

RODRIGO GONÇALVES DIAS

OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Streptococcus equinus* HC5 COM PRODUÇÃO AUMENTADA DE BOVICINA HC5 POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA EM LABORATÓRIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani

Coorientadores:

Denise Mara Soares Bazzolli
Tiago Antonio de Oliveira Mendes
Wendel Batista da Silveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus
Viçosa

T

D541o
2022
Dias, Rodrigo Gonçalves, 1996-
Obtenção de linhagens de *Streptococcus equinus* HC5 por
evolução adaptativa em laboratório / Rodrigo Gonçalves Dias. –
Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (70 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.792>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Peptídeos. 2. Bacteriocinas. 3. Bactéria do ácido láctico.
I. Mantovani, Hilário Cuquetto, 1970-. II. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 572.65

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz
Pinto CRB-6/3317

RODRIGO GONÇALVES DIAS

OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Streptococcus equinus* HC5 COM PRODUÇÃO AUMENTADA DE BOVICINA HC5 POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA EM LABORATÓRIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de outubro de 2022.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente

RODRIGO GONCALVES DIAS

Data: 24/01/2023 14:12:56-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Rodrigo Gonçalves Dias
Autor



Documento assinado digitalmente

HILARIO CUQUETTO MANTOVANI

Data: 24/01/2023 13:05:46-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Hilário Cuquetto Mantovani
Orientador

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio
e Nativa, por todo amparo e compreensão
nesta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda mansidão com que Ele conduziu essa jornada e conduz a minha vida.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Nativa, por todo amparo nessa caminhada. Vocês me ensinam pelo exemplo a lutar pelos meus sonhos e a ser paciente com os desafios da vida, sempre respeitando e valorizando as pessoas que encontramos pelo caminho. Aos meus irmãos, Gláucio e Géssica, e aos meus cunhados, Bianca e Luan, por sempre estarem, juntos ao pai e à mãe, de prontidão para me acolher e para resgatar a felicidade que é ter uma família. Às minhas sobrinhas, Sara e Mariana, que vivendo a ingenuidade da infância, trazem leveza e vitalidade aos nossos dias. Lar é onde nos sentimos bem-vindos... Vocês são meu refúgio.

Aos meus amigos de velha guarda que viram o sonho da pós-graduação nascer, vocês são os incentivadores dessa conquista. Agradeço aos novos amigos e à família que construí em Viçosa. Rúzivia, Matheus, Karina, Duda... e a outros tantos que estiveram comigo no dia-a-dia, vocês fizeram desta jornada árdua um caminho prazeroso de se viver. Obrigado por tanto. Sou mais feliz porque tenho vocês ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador, Hilário, por toda confiança, orientação e pela oportunidade em fazer parte do seu grupo de pesquisa. Tenho uma admiração enorme pelo seu trabalho. Agradeço a toda a equipe do laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e Microbiota Animal (BIOTAN), Juliana, Nívea, Katialaine, Yasmin, Ana Júlia e Vivian, por todo acolhimento, paciência e ensinamento. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto e me despertaram para uma ciência que é construída em coletivo. Um agradecimento especial a Kátia, que sempre esteve presente, com muita disposição, para me ensinar e para me incentivar a acreditar no meu trabalho. Vocês têm a minha gratidão.

Agradeço ao Departamento de Microbiologia e ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola por todo suporte na realização deste projeto. Agradeço ao professor Wendel e à professora Denise, pela preocupação e disposição em contribuir com o desenvolvimento deste trabalho. Meus agradecimentos se estendem aos técnicos de laboratório, Nívea, Alex e Patrícia. É um prazer trabalhar e aprender com vocês. Vocês realizam um trabalho ímpar no DMB e precisam ser

reconhecidos por isso. Agradeço também a secretária Letícia. Seu trabalho, eficiência e respeito aos alunos faz com que nosso primeiro contato com o PPGMBA seja uma experiência agradável e acolhedora.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“A verdadeira trilha é feita caminhando. Não existem mapas universais e atalhos iguais para todos. Cada vida é a bússola da própria existência e algumas ruas cabe a nós construir”.

(João Doederlein)

BIOGRAFIA

RODRIGO GONÇALVES DIAS, filho de Antônio Dias Dornelas e Maria Natividade Henrique Dias, nasceu em São João do Manhuaçu – Minas Gerais, em 28 de Maio de 1996.

Iniciou o curso de Biomedicina, no Centro Universitário Faminas – UNIFAMINAS em Muriaé, em fevereiro de 2014, pelo qual se graduou Bacharel em Biomedicina em janeiro de 2018.

Em Outubro de 2020 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

RESUMO

DIAS, Rodrigo Gonçalves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2022. **Obtenção de linhagens de *Streptococcus equinus* HC5 com produção aumentada de bovicina HC5 por evolução adaptativa em laboratório.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadores: Denise Mara Soares Bazzoli, Tiago Antônio de Oliveira Mendes e Wendel Batista da Silveira.

A bacteriocina bovicina HC5, sintetizada por *Streptococcus equinus* HC5, é capaz de inibir o crescimento de diversos microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Além disso, o peptídeo é termotolerante, resistente ao pH ácido e apresenta baixa toxicidade *in vivo*, o que confere vantagens para sua aplicação industrial. Obter maior rendimento de produção e efetiva recuperação é um dos principais gargalos para viabilizar o uso da bovicina HC5. Neste projeto, *S. equinus* HC5 foi submetido a diferentes temperaturas de incubação para avaliar os efeitos do estresse térmico no crescimento deste microrganismo. Posteriormente, foi utilizado a técnica de evolução adaptativa em laboratório (EAL) por estresse térmico com o objetivo de selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com maior produção de bovicina HC5. Foi observado, neste estudo, que a temperatura ótima de crescimento do *S. equinus* HC5 é 42 °C e que temperaturas maiores que 49 °C inibem completamente o crescimento da cultura. O processo de EAL em batelada foi mantido por 400 gerações (100 dias) em temperaturas de 47 °C e 48 °C. Oito linhagens com fenótipos distintos foram selecionadas, sendo que destas, duas apresentaram produção aumentada de bovicina HC5 entre 26% e 140% ($P < 0,05$). A linhagem com a maior produção da bacteriocina apresentou expressão diferencial dos genes biossintéticos da bovicina HC5, e foi observado maiores níveis de expressão do gene que codifica para o peptídeo precursor (*bvcA*) ($P < 0,05$). Além disso, as linhagens adaptadas apresentaram modificação na composição dos ácidos graxos de membrana, com aumento da concentração de ácidos graxos saturados ($P < 0,05$). A linhagem obtida ao final do processo de evolução apresentou maior resistência ao estresse térmico, demonstrando maior taxa de crescimento específico ($\mu = 1,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) e biomassa ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 4,03 \pm 0,06$) a 48 °C em relação à linhagem selvagem ($\mu = 0,98 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ e $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,96 \pm 0,12$) ($P < 0,05$). Os resultados desta pesquisa indicam que a EAL é uma estratégia eficaz para a seleção de linhagens de *S. equinus* HC5 com produção aumentada da bacteriocina bovicina HC5.

Palavras-chave: Bacteriocinas. Bactérias lácticas. Estresse térmico.

ABSTRACT

DIAS, Rodrigo Gonçalves, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, October, 2022. **Obtaining strains of *Streptococcus equinus* HC5 with increased production of bovicin HC5 by adaptive laboratory evolution.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli, Tiago Antônio Mendes and Wendel Batista da Silveira.

Bovicin HC5, a bacteriocin synthesized by *Streptococcus equinus* HC5, is capable of inhibiting the growth of several pathogenic and food-deteriorating microorganisms. Obtaining higher production yields and effective recovery is one of the main bottlenecks to enabling applied use of bovicin HC5. In this project, *S. equinus* HC5 was subjected to different incubation temperatures to evaluate the effects of heat stress on the growth of this bacterium. Subsequently, the technique of adaptive laboratory evolution (ALE) by heat stress was used in order to select *S. equinus* HC5 strains with higher production of bovicin HC5. It was observed in this study that the optimal temperature for growth of *S. equinus* HC5 is 42 °C and that temperatures higher than 49 °C completely inhibit growth. The batch ALE process was maintained for 400 generations (100 days) at temperatures of 47 °C and 48 °C. Eight strains with different phenotypes were selected, and of these, two showed increased production of bovicin HC5 between 26% and 140% ($P < 0.05$). The strain with the highest bacteriocin production showed differential expression of the bovicin HC5 biosynthetic genes, and higher expression of the gene encoding the precursor peptide (*bvcA*) ($P < 0.05$). In addition, the adapted strains showed changes in the composition of membrane fatty acids, with an increase in the concentration of saturated fatty acids ($P < 0.05$). Furthermore, the final strain obtained in the evolution process showed greater resistance to heat stress, obtaining a higher specific growth rate ($\mu = 1.33 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$) and biomass ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 4.03 \pm 0.06$) at 48 °C than the wild-type strain ($\mu = 0.98 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ and $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.96 \pm 0.12$) ($P < 0.05$). The results presented in this study indicate that ALE is an effective strategy to select *S. equinus* HC5 strains with increased production of bacteriocin bovicin HC5.

Keywords: Bacteriocins. Lactic acid bacteria. Thermal stress.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
CAPÍTULO 1	16
1. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Microbiota ruminal	16
1.2 Bacteriocinas	18
1.3 <i>Streptococcus equinus</i> HC5 e bovina HC5	20
1.4 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)	22
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2	32
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Microrganismos e condições de cultivo	34
2.2 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)	34
2.3 Caracterização fenotípica das linhagens de <i>S. equinus</i> HC5 obtidas na EAL.....	36
2.4 Extração de ácidos graxos de membrana e análise de ésteres metílicos.....	39
2.5 Análise da expressão dos genes biossintéticos de bovina HC5 por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)	40
2.6 Análise estatística	42
3. RESULTADOS	42
3.1 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)	42
3.2 Caracterização fenotípica das linhagens de <i>S. equinus</i> HC5 obtidas na EAL.....	48
3.3 Composição de ácidos graxos da membrana.....	53

3.4	Análise da expressão dos genes biossintéticos de bovicina HC5 por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	56
4.	DISCUSSÃO	58
5.	CONCLUSÕES	65
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INTRODUÇÃO GERAL

Desde o advento dos antibióticos com a descoberta da penicilina, o mundo tem experimentado diversos avanços na medicina e na produção industrial, o que tem nos permitido, juntamente com outros avanços tecnológicos, vislumbrar crescente expectativa de vida e sustentar elevadas taxas de crescimento populacional. O uso de antibióticos na área clínica permite não apenas o controle de infecções microbiana simples, mas também procedimentos de elevada complexidade como transplante de órgãos. Na produção de alimentos, mais especificamente proteína de origem animal, o uso de antibióticos como promotores de crescimento tem permitido aumentos na eficiência da conversão alimentar e maior rendimento na produção de carne e produtos lácteos.

No entanto, o uso amplo de antibióticos na agricultura e no controle de infecções na população tem exercido pressão de seleção que contribui para o aumento da prevalência de bactérias resistentes e multirresistentes, com riscos para a saúde pública. Desse modo, se faz urgente o desenvolvimento de alternativas para o uso de antibióticos, especialmente nos setores de produção animal, de forma que seja possível realizar o controle de microrganismos patogênicos ou deteriorantes de alimentos sem comprometer a eficácia de antibióticos de uso clínico. Neste contexto, as bacteriocinas têm sido propostas como estratégias alternativas ou complementares ao uso dos antibióticos no tratamento profilático e terapêutico de animais e na modulação do microbioma intestinal.

As bacteriocinas compreendem um grupo de peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por bactérias. Tais moléculas têm despertado crescente atenção das indústrias alimentícias e farmacêuticas, visto que apresentam alta estabilidade química, amplo espectro de ação contra patógenos, baixa citotoxicidade às células de mamíferos e baixa tendência de promover resistência bacteriana. No entanto, o baixo rendimento dessas moléculas confere limitações quanto ao uso desses peptídeos, sendo o aumento da produção e recuperação dos peptídeos uma das principais barreiras a serem transpostas.

Streptococcus equinus HC5 é uma bactéria Gram-positiva aerotolerante, isolada do rúmen bovino, capaz de sintetizar a bacteriocina bovicina HC5. *S. equinus* HC5 pertence ao complexo *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* (SBSEC). A revisão taxonômica mais recente, baseada em biomarcadores genéticos (16S rRNA,

sodA e groEL), descreve SBSEC como compreendendo as espécies: *Streptococcus equinus*, *Streptococcus infantarius subsp. infantarius*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus alactolyticus* e *Streptococcus gallolyticus*. A bovicina HC5 é até o momento a bacteriocina isolada do rúmen melhor caracterizada, possui amplo espectro e mecanismo de ação na membrana citoplasmática similar à nisina. Estudos anteriores demonstraram que a bovicina HC5 inibiu bactérias indesejáveis da fermentação ruminal e patógenos bacterianos presentes na silagem, além de que seu uso combinado com a nisina impediu o crescimento de bactérias deterioradoras de alimentos. A bovicina HC5 também demonstrou eficácia contra diversos microrganismos causadores de mastite bovina, incluindo diversas estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Apesar do potencial de aplicação da bovicina HC5, sua produção pela linhagem selvagem ainda requer melhoria da produtividade para viabilizar ensaios *in vivo* que demandem maior quantidade do peptídeo, a exemplo de experimentos com animais. Considerando o potencial biotecnológico bovicina HC5, a otimização da sua via de produção e o aumento do rendimento deste peptídeo se tornam alvo de estudo. À vista disso, neste estudo foi avaliada a hipótese de que a evolução adaptativa em laboratório de *S. equinus* HC5, submetido a estresse térmico, permite selecionar linhagens com alterações no envelope celular que contribuem para o aumento do rendimento de bovicina HC5. Classicamente, o aumento de produtividade pode ser atingido por meio da seleção de linhagens melhoradas do organismo produtor ou por técnicas de biologia molecular. A Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL) pode ser uma ferramenta valiosa dentro da microbiologia industrial para obtenção de linhagens de microrganismos com fenótipos melhorados. Nesta técnica, populações microbianas são cultivadas em condições de crescimento definidas por diversas gerações até a seleção de linhagens com características desejadas. Estratégias como a EAL podem oferecer possibilidades de obtenção de mutantes de *S. equinus* HC5 com melhores características fenotípicas, como produção aumentada de bovicina HC5. Além disso, esta técnica pode expandir os conhecimentos sobre a expressão dos genes biossintéticos da bacteriocina bovicina HC5, bem como aumentar o arcabouço de informações acerca da fisiologia do *S. equinus* HC5.

Neste projeto, *S. equinus* HC5 foi submetido a diferentes temperaturas de incubação para avaliar os efeitos do estresse térmico no crescimento da bactéria.

Posteriormente, foi utilizada a técnica de EAL por estresse térmico para selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com fenótipos de interesse melhorados.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Microbiota ruminal

Os animais ruminantes caracterizam-se por possuir estômago composto por quatro cavidades: rúmen, retículo, omaso e abomaso (RUSSELL, 2000). O rúmen é o maior compartimento, sendo um ambiente anaeróbico, isotérmico (temperatura em torno de 39-42 °C), com pH entre 6,0 e 7,0 e presença permanente de substratos, o que contribui para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios e anaeróbios facultativos e para intensa atividade fermentativa (KOZLOSKI, 2002). O ambiente ruminal é colonizado por populações interdependentes de bactérias, arqueas, protozoários, fungos e vírus. As bactérias representam o grupo mais abundante e diverso de microrganismos, dominado, principalmente, por bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, que podem representar quase 80% da comunidade bacteriana, sendo o gênero *Prevotella* um dos mais dominantes. (KITTELMANN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2019).

Os microrganismos presentes no rúmen são responsáveis pela decomposição de nutrientes, principalmente celulose e hemicelulose, e realizam a fermentação de carboidratos e proteínas, que são convertidos em moléculas mais simples, como açúcares e aminoácidos. Devido às condições anaeróbicas do rúmen, a fermentação microbiana ruminal metaboliza os açúcares em ácidos graxos voláteis, dióxido de carbono e metano (CREEVEY *et al.*, 2014). Nesse ecossistema com intensa atividade fermentativa, as bactérias são classificadas de acordo com a atividade metabólica que desempenham na digestão ruminal: fibrolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*), amilolíticas (*Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus* spp.), proteolíticas (*Prevotella* spp.), lipolíticas (*Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (*Streptococcus* spp. e *S. ruminantium*) e consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*) (CREEVEY *et al.*, 2014; HUNGATE, 1966).

A diversidade e abundância relativa da microbiota ruminal é afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos ao animal, sendo que esta microbiota pode responder ao uso de antibióticos, regime de dieta, idade e a saúde do animal hospedeiro; além de fatores ambientais associados a localização geográfica, clima e estações do ano

(HENDERSON *et al.*, 2015). A exemplo, altas temperaturas e umidade ambiente são capazes de causar estresse térmico em ruminantes e afetar a microbiota do rúmen, o que pode diminuir significativamente o desempenho animal. Considerando o aquecimento global, o problema do estresse térmico afeta cada vez mais a pecuária e a economia. Em um estudo realizado por Zhao e colaboradores (2019), foi avaliado a influência do estresse térmico na composição e no metabolismo de bactérias do rúmen de vacas leiteiras em lactação. Os animais submetidos ao estresse por calor apresentaram aumento significativo nas abundâncias relativas de *Streptococcus* spp. (principal gênero de bactérias produtoras de lactato no rúmen) e Enterobacteriaceae no líquido ruminal. Os pesquisadores observaram também aumento do nível de lactato e redução do pH, fatores que podem resultar em acidose ruminal, um importante distúrbio metabólico no rúmen que afeta negativamente a produção de leite em vacas leiteiras (ZHAO *et al.*, 2019). A capacidade de modulação da microbiota ruminal está diretamente relacionada com a capacidade de adaptação dos microrganismos a diferentes condições e fatores estressantes (HENDERSON *et al.*, 2015).

A alta diversidade e densidade das populações microbianas presentes no ambiente ruminal, proporcionam constante oportunidade de interações ecológicas, como competição, sinergismo e antagonismo entre os microrganismos. Devido a essas interações, algumas estratégias competitivas asseguram a sobrevivência e a permanência de organismos no rúmen. A capacidade de sintetizar compostos antimicrobianos como as bacteriocinas, confere à algumas bactérias vantagem na colonização do rúmen. Estudos indicam que os gêneros bacterianos *Ruminococcus* (ODENYO *et al.*, 1994; CHEN, STEVEN e SONWEIMER, 2004), *Butyrivibrio* (RYCHLIK e RUSSELL, 2002), *Enterococcus* (NIGUTOVA *et al.*, 2007) e *Streptococcus* (MANTOVANI *et al.*, 2002; WHITFORD *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2004; JOACHIMSTHAL *et al.*, 2010) são os mais frequentemente associados à produção de peptídeos antimicrobianos.

Em um estudo, realizado por Azevedo e colaboradores (2015), foi avaliado a distribuição e a diversidade de clusters gênicos de bacteriocinas nos genomas de 224 bactérias e cinco arqueas ruminais. Foram identificados 46 clusters de genes de bacteriocinas em 33 estirpes de bactérias ruminais (AZEVEDO *et al.*, 2015). Em outro trabalho, realizado por Oliveira *et al.* (2022), clusters de genes biossintéticos

conservados associados à produção de bacteriocinas foram identificados em diferentes estirpes de *Streptococcus lutetiensis* ruminais, sugerindo que estes microrganismos são potenciais produtores desses peptídeos antimicrobianos.

1.2 Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por bactérias e que apresentam diversidade em sua composição química, estrutural e funcional; diferindo em tamanho, sequência de aminoácidos e mecanismos de ação (COTTER *et al.* 2005). Geralmente, as bacteriocinas são sintetizadas como um pré-peptídeo inativo contendo uma sequência líder na região N-terminal que auxilia o reconhecimento do pré-peptídeo pelas enzimas de maturação e transporte, e protege a estirpe produtora, mantendo a bacteriocina inativa até ser secretada no meio extracelular (MORTON *et al.*, 2015). Esses peptídeos podem ou não sofrer modificações pós-traducionais e diferem dos antibióticos pelo seu mecanismo de síntese. Os antibióticos são tipicamente produzidos por vias biossintéticas compostas por complexo multi-enzimático (COTTER *et al.* 2005). Embora as bacteriocinas sejam estruturalmente diversas, os genes necessários para a biossíntese são geralmente conservados entre diferentes espécies (MORTON *et al.*, 2015).

A maioria dos peptídeos antimicrobianos são produzidos por bactérias Gram-positivas como uma estratégia de defesa. Geralmente, as bacteriocinas são efetivas contra microrganismos filogeneticamente relacionados e são produzidas em situação de estresse ou de elevado nível populacional (RILEY, 2011). Podem possuir espectro de ação amplo ou estreito, sendo que os organismos produtores são imunes às suas próprias bacteriocinas, devido à produção de proteínas específicas de “imunidade”. O mecanismo de ação desses peptídeos podem exibir atividade bactericida ou bacteriostática, formando poros em membranas de células susceptíveis, ou inibindo a síntese de moléculas como peptidoglicano, proteínas e de ácidos nucleicos (PAIVA *et al.*, 2011).

De acordo com o BACTIBASE (banco de dados dedicado a bacteriocinas), existem mais de 177 bacteriocinas descritas, das quais 88% são produtos de bactérias Gram-positivas e 10% de bactérias Gram-negativas. Além disso, é relatado que estas bacteriocinas estão distribuídas em 31 gêneros de microrganismos, sendo as

bactérias do ácido láctico (ordem Lactobacillales) o grupo predominante de produtores, responsável por 64% das bacteriocinas descritas (<http://bactibase.hamamilab.org/statistics.php>, acesso em Setembro de 2022).

As bacteriocinas formam um grupo heterogêneo de peptídeos e por esse motivo foram classificadas em quatro grupos com base na sua estrutura: classe I, constituída por peptídeos que sofrem modificações pós-traducionais; classe II, composta por peptídeos que permanecem inalterados após a tradução; classe III, que inclui proteínas de alta massa molecular (> 30 kDa); e classe IV, que consiste em peptídeos contendo carboidratos ou frações lipídicas (COTTER *et al.* 2005).

Os lantibióticos são agrupados na classe I e reconhecidos pela sua efetiva ação antimicrobiana, sendo que o grande potencial antimicrobiano dos lantibióticos é possibilitado pela estrutura única desses peptídeos. Trata-se de peptídeos de tamanho pequeno (5 kDa), caracterizados pela presença de aminoácidos não usuais como dehidrobutirina (Dhb) e dehidroalanina (Dha), monômeros de β -metilantionina (MeLan) e anéis de lantionina (Lan). Ligações covalentes podem ser formadas entre esses resíduos de aminoácidos, resultando em anéis internos que caracterizam estruturalmente os lantibióticos. Outros resíduos de aminoácidos incomuns também podem estar presentes na estrutura dos lantibióticos, resultantes da modificação pós-traducional (COTTER *et al.* 2005; BIERBAUM AND SAHL, 2009). Os lantibióticos atuam principalmente, formando poros na membrana citoplasmática que dissipam o gradiente eletroquímico através da membrana. Além disso, podem se ligar a moléculas precursoras da biossíntese de peptidoglicano na membrana plasmática, a exemplo do lipídeo II, inibindo a síntese da parede celular (DISCHINGER *et al.*, 2014).

As bactérias produtoras de lantibióticos são capazes de se proteger dos efeitos da bacteriocina por meio de proteínas de imunidade ancoradas em suas membranas citoplasmáticas. Proteínas de imunidades conhecidas como LanI interagem com a bacteriocina impedindo a formação de poros na membrana citoplasmática (KHOSA *et al.*, 2016). Além disso, as proteínas de imunidade LanF, LanE e LanG atuam como transportador ABC especializado na secreção de lantibióticos do citoplasma para o meio extracelular (ASO *et al.*, 2005). Dentre os lantibióticos ruminais melhor caracterizados e com potencial de aplicação biotecnológica, destaca-se a bovicina HC5, sintetizada por *S. equinus* HC5.

1.3 *Streptococcus equinus* HC5 e bovicina HC5

Streptococcus spp. compreende um gênero de bactérias comensais com grande importância industrial e na clínica humana e veterinária. Esse gênero se destaca pela alta capacidade adaptativa em diferentes ecossistemas, resistência a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro (JANS *et al.*, 2015). O complexo *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* (SBSEC), pertence ao grupo de *Streptococcus* spp do grupo D não enterocócico e a análise de biomarcadores genéticos (16S rRNA, *sodA* e *groEL*), indicou que SBSEC compreende as espécies: *Streptococcus equinus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus alactolyticus* e *Streptococcus gallolyticus* (POMPILIO, BONAVENTURA e GHERARD, 2019). Espécies representativas deste complexo bacteriano são comumente encontradas no trato digestivo de humanos e ruminantes, mas também, foi relatado em aves e suínos, e seus produtos alimentícios, bem como em alguns animais silvestres, tais como aves, marsupiais e mamíferos aquáticos. (PARK *et al.*, 2021). Para a maioria dos microrganismos do grupo SBSEC o crescimento ocorre em temperaturas entre 10 e 45 °C, com temperatura ótima em torno de 37 °C. Dependendo da espécie, maior crescimento ocorre em atmosfera com 5% de CO₂, enquanto algumas linhagens requerem concentrações mais altas de CO₂ (HODGE E SHERMAN, 1936).

S. equinus HC5, pertencente ao complexo SBSEC, é uma bactéria aerotolerante Gram-positiva isolada do rúmen bovino. Os estreptococos ruminais (*S. bovis*/*S. equinus*) são considerados importantes produtores de ácido láctico no ecossistema ruminal (MANTOVANI *et al.* 2002; HUNGATE, 1966). *S. equinus* HC5 é capaz de sintetizar uma bacteriocina denominada bovicina HC5 (MANTOVANI *et al.*, 2002). Esta bacteriocina é um peptídeo anfifílico de 2449 Da carregado positivamente, classificada como um lantibiótico de classe I e que apresenta resíduos de aminoácidos modificados pós-traducionalmente, com um padrão de anéis de lantionina similar à nisina (MANTOVANI *et al.*, 2002). Até o momento, a bovicina HC5 é a bacteriocina isolada do rúmen mais bem caracterizada, com cluster gênico constituído pelos genes *bvcATCBFEGRK* com tamanho estimado de 10,1 kb. O gene *bvcA* codifica o precursor de bovicina HC5 enquanto, *bvcB* e *bvcC* codificam enzimas necessárias para modificação pós-traducional; *bvcT* possui homologia com o transportador necessário para a secreção de lantibióticos. Os genes *bvcFEG* codificam proteínas de imunidade,

enquanto *bvcRK* estão associados com o sistema de regulação da biossíntese do peptídeo (AZEVEDO *et al.*, 2015).

Sugere-se que a biossíntese da bovicina HC5 ocorre conforme descrito para outros lantibióticos. Inicia-se com a tradução do gene estrutural *lanA*, que codifica um peptídeo precursor, constituído pela região líder (LanA) e a sequência do estrutural do peptídeo que é modificado enzimaticamente após a tradução (ARNISON *et al.*, 2013). No peptídeo precursor os resíduos de serina e treonina sofrem desidratação e formam dehidroalanina (Dha) e dehidrobutirina (Dhb), respectivamente. As enzimas LanB (desidratase) e LanC (ciclase) catalisam as reações entre a amina da cisteína e a carbonila da Dha/Dhb, que resulta na formação dos anéis de lantionina (Lan) e β -metilantionina (MeLan), na devida ordem (BIERBAUM e SAHL, 2009). O peptídeo recém modificado, é translocado para o exterior da célula pela enzima de transporte LanT, que pode ser responsável por clivar o peptídeo líder através do domínio cisteíno-protease N-terminal de algumas LanT (WILLEY e VAN DER DONK, 2007; ARNISON *et al.* 2013).

A maior recuperação de atividade da bovicina HC5 foi observada quando *S. equinus* HC5 foi cultivado em meio basal (pH 6,5), em anaerobiose sob fluxo constante de CO₂. A produção de bovicina HC5 ocorre em diferentes temperaturas de incubação do microrganismo produtor, se mantendo constante em temperaturas entre 33 - 42 °C, com diminuição da atividade em temperaturas superior a 45 °C (BARBOSA *et al.*, 2015). Devido a característica catiônica desta bacteriocina, durante o crescimento do *S. equinus* HC5 a maioria das moléculas permanecem ligadas à membrana celular das células produtoras. Dessa forma, a extração da bovicina HC5 é baseada em troca iônica, utilizando soluções ácidas de cloreto de sódio (MANTOVANI *et al.*, 2002).

A bovicina HC5 é resistente à α -quimiotripsina, proteinase K e ao aquecimento a 121°C por 20 min, características vantajosas para sua aplicação industrial (MANTOVANI *et al.*, 2002). O amplo espectro de ação da bovicina HC5 em bactérias Gram-positivas pode estar relacionado com o seu mecanismo de ação, semelhante ao da nisina, com ligação específica da bacteriocina no lipídeo II presente na membrana das células alvos de microrganismos sensíveis. A associação da bovicina HC5 com o lipídeo II pode interferir com a biossíntese da parede celular, por meio da inibição da síntese de peptideoglicano. Conseqüentemente, há formação de poros na membrana,

o que ocasiona a depleção de potássio intracelular e de ATP nas células alvos (MANTOVANI e RUSSELL, 2008).

Diversos trabalhos demonstram resultados promissores para aplicação da bovicina HC5 na indústria alimentícia devido a atividade contra bactérias deterioradoras de alimentos. Em um trabalho realizado por Ribeiro e colaboradores (2022), bovicina HC5 e nisina reduziram a viabilidade celular e a resistência térmica de endósporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em sucos de frutas. A atividade de bovicina HC5 também foi relatada em bactérias isoladas de alimentos, tais como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum* e *Bacillus thuringiensis* (MANTOVANI e RUSSELL, 2003; DE CARVALHO, *et al.*, 2007; DE CARVALHO, *et al.*, 2008).

Alguns resultados também apontam aplicação da bovicina HC5 na produção agropecuária, uma vez que esta bacteriocina tem atividade contra bactérias que reduzem a eficiência ruminal, e foi capaz de reduzir a produção de metano ruminal *in vitro* (FLYTHE e RUSSELL, 2004; LEE *et al.*, 2002); um efeito semelhante foi obtido com bovicina HC5 na redução da produção de amônia ruminal por bactérias (LIMA *et al.*, 2009). Além disso, Godoy-Santos *et al.* (2019), demonstraram que a bovicina HC5 apresenta eficácia contra diversos microrganismos causadores de mastite bovina, incluindo estirpes de *Staphylococcus aureus*.

Embora o potencial de aplicação da bovicina HC5 tenha sido explorado em diversos trabalhos ainda se faz necessária a superação de algumas barreiras tecnológicas para que a produção da bacteriocina seja escalonável. Obter maior rendimento de produção e efetiva recuperação é um dos principais gargalos para viabilizar o uso da bovicina HC5 de forma industrial.

1.4 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)

A evolução natural é o processo no qual as espécies da biosfera sofrem mutações e recombinações, que são dependentes do ambiente ou são hereditárias, seguida pela seleção natural, onde as espécies mais adaptadas aos seus ambientes sobrevivem e se reproduzem (DARWIN, 1859). Todo esse processo também é conhecido como evolução adaptativa (METZGAR e WILLS, 2000). A evolução

adaptativa em laboratório (EAL) é o processo no qual os princípios da evolução natural são implementados em laboratório para uma população específica sob condições controladas e desejadas (MAVROMMATI *et al.*, 2022). Nessa técnica, populações microbianas são cultivadas em condições de crescimento definidas por períodos prolongados, e linhagens adaptadas com o fenótipo de interesse podem ser selecionadas (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2022).

Os experimentos de EAL são realizados principalmente em microrganismos, pois apresentam vantagens sobre animais e plantas, como: curto tempo de geração, grande tamanho populacional, ambiente facilmente aplicável e reprodutível. Outro fator importante é que culturas de microrganismos podem ser congeladas e permanecem viáveis por longo período de tempo; além do que, apresentam genomas relativamente pequenos que simplificam a análise e compreensão dos mecanismos de adaptação (MAVROMMATI *et al.*, 2022).

A estratégia mais comum para a realização de um experimento EAL em populações microbianas é o cultivo em bateladas. Tecnicamente, esse processo é realizado inoculando as células do microrganismo em meio líquido, cultivando-as sob a pressão seletiva desejada e transferindo alíquotas dessa cultura de uma batelada para outra. O procedimento continua até o número desejado de gerações, de forma que é possível manter ou aumentar a pressão seletiva durante o experimento. De forma alternativa, o experimento EAL pode ser realizado em dispositivos de cultura contínua, como os quimiostatos. Nestes equipamentos as células microbianas são cultivadas sob um ambiente controlado. O meio de cultura é adicionado ao biorreator a uma taxa constante, enquanto a cultura microbiana é removida na mesma taxa de entrada do meio, de modo que o volume permaneça inalterado ao longo do tempo. Durante um experimento de EAL por cultura contínua, um único nutriente essencial é usado como fator limitante do crescimento, enquanto todos os outros nutrientes são abundantes no meio (GRESHAM e HONG, 2015; MAVROMMATI *et al.*, 2022).

A EAL tornou-se valiosa para a engenharia metabólica e para a microbiologia industrial, e pode ser utilizada para diferentes aplicações: Otimização da taxa de crescimento e aumento da tolerância a estresses, assimilação de substrato, aumento do rendimento/título do produto e para estudos da fisiologia, do metabolismo e da expressão gênica de microrganismos. Diversas pesquisas com EAL estão sendo

conduzidas para a obtenção de microrganismos com fenótipos de interesse melhorados, como: melhoramento da produção de etanol, aumento da produção de bacteriocinas, ácido láctico, lipídeos e carotenóides; além de obtenção de resistências térmica, osmótica e oxidativa, bem como melhoramento da assimilação de substratos de baixo valor agregado (SANDBERG *et al.*, 2019).

Em uma pesquisa conduzida por da Silveira e colaboradores (2020) a levedura *Kluyveromyces marxianus* foi sujeitada a EAL com o objetivo de obter linhagens tolerantes ao etanol. As células de *K. marxianus* foram expostas à concentração constante de etanol (4 % v /v). A linhagem evoluída apresentou taxa de crescimento específico 122% maior do que sua linhagem selvagem quando cultivada em etanol 4% v/v. A toxicidade do etanol é um dos estresses mais prejudiciais que as células de levedura sofrem durante a fermentação alcoólica, resultando em menor viabilidade celular, menor eficiência do processo fermentativo e diminuição da produção de etanol. Portanto, a otimização da tolerância ao etanol pelos microrganismos produtores de etanol é uma das principais melhorias que os pesquisadores buscam (DA SILVEIRA *et al.*, 2020; MAVROMMATI *et al.*, 2022). Mladenović *et al.* (2019) utilizaram o processo de EAL para melhorar a assimilação de melaço e produtividade de ácido láctico por *Lactobacillus paracasei*, aumentando gradualmente a concentração de melaço durante o processo de evolução. A linhagem evoluída apresentou maiores taxas de consumo de melaço e 59% maior produtividade de ácido láctico quando comparado com a estirpe selvagem.

Um estudo realizado por Papiran e Hamedí (2021), a EAL sob estresse térmico e oxidativo foi aplicada em *L. lactis* com o objetivo de aumentar os rendimentos de biomassa e de nisina. A linhagem final adaptada ao estresse oxidativo, apresentou produção de biomassa e nisina aumentada 1,87 e 1,48, respectivamente, em relação a linhagem selvagem. Além disso, a linhagem de *L. lactis* adaptada ao estresse térmico apresentou produção de biomassa e nisina aumentadas 1,2 e 1,32 vezes, respectivamente, em relação à estirpe de *L. lactis* selvagem. Em outro estudo realizado por Moreira, Mendes e Mantovani (2021), pioneiro na utilização da EAL em bactérias lácticas para obtenção de maior rendimento de título de bacteriocinas, o microrganismo produtor da bacteriocina bovicina HC5, *S. equinus* HC5, foi submetido a um processo de EAL sob estresse ácido e os resultados mostraram maior recuperação de bovicina HC5 pela linhagem adaptada em relação a selvagem. Além

disso, o estudo contribuiu para o entendimento do nível de expressão dos genes biossintéticos de bovicina HC5 ao longo das fases do crescimento de *S. equinus* HC5.

A EAL é uma ferramenta valiosa que pode ser utilizada para a compreensão das vias genéticas e/ou metabólicas de microrganismos, bem como para o melhoramento da fabricação de produtos industriais de alto valor agregado, sendo um método promissor e eficaz para a biotecnologia e microbiologia industrial (MAVROMMATI *et al.*, 2022). Estratégias como a EAL podem oferecer possibilidades de obtenção de linhagens de *S. equinus* HC5 com melhores características fenotípicas, como produção aumentada de bovicina HC5. Além disso, essa técnica pode expandir os conhecimentos sobre a expressão dos genes biossintéticos da bacteriocina bovicina HC5, bem como aumentar o arcabouço de informações acerca da fisiologia do *S. equinus* HC5. Devido a bovicina HC5 permanecer aderida ao envelope celular do microrganismo produtor em razão da sua característica catiônica, foi avaliada a hipótese de que a EAL de *S. equinus* HC5 submetido a estresse térmico permite selecionar linhagens com alterações no envelope celular que contribuem para o aumento do rendimento de bovicina HC5.

Neste projeto, *Streptococcus equinus* HC5 foi submetido a diferentes temperaturas de incubação para avaliar os efeitos do estresse térmico no crescimento deste microrganismo. Posteriormente, foi utilizada a técnica de EAL por estresse térmico para selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com fenótipos de interesse melhorados.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNISON, P. G. *et al.* Ribosomally synthesized and post translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 108-60, 2013.

ASO, Y. *et al.* A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1403–1410, 2005.

AZEVEDO, A. C. *et al.* Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7290–7304, 2015.

ANDRÉA TEIXEIRA BARBOSA, A. *et al.* LIKE IT ACID AND POOR: A STUDY OF ABIOTIC FACTORS INFLUENCING *Streptococcus bovis* HC5 GROWTH AND BACTERIOCIN PRODUCTION. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 4, n. 5, p. 421–426, 2015.

BIERBAUM, G.; SAHL, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 2–18, 2009.

CHEN, J.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Albusin B, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3167–3170, 2004.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.

CREEVEY, C. J. *et al.* Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 467–479, 2014.

DARWIN, C., *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. Murray, London. 1859.

DA SILVEIRA, F. A. *et al.* Assessment of ethanol tolerance of *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 selected by adaptive laboratory evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 17, p. 7483–7494, 2020.

DE CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 68–74, 2007.

DE CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1685–1691, 2008.

DE OLIVEIRA, I. M. F. *et al.* Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of Antimicrobial Producing *Streptococcus lutetiensis* from the Rumen. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, 2022.

DISCHINGER, J.; BASI CHIPALU, S.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 51–62, 2014.

FLYTHE, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 2, p. 215–222, 2004.

GODOY-SANTOS, F. *et al.* Efficacy of a Ruminal Bacteriocin Against Pure and Mixed Cultures of Bovine Mastitis Pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 304–312, 1 set. 2019.

GRESHAM, D.; HONG, J. The functional basis of adaptive evolution in chemostats. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 1, p. 2–16, 2015.

HENDERSON, G. *et al.* Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, 2015.

HODGE E SHERMAN. *Streptococcus equinus*. **Streptococcus**. n. 1910, p. 283–289, 1936.

HUNGATE, R. E. Ruminations on the rumen. **The rumen and its microbes**, p. 533, 1966.

JANS, C. *et al.* Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 33, p. 419–436, 2014.

JOACHIMSTHAL, E. L. *et al.* Production of bacteriocins by *Streptococcus bovis* strains from Australian ruminants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 428–436, 2010.

KITTELMANN, S. *et al.* Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

KHOSA, S.; LAGEDROSTE, M.; SMITS, S. H. J. Protein defense systems against the lantibiotic nisin: Function of the immunity protein Nisl and the resistance protein NSR. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–9, 2016.

KOZLOSKI, V. G. Bioquímica microbiana ruminal. In: **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFMS, 2002, cap. 1, p. 140p.

LEE, S. S. *et al.* The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro¹. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 51–55, 2002.

LIMA, J. R. *et al.* Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, n. 1, p. 78–84, 2009.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. J. *et al.* Adaptive evolution of industrial *Lactococcus lactis* under cell envelope stress provides phenotypic diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–17, 2018.

MANTOVANI, H. C. *et al.* Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347–3352, 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 77–83, 2003.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247–2249, 2008.

MAVROMMATI, M. *et al.* Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 54, n. April 2021, p. 107795, 2022.

METZGAR, D.; WILLS, C. Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. **Cell**, v. 101, n. 6, p. 581–584, 2000.

MLADENOVIĆ, D. *et al.* Enhanced Lactic Acid Production by Adaptive Evolution of *Lactobacillus paracasei* on Agro-industrial Substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 3, p. 753–769, 2019.

MOREIRA, S. M.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; MANTOVANI, H. C. Stimulation of Bovicin HC5 Production and Selection of Improved Bacteriocin-Producing *Streptococcus equinus* HC5 Variants. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 899–913, 2021.

MORTON, J. T. *et al.* A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2015.

NIGUTOVA, K. *et al.* Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram-positive cocci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 563–569, 2007.

ODENYO, A. A. *et al.* The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: Pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3697–3703, 1994.

PAIVA, A. D.; BREUKINK, E.; MANTOVANI, H. C. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5284–5293, 2011.

PAPIRAN, R.; HAMED, J. Adaptive Evolution of *Lactococcus Lactis* to Thermal and Oxidative Stress Increases Biomass and Nisin Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 11, p. 3425–3441, 2021.

PARK, S. Y. *et al.* Diversity and antimicrobial resistance in the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (Sbsec) isolated from Korean domestic ruminants. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–24, 2021.

POMPILIO, A.; DI BONAVENTURA, G.; GHERARDI, G. An overview on *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex isolates: Identification to the species/subspecies level and antibiotic resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 2019.

RIBEIRO, A. M. *et al.* Bovicin HC5 and nisin reduce cell viability and the thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* endospores in fruit juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 10, p. 3994–4002, 2022.

RILEY, M. A. Prokaryotic Antimicrobial Peptides. **Prokaryotic Antimicrobial Peptides**, p. 13–26, 2011.

RUSSELL, J. B. Rumen Fermentation. **Encyclopedia of Microbiology, Academic Press**. v. 4, p. 185-194. 2000

RYCHLIK, J. L.; RUSSELL, J. B. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1040–1046, 2002.

SANDBERG, T. E. *et al.* The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. **Metabolic Engineering**, v. 56, p. 1–16, 2019.

WHITFORD, M. F. *et al.* Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 569–574, 2001.

WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 477–501, 2007.

WU, Y. *et al.* Advanced strategies and tools to facilitate and streamline microbial adaptive laboratory evolution. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 38–59, 2022.

XIAO, H. et al. Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. **Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 103–108, 2004.

ZHAO, S. *et al.* Effect of heat stress on bacterial composition and metabolism in the rumen of lactating dairy cows. **Animals**, v. 9, n. 11, 2019.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos e a desaceleração na descoberta de novas classes destes medicamentos são considerados problemas graves para a saúde pública mundial (Organização Mundial de Saúde – OMS, 2019). Neste contexto, tem aumentado os estudos para identificar estratégias terapêuticas com potencial de aplicação nos setores alimentício, biomédico e agropecuário (SOLTANI *et al.*, 2021). Entre as moléculas com potencial antimicrobiano, as bacteriocinas representam o grupo mais importante como alternativa aos antibióticos, visto que apresentam alta estabilidade química, amplo espectro de ação, baixa citotoxicidade e baixa pressão seletiva para resistência bacteriana (BENÍTEZ-CHAO *et al.*, 2021; GROSU-TUDOR *et al.*, 2014; PERALES-ADÁN *et al.*, 2018; TODOROV *et al.*, 2017). Isto posto, existe grande interesse em compreender a biossíntese e produção dessas moléculas antimicrobianas para aplicabilidade industrial.

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomicamente por bactérias e que apresentam diversidade em sua composição química, estrutural e funcional (COTTER *et al.* 2005). Dentre as bacteriocinas, a bovicina HC5 é um lantibiótico de classe I de 2449 Da carregado positivamente, caracterizada pela presença de modificações pós-traducionais. Este peptídeo é sintetizado por *Streptococcus equinus* HC5, bactéria aerotolerante, Gram-positiva, isolada do rúmen bovino (MANTOVANI *et al.*, 2002). Atualmente, a bovicina HC5 é a bacteriocina isolada do rúmen mais bem caracterizada. O cluster gênico é constituído pelos genes *bvcATCBFEGRK*, com tamanho estimado de 10,1 kb. O gene *bvcA* codifica o precursor de bovicina HC5, *bvcB* e *bvcC* codificam enzimas necessárias para modificação pós-traducional; *bvcT* possui homologia com o transportador necessário para a secreção de lantibióticos. Os genes *bvcF*, *bvcE*, e *bvcG* codificam as proteínas de imunidade, enquanto *bvcR* e *bvcK* estão associados com o sistema de regulação da biossíntese do peptídeo (AZEVEDO *et al.*, 2015). A maior atividade específica de bovicina HC5 é observada na fase estacionária do crescimento do *S. equinus* HC5, sendo que devido a característica catiônica do peptídeo a maioria das moléculas permanecem ligadas a membrana celular das células produtoras (MOREIRA, MENDES E MANTOVANI, 2021; MANTOVANI *et al.*, 2002).

Bovicina HC5 apresenta estabilidade em altas temperaturas e pH ácido e baixa toxicidade *in vivo* e amplo espectro de ação, o que confere vantagens para a aplicação industrial (MANTOVANI *et al.*, 2002;; AZEVEDO *et al.*, 2015). Além disso, diversos trabalhos demonstram resultados promissores para aplicação da bovicina HC5 na indústria de alimentos (MANTOVANI e RUSSELL, 2003; DE CARVALHO, *et al.*, 2007; DE CARVALHO, *et al.*, 2008) e na agropecuária (FLYTHE e RUSSELL, 2004; LEE *et al.*, 2002 LIMA *et al.*, 2009; GODOY-SANTOS *et al.*, 2019). Embora inúmeros trabalhos tenham explorado o potencial de aplicação da bovicina HC5, se faz necessária a superação de algumas barreiras tecnológicas para que a produção do peptídeo seja escalonável, como o aumento do rendimento do peptídeo produzido em batelada.

Os estudos para aumentar a produção de bovicina HC5 têm focado na otimização de fatores abióticos e nas condições de crescimento do microrganismo produtor, visando aumentar a biomassa celular ou o rendimento de bacteriocina (BARBOSA *et al.*, 2015; DE CARVALHO *et al.*, 2009). Além disso, Moreira, Mendes e Mantovani (2021) selecionaram linhagens de *S. equinus* HC5 com características fenotípicas melhoradas e maior produção de bovicina HC5 por Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL) sob condição de estresse ácido. A EAL é uma ferramenta valiosa para a microbiologia industrial (MAVROMMATI *et al.*, 2022). Nessa técnica, populações microbianas são cultivadas em condições de crescimento definidas por períodos prolongados, e linhagens adaptadas com o fenótipo de interesse podem ser selecionadas (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.* 2018; WU *et al.*, 2022). A EAL pode possibilitar obtenção de mutantes de *S. equinus* HC5 com características fenotípicas desejáveis do ponto de vista industrial, como por exemplo a produção aumentada de bovicina HC5. Além disso, pode contribuir para expandir o conhecimento acerca dos genes biossintéticos desta bacteriocina.

Em razão da característica catiônica da bovicina HC5, o peptídeo permanece aderido ao envelope celular do microrganismo produtor. No presente trabalho, foi avaliada a hipótese de que a EAL de *S. equinus* HC5 sob estresse térmico permite selecionar linhagens com alterações no envelope celular que contribuem para o aumento do rendimento de bovicina HC5. Esta pesquisa, teve como objetivo, selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com produção aumentada de bovicina HC5 utilizando a estratégia de EAL sob estresse térmico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

S. equinus HC5, produtor de bovicina HC5, foi cultivado a 42 °C em meio basal (PC), semi-sintético, contendo (por litro): 292 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 64 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 500 mg de cisteína hidrocloreídica, 1000 mg de *Trypticase*® (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA), 500 mg de extrato de levedura, 4000 mg de Na_2CO_3 e 8000 mg de glicose. O meio de cultura foi preparado anaerobicamente sob fluxo de CO_2 livre de O_2 e o pH final foi ajustado para 6,5 com NaOH (3 mols l^{-1}). O crescimento foi monitorado em espectrofotômetro Spectronic 200E (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA) por meio da densidade óptica a 600nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$). *Lactococcus lactis* ATCC 19345, bactéria susceptível à bovicina HC5, foi utilizado como microrganismo indicador para os ensaios de quantificação da atividade antimicrobiana. A bactéria indicadora foi cultivada aerobicamente em caldo *Brain Heart Infusion* – BHI (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brasil), a 37 °C, por 24 h antes do uso.

2.2 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)

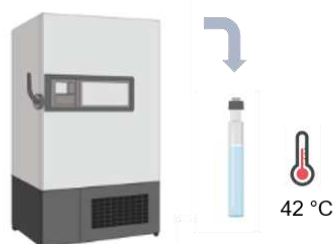
2.2.1 Efeito da temperatura no crescimento de *S. equinus* HC5

S. equinus HC5 foi cultivado em diferentes temperaturas, entre 33°C e 51 °C, por 24 h, mensurando a taxa de crescimento específico (μ) e a densidade óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$), para estabelecer a faixa de temperatura para o cultivo de *S. equinus* HC5 durante a Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL) e para determinar a temperatura ótima e máxima de crescimento. A taxa de crescimento específico (μ) foi calculada a partir da regressão linear dos valores de logaritmo neperiano (\ln) da $\text{DO}_{600\text{nm}}$ em função do tempo (h), utilizando o programa Microsoft Office Excel (2013). Os resultados obtidos foram utilizados para a construção do Gráfico de Arrhenius [$\ln (\mu, \text{h}^{-1}) \times 1/\text{Temperature (K}^{-1})$]. A temperatura mais alta que permitiu manter o crescimento da cultura durante as transferências sucessivas do inóculo foi escolhida como temperatura inicial para o experimento de EAL por bateladas.

2.2.2 Obtenção de linhagens de *S. equinus* HC5 por Evolução Adaptativa em Laboratório sob estresse térmico

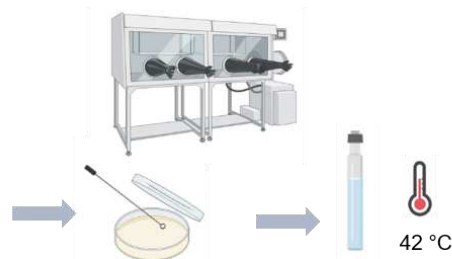
Antes de iniciar o processo de evolução adaptativa sob estresse térmico, a cultura de *S. equinus* HC5 foi ativada em meio PC anaeróbico, na temperatura ótima de crescimento estabelecida previamente. Após a ativação, *S. equinus* HC5 foi cultivado em meio PC anaeróbico sólido em câmara de anaerobiose, por 48 h. Posteriormente, uma colônia de *S. equinus* HC5 foi selecionada e inoculada em meio PC anaeróbico. Para iniciar a EAL, *S. equinus* HC5, foi inoculado em tubo Hungate (16 x 125 mm) contendo 5 ml de meio PC anaeróbico (8 g l⁻¹ glicose) com DO_{600nm} ajustada para 0,05; a incubação foi realizada em banho-maria (Digital Thermostated Bath, modelo B105-DE, OVAN, Barcelona, Espanha) em temperatura de 47 °C. As transferências em série do inóculo (3 % v / v) para um novo tubo contendo o mesmo meio de cultura foram realizadas quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento. A cada 50 gerações foi determinada a DO_{600nm}, a taxa de crescimento específica (μ , h⁻¹) e o tempo de geração da cultura (h). Foram utilizados como critérios de adaptação da cultura à temperatura, o aumento do μ e da DO_{600nm}. Após aumento dos critérios de adaptação, a temperatura de incubação foi elevada para 48 °C. Para a preservação das estirpes adaptadas de *S. equinus* HC5, amostras das culturas coletadas a cada 50 gerações foram armazenadas em glicerol (25 % v / v) a -20 °C e a -80 °C para posterior caracterização fenotípica. O processo de evolução adaptativa foi realizado durante 120 bateladas, por aproximadamente 400 gerações e 100 dias (Figura 1).

① Ativação de *S. equinus* HC5



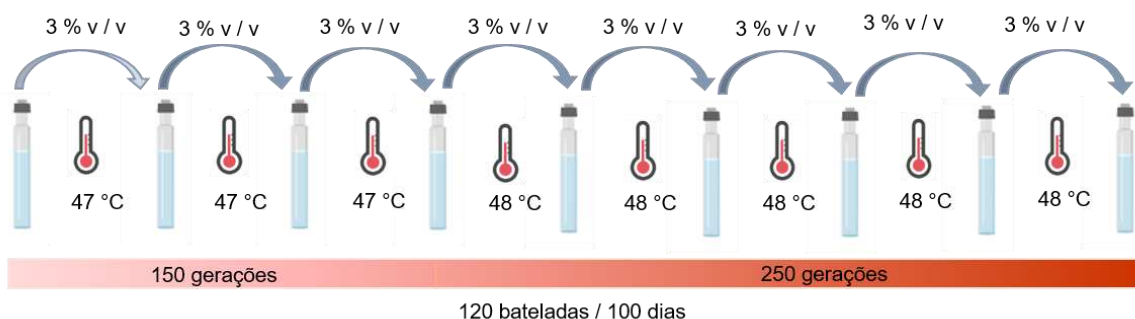
S. equinus HC5 foi ativado do estoque em meio PC a 42 °C por 24h.

② Isolamento de colônia e preparo do inoculo



Após a ativação, *S. equinus* HC5 foi cultivado em meio PC anaeróbico sólido em câmara de anaerobiose, por 48 h. Posteriormente, uma colônia de *S. equinus* HC5 foi selecionada e inoculada em meio PC anaeróbico.

③ Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL) em bateladas por estresse térmico



Para iniciar a EAL, *S. equinus* HC5 foi inoculado em tubo Hungate contendo 5 ml de meio PC anaeróbico (8 g l^{-1} glicose) com $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ajustada para 0,05 em temperatura de 47 °C. As transferências em série do inoculo (3 % v / v) para um novo tubo contendo meio PC foram realizadas na fase estacionária de crescimento de cada batelada. Após aumento dos critérios de adaptação, a temperatura de incubação foi elevada para 48 °C.

Figura 1: Fluxograma metodológico experimental da EAL.

2.3 Caracterização fenotípica das linhagens de *S. equinus* HC5 obtidas na EAL

As linhagens de *S. equinus* HC5 obtidas durante a EAL foram comparadas com a linhagem selvagem quanto aos parâmetros cinéticos de crescimento ($\text{DO}_{600\text{nm}}$, massa seca e velocidade específica de crescimento) e produção de bovicina HC5. As culturas também foram avaliadas quanto à produção de ácidos orgânicos e composição de lipídeos de membrana. As linhagens adaptadas onde a recuperação de bovicina HC5 foi distinta da linhagem parental foram submetidas à análise de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) para avaliar a expressão dos genes de biossíntese, imunidade e regulação da síntese de bovicina HC5. A caracterização fenotípica da bactéria foi realizada em cultivos em batelada sob temperatura de 42 °C.

2.3.1 Parâmetros cinéticos de crescimento

Para determinar a DO_{600nm} e a velocidade específica de crescimento (μ , h^{-1}) da linhagem selvagem e das linhagens obtidas por EAL, as culturas foram cultivadas anaerobicamente em tubos Hungate contendo 5 ml de meio PC a 42 °C, por 24 h. A DO_{600nm} foi monitorada utilizando o espectrofotômetro Spectronic 200E (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, EUA). O μ foi calculado a partir da regressão linear dos valores de logaritmo neperiano (ln) da DO_{600nm} em função do tempo (h), utilizando o programa Microsoft Office Excel (2013).

2.3.2 Extração da bovicina HC5

Para avaliar a eficiência do método de extração da bovicina HC5 do *S. equinus* HC5 selvagem e das linhagens obtidas no processo de EAL, foi utilizado o protocolo de Mantovani *et al.* (2002), sob diferentes condições de temperatura de extração, conforme descrito abaixo. Após 24 h de fermentação, o pH dos cultivos foi ajustado para 7,0, com NaOH (2 M). Posteriormente, as culturas foram submetidas a temperatura de 75°C por 30 min para inativação de peptidases. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min, 4 °C (Sigma 4K15 centrifuge - Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Germany) e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 10 ml de solução de cloreto de sódio (100 mM) com pH ajustado para 2,0 com solução de HCl (1 M). As suspensões foram submetidas a diferentes temperaturas de incubação: 5 ml de cada suspensão foram incubados à 4 °C por 16 h e 5 ml foram tratados termicamente a 100 °C por 10 min. Após as incubações, as suspensões de células foram centrifugadas a 10.000 g por 20 min, a 4 °C e o sobrenadante foi recuperado para avaliação da atividade de bovicina HC5.

A atividade antimicrobiana do extrato foi analisada pelo método de difusão em meio sólido segundo Tagg *et al.* (1976). Os ensaios foram realizados utilizando 20 ml de meio BHI e 20 μ l de inóculo com densidade óptica ajustada na escala McFarland 0,5. 25 μ l dos diferentes extratos foram colocadas em poços nas placas de ágar BHI, utilizando como microrganismo indicador *Lactococcus lactis* ATCC 19345. As placas foram incubadas a 4 °C por 16 h e posteriormente, a 37 °C por 24 h.

2.3.3 Massa seca e recuperação da atividade de bovicina HC5

A recuperação da atividade de bovicina HC5 de *S. equinus* HC5 selvagem e das linhagens obtidas no processo de EAL foi realizada conforme Mantovani *et al.* (2002), com temperatura de extração de 100 °C por 10 min, definido previamente. O extrato recuperado foi utilizado para avaliação da atividade da bovicina HC5 e a biomassa de células foi utilizada para a quantificação da massa seca. A massa seca foi determinada após secagem em estufa a 105 °C até obter peso constante (Estufa de Secagem e Esterilização – Fanem 315 SE, São Paulo, Brasil) (DE CARVALHO *et al.*, 2009).

A atividade antimicrobiana do extrato de bovicina HC5 foi analisada pelo método de difusão em meio sólido (HOOVER E HARLANDER, 1993). Diluições seriadas do extrato foram realizadas em água ultrapura e alíquotas de 25 µl de cada diluição foram colocadas em poços nas placas de ágar BHI, utilizando como microrganismo indicador *L. lactis* ATCC 19345. Os ensaios foram realizados utilizando 20 ml de meio BHI e 20 µL de inóculo ajustado na escala McFarland 0,5. As placas foram incubadas a 4 °C por 16 h e posteriormente, à 37 °C por 24 h. O título de bovicina HC5, expresso em unidades de atividade (AU), foi calculado da seguinte forma: $AU / ml = (1000 / 25) (FD)$, no qual o FD é o fator de maior diluição que produziu uma zona de inibição com pelo menos 5 mm de diâmetro a partir da borda do poço. A atividade específica da bovicina HC5 foi calculada dividindo o título de bacteriocina pela biomassa (AU / ml por mg de massa celular seca).

2.3.4 Análise do consumo de glicose, produção de ácidos orgânicos e etanol

Para a análise da produção de ácidos orgânicos (ácido fórmico, ácido láctico, ácido acético), etanol e glicose residual, *S. equinus* HC5 selvagem e as linhagens adaptadas, foram cultivados em 5 ml de meio PC em tubos Hungate, com DO_{600nm} ajustado para 0,05. As incubações foram realizadas a 42 °C por 24 h. Como controle, foram utilizadas amostras do meio PC sem adição do inóculo. Após 24 h de fermentação os cultivos foram centrifugados a 10.000 g por 15 min (Eppendorf 5417C Centrifuge - Hamburgo, Alemanha). Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa PVDF FI de 13 mm com poros de 0,45 µm e 500 µl foram adicionados aos *vials* de cromatografia para posterior análise.

As quantificações dos ácidos orgânicos e glicose residual foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Foi utilizado detector por índice de refração (RI) Shodex RI – 101 e coluna Phenomenex Rezex-ROA (300 x 7,8 mm, Phenomenex Inc. Torrance, CA, EUA). A fase móvel usada foi de H₂SO₄ em concentração de 5 mmol / L em água ultrapura, com fluxo de 0,7 ml / min e temperatura de forno de 45 °C. O volume de injeção por amostra foi de 20 µl. O rendimento dos ácidos orgânicos e etanol foi expresso pela razão da concentração dos produtos pelo consumo de glicose, de acordo com a equação $Y_{P/S}$ (g/g).

2.4 Extração de ácidos graxos de membrana e análise de ésteres metílicos

S. equinus HC5 selvagem e as linhagens adaptadas foram cultivadas em 50 ml de meio PC em frascos de penicilina a temperatura de incubação de 42 °C por 24 h. Posteriormente, os cultivos foram centrifugados a 10.000 g por 10 min (Eppendorf 5417C Centrifuge - Hamburgo, Alemanha) e a biomassa celular foi lavada com solução salina. Os ácidos graxos da membrana foram saponificados, metilados e extraídos seguindo o protocolo recomendado por Rozès (1993).

A saponificação foi realizada pela adição de 1 ml do Reagente 1 (3,75 mol l⁻¹ NaOH:CH₃OH, 1:3 v/v), seguido de breve agitação e aquecimento dos tubos a 95 °C por 25 min. A metilação foi feita incubando os tubos arrefecidos com 2 ml de Reagente 2 (CH₃OH:6N HCl, 85:1) a 80 °C durante 10 min. As reações de extração foram então realizadas adicionando 1,25 mL de Reagente 3 (C₆H₁₄:C₅H₁₂O, 1: 1 v/v) e agitando suavemente os tubos por 10 min. A fase aquosa inferior foi removida e foram adicionados 3 ml de Reagente 4 (0,3 mol l⁻¹ NaOH) à fase orgânica. Após agitação por 5 minutos, a camada superior orgânica foi colocada em um frasco de Cromatografia Gasosa (GC) para análise.

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi realizada em cromatógrafo GC Agilent Technologies 7890A (Wilmington, DE, EUA) equipado com coluna capilar de metil-silicone (HP-ULTRA 2-25 m × 0,2 mm × 0,33 µm). A temperatura inicial do forno foi mantida constante em 310 °C, e o hidrogênio (H₂) foi usado como gás de arraste. Os FAMES foram identificados com o software Sherlock (RTSBA6 Library, Versão 3.9, Microbial ID, Newark, DE, EUA), com base nos tempos de retenção do padrão de calibração externo antes da análise da amostra. O padrão

de calibração foi composto por uma mistura de ácidos graxos saturados de cadeia linear de 9 a 20 carbonos de comprimento (9:0 a 20:0) e cinco hidroxíácidos.

2.5 Análise da expressão dos genes biossintéticos de bovicina HC5 por PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR)

O RT-qPCR foi realizado para quantificar a expressão relativa dos genes de bovicina HC5 das linhagens de *S. equinus* HC5. Pares de primers foram projetados para flanquear os genes biossintéticos (*bvcATCBFEGRK*) envolvidos na biossíntese de bovicina HC5 usando GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design Tool (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>) (MOREIRA, MENDES e MANTOVANI, 2021). As sequências dos iniciadores de bovicina HC5 estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Primers de RT-qPCR para genes os biossintéticos de bovicina HC5.

Gene	Product	Sequence (5'→3')	Accession number
<i>bvcA</i>	Bovicin HC5 structural gene	TGGCGCTCATGTTGAAGTAGGT AACATACTTCCAACATGAACCAGGAG	BAP19019
<i>bvcT</i>	Bovicin HC5 transporter	GCGAGAGAATATAGGCTTGGGAGA TTTGCCACTGCCCTCCTGAT	BAP19020
<i>bvcC</i>	Lanthionine synthetase	CACGGCATAATTGGTCCGCTT GCCATGCGACTTGGACTGTT	BAP19021
<i>bvcB</i>	Lantibiotic dehydratase	GGACCGAGAGAACGCCAAGAAG CCTTAGGTCCGCCATACCTAT	BAP19022
<i>bvcF</i>	Transporter immunity protein	CTAATGGGGCTGGTAAGTCA TCTCGTCTCCATTCATGACCA	BAP19023
<i>bvcG</i>	Transporter immunity protein	TTGGTCACGAAGAGGTGGTG TCCGACACCTGCTTCCATAT	BAP19024
<i>bvcE</i>	Transporter immunity protein	AGACTCCTAGTGTAACCTTCGCT AAGTGGCTCTAGAAGTCGCA	BAP19025
<i>bvcK</i>	DNA-binding response regulator	AGAGGCTGCCAATAAGACGA AGGTGCCCAAATCCTCAGT	BAP19026
<i>bvcR</i>		AGTTAACGCAGACGGAGATGA	BAP19027

	Signal transduction histidine kinase	TTGATTTCCGTCCCAAAGCC	
gyrA	DNA gyrase subunit A	TTGTTGCTCGTGCTCTTCCT TAACATCCCCGGTGATACGT	WP024344064
16S rRNA	16S ribosomal RNA	TGCCTTGGCACTAGAAGC TCCCCATTCTGGACATCT	KF573427.1

Para a extração de RNA total do *S. equinus* HC5 selvagem e das linhagens adaptadas, foram realizados cultivos em condição anóxica em 50 ml meio PC, a 42 °C e após 12 h (fase estacionária) amostras de 25 ml foram coletadas e centrifugadas (10.000 g/10 min). Posteriormente, foi adicionado 1 ml de nitrogênio líquido nos microtubos contendo o *pellet* celular obtidos na centrifugação e foi realizada a maceração das amostras com o pistilo. Em seguida, foi adicionado 1 ml de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Corp, WI, EUA.), seguindo as instruções do fabricante. A concentração total e pureza dos ácidos nucleicos foram determinadas com leituras de absorbância (260 nm e 280 nm) utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Para verificar a integridade dos ácidos nucleicos, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1%) a 80 V por 30 min.

O RNA extraído foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI, EUA) e posteriormente, convertido em seu DNA complementar (cDNA) por High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, WI, EUA). Foi utilizado 20 ng de cDNA para realizar o RT-qPCR usando o CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em volumes de 10 µl, contendo: 5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific), 0,8 µl de cada primer (10 µmol l⁻¹), 2 µl de cDNA diluído e 1,4 µl de água livre de RNase. A reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C (10 min) seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C (30 s), anelamento e extensão a 60 °C (1 min), conforme instruções do fabricante. A análise da curva de fusão foi realizada imediatamente após o último ciclo de RT-qPCR com uma etapa preliminar de desnaturação a 95 °C por 1 min, manutenção inicial a 60 °C / 1 min, seguida de incremento na temperatura para 95 °C em rampa com taxa de 1 °C / min e aquisição contínua de fluorescência. As curvas de fusão foram geradas plotando os valores de fluorescência versus temperatura.

O software Bio-Rad CFX Manager 2.0 versão 2.0.885.0923 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) foi utilizado para calcular os valores de limiar de ciclo (Ct) e coletar os dados de ponto de fusão. Para cada conjunto de primers, R^2 foi determinado e a eficiência de amplificação foi calculada usando a seguinte equação: $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ da concentração de cDNA de controle (SOUZA *et al.*, 2019). Os genes de RNA ribossômico 16S (*16S rRNA*) e DNA girase A (*gyrA*) de *S. equinus* HC5 foram usados como genes endógenos de referência para calcular os níveis de expressão relativa. Os resultados foram expressos pela média da expressão relativa obtida a partir de cada gene endógeno.

2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas e em duplicatas. Os resultados foram submetidos à análise de variância unilateral (ANOVA one-way), seguido de teste de comparação de médias (Tukey e Bonferroni) a 5 % significância. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Evolução Adaptativa em Laboratório (EAL)

3.1.1 Gráfico de Arrhenius

S. equinus HC5 foi cultivado em diferentes temperaturas de incubação, entre 33 °C e 51 °C, a maior taxa de crescimento específico ($\mu = 2,16 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$), foi observada quando *S. equinus* HC5 foi cultivado a 42 °C (Figura 2). Temperaturas de cultivo acima de 42 °C causaram redução nos valores da taxa de crescimento específico e temperaturas maiores que 49 °C inibiram completamente o crescimento bacteriano ($P < 0,05$).

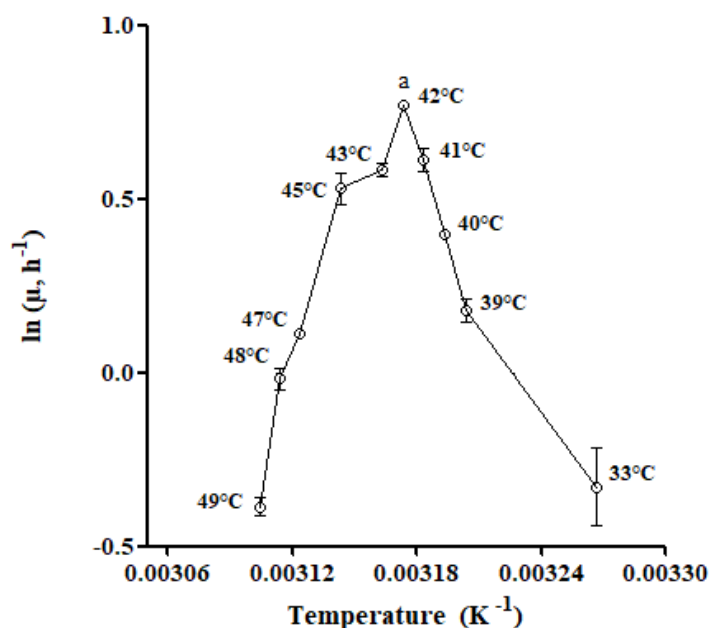


Figura 2: Gráfico de Arrhenius demonstrando o efeito da temperatura na taxa de crescimento específico (μ , h^{-1}) de *S. equinus* HC5. *S. equinus* HC5 foi cultivado por 24 h em meio PC anaeróbico em diferentes temperaturas de incubação. O inóculo inicial foi ajustado para 0,05 de DO_{600nm} . O μ foi mensurada por regressão linear entre os valores de \ln da DO_{600nm} ao longo do tempo (h). a* representa a maior média entre os tratamentos pelo teste de Tukey e/ou Bonferroni a 5%.

Quando o efeito de diferentes temperaturas de incubação na DO_{600nm} de *S. equinus* HC5 foi monitorado (Figura 3), observou-se que as temperaturas de cultivo entre 40 °C e 42 °C resultaram nos maiores valores de DO_{600nm} ($5,24 \pm 0,41$) e não houve diferença estatística nesse intervalo. Em temperaturas maiores que 42 °C foi observado diminuição da DO_{600nm} , sendo que a 48 °C a DO_{600nm} foi de aproximadamente 1,91. Apesar de *S. equinus* HC5 apresentar crescimento a 49 °C (DO_{600nm} de aproximadamente 0,20) não houve diferença estatística quando comparada com temperaturas de 50 °C e 51 °C, nas quais o crescimento microbiano não foi notado.

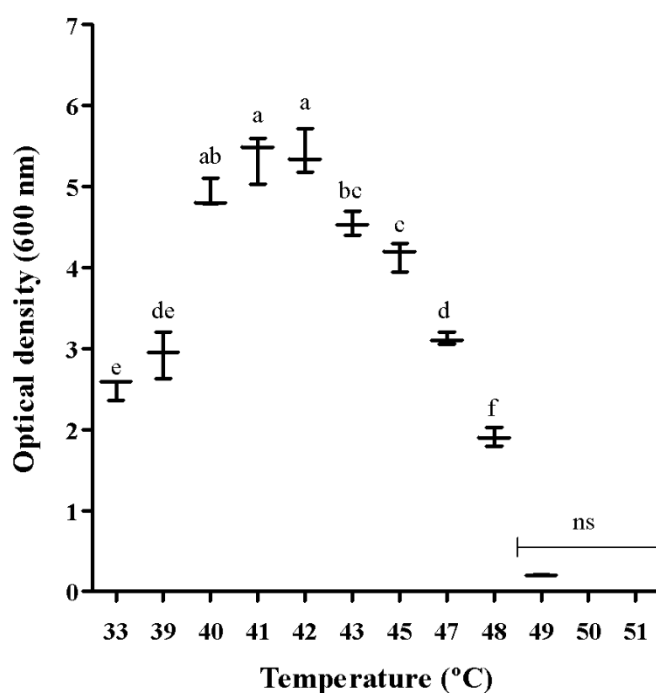


Figura 3: Efeito da temperatura de incubação na densidade óptica 600 nm (DO_{600nm}) de *S. equinus* HC5. *S. equinus* HC5 foi cultivado por 24 h em meio PC anaeróbico. Os valores apresentados foram subtraídos da DO_{600nm} inicial (0,05). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.1.2 Obtenção de linhagens de *S. equinus* HC5 por EAL sob estresse térmico

Para selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com fenótipos melhorados para produção de bovicina HC5, utilizou-se o método de evolução adaptativa em laboratório por estresse térmico. A EAL foi iniciada com a temperatura de incubação de 47 °C na qual a taxa de crescimento específico de *S. equinus* HC5 foi de $1,12 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ e DO_{600nm} de $3,17 \pm 0,08$. Durante as primeiras 150 gerações houve aumento da taxa de crescimento específico em aproximadamente $0,26 \text{ h}^{-1}$ e elevação da DO_{600nm} em aproximadamente 1,31 comparado com a linhagem selvagem ($P < 0,05$) (Figuras 4 e 5).

Após 150 gerações aumentou-se o estresse térmico com a elevação da temperatura de incubação para 48 °C e foi observado queda na taxa específica de crescimento, de $1,37 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ para $0,89 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ($P < 0,05$). (Figura 4). Os valores de μ aumentaram nas gerações seguintes e mantiveram-se constantes, sendo de aproximadamente $1,33 \text{ h}^{-1}$ nas últimas 100 gerações do processo evolutivo ($P < 0,05$).

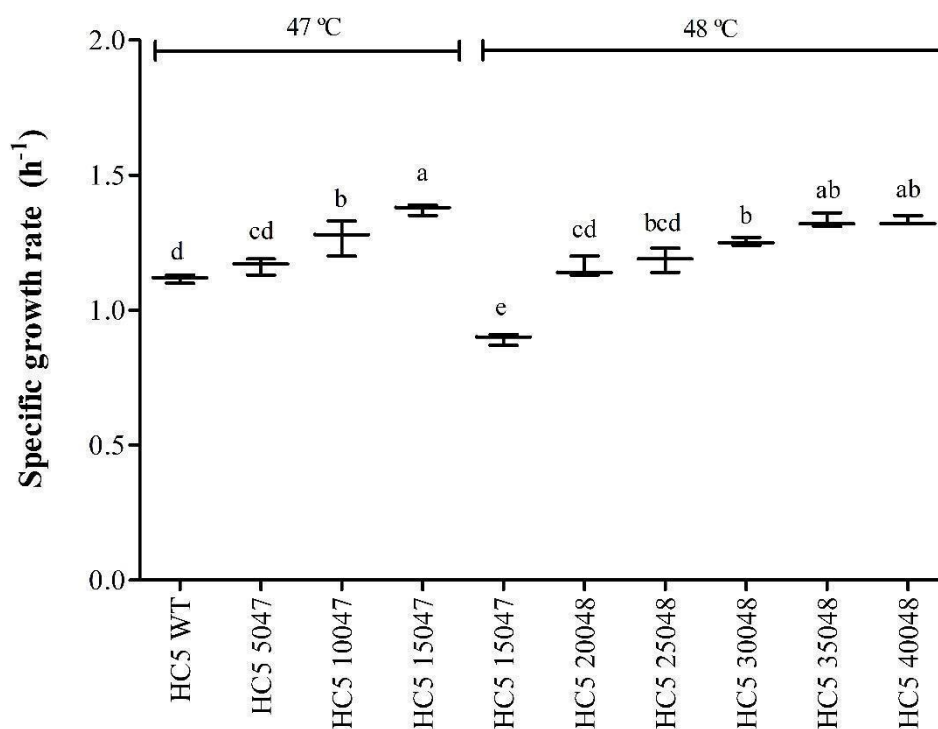


Figura 4: Efeito da evolução adaptativa em laboratório por estresse térmico na taxa de crescimento específico (μ , h^{-1}) de *S. equinus* HC5. O experimento de EAL foi conduzido nas temperaturas de incubação de 47 °C por 150 gerações e depois a 48 °C por 250 gerações. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em resposta ao aumento da temperatura de incubação para 48 °C foi observado diminuição da DO_{600nm} de $4,48 \pm 0,05$ para $4,05 \pm 0,08$, a qual se manteve constante nas gerações seguintes. A linhagem de *S. equinus* HC5 40048 (linhagem adaptada), aumentou ($P < 0,05$) a DO_{600nm} em aproximadamente 2,12 em relação a *S. equinus* HC5 WT (selvagem) quando cultivadas em temperatura de 48 °C (Figura 5 e 6).

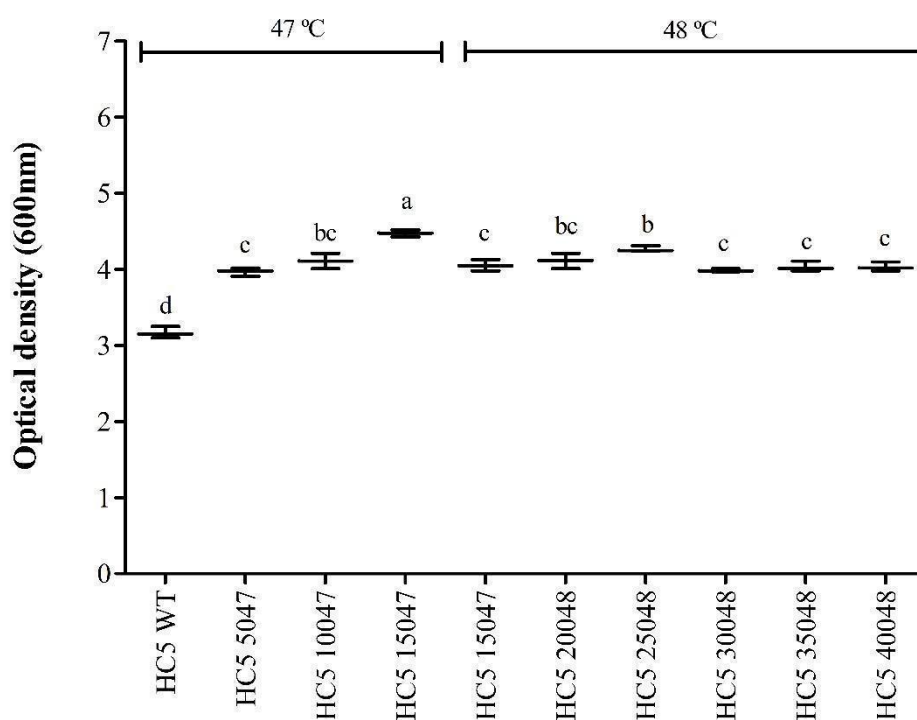


Figura 5: Efeito da evolução adaptativa em laboratório por estresse térmico na DO_{600nm} de *S. equinus* HC5. O experimento de EAL foi conduzido nas temperaturas de incubação de 47 °C por 150 gerações e depois a 48 °C por 250 gerações. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.



S. equinus HC5 40048 (adapted) *S. equinus* HC5 WT

Figura 6: Crescimento de *S. equinus* HC5 WT (selvagem) e de *S. equinus* HC5 40048 (linhagem adaptada) em temperatura de incubação de 48 °C. As linhagens selvagem e adaptada foram cultivadas em meio PC anaeróbico com DO_{600nm} inicial de 0,05.

Após 24 h de incubação *S. equinus* HC5 WT e *S. equinus* HC5 40048 obtiveram DO_{600nm} de aproximadamente $1,91 \pm 0,11$ e $4,03 \pm 0,06$, respectivamente.

O tempo de geração de *S. equinus* HC5 reduziu de $0,62 \pm 0,01$ h para $0,50 \pm 0,01$ h nas primeiras 150 gerações do processo de EAL (Figura 7) em função da maior taxa de crescimento específico observada nas linhagens de *S. equinus* HC5. Após a elevação da temperatura de incubação para 48 °C observou-se aumento do tempo de geração em aproximadamente 0,27 h ($P < 0,05$). Nas gerações seguintes o tempo de geração diminuiu e se manteve constante nas últimas 100 gerações, com média de $0,52 \pm 0,01$ h. A média de tempo de geração ao longo do processo evolução foi de $0,58 \pm 0,08$ h.

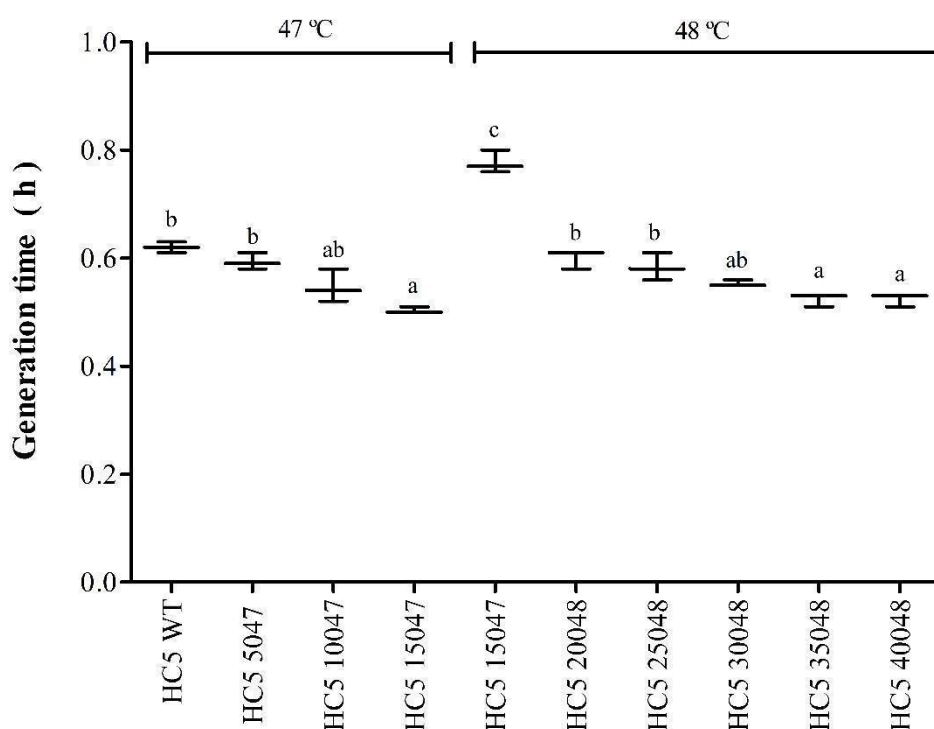


Figura 7: Efeito da evolução adaptativa em laboratório por estresse térmico no tempo de geração (h) de *S. equinus* HC5. O experimento de EAL foi conduzido nas temperaturas de incubação de 47 °C por 150 gerações e depois a 48 °C por 250 gerações. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2 Caracterização fenotípica das linhagens de *S. equinus* HC5 obtidas na EAL

3.2.1 Parâmetros cinéticos de crescimento

Oito linhagens de *S. equinus* HC5 foram selecionadas durante a EAL: HC5 5047, HC5 10047, HC5 15047, HC5 20048, HC5 25048, HC5 30048, HC5 35048, HC5 40048. Essas linhagens foram comparadas com a linhagem selvagem quanto a velocidade específica de crescimento (h^{-1}), densidade óptica 600 nm (D_{0600nm}), produção de massa seca ($mg\ ml^{-1}$) e pH final, em temperatura de incubação de 42 °C (Figura 8) e produção de bovicina HC5 (Figuras 9 e 10).

A cultura de *S. equinus* HC5 selvagem apresentou maior taxa de crescimento específico ($2,16 \pm 0,02\ h^{-1}$) e maior D_{0600nm} ($5,46 \pm 0,28$) em relação às linhagens adaptadas quando cultivada a 42 °C (Figuras 8A e 8B). Os valores de μ para as linhagens obtidas no processo de evolução adaptativa variaram entre $1,13\ h^{-1}$ e $1,48\ h^{-1}$. Em relação a recuperação de massa seca, a linhagem de *S. equinus* HC5 selvagem também resultou em maior rendimento de biomassa de $0,75 \pm 0,03\ mg\ ml^{-1}$ e não apresentou diferença estatística significativa quando comparada com as linhagens HC5 5047, HC5 10047, HC5 25048 e HC5 35048 (Figura 8C). Não foi observado diferença significativa entre os valores de pH final das linhagens de *S. equinus* HC5 analisadas. O pH final médio entre os cultivos foi de $3,85 \pm 0,12$ (Figura 8D).

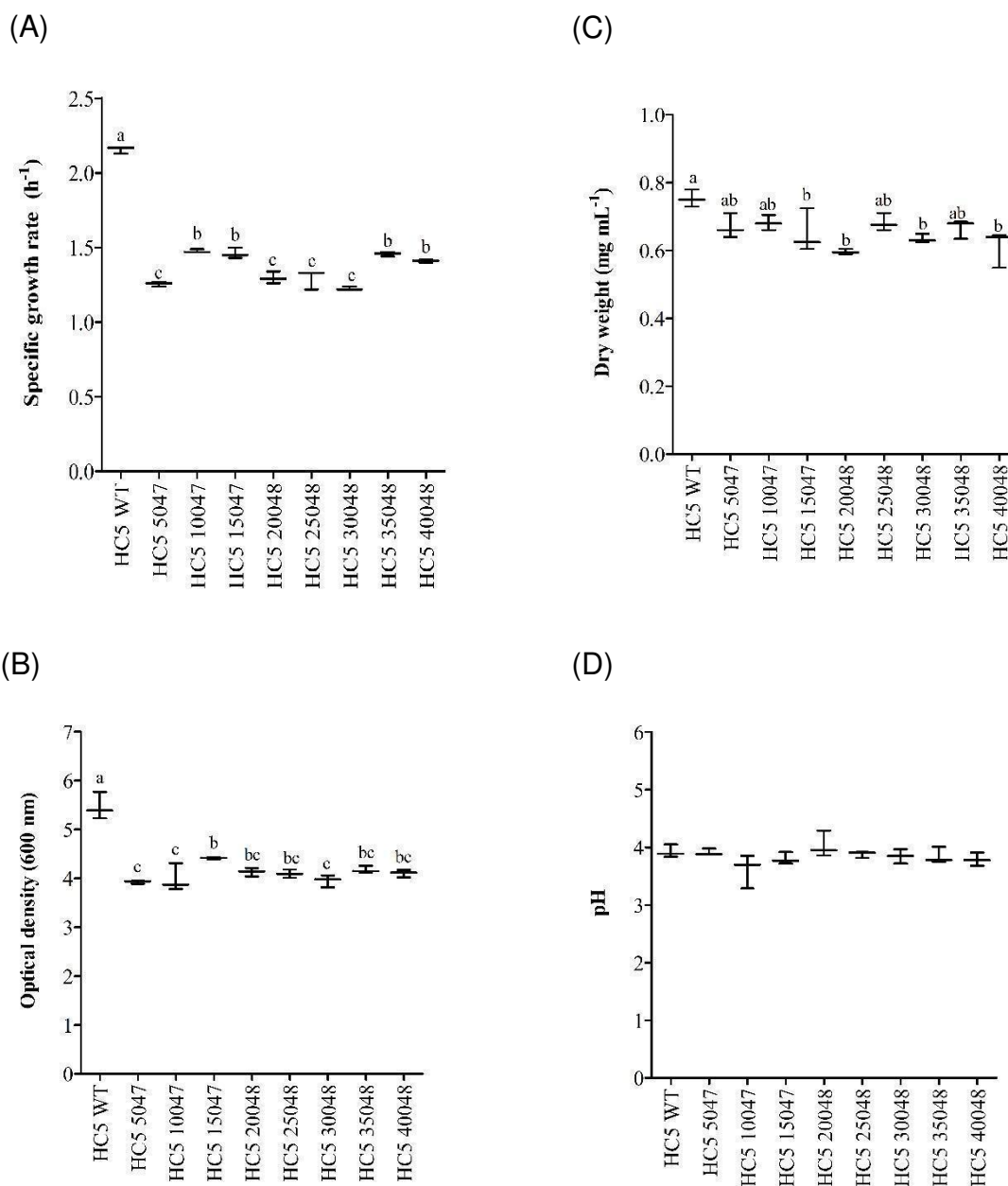


Figura 8: Parâmetros cinéticos de crescimento de *S. equinus* HC5 WT (selvagem) e das linhagens obtidas na EAL. **A:** Taxa de crescimento específico máxima **B:** Densidade óptica 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) **C:** Massa seca ($mg mL^{-1}$). **D:** Valores de pH. O experimento foi realizado em meio PC anaeróbico com temperatura de incubação de 42 °C por 24 h. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Não houve diferença significativa entre os valores de pH final das linhagens de *S. equinus* HC5 analisadas.

3.2.2 Extração da bovina HC5

Foram avaliados dois métodos para a recuperação de bovina HC5 das células de *S. equinus* HC5, o quais basearam-se em diferentes temperaturas de extração. O teste de atividade revelou que a extração em baixa temperatura (a 4 °C por 16 h) não foi eficiente para recuperar a bovina HC5 das linhagens de *S. equinus* HC5 selecionadas na EAL (Figura 9). Apenas o extrato de *S. equinus* HC5 (WT) apresentou atividade antimicrobiana (zona de inibição de $20 \pm 0,58$ mm) (Figura 9). No entanto, todos os extratos de bovina HC5 obtidos por extração em alta temperatura (a 100 °C por 10 min) apresentaram atividade antimicrobiana. A maior zona de inibição foi observada pelo extrato da linhagem HC5 40048 ($24 \pm 0,58$ mm), seguido pela linhagem selvagem ($22 \pm 0,58$ mm) (Figura 9). Não houve diferença estatística no diâmetro dos halos dos extratos das linhagens HC5 15047, HC5 20048, HC5 25048, HC5 30048, HC5 35048; e os menores diâmetros foram observados nas linhagens HC5 5047 e HC5 10047 (Figura 9B). Quando a atividade de bovina HC5 foi avaliada no sobrenadante livre de células, foi observado que apenas o sobrenadante da linhagem selvagem apresentava atividade de bovina HC5.

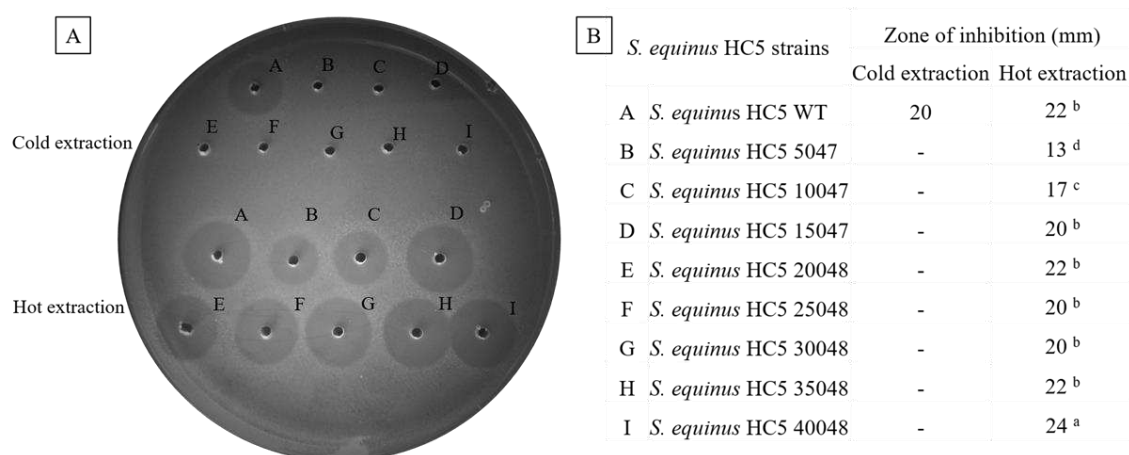


Figura 9: Eficiência dos métodos de extração de bovina HC5 em alta temperatura (a 100 °C por 10 min) e baixa temperatura (a 4 °C por 16h) a partir de células de *S. equinus* HC5. **A:** Teste de atividade dos extratos de bovina HC5 obtidos na extração em baixa e alta temperatura, utilizando *L. lactis* ATCC 19345 como indicador. As letras maiúsculas representam a identificação dos extratos. **B:** Identificação dos extratos correspondentes às respectivas linhagens de *S. equinus* HC5 por letras maiúsculas. Tamanho das zonas de inibição (mm) formadas pela atividade de bovina HC5. Letras

minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2.3 Atividade específica de bovicina HC5

A atividade específica de bovicina HC5 foi comparada entre a linhagem selvagem de *S. equinus* HC5 e as linhagens selecionadas por EAL (Figura 10). A linhagem HC5 40048 apresentou a maior atividade específica de bovicina HC5 entre as linhagens avaliadas ($1022,22 \pm 38,49$ AU ml⁻¹ mg de massa seca⁻¹) ($P < 0,05$). Quando comparada com a linhagem selvagem ($425,10 \pm 14,12$ AU ml⁻¹ mg de massa seca⁻¹) o aumento da atividade foi de 140%. Além disso, a linhagem HC5 20048 apresentou aumento de 26% na atividade específica de bovicina HC5 ($539,36 \pm 5,22$ AU ml⁻¹ mg de massa seca⁻¹) quando contrastada com a linhagem selvagem ($P < 0,05$). Não houve diferença estatística significativa na atividade específica de bovicina HC5 entre as linhagens HC5 15047, HC5 25048, HC5 30048, HC5 35048 e a linhagem selvagem. Em contraste, as linhagens HC5 5047 e 10047 apresentaram redução de aproximadamente 56% na produção de bovicina HC5 ($P < 0,05$).

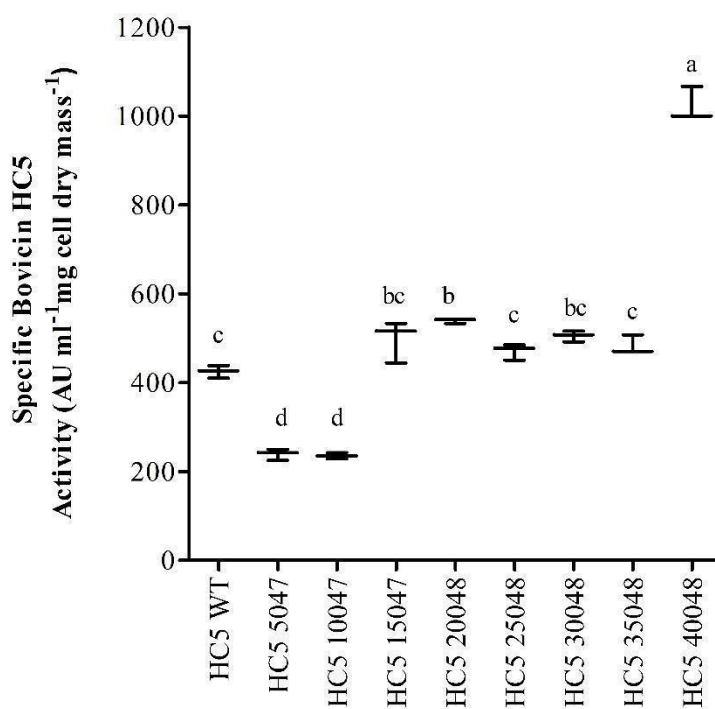


Figura 10: Atividade específica dos extratos de bovicina HC5 entre diferentes linhagens de *S. equinus* HC5. Os cultivos foram realizados em meio PC anaeróbico, com temperatura de incubação de 42 °C por 24 h. A bovicina HC5 foi extraída a 100

°C por 10 min. A atividade específica da bovicina HC5 foi calculada dividindo o título de bacteriocina pela biomassa ($\text{AU ml}^{-1} \text{ mg de massa seca celular}^{-1}$). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.2.4 Consumo de glicose, produção de ácidos orgânicos e etanol

Foi observado que tanto *S. equinus* HC5 selvagem, quanto as linhagens obtidas no processo de EAL consumiram aproximadamente 95% ($7,22 \pm 0,02 \text{ g}$) da glicose disponível no meio. Em relação a produção de ácidos orgânicos e etanol, foi identificado produção de ácido láctico e etanol por todas as linhagens de *S. equinus* HC5 avaliadas e não foi detectado ácido fórmico e ácido acético no sobrenadante livre de células. As linhagens HC5 30048 e HC5 35048 resultaram nos maiores rendimentos de ácido láctico ($P < 0,05$) ($2,58 \pm 0,19 \text{ g/g}$ e $2,29 \pm 0,19 \text{ g/g}$, respectivamente) com valores semelhantes estatisticamente. A linhagem selvagem de *S. equinus* HC5 apresentou rendimento de ácido láctico de aproximadamente $1,98 \text{ g/g}$, com diferença estatística apenas para a linhagem HC5 30048 ($P < 0,05$) (Figura 11)

Em relação a produção de etanol, as linhagens HC5 15047 e HC5 25048 apresentaram os maiores rendimentos ($0,068 \pm 0,02$ e $0,039 \pm 0,01 \text{ g/g}$, respectivamente) ($P < 0,05$). A linhagem selvagem obteve rendimento de cerca de $0,021 \text{ g/g}$, menor do que o observado para a linhagem HC5 15047 ($P < 0,05$) (Figura 11).

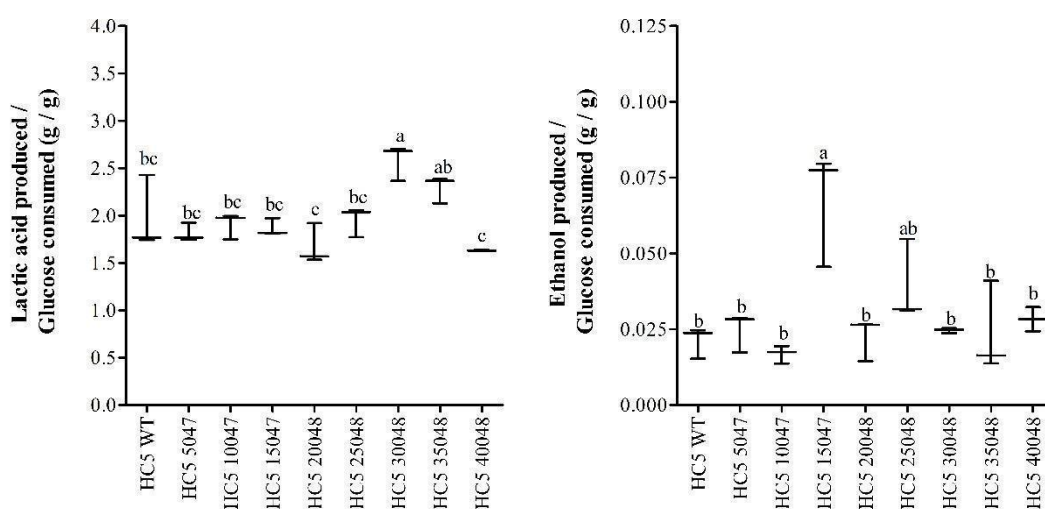


Figura 11: Rendimento de ácido láctico e etanol por *S. equinus* HC5 selvagem e pelas linhagens selecionadas por EAL. **A:** Produção de ácido láctico por glicose consumida (g/g). **B:** Produção de etanol por glicose consumida (g/g). Os cultivos das linhagens de *S. equinus* HC5 foram conduzidos em temperatura de incubação de 42 °C, em meio PC anaeróbio. O rendimento de ácido láctico e etanol foram expressos pela razão da concentração dos produtos pelo consumo de glicose ($Y_{P/S}$ g/g). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.3 Composição de ácidos graxos da membrana

A linhagem selvagem de *S. equinus* HC5 e quatro linhagens obtidas no processo de EAL (HC5 10047, HC5 20048, HC5 30048 e HC5 40048) foram avaliadas quanto a composição de ácidos graxos da membrana. A análise de éster metílico de ácidos graxos (FAMES) mostrou alterações na composição dos ácidos graxos da membrana das culturas de *S. equinus* HC5 submetidas à EAL (Tabela 2). Apenas na membrana celular das linhagens de *S. equinus* HC5 obtidas por EAL foram encontrados os ácidos decanoico (C10:0), eicosanoico (C20:0) e tridecanoico (C13:1). Em relação aos ácidos graxos saturados, foi observado que a membrana da linhagem HC5 40048 apresentou diminuição ($P < 0,05$) da proporção do ácido hexadecanoico (C16:0) quando comparada com a variante HC5 10047 e aumento ($P < 0,05$) da proporção do ácido octadecanoico (C18:0) em comparação com a linhagem HC5 30048. Acerca dos ácidos graxos insaturados, foi notado que na membrana das linhagens adaptadas houve diminuição ($P < 0,05$) da concentração do ácido hexadecenóico (C16:1 ω 5c) e de ácido octadecanoico (C18:1 ω 7c) na linhagem HC5 10047 ($P < 0,05$) em comparação com a linhagem selvagem. A proporção de ácidos graxos saturados para insaturados aumentou ($P < 0,05$) na linhagem HC5 10047 em contraste com *S. equinus* HC5 selvagem e não foi observado diferença estatística entre as linhagens HC5 20048, 30048, 40048 e a linhagem selvagem.

Tabela 2: Concentração relativa de ácidos graxos de *S. equinus* HC5 selvagem e das linhagens selecionadas por EAL após crescimento por 24 h a 42 °C em meio PC anaeróbico.

Fatty acids		Relative concentrations (%)					P-value
		<i>S. equinus</i> HC5 strains					
Saturated	Abbreviation	HC5 WT	HC5 10047	HC5 20048	HC5 30048	HC5 40048	
Decanoic acid	10:0	-	1.10 ± 0.60 ^a	0.59 ± 0.35 ^{ab}	0.93 ± 0.54 ^a	0.83 ± 0.17 ^{ab}	0.023
Dodecanoic acid	12:0	2.32 ± 0.80	10.85 ± 4.92	7.27 ± 0.33	6.44 ± 0.98	5.58 ± 0.71	0.057
2-hydroxytridecanoic acid	13:0 2OH	0.26 ± 0.10	0.20 ± 0.10	0.54 ± 0.30	0.61 ± 0.19	0.54 ± 0.12	0.145
Tetradecanoic acid	14:0	11.70 ± 2.40	19.40 ± 2.90	15.83 ± 6.75	20.00 ± 1.77	15.85 ± 3.85	0.178
2-hydroxypentadecanoic acid	15:0 2OH	0.43 ± 0.01	-	0.70 ± 0.27	0.69 ± 0.34	0.70 ± 0.06	0.071
Hydroxyhexadecanoic acid	16:0 OH	0.96 ± 0.47	1.55 ± 1.23	0.83 ± 0.20	1.75 ± 0.91	2.33 ± 1.33	0.524
Hexadecanoic acid	16:0	38.10 ± 2.30 ^{ab}	38.31 ± 3.19 ^a	32.96 ± 2.90 ^{ab}	31.60 ± 2.25 ^{ab}	30.49 ± 2.63 ^b	0.025
3-hydroxyhexadecanoic acid	16:0 3OH	0.26 ± 0.02	0.41 ± 0.06	0.34 ± 0.13	0.33 ± 0.06	-	0.294
Heptadecanoic acid	17:0	0.28 ± 0.04	0.38 ± 0.26	0.84 ± 0.42	0.95 ± 0.71	0.78 ± 0.23	0.446
2-heptadecanoic acid	17:0 2OH	0.76 ± 0.29	0.30 ± 0.04	0.46 ± 0.08	0.28 ± 0.05	0.33 ± 0.03	0.073
Octadecanoic acid	18:0	8.70 ± 1.56 ^{ab}	14.14 ± 0.63 ^{ab}	10.74 ± 5.37 ^{ab}	7.45 ± 0.42 ^b	17.93 ± 3.56 ^a	0.034
17-methyloctadecanoic acid	19:0 isso	1.24 ± 0.10 ^{ab}	-	1.58 ± 0.08 ^a	0.47 ± 0.15 ^b	1.18 ± 0.47 ^{ab}	0.007
Eicosanoic acid	20:0	-	0.23 ± 0.11 ^{ab}	0.37 ± 0.07 ^a	-	0.40 ± 0.07 ^a	0.004
Unsaturated							
Tridecanoic acid	13:1	-	0.34 ± 0.09 ^b	0.38 ± 0.19 ^b	0.68 ± 0.11 ^{ab}	0.87 ± 0.11 ^a	0.002
7(Z)-hexadecenoic acid	16:1 ω9c	6.94 ± 0.35	5.20 ± 1.27	6.80 ± 0.80	7.08 ± 0.20	5.39 ± 0.78	0.064

9(Z)-hexadecenoic acid/8/(Z)-hexadecenoic acid	16:1 ω7c/16:1 ω6c	3.43 ± 0.56	3.38 ± 0.38	3.81 ± 1.21	3.97 ± 0.79	3.50 ± 0.75	0.856
11(Z)-hexadecenoic acid	16:1 ω5c	2.00 ± 0.08 ^a	1.15 ± 0.27 ^b	1.13 ± 0.29 ^b	1.10 ± 0.19 ^b	1.02 ± 0.19 ^b	0.010
9(Z)-octadecenoic acid	18:01 ω7c	14.02 ± 2.99 ^a	4.76 ± 2.75 ^b	7.73 ± 3.13 ^{ab}	8.32 ± 1.12 ^{ab}	9.70 ± 2.35 ^{ab}	0.017
9(Z)-octadecenoic acid	18:1 ω9c	6.18 ± 2.28	3.35 ± 0.48	5.31 ± 0.61	5.05 ± 1.73	7.02 ± 1.51	0.215
10(Z)-nonadecenoic acid	19:1 iso I	-	-	0.62 ± 0.08	0.67 ± 0.45	0.49 ± 0.06	0.052
11(Z)-eicosenoic acid	20:1 ω9c	1.04 ± 0.12	0.42 ± 0.05	1.01 ± 0.07	0.86 ± 0.33	0.91 ± 0.23	0.134
Sat./Unsat. Ratio		1.79 ± 0.03 ^b	4.67 ± 0.59 ^a	2.73 ± 0.54 ^{ab}	2.58 ± 0.22 ^{ab}	2.57 ± 0.78 ^{ab}	0.045

Os valores estão representados em média e desvio padrão (±). OH* posição do grupo hidroxila da extremidade ácida. ω* extremidade metil do ácido graxo. c* configuração cis da ligação dupla. iso* ácidos graxos ramificados. Sat./Insat.* proporção de ácidos graxos saturados para insaturados. – * não detectado. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4 Análise da expressão dos genes biossintéticos de bovicina HC5 por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

RT-qPCR foi utilizado para avaliar os níveis de expressão dos genes do cluster da bovicina HC5 na linhagem selvagem de *S. equinus* HC5 e em quatro linhagens selecionadas no processo de EAL e que apresentaram atividade específica de bovicina HC5 diferentes. As análises confirmaram que os genes envolvidos na biossíntese da bovicina HC5 foram diferencialmente expressos entre as linhagens de *S. equinus* HC5 avaliadas (Figura 12).

A linhagem adaptada HC5 40048 apresentou maiores níveis de expressão do gene que codifica para o peptídeo precursor (*bvcA*) em comparação com as outras linhagens avaliadas ($P < 0,05$) (Figura 12.B). No entanto, a linhagem selvagem apresentou maior expressão do gene do transportador (*bvcT*), sendo que, entre as linhagens adaptadas, o maior nível de expressão desse gene ocorreu na linhagem HC5 40048 ($P < 0,05$) (Figura 12.C). Em relação aos genes que codificam as enzimas de modificação pós-traducional (*bvcB* e *bvcC*), não houve diferença significativa nas expressões entre as linhagens selvagem e HC5 40048; as linhagens HC5 10047, HC5 20048 e HC5 30048 mostraram baixa expressão desses genes (Figura 12D e 12E). As expressões dos genes das proteínas de imunidade (*bvcF*, *bvcE* e *bvcG*) foram maiores na linhagem selvagem, exceto pelo gene *bvcG* cuja expressão foi semelhante entre as linhagens selvagem e HC5 40048 (Figura 12F-H). Quanto aos genes do sistema de regulação (*bvcK* e *bvcR*) foi observado que *bvcK* foi mais expresso na linhagem selvagem de *S. equinus* HC5 e que não houve diferença significativa na expressão entre as linhagens adaptadas. A expressão do gene *bvcR* foi semelhante entre as linhagens, HC5 20048 e HC5 30048 e não houve diferença significativa entre as outras linhagens adaptadas (Figura 12H e 12I).

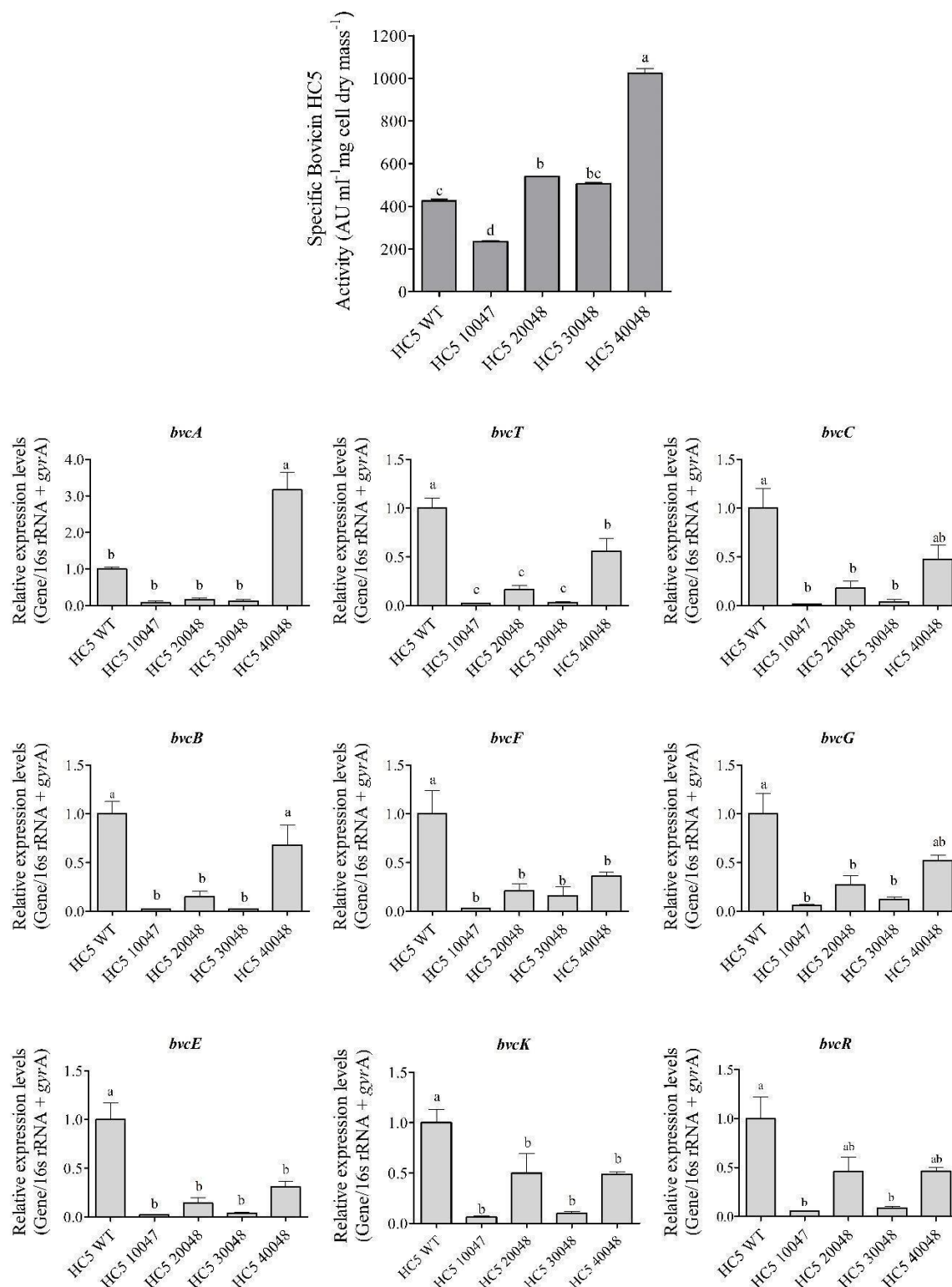


Figura 12: Atividade específica de bovicina HC5 e expressão dos genes biossintéticos de bovicina HC5 de *S. equinus* HC5 selvagem e das linhagens selecionadas por EAL. Os cultivos foram conduzidos a 42 °C, em meio PC anaeróbio suplementado com 8 g L⁻¹. A extração de RNA foi conduzida após 12 h de fermentação (fase estacionária). Os genes de RNA ribossômico 16S (*16S rRNA*) e DNA girase A (*gyrA*) de *S. equinus*

HC5 foram utilizados como controles endógenos para calcular os níveis de expressão relativa. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4. DISCUSSÃO

Apesar de muitas bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas terem sido isoladas de diversos ecossistemas e avaliadas por sua atividade antibacteriana, existem poucas informações acerca da resposta desses microrganismos a fatores abióticos e estresses ambientais. Neste trabalho, demonstramos o efeito do estresse por calor na cinética de crescimento e na composição de ácidos graxos de membrana de *S. equinus* HC5. Além disso, foi utilizada a técnica de EAL por estresse térmico para selecionar linhagens de *S. equinus* HC5 com fenótipos de interesse melhorados, com produção aumentada de bovicina HC5 e para obter informações que contribuam para a compreensão acerca da expressão dos genes biossintéticos da bacteriocina bovicina HC5.

Nossos resultados demonstraram que a temperatura ótima de crescimento de *S. equinus* HC5 é 42 °C, resultando em maior taxa de crescimento específico e acúmulo de biomassa. Além disso, evidenciamos, que 49 °C é a temperatura máxima de crescimento de *S. equinus* HC5, com redução expressiva da taxa de crescimento celular e biomassa, de modo que a 50 °C já não é possível observar o crescimento microbiano. O ambiente ruminal apresenta característica isotérmica, com faixa de temperatura entre 38 °C e 42 °C, de modo que a maioria dos microrganismos desse ecossistema apresentam crescimento ótimo a 39 °C (KOZLOSKI, 2002). Corroborando com nossos resultados, um estudo realizado por Zhao e colaboradores (2019), avaliaram a influência do estresse térmico na composição da microbiota do rúmen. Os autores relataram que os animais submetidos ao estresse por calor apresentam aumento significativo da abundância relativa de *Streptococcus* spp., sendo que no ambiente ruminal este gênero é representado em sua maioria por microrganismos do complexo SBSEC. A elevada taxa de crescimento de *S. equinus* HC5 em altas temperaturas favorece o aumento da abundância deste microrganismo na composição microbiana do rúmen sob estresse térmico. Alguns estudos relatam que animais submetidos ao estresse por calor desenvolvem acidose ruminal, importante distúrbio metabólico que diminui a eficiência da fermentação no rúmen e que pode afetar a saúde do animal (YADAV *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2019). *S. equinus*

HC5 produz lactato como o principal produto de fermentação, dessa forma, o crescimento substancial desta espécie no ambiente ruminal pode elevar os níveis de lactato, reduzir o pH e diminuir a disponibilidade de energia, contribuindo para acidose ruminal. Essas alterações têm potencial de modificar a composição microbiana do rúmen, visto que podem inibir o crescimento de bactérias sensíveis ao pH, como algumas bactérias celulolíticas e comprometer a capacidade metabólica ruminal (RUSSELL E ROBINSON, 1983; ASANUMA E HINO, 2002; ZHAO *et al.*, 2019).

S. equinus HC5 é capaz de sintetizar a bacteriocina bovicina HC5. Devido a característica catiônica do peptídeo, durante a multiplicação celular as moléculas permanecem majoritariamente ligadas à superfície do envelope celular do microrganismo produtor. Dessa forma, estratégias que induzam alterações na parede celular podem ser utilizadas para obter linhagens adaptadas de *S. equinus* HC5 com maior produção e/ou recuperação de bovicina HC5. Visando obter maior rendimento e eficácia de extração do peptídeo foi utilizado o método de EAL por estresse térmico para selecionar linhagens de *S. equinus* HC5. A EAL é o processo no qual os princípios da evolução natural são implementados em laboratório para uma população específica sob condições controladas. Essa estratégia se tornou ferramenta valiosa na engenharia metabólica e para a microbiologia industrial para a obtenção de microrganismos com fenótipos de interesse melhorados, como otimização da taxa de crescimento, tolerância a estresses e aumento do rendimento/título de produtos de interesse biotecnológico. (LOPEZ-GONZALEZ *et al.*, 2018; SANDBERG *et al.*, 2019; MAVROMMATI *et al.*, 2022).

Neste estudo, *S. equinus* HC5 foi submetido ao estresse térmico em temperaturas de incubação de 47 °C e 48 °C e durante 400 gerações, oito linhagens com fenótipos distintos da linhagem selvagem foram selecionadas para caracterização. Das linhagens obtidas, duas (HC5 20048 e HC5 40048) apresentaram maior produção da bacteriocina em comparação com o *S. equinus* HC5 selvagem, sendo que a linhagem HC5 40048 alcançou produção aumentada em 140%. Em concordância com nossos resultados, Papiran e Hamedi (2021) utilizaram a EAL sob a abordagem de estresse do envelope celular (térmico e oxidativo) para selecionar linhagens de *L. lactis* com características fisiológicas e metabólicas melhoradas. A linhagem final adaptada ao estresse oxidativo, obteve produção de biomassa e nisina aumentada em 1,87 e 1,48, respectivamente, em relação à linhagem selvagem. Além

disso, a linhagem de *L. lactis* adaptada ao estresse térmico também apresentou produção de biomassa e nisina aumentadas em 1,20 e 1,32 vezes, respectivamente, em comparação com a linhagem selvagem. Os autores identificaram mutações pontuais no genoma das linhagens adaptadas responsáveis pela homeostase da bactéria aos estresses oxidativo e térmico que podem ter contribuído para a diversidade fenotípica encontrada. Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) foi encontrado na sequência do gene da DnaB da linhagem adaptada. A DnaB é uma enzima crítica na replicação do DNA e já foi relatado que mutações nessa enzima resultaram na adaptação de *Escherichia coli* ao estresse térmico (SALUJA E GODSON, 1995). Um SNP também foi observado em uma proteína reguladora da via da arginina. O catabolismo da arginina e o aumento do pH citoplasmático é uma estratégia conhecida de tolerância ácida e oxidativa em bactérias (XIONG *et al.*, 2015).

Neste trabalho, a produção aumentada de bovicina HC5 pode estar relacionada com a expressão diferencial dos genes do cluster biossintético da bacteriocina entre a linhagem selvagem e as linhagens adaptadas. A linhagem adaptada HC5 40048, que apresentou a maior produção de bovicina HC5, também demonstrou níveis elevados de expressão do gene que codifica para o peptídeo precursor (*bvcA*) em comparação com as outras linhagens avaliadas. Contudo, a expressão dos genes que codificam para as enzimas de modificação pós-traducional (*bvcB* e *bvcC*) foram semelhantes entre as linhagens selvagem e HC5 40048. A expressão dos genes do transportador (*bvcT*), de proteínas de imunidade (*bvcF*, *bvcE* e *bvcG*) e os genes do sistema de regulação (*bvcK* e *bvcR*), de forma geral, foram menores na linhagem HC5 40048 em comparação com a selvagem. Esses resultados sugerem que o aumento da expressão do gene que codifica o peptídeo precursor seja suficiente para aumentar a produção de bovicina HC5 no microrganismo produtor e que a superexpressão do gene *bvcA* em *S. equinus* HC5 pode ser uma estratégia promissora para aumentar a produção da bacteriocina nesta bactéria. Em um estudo realizado por Moreira, Mendes e Mantovani (2021), *S. equinus* HC5 foi submetido a um processo de evolução adaptativa ao estresse ácido e foi observado maior produção de bovicina HC5 pela linhagem adaptada em relação à selvagem. Contudo, quando a expressão dos genes do cluster da bovicina foram avaliados, notou-se que todos os genes tinham sua expressão aumentada na linhagem adaptada em comparação com a linhagem

selvagem, no entanto, o nível de expressão do gene *bvcA* foi pelo menos 10 vezes maior do que os demais genes do cluster biossintético, em concordância com nossos resultados. O cluster biossintético da bovicina HC5 (*bvcATCBFEGRK*) apresenta nove genes que estão sob controle de um mesmo operon e que são transcritos em um único RNAm policistrônico. A expressão diferencial dos genes dentro do mesmo operon, observada na expressão do cluster da bovicina HC5, pode ser consequência da regulação gênica em nível transcricional, por meio de fatores que afetam a estabilidade do RNAm, como a presença de estruturas secundárias conhecidas como *hairpins*. Estas estruturas, além de funcionarem como terminadores da transcrição, fazendo com que a RNA polimerase libere o RNAm no final da transcrição, quando presentes internamente nos genes, fornecem uma barreira para a ação de exonucleases e endonucleases, impedindo-as de degradar a sequência de codificação do RNAm (QUAX *et al.*, 2013). A proteção a nucleases proporcionada à alguns genes pela presença de *hairpins* pode promover decaimento diferencial de genes transcritos em um mesmo RNAm policistrônico, como observado a expressão dos genes do cluster biossintético da bovicina HC5 (CARRIER e KEASLING, 1997; DAR e SOREK, 2018).

No presente estudo, a diferença na expressão dos genes envolvidos na biossíntese de bovicina HC5 entre a linhagens selvagem e adaptadas, pode estar relacionada com o surgimento de mutações no cluster da bacteriocina durante o experimento de EAL. Em condições estressantes os microrganismos são submetidos a mecanismos que podem aumentar a variação genética. No processo de evolução, *S. equinus* HC5 foi exposto ao estresse térmico durante inúmeras gerações e o aumento da temperatura pode ter causado desnaturação térmica parcial do DNA, além de depurinação e perda de bases nitrogenadas pirimídicas (LINDAHL E NYBERG, 1972). Os microrganismos utilizam de sistemas de reparo de DNA para corrigir os danos causados pelo estresse e esses sistemas induzem polimerases propensas a erros para reparar as incompatibilidades de DNA, o que pode facilitar a mutagênese espontânea (FOSTER, 2007). Estas eventuais mutações podem ter influenciado a transcrição e a estabilidade do RNA mensageiro policistrônico, por meio de modificações em estruturas secundárias presentes nesses RNAs, responsáveis pela regulação pós-transcricional. O sequenciamento do genoma completo do *S.*

equinus HC5 selvagem e das linhagens adaptadas permitirá identificar eventuais mutações associadas com os fenótipos obtidos.

Além disso, a recuperação de bovicina HC5 das linhagens obtidas por EAL pode estar sendo afetada pela modificação na composição da membrana citoplasmática. Para recuperar a atividade da bacteriocina foram avaliados dois métodos utilizando diferentes temperaturas de extração. Foi observado que a extração usando baixas temperaturas não foi eficiente para recuperação de bovicina HC5 nas linhagens adaptadas. Contudo, quando se utilizou altas temperaturas de extração todos os extratos das culturas de *S. equinus* HC5 avaliados apresentaram atividade. Esses resultados, de forma geral, podem estar relacionados com o aumento da proporção de ácidos graxos saturados para insaturados nas linhagens adaptadas em relação à selvagem, que pode ter contribuído para o aumento da rigidez da membrana celular. Além do que, as linhagens selecionadas por EAL demonstraram maior diversidade de ácidos graxos de membrana, colaborando para possíveis modificações da hidrofobicidade e do balanço de cargas do envelope celular (FONSECA *et al.*, 2019). Essas alterações em conjunto têm potencial para alterar a recuperação de bovicina HC5 das linhagens adaptadas durante o processo de extração. Em concordância com os resultados do presente trabalho, diversos estudos relataram modificação dos padrões de ácidos graxos de membrana e alteração da fluidez do envelope celular em microrganismos adaptados ao estresse por calor (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2015; ARKU, FANNING E JORDAN, 2011; HADDAJI *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2019). Com a elevação da temperatura a fluidez da membrana pode aumentar, comprometendo a permeabilidade seletiva e expondo a célula a chances de lise por pressão osmótica. Pesquisadores demonstraram que células com concentração diminuída de ácidos graxos insaturados ou com teor aumentado de ácidos graxos saturados têm a fluidez de membrana diminuída, conferindo maior resistência ao calor (SHIN *et al.*, 2019). A permeabilidade da membrana celular a íons também pode aumentar com a temperatura, afetando o gradiente eletroquímico (ALBERS *et al.*, 2000).

Durante o processo de evolução adaptativa observou-se aumento gradual da taxa de crescimento específico e da biomassa ($DO_{600\text{ nm}}$) *S. equinus* HC5. Contudo, ao aumentar o estresse por meio da elevação da temperatura observou-se diminuição acentuada da taxa de crescimento específico e $DO_{600\text{ nm}}$. O estresse térmico pode

causar desnaturação e agregação de proteínas, desestabilização de macromoléculas e instabilidade do material genético. Essas alterações podem resultar na diminuição da taxa de crescimento e do metabolismo celular dos microrganismos (RICHTER, HASLBECK E BUCHNER, 2010). Todavia, após várias gerações expostas a condição de maior estresse a taxa de crescimento específico e a $DO_{600\text{ nm}}$ tendem a aumentar em resposta à adaptação celular. As bactérias respondem a condições estressantes alterando seus padrões de expressão gênica, codificando proteínas que melhoram a adaptação às condições ambientais (RICHTER, HASLBECK E BUCHNER, 2010; MARMION *et al.*, 2022). Dessa forma, o estresse por calor pode induzir a expressão de genes que codificam proteínas de choque térmico (HSPs). Algumas dessas proteínas, como GroEL, DnaK, e ClpATPases, são pequenas enzimas chaperonas moleculares que auxiliam no redobramento de proteínas celulares danificadas. Outras proteínas como ClpP e FtsH, atuam como proteases e degradam proteínas irreversivelmente danificadas. A resposta ao choque térmico é uma das respostas adaptativas mais conservadas entre os organismos e permite às células sobreviverem em condições de estresse por calor. (RICHTER, HASLBECK E BUCHNER, 2010; SCHUMANN, 2016; GHAZAEI, 2017).

A linhagem HC5 40048 apresentou maior robustez térmica em temperaturas elevadas, caracterizada por maior taxa de crescimento específico, maior acúmulo de biomassa e menor tempo de geração, em comparação com a estirpe selvagem. Esses resultados corroboram as observações relatadas por outros pesquisadores como Chen e colaboradores (2015) e Papiran e Hamedi (2021), que relataram a seleção de linhagens de *L. lactis* com maior adaptabilidade térmica e robustez sob estresse por calor quando as culturas foram submetidas a EAL sob estresse térmico.

Todavia, apesar das linhagens adaptadas apresentarem fenótipos melhorados em temperaturas elevadas (47 °C e 48 °C), quando foram cultivadas na temperatura ótima de crescimento do *S. equinus* HC5 (42 °C), exibiram menor taxa de crescimento específico e obtiveram menor $DO_{600\text{ nm}}$ que a estirpe selvagem. Esses resultados podem ser explicados por mecanismos de regulação fisiológica e estrutural da célula. Como já relatado, as linhagens adaptadas ao estresse térmico apresentaram modificações na membrana celular, caracterizadas por maior diversidade de ácidos graxos e maior conteúdo de ácidos graxos saturados. Essas alterações, podem conferir resistência e estabilidade do envelope celular a temperaturas mais elevadas.

Entretanto, quando as linhagens adaptadas são cultivadas em temperaturas mais baixas, as alterações na parede celular podem influenciar o transporte de substratos e nutrientes para o citoplasma, potencialmente influenciando o fluxo metabólico. Estudos adicionais serão necessários para avaliar esta hipótese. Além disso, o fenômeno observado poderia ser explicado pela modificação da temperatura ótima das proteínas (enzimas) nas células adaptadas ao estresse por calor ou por alterações permanentes na regulação da expressão gênica em resposta ao choque térmico (RUSSELL, 2002; PANDEY *et al.*, 2022).

Quando *S. equinus* HC5 selvagem e as linhagens obtidas no processo de EAL foram avaliados quanto a produção de ácidos orgânicos, foi identificada produção majoritária de ácido láctico e baixa concentração de etanol por todas as linhagens selecionadas e não foi detectado produção ácido fórmico e ácido acético. A produção de lactato por *S. equinus* ocorre em altas taxas de crescimento microbiano e em cultivos com pH abaixo de 5,5. Contudo, a produção de acetato e formato acontece com taxas de crescimento lentas e é limitada quando o pH é menor do que 6,0 (GUNSALUS E GIBBS, 1953; RUSSELL E HINO, 1984). Em nossos experimentos, as linhagens de *S. equinus* HC5 apresentaram elevada taxa de crescimento específico ($1,45 \pm 0,28 \text{ h}^{-1}$) e pH final médio de $3,85 \pm 0,12$. Esses dados corroboram com a produção predominante de ácido láctico e escassez de formato e acetato pelas estirpes avaliadas. Pesquisas anteriores realizadas por Russell e Hino (1984) em microrganismos do complexo *S. bovis* / *S. equinus*, relataram o lactato como principal produto da fermentação em cultivos realizados a uma taxa de crescimento de 1.47 h^{-1} .

Os resultados deste estudo permitiram identificar a temperatura ótima e a máxima de *S. equinus* HC5. Além disso, oito linhagens de *S. equinus* HC5 com fenótipos distintos e com maior resistência ao estresse térmico foram selecionadas por EAL. Duas linhagens obtiveram maior produção de bovicina HC5 em relação à linhagem selvagem. A linhagem que apresentou maior título de produção da bacteriocina apresenta elevados níveis de expressão do gene que codifica para o peptídeo precursor (*bvcA*). As linhagens de *S. equinus* HC5 adaptados ao estresse térmico apresentam modificação na concentração de lipídeos do envelope celular e fenótipo diferencial na extração e recuperação de bovicina HC5.

5. CONCLUSÕES

S. equinus HC5 apresenta temperatura ótima de crescimento a 42 °C e temperatura máxima a 49 °C. As linhagens de *S. equinus* HC5 selecionadas por EAL demonstram fenótipo diferencial de extração de bovicina HC5, maior tolerância ao estresse térmico e aumento na concentração de ácidos graxos saturados no envelope celular. Duas linhagens de *S. equinus* HC5 com produção aumentada de bovicina HC5 foram selecionadas por meio de EAL. A linhagem de *S. equinus* HC5 com o maior título de bovicina HC5 apresenta expressão aumentada do gene (*bvcA*) que codifica o peptídeo precursor da bacteriocina. O aumento da expressão do gene *bvcA* é suficiente para aumentar a produção de bovicina HC5 no *S. equinus* HC5. Desta forma, em trabalhos futuros, a superexpressão do gene *bvcA* pode ser uma estratégia promissora para obter uma linhagem de *S. equinus* HC5 com produção industrial de bovicina HC5.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, S.-V. Department of Microbiology, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Kerklaan 30, 9751 NN Haren, The Netherlands, **2 Rumen Microbiology**, Agresearch Grasslands, Private bag 11008, Palmerston North, New Zealand. *Archaea*, p. 813–820, 2000.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella Typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 212–219, 2008.

ARKU, B.; FANNING, S.; JORDAN, K. Heat adaptation and survival of *Cronobacter* spp. (Formerly *Enterobacter sakazakii*). **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 9, p. 975–981, 2011.

ASANUMA, N.; HINO, T. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. **Animal Science Journal**, v. 73, n. 5, p. 313–325, 2002.

AZEVEDO, A. C. *et al.* Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7290–7304, 2015.

BARBOSA, A. A. T. *et al.* Like it acid and poor: a study of abiotic factors influencing *Streptococcus bovis* HC5 growth and bacteriocin production. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 4, n. 5, p. 421–426, 2015.

BENÍTEZ-CHAO, D. F. *et al.* Bacteriocins: An Overview of Antimicrobial, Toxicity, and Biosafety Assessment by in vivo Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. April, p. 1–18, 2021.

CARRIER, T. A.; KEASLING, J. D. Controlling messenger RNA stability in bacteria: Strategies for engineering gene expression. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 6, p. 699–708, 1997.

CHEN, J. *et al.* Adaptation of *Lactococcus lactis* to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate. **Scientific Reports**, v. 5, n. February, p. 1–15, 2015.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.

DAR, D.; SOREK, R. Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mRNA decay. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, p. 1–19, 2018.

DE CARVALHO, A. A. T. *et al.* The effect of carbon and nitrogen sources on bovicin HC5 production by *Streptococcus bovis* HC5. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 339–347, 2009.

DE CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 68–74, 2007.

DE CARVALHO, A. A. T.; VANETTI, M. C. D.; MANTOVANI, H. C. Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1685–1691, 2008.

FLYTHE, M. D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5) on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 2, p. 215–222, 2004.

FONSECA, F. *et al.* Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 6867–6883, 2019.

FOSTER, P. L. Stress-induced mutagenesis in bacteria. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 373–397, 2007.

GHAZAEI, C. Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 259–265, 2017.

GODOY-SANTOS, F. *et al.* Efficacy of a Ruminal Bacteriocin Against Pure and Mixed Cultures of Bovine Mastitis Pathogens. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 304–312, 1 set. 2019.

GROSU-TUDOR, S. S. *et al.* Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 2459–2469, 2014.

GUNSALUS, I. C. AND GIBBS, M. 1952 The heterolactic fermentation. II. Position of C14 in the products of glucose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Biol. Chem.**, 194, 871-875.

HADDAJI, N. *et al.* Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 9, p. 1–7, 2015.

HOOVER, D. G.; HARLANDER, S. K. Chapter - Screening Methods for Detecting Bacteriocin Activity. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: Academic Press**, p.23-39, 1993.

KOZLOSKI, G. B. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 139p.2002.

LEE, S. S. *et al.* The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro¹. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 51–55, 2002.

LIMA, J. R. *et al.* Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, n. 1, p. 78–84, 2009.

LINDAHL, T.; NYBERG, B. Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. **Biochemistry**, v. 11, n. 19, p. 3610–3618, 1972.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. J. *et al.* Adaptive evolution of industrial *Lactococcus lactis* under cell envelope stress provides phenotypic diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 1–17, 2018.

MANTOVANI, H. C. *et al.* Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347–3352, 2002.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 77–83, 2003.

MARMION, M. *et al.* Survive and thrive: Control mechanisms that facilitate bacterial adaptation to survive manufacturing-related stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 368, n. March, p. 109612, 2022.

MAVROMMATI, M. *et al.* Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 54, n. April 2021, p. 107795, 2022.

MOREIRA, S. M.; DE OLIVEIRA MENDES, T. A.; MANTOVANI, H. C. Stimulation of Bovicin HC5 Production and Selection of Improved Bacteriocin-Producing *Streptococcus equinus* HC5 Variants. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 3, p. 899–913, 2021.

PANDEY, S. *et al.* Mechanisms of stress adaptation by bacterial communities. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2022.

PAPIRAN, R.; HAMED, J. Adaptive Evolution of *Lactococcus Lactis* to Thermal and Oxidative Stress Increases Biomass and Nisin Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 11, p. 3425–3441, 2021.

PERALES-ADÁN, J. *et al.* LAB bacteriocins controlling the food isolated (drug-resistant) *staphylococci*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 2018.

QUAX, T. E. F. *et al.* Differential translation tunes uneven production of operon-encoded proteins. **Cell Reports**, v. 4, n. 5, p. 938–944, 2013.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253–266, 2010.

ROZÈS, N. *et al.* A rapid method for the determination of bacterial fatty acid composition. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 126–131, 1993.

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of Lactate Production in *Streptococcus bovis*: A Spiraling Effect That Contributes to Rumen Acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712–1721, 1985.

RUSSELL, J. B.; ROBINSON, P. H. Compositions and Characteristics of Strains of *Streptococcus bovis*. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 7, p. 1525–1531, 1984.

RUSSELL, N. J. Bacterial membranes: The effects of chill storage and food processing. An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1–2, p. 27–34, 2002.

SALUJA, D.; GODSON, G. N. Biochemical characterization of *Escherichia coli* temperature-sensitive dnaB mutants dnaB8, dnaB252, dnaB70, dnaB43, and dnaB454. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 1104–1111, 1995.

SANDBERG, T. E. *et al.* The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. **Metabolic Engineering**, v. 56, p. 1–16, 2019.

SCHUMANN, W. Regulation of bacterial heat shock stimulons. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 6, p. 959–968, 2016.

SHIN, Y. J. *et al.* Heat Adaptation Improved Cell Viability of Probiotic *Enterococcus faecium* HL7 upon Various Environmental Stresses. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 618–626, 2019.

SOLTANI, S. *et al.* Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 1, p. 1–24, 2021.

SOUZA, G. B. DE *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of dormancy-associated gene 1/auxin repressed protein (DRM1/ARP) gene family in Glycine max. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 146, p. 134–141, 2019.

TAGG, J. R. *et al.* Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 171–200, 1995.

TODOROV, S. D. *et al.* Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 3, p. 334–344, 2017.

World Health Organization (2019). New Report Calls for Urgent Action to Avert Antimicrobial Resistance Crisis. **WHO Jt. News Release**. Available online at: <https://www.who.int/> (accessed October 01, 2022).

WU, Y. *et al.* Advanced strategies and tools to facilitate and streamline microbial adaptive laboratory evolution. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 38–59, 2022.

XIONG, L. *et al.* Molecular characterization of arginine deiminase pathway in *Laribacter hongkongensis* and unique regulation of arginine catabolism and anabolism by multiple environmental stresses. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4469–4483, 2015.

YADAV, B. *et al.* Impact of heat stress on rumen functions. **Veterinary World**, v. 6, n. 12, p. 992–996, 2013.

ZHAO, S. *et al.* Effect of heat stress on bacterial composition and metabolism in the rumen of lactating dairy cows. **Animals**, v. 9, n. 11, 2019.