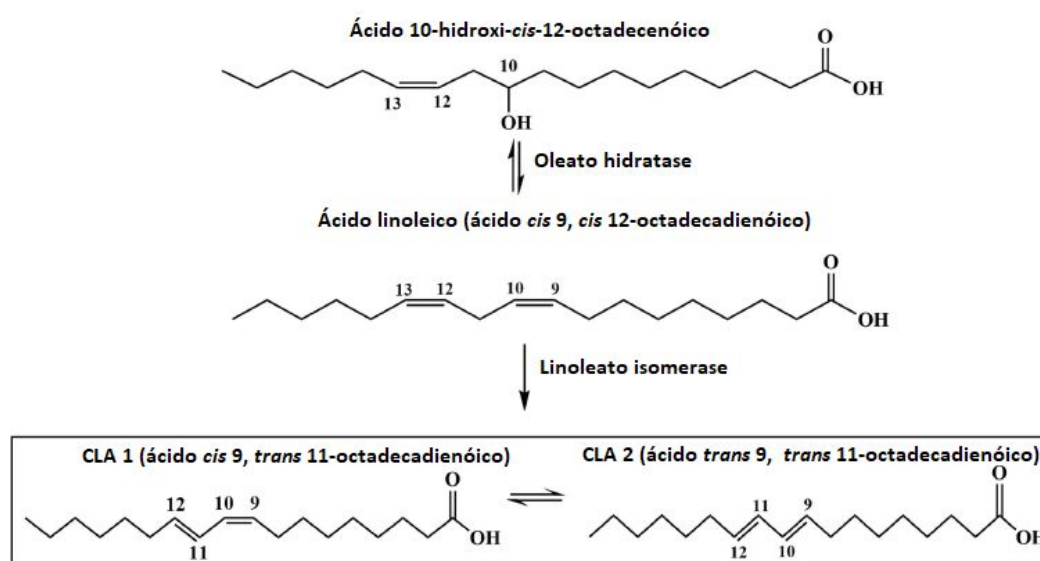


Fonte: Adaptado de Kishino et al. (2002).

Por outro lado, OleH recombinante catalisou a conversão de RA em LA, indicando que esta enzima pode ser responsável pela conversão reversível entre LA e RA, conforme verificado por Gao et al. (2019). Os autores constataram que a MCRA bifidobacteriana poderia transformar 10-HOE em LA reversamente. Além disso, ao usarem 10-HOE como

substrato, os autores relataram a produção de CLA por bifidobactérias, primeiro convertendo-o em LA, seguido pelo acúmulo de CLA pela atividade de uma linoleato isomerase (FIGURA 13). Uma vez que não foi anotada nenhuma linoleato isomerase no genoma de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 (KUHL et al., no prelo), mais estudos devem ser realizados para explicar a produção de CLA nesta cepa.

Figura 13. Via proposta de produção de CLA a partir de 10-HOE.



Fonte: Adaptado de Gao et al. (2019).

Com base na modelagem de homologia 3D e análise de *docking* molecular, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 apresentou dois sítios de ligação de ácidos graxos putativos. A estrutura usada como modelo (PDB: 41A6) de *L. acidophilus*, apresentou ligação de ácido linoleico à cavidade A. Esta região foi considerada um portal de entrada para ácidos graxos (Volkov et al., 2013). A análise de acesso ao túnel sugere a conexão entre as cavidades A e B, onde o ácido graxo pode atingir o local de ligação do FAD. Os dados *in silico* mostraram interação polar de ácido graxo com Y414 e uma maior afinidade para o sítio de ligação na cavidade B, indicando o movimento da cavidade A para B. Na estrutura 41A6 o FAD não foi cristalizado provavelmente devido a uma alta flexibilidade nesta região. O sítio de ligação de FAD proposto envolveu a assinatura conservada GXGXXG (X)_{17/23E} (VOLKOV et al., 2013). O sítio de ligação FAD mapeado por análise de *docking* em OleH de *L.*

bulgaricus LBP UFSC 2230 mostrou interações não polares com G³¹, A³³, E⁵⁷ sugerindo que o motivo conservado G²⁹G³⁰G³¹L³²A³³G³⁴(X)₂₃E⁵⁷ está relacionado à ligação FAD.

Com relação à tolerância ao LA, as vias de biohidrogenação bacteriana têm sido propostas como um mecanismo de desintoxicação ao LA (MAIA et al., 2010). Neste estudo, a OleH recombinante mostrou desempenhar um papel no crescimento bacteriano em presença de LA, transformando-o em um ácido graxo menos tóxico. Muitas bactérias desintoxicam ácidos graxos insaturados pela proteína MCRA, convertendo-os em ácidos graxos hidroxilados. De acordo com Kishino et al. (2002) CLA-HY, que pertence à família MCRA, é responsável pela desintoxicação de ácidos graxos insaturados em *L. plantarum*. Na verdade, devido à atividade imunomoduladora dos ácidos graxos hidroxilados, Bergamo et al. (2014), consideraram essa molécula similar ao isômero *c9, t11*-C18: 2, como um componente funcional em alimentos e produtos farmacêuticos.

Demais investigações com a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 são necessárias para a caracterização do seu papel no metabolismo dos ácidos graxos. Nosso grupo propõe pesquisas futuras para aprofundar os estudos na identificação das propriedades da enzima e determinar a via da biohidrogenação do LA em *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230. Uma abordagem prática seria a expressão homóloga da OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230. Sem sucesso na transformação do pLEM415-oleH em *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 para fins de ensaios de expressão homóloga, uma posterior investigação gênica, demonstrou a presença da enzima *EcoRI* na anotação do genoma da bactéria, levando à linearização do plasmídeo ao ser inserido na célula. Desta forma sugere-se para estudos futuros, a aplicação de um método de biologia molecular denominado de mutagênese sítio-dirigida. Este método consistirá na alteração específica e intencional na sequência do plasmídeo, prevenindo que este apresente um sítio de restrição de *EcoRI*. Além disso, outra abordagem futura envolve o estudo com outras enzimas já caracterizadas como ferramenta para o desenvolvimento de um método enzimático capaz de produzir CLA sem o uso de bactérias.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, descrevemos as características enzimáticas e físico-químicas da OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, que catalisa a etapa inicial do metabolismo de saturação do

ácido linoleico. Verificou-se que a enzima é uma hidratase / desidratase, demonstrando atividade na presença de FAD.

Em conclusão, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 não demonstrou capacidade de produzir isômeros de CLA a partir dos substratos LA e RA. Apesar disso, a OleH de *L. bulgaricus* LBP UFSC pode catalisar tanto a hidratação quanto a desidratação dos substratos testados, levando à transformação reversível entre LA e RA. Além disso, a enzima demonstrou atividade de desintoxicação, como uma possível adaptação fisiológica à ambientes ricos em ácidos graxos insaturados.

Coletivamente, nossos resultados demonstram que a proteína OleH codificada por *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230, desempenha um papel na tolerância ao estresse, embora não pareça exercer, por si só, um papel na conversão de LA em CLA por *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230. A via metabólica real da produção de CLA em *Lactobacillus* ssp. ainda não está definida. Futuramente, nosso grupo de pesquisa terá como objetivo descobrir os elementos genéticos envolvidos nesta bioconversão.

PERSPECTIVA FUTURA

UTILIZAÇÃO DE SORO DE LEITE EM BIOPROCESSO: EFEITO DA APLICAÇÃO DE LINHAGEM RECOMBINANTE DE *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* PARA SÍNTESE DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.

O soro é um coproduto líquido da indústria de laticínios resultante da coagulação do leite na produção de queijo (DESCONSI; FILHO; SALAZAR, 2014). Aproximadamente 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos resulta em soro (LIMA; ROCHA, 2016). Devido ao grande volume de soro gerado, um adequado aproveitamento é fundamental, considerando a sua qualidade nutricional, e seu poder poluente quando descartado no meio ambiente (SHARMA; TRIVEDI; GAT, 2017). Atualmente o soro resultante da indústria láctea é destinado à alimentação animal, fabricação de ricota, bebida láctea e produção de soro em pó concentrado (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Estudos recentes têm adequado este resíduo lácteo como substrato para a síntese de compostos orgânicos para a produção de alimentos e bebidas fermentados, nos quais os micro-organismos foram inoculados diretamente aos substratos lácteos para obtenção do produto final (GARCÍA; RENDUELES; DÍAZ, 2017). Devido à sua composição bioquímica (lactose, proteínas, vitaminas), o soro é um excelente meio de cultura para micro-organismos (SAHA; RAY; HAZRA, 2017; BENAÏSSA; ZADI-KARAM; KARAM, 2017).

De acordo com Desconsi, Filho e Salazar (2014) o soro contém cerca de metade dos componentes sólidos presentes no leite (lactose, lipídios, minerais, proteínas e vitaminas). As proteínas possuem alto valor nutricional, pois contêm todos os aminoácidos essenciais e a lactose por ser fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos (GIROTO; PAWLOWSKY, 2001).

Uma vez que a lactose é o principal componente dos sólidos de soro de leite, além de vitaminas, minerais e proteínas solúveis em água, vários processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para utilizar o soro para a produção de alguns produtos úteis de importância industrial, como etanol, ácido láctico, ácido cítrico, proteínas de célula única, biogás, vitaminas e bebidas fermentadas e assim por diante (PANESAR; KENNEDY, 2012).

Diversos estudos revisados por Panesar e Kennedy (2012) reportaram a aplicação do soro de leite como meio de cultivo para fermentação utilizando BAL. Dentre as BAL testadas, o *L. bulgaricus* mostrou-se capaz de produzir diferentes metabólitos a partir do soro de leite utilizado como principal substrato. A produção de ácido láctico mediante fermentação do soro por *L. bulgaricus*, por exemplo, rende níveis satisfatórios, segundo Fakhravar et al. (2012). Para os autores, o soro de leite é um substrato alternativo e de baixo custo para a produção de ácido láctico por fermentação bacteriana.

Em estudo prévio identificamos a eficácia da linhagem *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 na biosíntese de CLA em leite de ovelha (KUHL et al., 2017). Neste sentido, objetivo do futuro trabalho seria a caracterização fenotípica da linhagem recombinante de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 carregando pLEM415-oleH (pós mutagênese sítio-dirigida) para expressão homóloga de OleH, por meio do emprego da cultura em soro de leite para avaliar a bioprodução de CLA, bem como, comparar as linhagens de *L. bulgaricus* LBP UFSC 2230 selvagem e recombinante, considerando os aspectos de cinética de crescimento, velocidade específica, fatores de conversão e rendimento.

REFERÊNCIAS

ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U. T.; BEDNARSKI, W. Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 6, p. 491–504, 2008.

ALEXANDRAKI, V. et al. Complete genome sequence of the yogurt isolate *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACA-DC 87. **Genome Announcements**, v. 5, n. 34, 2017.

ALI, A. A. **Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review** **Research Journal of Microbiology**, 2010.

AMMOR, M. S.; BELÉN FLÓREZ, A.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 559–570, 2007.

ANDO, A. et al. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 40–45, 2004.

ANDO, A. et al. Procedimentos para terapia nutricional enteral e parenteral. **Food Chemistry**, v. 67, n. 01, p. 2168–2178, 2016.

ANISIMOVA, E. A.; YARULLINA, D. R. Antibiotic Resistance of *LACTOBACILLUS* Strains. **Current Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 1407–1416, 2019.

ARAB, A. et al. The effects of conjugated linoleic acids on breast cancer: A systematic review. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, n. 1, p. 115, 2016.

AZCÁRATE-PERIL, M. A.; RAYA, R. R. Sequence analysis of pLBB1, a cryptic plasmid from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 105–112, 2002.

BALCI YUCE, H. et al. The effect of commercial conjugated linoleic acid products on experimental periodontitis and diabetes mellitus in Wistar rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 21–29, 2017.

BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 5, p. 721–727, 2012.

BELL, E. W.; ZHANG, Y. DockRMSD: An open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2019.

BELURY, M. A. Recent Advances in Nutritional Sciences Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action 1. **Recent Advances in Nutritional Sciences**, n. July, p. 2995–2998, 2002.

BERGAMO, P. et al. Immunomodulatory activity of a gut microbial metabolite of dietary linoleic acid, 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid, associated with improved

antioxidant/detoxifying defences. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 192–202, 2014.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278–285, 2008.

Biosynthesis_of_potential_anti (1).pdf, [s.d.].

BOSMA, E. F.; FORSTER, J.; NIELSEN, A. T. *Lactobacilli* and *pediococci* as versatile cell factories – Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 4, p. 419–442, 2017.

BOUR, M. et al. Acquisition of Class C β -Lactamase PAC-1 by Sequence Type 644 Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, 2019.

BOURNIQUEL, A. A. et al. DNA sequence and functional analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* plasmids pN42 and pJBL2. **Plasmid**, v. 47, n. 2, p. 153–157, 2002.

CAMPEDELLI, I. et al. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 1–21, 2019.

CASTAGNA, A. et al. Recombinant oleate hydratase from *Lactobacillus rhamnosus* atcc 53103: Enzyme expression and design of a reliable experimental procedure for the stereoselective hydration of oleic acid. **Catalysts**, v. 10, n. 10, p. 1–16, 2020.

CHARTERIS, W. P. et al. Probiotic *Lactobacilli* AND. v. 64, n. 12, p. 2007–2014, 2014.

CHEN, W.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.

CHOUAYEKH, H. et al. Highly efficient production of the staphylococcal nuclease reporter in *Lactobacillus bulgaricus* governed by the promoter of the *hlyA* gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 2, p. 232–239, 2009.

CHOVANCOVA, E. et al. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 10, 2012.

COAKLEY, M. et al. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 138–145, 2003.

COLLINS, M. D. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, n. 1, p. 5–12, 1991.

DAHIYA, D. K.; PUNIYA, A. K. Optimisation of fermentation variables for conjugated linoleic acid bioconversion by *Lactobacillus fermentum* DDHI27 in modified skim milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1–10, 2017.

DE ANGELIS, M. et al. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. **Proteomics**, v. 16, n. 6, p. 946–962, 2016.

DE DEA LINDNER, J. Characteristics and Production of Microbial Cultures. In: Ana Lucia Barretto Penna; Luis A. Nero; Svetoslav D. Todorov. (Org.). *Fermented Foods of Latin America: From Traditional Knowledge to Innovative Applications*. 1ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2016, v. 1, p. 267–294.

DE DEA LINDNER, J. et al. Parmigiano Reggiano cheese: Evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science and Technology**, v. 88, n. 4–5, p. 511–523, 2008.

DENG, M. DE et al. Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes*: Purification, characterization, molecular cloning, and heterologous expression. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, n. 3, p. 199–211, 2007.

DERKX, P. M. F. et al. The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. S5, 2014.

DUAR, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 1, p. S27–S48, 2017.

DUARTE, R. T. D. Micro-Organismos Em Ambientes Criogênicos: Gelo Glacial, Solos Expostos Por Recuo De Geleiras, E Permafrost Polares. p. 201, 2010.

ENGLEDER, M. et al. Structure-Based Mechanism of Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. **ChemBioChem**, v. 16, n. 12, p. 1730–1734, 2015.

FERRER-MIRALLES, N.; VILLAVARDE, A. Bacterial cell factories for recombinant protein production ; expanding the catalogue. p. 2–5, 2013.

FIBINGER, M. P. C. et al. A directed mutational approach demonstrates that a putative linoleate isomerase from *Lactobacillus acidophilus* does not hydrate or isomerize linoleic acid. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, n. 6, p. 841–848, 2016.

FONTES, A. L. et al. Effect of Pufa Substrates on Fatty Acid Profile of *Bifidobacterium breve* Ncimb 702258 and CLA/CLNA Production in Commercial Semi-Skimmed Milk. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. [s.l: s.n.].

FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; PEÑAS, E. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. [s.l: s.n.].

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106–117, 2015.

GAO, H. et al. Role of 10-hydroxy-cis-12-octadecenic acid in transforming linoleic acid into conjugated linoleic acid by bifidobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 7151–7160, 2019.

GARCIA, C. et al. Synthesis of the suspected trans- 11, cis- 13 conjugated linoleic acid isomer in ruminant mammary tissue by FADS3-catalyzed Δ 13-desaturation of vaccenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 783–796, 2017.

GEBAUER, S. K. et al. Effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and cancer: A comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 332–354, 2011.

GILL, M. J.; BRENWALD, N. P.; WISE, R. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 187–189, 1999.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391–398, 2012.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480–487, 2010.

GIRAFFA, G.; DE VECCHI, P.; ROSSETTI, L. *Note*: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 5, p. 918–918, 1998.

GORBENA, J. C. R.; SAENZ, T. A. Bacterias ácido lácticas. **Biotempo**, v. 8, n. 0, p. 54–64, 2017.

GORISSEN, L. et al. Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n.

3, p. 593–606, 2011.

GORISSEN, L. et al. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. **Critical reviews in food science and nutrition**, n. January 2015, p. 37–41, 2013.

GORISSEN, L. et al. Bacterial Production of Conjugated Linoleic and Linolenic Acid in Foods: A Technological Challenge. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1561–1574, 2015.

GREENWAY, D. L. A.; DYKE, K. G. H. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 233–245, 1979.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.

HAYES, M. et al. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 4, p. 435–449, 2007.

HIRATA, A. et al. A novel unsaturated fatty acid hydratase toward C16 to C22 fatty acids from *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 7, p. 1340–1350, 2015.

HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399, 2012.

IP, C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 6 SUPPL., 1997.

IRMAK, S. et al. Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. **Lipids**, v. 41, n. 8, p. 771–776, 2006.

JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 295–350, 2002.

JOHNSON, A. D. An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. **Bioinformatics**, v. 26, n. 10, p. 1386–1389, 2010.

KAFSI, H. EL et al. Open Access bulgaricus: a chronicle of evolution in action. 2014.

KAMEL, H. E. M. et al. Influence of dietary supplementation with sunflower oil and quebracho tannins on growth performance and meat fatty acid profile of Awassi lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, n. November, p. 97–104, 2018.

KARAPETKOV, N. et al. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. **Beneficial Microbes**, v. 2, n. 4, p. 335–339, 2011.

KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; TOVE, S. B. Intermediates and Products of the Biohydrogenation of Linoleic Acid by Intermediates of Linoleic and Products of the Biohydrogenation Acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 6, p. 1350–1354, 1966.

KISHINO, S. et al. Ricinoleic acid and castor oil as substrates for conjugated linoleic acid production by washed cells of *Lactobacillus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 10, p. 2283–2286, 2002.

KISHINO, S. et al. Microbial production of conjugated fatty acids. **Lipid Technology**, v. 21, n. 8–9, p. 177–181, 2009.

KISHINO, S. et al. Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing CC double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis. **Biochemical**

and **Biophysical Research Communications**, v. 416, n. 1–2, p. 188–193, 2011.

KISHINO, S. et al. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 44, p. 17808–17813, 2013.

KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity research & clinical practice**, v. 8, n. 6, p. e525-32, 2014.

KRISTJANSDOTTIR, T. et al. A metabolic reconstruction of *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–19, 2019.

KUHL, G. C. et al. Selection of Lactic Acid Bacteria for the Optimized Production of Sheep's Milk Yogurt with a High Conjugated Linoleic Acid Content. **Journal of Food Research**, v. 6, n. 4, p. 44, 2017.

KUHL, G.; DE DEA LINDNER, J. Biohydrogenation of Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria for the Production of Functional Cultured Dairy Products: A Review. **Foods**, v. 5, n. 1, p. 13, 2016.

KUHL, G. C.; MAZZON, R. R., DE DEA LINDNER, J. Draft genome sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBP UFSC 2230, a tool for preliminary identification of enzymes involved in CLA metabolism. **Braz J Microbiol**, 2021, no prelo.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

KURODA, T.; TSUCHIYA, T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 763–768, 2009.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LEE, J. H. et al. Comparative sequence analysis of plasmids from *Lactobacillus delbrueckii* and construction of a shuttle cloning vector. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4417–4424, 2007.

LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZAA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v. 108, n. 1, p. 19–25, 1994.

LEE, Y. J.; JENKINS, T. C. Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 8, p. 1445–1450, 2011.

LEVIT, R. et al. **Increasing B Vitamins in Foods to Prevent Intestinal Inflammation and Cancer**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

LIAVONCHANKA, A. et al. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 8, p. 2576–2581, 2006.

LIAVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Biochemistry of PUFA double bond isomerases producing conjugated linoleic acid. **ChemBioChem**, v. 9, n. 12, p. 1867–1872, 2008.

LIN, T. Y. Conjugated linoleic acid production by cells and enzyme extract of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with additions of different fatty acids. **Food Chemistry**, v. 94, n. 3, p. 437–441, 2006.

LINOLEATE, O. F. A. of *Unsaturated Fatty Acids*. n. 24, p. 5686–5693, 1967.

LIU, E. et al. A model of proteolysis and amino acid biosynthesis for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in whey. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 742–751, 2012.

LIU, E. et al. Relationship between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* under whey conditions: Focus on amino acid formation. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 141–150, 2016.

LIU, P. et al. Production of conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented Chinese pickles. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 12, n. 11, p. 923–930, 2011.

LUCATTO, J. N.; BRANDÃO, S. N. T. G. DE; DRUNKLER, D. A. Ácido Linoleico Conjugado: Estrutura Química, Efeitos Sobre a Saúde Humana E Análise Em Lácteos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 199, 2014.

LUO, X. et al. Comparison of enzymatic activity of two linoleic acid isomerases expressed in *E. coli*. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 10, p. 5913–5919, 2013.

LV, H. et al. Linoleic acid inhibits *Lactobacillus* activity by destroying cell membrane and affecting normal metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 5, p. 2057–2064, 2020.

MACOUZET, M.; LEE, B. H.; ROBERT, N. Genetic and structural comparison of linoleate isomerases from selected food-grade bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 6, p. 2128–2134, 2010.

MAIA, M. R. et al. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 8–10, 2010.

MALINSKA, H. et al. Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriglyceridemia. **Nutrition**, v. 31, n. 7–8, p. 1045–1051, 2015.

MATSUMURA, N.; MINAMI, S.; MITSUHASHI, S. Sequences of homologous β -lactamases from clinical isolates of *Serratia marcescens* with different substrate specificities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 176–179, 1998.

MENEGHEL, J. et al. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1, a Lactic Acid Bacterium Isolated from French Handcrafted Fermented Milk. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00052-16, 2016.

MILLER, E. F. by. 2017.

MISHRA, B. K. et al. Identification and Characterization of *Lactobacillus* isolates from fermented soya food “Tungrymbai”, Meghalaya, India. v. 6, n. 2, p. 1103–1112, 2017.

NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 2017.

NIEUWENHOVE, C. P. VAN; TERÁN, V.; GONZÁLEZ, S. N. Conjugated Linoleic and Linolenic Acid Production by Bacteria: Development of Functional Foods. **Prob**, 2012.

NYAMBANE, B. et al. Lactic acid bacteria and yeasts involved in the fermentation of amabere amaruranu, a Kenyan fermented milk. **Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 6, p. 692–699, 2014.

O’CONNELL, K. J. et al. Identification and characterization of an oleate hydratase-encoding gene from *Bifidobacterium breve*. **Bioengineered**, v. 4, n. 5, 2013.

OGAWA, J. et al. Conjugated Linoleic Acid Accumulation via 10-Hydroxy-12-Octadecaenoic Acid during Microaerobic Transformation of Linoleic Acid by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 1246–1252, 2001.

OHKI, R.; MURATA, M. *bmr3*, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 4, p. 1423–1427, 1997.

OLSON, J. M. et al. A Comparison of the Anti-Inflammatory Effects of Cis-9, Trans-11 Conjugated Linoleic Acid to Celecoxib in the Collagen-Induced Arthritis Model.

Lipids, v. 52, n. 2, p. 151–159, 2017.

ORTEGA-ANAYA, J.; HERNÁNDEZ-SANTOYO, A. Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with biosynthetic membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 12, p. 3166–3174, 2015.

PALMQUIST, D. L. et al. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 50, n. 05, p. 179–217, 2005.

PANESAR, P. S. Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. **Food and Nutrition Sciences**, v. 02, n. 01, p. 47–51, 2011.

PARIZA, M. W. et al. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, v. 7, n. 2–3, p. 63–69, 1979.

PARIZA, M. W.; BENJAMIN, H. W.; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by DMBA. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. VOL. 26, n. 4, p. 591–593, 1985.

PARIZA, M. W.; HA, Y. L. Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid: A new class of anticarcinogens. **Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy**, v. 7, n. 2, p. 169–171, 1990.

PARK, J. Y. et al. Production of 13S-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Biotechnology**, v. 208, p. 1–10, 2015.

PARK, Y.; PARIZA, M. W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 311–323, 2007.

PESTOVA, E. et al. Contribution of topoisomerase IV and DNA gyrase mutations in *Streptococcus pneumoniae* to resistance to novel fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2000–2004, 1999.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PHILIPPAERTS, A. et al. Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. **ChemSusChem**, v. 4, n. 6, p. 684–702, 2011.

POELARENDS, G. J.; MAZURKIEWICZ, P.; KONINGS, W. N. Poelarends_2002_Biochimica-et-Biophysica-Acta-(BBA)---Bioenergetics.pdf. v. 1555, p. 1–7, 2002.

POLIDORI, P. et al. **CLAs in Animal Source Foods: Healthy Benefits for Consumers**. [s.l: s.n.].

POT, B. et al. **The genus Lactobacillus**. [s.l: s.n.].

POUWELS, P. H.; LEUNISSEN, J. A. M. Divergence in codon usage of *Lactobacillus* species. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 6, p. 929–936, 1994.

RAYCHOWDHURY, M. K.; GOSWAMI, R.; CHAKRABARTI, P. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, n. 2, p. 183–188, 1985.

RENES, E. et al. Study of the conjugated linoleic acid synthesis by *Lactobacillus* strains and by different co-cultures designed for this ability. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 74–80, 2017.

REZAUL, M. et al. Starter Cultures Used in the Production of Probiotic Dairy Products and Their Potential Applications: A Review. **Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 2, p. 83–89, 2017.

RICCI, A. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, 2017.

ROACH, J. A. G. et al. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, n. 1–2, p. 207–226, 2002.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. **Recombinant protein expression in microbial systems**. [s.l: s.n.]. v. 5

ROSBERG-CODY, E. et al. Heterologous expression of linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes* and anti-proliferative activity of recombinant trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2483–2490, 2007.

SALSINHA, A. S. et al. Microbial Production of Conjugated Linoleic Acid and Conjugated Linolenic Acid Relies on a Multienzymatic System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 4, p. 1–21, 2018.

SALVETTI, E.; O'TOOLE, P. W. The Genomic Basis of Lactobacilli as Health-Promoting Organisms. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 49–71, 2017.

SCHMID, J. et al. Biocatalytic study of novel oleate hydratases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S243–S249, 2016.

SEHAT, N. et al. Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Lipids**, v. 33, n. 2, p. 217–221, 1998.

SERAPEIMIDOU, A. et al. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. **Food chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1839–46, 15 out. 2012.

SERROR, P. et al. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 46–52, 2002.

SETTACHAIMONGKON, S. Simultaneous growth and metabolite production by yoghurt starters and probiotics : a metabolomics approach. [s.d.].

SHARMA, P. et al. Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 1, p. 38–51, 2016.

SILVA, L. DE J. M. DA. Universidade dos Açores Departamento de Ciências Agrárias Isolamento e Caracterização Bioquímica das Bactérias do Ácido Láctico do Queijo São Jorge DOP. p. 117, 2011.

SIURANA, A. et al. Strategies to modify the ruminal biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and the production of trans-10, cis-12 C18:2 in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, n. November 2016, p. 158–165, 2018.

SONG, Y. et al. Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–8, 2016.

STACHOWSKA, E. et al. Conjugated linoleic acid isomers may diminish human macrophages adhesion to endothelial surface. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 1, p. 30–5, 2012.

STANTON, C. et al. Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 5, p. 1083–1086, 1997.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. **Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review**. [s.l: s.n.]. v. 61

STUDIER, F. W. Stable Cultures and Auto-Induction for Inducible Protein Production in *E. coli*. **Structural Genomics: Methods and Protocols**, v. 1091, p. 17–32, 2014.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

SURAWEERA, S. A. S. S.; CHANDRASEKARA, A.; MENDIS, B. E. P. Assessing the Probiotic Activity in Conventional Yoghurt Produced at a Dairy Processing Company in Sri Lanka. **Proceedings of the Peradeniya Univ. International Research Sessions**, v. 18, n. July, p. 216, 2014.

TAALE, E. et al. Searching for Bacteriocin Pln Loci From Lactobacillus Spp. Isolated From Fermented Food in Burkina Faso By Molecular Methods. n. July, 2016.

TABASHSUM, Z. et al. **Competitive elimination and virulence property alteration of Campylobacter jejuni by genetically engineered Lactobacillus casei**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018. v. 85

TAKEUCHI, M. et al. Characterization of the linoleic acid $\delta 9$ hydratase catalyzing the first step of polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in Lactobacillus plantarum AKU 1009a. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 636–641, 2015.

TAMURA, K.; NEI, M. <1993-Tamura-Nei.Pdf>. v. 10, n. 3, 1993.

TAPIA, A. M. et al. Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria: Screening and optimization. **Philippine Journal of Science**, v. 148, n. 3, p. 457–464, 2019.

TIAN, W. et al. CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2018.

TRIGUEROS, L.; BARBER, X.; SENDRA, E. Conjugated linoleic acid content in fermented goat milk as affected by the starter culture and the presence of free linoleic acid. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 2, p. 198–206, 2015.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; ENJALBERT, F. Les acides linoléiques conjugués: 3. Facteurs de variation des teneurs dans le lait et les produits laitiers. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 1, n. n° 6, p. 323–331, 2005.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. NA-NA, 2009.

TVRZICKA, E. et al. Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - a review. part 1: Classification, dietary sources and biological functions. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 2, p. 117–130, 2011.

VAN NIEUWENHOVE, C. P. et al. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 467–474, 2007.

VILLAR-TAJADURA, M. A. et al. Production of conjugated linoleic and conjugated α -linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by bifidobacterial strains isolated from human breast milk. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

VOLKOV, A. et al. Myosin cross-reactive antigen of Streptococcus pyogenes M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 14, p. 10353–10361, 2010.

VOLKOV, A. et al. Crystal structure analysis of a fatty acid double-bond hydratase from Lactobacillus acidophilus. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 4, p. 648–657, 2013.

WAHLE, K. W.; HEYS, S. D.; ROTONDO D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 6, p. 553–87, 2004.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018.

WATERS, D. M. et al. Lactic Acid Bacteria as a Cell Factory for the Delivery of Functional Biomolecules and Ingredients in Cereal-Based Beverages: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 4, p. 503–520, 2015.

YANG, B. et al. Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 1, p. 75–81, 2013.

YANG, B. et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 430–439, 2014.

YANG, B. et al. Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 314–325, 2015.

YANG, B. et al. Bacterial conjugated linoleic acid production and their applications. **Progress in Lipid Research**, v. 68, n. June, p. 26–36, 2017.

YE, J. et al. art%3A10.1186%2F1471-2105-13-134. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 134, 2012.

YU, J. et al. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 22, p. 9825–9836, 2013.

ZANNI, E. et al. Combination of metabolomic and proteomic analysis revealed different features among *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and *lactis* strains while in vivo testing in the model organism *Caenorhabditis elegans* highlighted probiotic properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–12, 2017.

ZHANG, Y. et al. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 279–288, 2016.

ZHAO, Y. et al. *Staphylococcus aureus* Methicillin-Resistance Factor *fmtA* Is Regulated by the Global Regulator *SarA*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–13, 2012.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHOU, J. S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 211–217, 2005.

