



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

VIVIAN KELEN GONÇALVES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EPISSOMAL DE
AMPLO ESPECTRO PARA BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Recife
2025

VIVIAN KELEN GONÇALVES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EPISSOMAL DE
AMPLO ESPECTRO PARA BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de
Morais Junior

Coorientador: Dr. Allyson Andrade
Mendonça

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Almeida, Vivian Kelen Gonçalves de.

Desenvolvimento de um sistema episomal de amplo espectro para
bactérias lácticas / Vivian Kelen Gonçalves de Almeida. - Recife, 2025.
51p : il., tab.

Orientador(a): Marcos Antônio de Moraes Junior

Coorientador(a): Allyson Andrade Mendonça

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências, anexos.

1. Genética. 2. Microbiologia. 3. Vetor Plasmidial. 4. Engenharia
Genética. 5. Biotecnologia. I. Moraes Junior, Marcos Antônio de. (Orientação). II.
Mendonça, Allyson Andrade. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

VIVIAN KELEN GONÇALVES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EPISSOMAL DE
AMPLO ESPECTRO PARA BACTÉRIAS LÁCTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior
UFPE/ Departamento de Genética

Dr^a. Carolina Elsztein
UFPE/ CETENE

MSc. Tiago Luiz Santana Calazans
UFPE/ Departamento de Genética

Dedico este trabalho àqueles que me incentivaram e foram meu amparo: Edinalva Gonçalves, minha mãe, Yasmin Jennifer, minha amiga e *In memoriam* de minha amiga Hannah Arielly. Aos meus companheiros: Sylvie e Loki. Nada seria possível sem vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir alcançar um lugar que, aos meus sonhos, jamais imaginaria chegar.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marcos Morais, e ao meu coorientador, Dr. Allyson Mendonça, por todas as instruções, ensinamentos e apoio que obtive durante esse processo. Suas orientações foram valiosas para meu desenvolvimento acadêmico e para a conclusão deste trabalho. Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro proporcionado através do PIBIC/CNPq. Ademais, meus agradecimentos a todos os pesquisadores do LGM e ao Departamento de Genética, especialmente a Dayane e Tiago por todos os ensinamentos enriquecedores.

A minha imensa e profunda gratidão a Edinalva, minha mãe, minha grande amiga. A Valdeci, Elton, Maria José, Edinete, Micheline, a minha grande amiga e parceira de vida: Yasmin, e meus companheiros Loki e Sylvie. Eles são a base da minha vida, com amor incondicional, com palavras de sabedoria, apoio e companherismo durante toda a jornada da minha vida. Tudo isso é em prol de vocês e nada disso seria possível sem o amor, o carinho e a credibilidade de vocês.

In memoriam e em gratidão a Hannah Arielly, a quem tanto incentivou e me ouviu em cada momento de dificuldade, minha amiga confidente, minha companheira de profissão. Esse trabalho é para você.

Aos meus amigos do LGM: Bruna Maria, Maria Cecília, José Neto e Jamerson. Muito obrigada por todo apoio, por cada momento vivenciado em cada experimento, por toda a ajuda durante os inúmeros sufocos, sendo superados com muitas risadas e a parceria de sempre, tornando todos momentos especiais e mais leves. Somente assim, a síntese desse trabalho foi possível. Agradeço as minhas amigas Mariane, Thamires, Mayza, Ana Luíza, Alice, Júlia, Aline, Mayara e Laís, por dividirem essa jornada comigo. Desde o início, estivemos juntas em longas viagens de ônibus, nos almoços, nas inúmeras horas de estudo, e entre tantos outros momentos especiais, sejam eles de risadas ou até mesmo de lágrimas, mas sempre acreditando, confiando no potencial e sendo o suporte uma das outras.

Agradeço a todos os demais amigos e familiares que contribuíram de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional. Seja com simples palavras de apoio, ou até mesmo com grandiosos gestos. Todo incentivo e momentos compartilhados foram de fundamental importância para meu desenvolvimento

“Aquele que tem uma razão para viver pode suportar quase tudo.”

Friedrich Nietzsche

ALMEIDA, Vivian Kelen Gonçalves. **Desenvolvimento de um sistema episomal de amplo espectro para bactérias lácticas**. 2025. 52 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

O desenvolvimento de vetores extracromossômicos mais seguros, regulados e eficientes tem sido um dos projetos de estudo na área de pesquisa biotecnológica no cenário atual, haja visto suas significativas aplicações, seja na formulação de um sistema voltado para a terapia imunogênica, ou para o uso industrial e entre outros. A construção do sistema episomal deste trabalho em questão, utilizando como modelo *in vivo* a bactéria *Liquorilactobacillus vini* JP 7.8.9, tem potencial abrangente de contribuição considerável para a engenharia genética aplicada a bactérias ácido-lácticas, onde elas têm sua relevância em seu aproveitamento na indústria de alimentos fermentados e na produção de probióticos. Esse sistema foi sintetizado a partir da obtenção e caracterização dos replicons de plasmídeos nativos de *L. vini* JP 7.8.9, onde esses replicons consistem no gene repA e na sua origem de replicação. Os replicons foram inseridos no vetor integrativo derivado de *Escherichia coli* DH10B, o pRV-300, para a construção de um vetor recombinante funcional. O sistema episomal resultante foi idealizado para apresentar um amplo espectro de aplicação e carrear genes de escolha para diferentes espécies de bactérias lácticas. As espécies selecionadas para este estudo incluem *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, onde apresentam características que favorecem seu uso no setor industrial bem como o uso para aplicações probióticas e, expõem significativa relevância nos estudos biotecnológicos. Essas foram submetidas a processos de transformação seguido de avaliação da capacidade e análise de estabilidade ao incorporar o vetor recombinante desenvolvido. A funcionalidade de um sistema episomal de amplo espectro poderá viabilizar aplicações de transformação em bactérias lácticas eficientes, e consequentemente, a otimização de processos fermentativos, a expressão de genes de interesse para a produção de biomoléculas, com aspectos imunogênicos, e o desenvolvimento de novas cepas com propriedades melhoradas, atendendo tanto às demandas industriais quanto às científicas. Este estudo buscou explorar a variabilidade e estabilidade dos vetores recombinantes em diferentes hospedeiros lácteos. Assim, os resultados contemplados poderão expandir o uso de ferramentas moleculares para a manipulação de bactérias lácticas, promovendo avanços em diversas áreas da microbiologia aplicada.

Palavras-chave: Genética. Microbiologia. Vetor Plasmidial. Engenharia Genética. Biotecnologia.

ALMEIDA, Vivian Kelen Gonçalves. **Development of a broad-spectrum episomal system for lactic acid bacteria**. 2025. 52 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

The development of safer, more regulated, and more efficient extrachromosomal vectors has been a major focus of research in biotechnology today, given their significant applications, whether in the formulation of systems for immunogenic therapy or industrial use, among others. The construction of the episomal system in this study, using the bacterium *Liquorilactobacillus vini* JP 7.8.9 as an in vivo model, has the potential to significantly contribute to genetic engineering applied to lactic acid bacteria, where they are relevant for their use in the fermented food industry and probiotic production. This system was synthesized by obtaining and characterizing replicons from native plasmids of *L. vini* JP 7.8.9, where these replicons consist of the *repA* gene and its origin of replication. The replicons were inserted into the integrative vector derived from *Escherichia coli* DH10B, pRV-300, to construct a functional recombinant vector. The resulting episomal system was designed to offer a broad spectrum of applications and carry genes of choice for different lactic acid bacteria species. The species selected for this study include *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus rhamnosus*, which exhibit characteristics that favor their use in the industrial sector as well as for probiotic applications, and are of significant relevance in biotechnological studies. These species underwent transformation processes followed by capacity evaluation and stability analysis upon incorporation of the developed recombinant vector. The functionality of a broad-spectrum episomal system could enable efficient lactic acid bacteria transformation applications and, consequently, the optimization of fermentation processes, the expression of genes of interest for the production of biomolecules with immunogenic aspects, and the development of new strains with improved properties, meeting both industrial and scientific demands. This study sought to explore the variability and stability of recombinant vectors in different dairy hosts. Thus, the results may expand the use of molecular tools for manipulating lactic acid bacteria, promoting advances in various areas of applied microbiology.

Key words: Genetics. Microbiology. Plasmid Vector. Genetic Engineering. Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de Síntese de Compostos Metabólicos	15
Figura 2 – Nichos das espécies de <i>Lactobacillus</i>	16
Figura 3 – Tipos de fermentação pelas bactérias ácido lácticas.	18
Figura 4 – Vetor de Clonagem pBR322	20
Figura 5 – Uso das Bactérias Ácido Lácticas para aplicações médicas.	21
Figura 6 – Esquema de Ativação Imunológica por BAL recombinantes	22
Figura 7 - Vetor utilizado como base para construção	28
Figura 8 - Esquema do processo de clonagem pela técnica de Gibson Assembly	31
Figura 9 - Esquema do processo de clonagem pela técnica de Gibson Assembly para moléculas de DNA circular	32
Figura 10 - Digestão plasmidial da linhagem de <i>L. vini</i> JP 789	35
Figura 11 - Mapa dos plasmídeos de <i>L. vini</i> JP 7.8.9	36
Figura 12 – Amplificação dos elementos genéticos utilizados no trabalho para construção do vetor episomal	39
Figura 13 - Amplificação teste dos transformantes de <i>E. coli</i>	39
Figura 14 - Resultado da confirmação do sítio de inserção dos replicons	40
Figura 15 - Resultado da PCR para réplicon do plasmídeo pRLV-3	42
Figura 16 - Porcentagem da população bacteriana de cada espécie que reteve o vetor	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Elementos Fundamentais para Clonagem essenciais para replicação	20
Tabela 2 – Primers utilizados no trabalho	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	BACTÉRIAS ÁCIDOS LÁCTICAS (LAB)	14
2.2	<i>LACTOBACILLUS</i>	15
2.3	<i>LACTOCOCCUS</i>	16
2.4	APLICAÇÕES DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NA BIOTECNOLOGIA	17
2.5	VETORES E SUAS APLICAÇÕES	19
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	24
4.2	ANÁLISE PLASMIDIAL DE LIQUORILACTOBACILLUS VINI	24
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	25
4.4	PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	25
4.5	DESENHO DE PRIMERS PARA PCR CONVENCIONAL E CONDIÇÕES DE REAÇÃO	27
4.6	DESENHO DE PRIMERS PARA PCR QUANTITATIVA E CONDIÇÕES DE REAÇÃO	29
4.7	CONSTRUÇÃO DO VETOR EPISSOMAL	31
4.8	ANÁLISE FUNCIONAL DO SISTEMA DE REPLICAÇÃO E ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES	33
5	RESULTADOS	35
5.1	IDENTIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DOS SISTEMAS DE REPLICAÇÃO DE SEGREGAÇÃO PLASMIDIAL	35
5.2	TRANSFORMAÇÃO EM BACTÉRIAS LÁCTICAS, EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO E ESTABILIDADE	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	45
8	REFERÊNCIAS	46
9	ANEXO	50

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas são microrganismos conhecidos pela sua participação na indústria de alimentos fermentados e por suas características probióticas quando administrados em quantidades adequadas (Zhang e Cai, 2014; Mendonça *et al* 2022). A título de exemplo, está o seu uso para o auxílio na manutenção e restauração adequada das funções digestivas, como na resposta imune e prevenção de sensibilidade. (Cui, Y. *et al.* 2015; Kazi, T. A. *et al.* 2022). Além da sua aplicação em formulações de diversos produtos lácteos, elas também têm sido utilizadas para síntese de macromoléculas e enzimas benéficas à saúde, (Meruvu, Haritha *et al.*, 2023). Ademais, algumas apresentam características antimicrobianas que auxiliam no controle de patógenos com a produção de biocinas (Reis *et al* 2012).

Adicionalmente às aplicações biotecnológicas clássicas na indústria de alimentos, seu potencial tem sido ampliado com o auxílio das novas tecnologias. Através da engenharia genética, novas atividades biológicas podem ser adicionadas às bactérias ácido lácticas (BAL), onde elas possuem potencial biotecnológico de construção de vetores recombinantes por meio do seu material genético extracromossômico. Os plasmídeos são moléculas de DNA existentes de forma independente do DNA genômico celular, e carregam genes específicos que, por meio da sua expressão, atribuem à célula hospedeira características que podem consequentemente dispor de resultados significantes. A presença do plasmídeo em microrganismos naturalmente confere ao hospedeiro microbiano maior competitividade e sobrevivência em ambientes desfavoráveis. Podemos observar a ação de tais plasmídeos quando estes tornam as células bacterianas resistentes a antibióticos, metais pesados, atuam na produção de pigmentos, ou até mesmo na síntese de bacteriocina. (Cui, Y. *et al* 2015; Coutinho, HDM *et al* 2022). Entretanto, um outro fator deve ser considerado sobre os plasmídeos: carregar os genes alvos para produção de biomoléculas de interesse, como a síntese de proteínas heterólogas, sejam elas com o objetivo final imunogênico, denominadas probióticos vacinais, ou com o princípio de aumento da qualidade alimentar, entre outros benefícios. (Cui, Y. *et al* 2015; Kazi, T. A. *et al.* 2022; Szatraj *et al* 2017).

Tais características apresentadas por essa molécula de DNA, em especial as

últimas supracitadas, ao que diz respeito às aplicações biotecnológicas, os plasmídeos podem permitir a manipulação genética das BAL de modo a ampliar o desempenho delas, explorando seu potencial como vetores vacinais com a produção de antígenos heterólogos de maneira que não ocasione efeito colaterais por se tratar de bactérias não patogênicas. Essa molécula também pode carregar genes que sintetizam os subsídios para proteção da mucosa intestinal e ainda apresentar resistência ao baixo pH e as altas concentrações de sais (Wang *et al* 2020; Qiao *et al.* 2021).

O presente projeto teve por objetivo desenvolver um vetor recombinante de amplo espectro, cujo abrange distintas espécies de bactérias lácteas. Esse vetor foi construído por meio da origem de replicação e o gene *repA* dos plasmídeos nativos observados na espécie *L. vini* JP 7.8.9, uma das bactéria de estudo genético do laboratório desse projeto, seguindo para inserção desses replicons no vetor integrativo *pRV-300*, derivado de *Escherichia coli* DH10B. Por conseguinte, esses vetores recombinantes foram adicionados as espécies competentes de *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus casei* BL23, *Lactobacillus plantarum* WCSF 1, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus rhamnosus* GG que foram transformadas com a inserção desse plasmídeo de amplo espectro. Posteriormente, foram efetuadas a análise do sistema de replicação desses vetores recombinantes, juntamente com a avaliação da estabilidade dos plasmídeos nas cepas de BAL transformantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDOS LÁCTICAS (BAL)

De acordo com Zhang e Cai 2014, às bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos gram-positivos, catalase negativa e fermentadores de carboidratos com produção final de ácido láctico. São microaerofílicos, não esporulantes, aerotolerantes, e podem apresentar características morfológicas de cocos ou bacilos (Zhang e Cai, 2014; Coelho, Márcia *et al* 2022). Quanto a sua taxonomia, as BAL compõem o filo *Firmicutes*, cujo os gêneros que elas integram são *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. É imprescindível ressaltar os gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, visto que, para construção dessa pesquisa, algumas de suas espécies foram examinadas (Motta e Gomes, 2015; Wright *et al* 2019).

Algumas BAL são vitais na indústria, onde são legitimadas como seguras, e geralmente adquirem o título de GRAS (do inglês *Generally Recognized As Safe*) de acordo com *American Food and Drug Administration (FDA)*. Elas são amplamente reconhecidas pela sua capacidade de acidificar os alimentos. Esse procedimento é definido na indústria de alimentos como a utilização de culturas iniciadoras, fundamentais para a fabricação de inúmeros alimentos fermentados. (Landete, J. M. 2017; García-díez e Saraiva, 2021; Coelho *et al* 2022). Com essa propriedade, elas compõem um papel significativo, onde são responsáveis pela textura, sabor e odor dos alimentos, possuindo assim como consequência fundamental, a melhoria da qualidade nutricional, com a adição de compostos benéficos. (Motta e Gomes, 2015; Meruvu, Haritha *et al.*, 2023).

A conservação e segurança dos alimentos também é um dos papéis importantes das bactérias ácido lácticas, já que a acidificação do ambiente e a produção de bacteriocinas (figura 1) impede a proliferação de microrganismos prejudiciais, nomeados de patogênicos, desempenhando um papel crucial na segurança alimentar (Zacharof e Lovitt, 2012). Este processo não só aprimora a qualidade dos alimentos, como também diminui a possibilidade de contaminação e prolonga a durabilidade dos produtos, o que os tornam mais seguros para consumo, evitando a presença de bactérias patogênicas como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, entre outras. (Wang *et al* 2015; García-Díez e Saraiva, 2021).

Outro fator a ser observado são as suas características probióticas quando administradas em quantidades adequadas, de modo a promover a melhora na saúde (Mendonça *et al* 2022). As cepas de BAL que são classificadas como seguras permitem seu manuseamento em processos biotecnológicos voltados para saúde, como no transporte de proteínas recombinantes terapêuticas e antígenos, sem a presença de endotoxinas (figura 5). (Cui, Y. *et al* 2015; Cano-Garrido *et al* 2015; Kazi, T. A. *et al*. 2022).

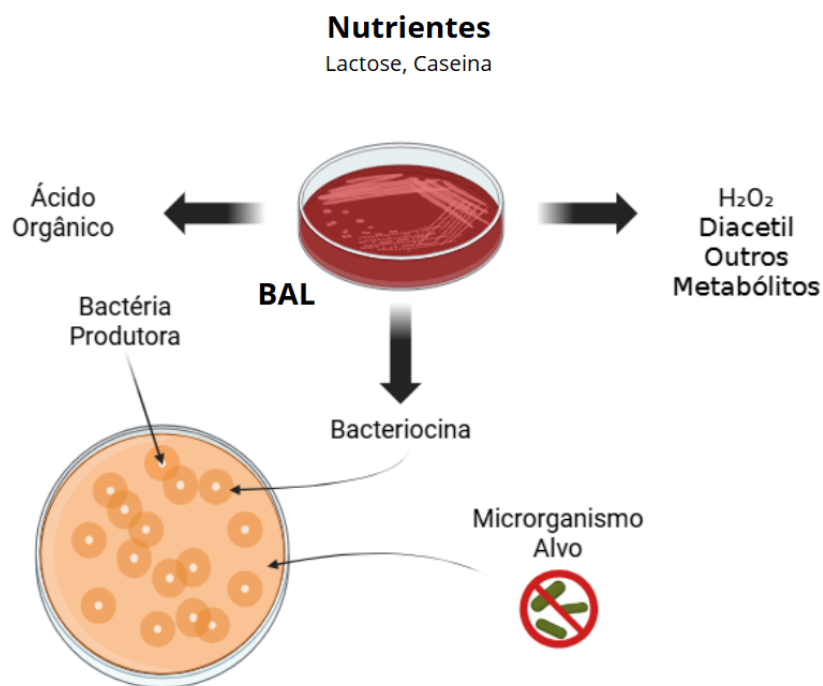


Figura 1: Esquema de Síntese de Compostos Metabólicos pelas Bactérias Ácido-Láticas
Fonte: VINDEROLA, G. 2024 (Adaptado)

2.2 *LACTOBACILLUS*

Dentre as bactérias selecionadas para este estudo, é relevante ressaltar os *Lactobacillus*, o maior gênero do grupo das bactérias ácido lácticas. Esses microrganismos são comumente encontrados em nichos diversos conforme demonstrado na figura 2, como produtos alimentícios lácteos, com nichos ecológicos naturais (plantas e solo), como também são hospedeiros de animais e humanos - localizados na microbiota do trato gastrointestinal (TGI), cavidade oral e trato urogenital. Eles contribuem na fermentação de vinhos, bebidas alcólicas e alimentos fermentados (Vinderola *et al* 2024; Cui, Y. *et al*. 2015). Segundo Vinderola *et al*. 2019, existe uma correlação entre o nicho em que as BAL são encontradas e o tamanho do genoma das espécies. A exemplo estão os *Lactobacillus* que

adaptaram-se ao TGI e a vagina humana, e obtiveram uma consequente redução do genoma e estreitamento do seu habitat. A tese apontada para tal desfecho seria em razão de uma possível coevolução com seus hospedeiros. Entretanto, para as bactérias com nichos generalistas, como os *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*, os seus genomas são maiores. Tal fator supracitado mostra-se relevante para compreensão da especificidade desses *Lactobacillus* a determinados nichos e como seu papel fermentador e probiótico podem ser explorados para a biotecnologia e construção de vetores (Papizadeh *et al.* 2017).

Conforme Cui, Yanhua, *et al.* 2015 as diferentes espécies dos *Lactobacillus* podem dispor de 1 a 10 plasmídeos distintos a cada cepa. Esses plasmídeos contêm tamanhos que encontram-se entre 1,80 kb a 245 kb. As bactérias desse gênero são amplamente utilizadas para construção de vetores com expressão de genes heterólogos. Nesse estudo, optou-se pelo uso das espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus vini*.

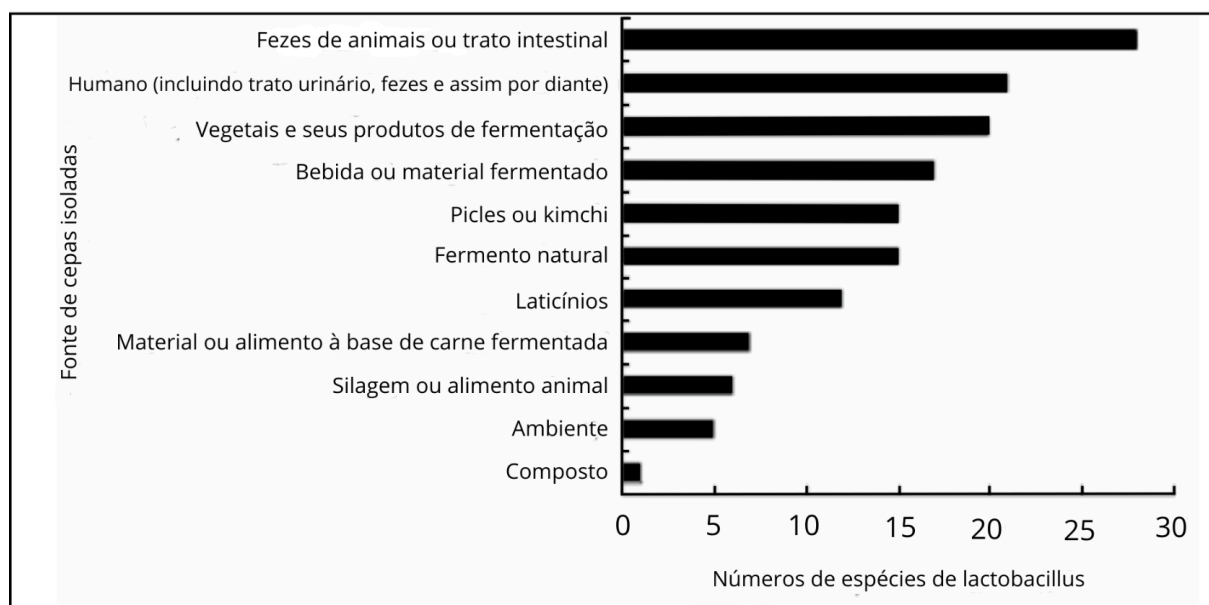


Figura 2: Nichos das espécies de *Lactobacillus* apresentando distintos nichos ecológicos, com maior presença no TGI ou fezes de animais. **Fonte:** Vinderola *et al* 2019 (Adaptado)

2.3 LACTOCOCCUS

O gênero *Lactococcus* é extensivamente utilizado em processos fermentativos por ser um gênero amplamente caracterizado, onde seu metabolismo e genoma são analisados em demasia. Outro fato seria a sua presença em

distintos nichos. Logo, esse gênero apresenta um número de plasmídeos que varia entre 4-14 plasmídeos, com tamanho que pode ser de 0,80 kb a 80 kb. Seu genoma é relativamente extenso, entre 2250 Mbp a 2600 Mbp. Dentre as espécies desse gênero, *Lactococcus lactis* é a mais explorada, sendo aplicada principalmente na fermentação de leite e queijo. Da mesma forma, *Lac. lactis* é reconhecida também por sua capacidade de sintetizar bacteriocinas, como demonstrada na figura 1, e exopolissacarídeos, que podem inibir a formação de biofilme de bactérias patogênicas. Desse modo, ela tornou-se altamente valorizada na indústria de alimentos e biotecnologia (Papagianni, M. 2012; Cui, Y. *et al.* 2015; Cirkovic, I. *et al.* 2016).

Lactococcus também possuem um potencial como carreador de proteínas terapêuticas, o que a torna uma ferramenta extensamente utilizada para aplicações na biotecnologia recombinante. Seu uso diversificado está diretamente ligado ao seu genoma bem caracterizado e amplamente sequenciado. (Tavares *et al.* 2020).

2.4 APLICAÇÕES DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NA BIOTECNOLOGIA

Como relatado anteriormente, as bactérias ácido lácticas contêm atributos inatos que são cruciais para o seu manuseio em biotecnologia. Algumas dessas bactérias são classificadas como seguras, produzem ácido láctico como metabólito do processo de fermentação de açúcar (figura 3) e contêm propriedades probióticas. Elas são atuantes na indústria alimentícia até a área da saúde humana. (Landete, J. M. 2017)

Segundo García-díez e Saraiva, 2021, na indústria as BAL são extensamente utilizadas em processos fermentativos como Culturas Iniciadoras (do inglês, Starter Cultures) de alimentos para o consumo humano e animal como queijo, leite e iogurtes a partir de produtos primários como carne, cereais e vegetais. Essas bactérias conferem características específicas de aparência, textura, aroma e sabor, devido a produção do ácido láctico, componente fundamental para acidificar o meio e emulsificar a proteína do leite, bem como a produção de diacetil e acetaldeído (Figura 3), que também influenciam no sabor e aroma dos alimentos (Papagianni, M. 2012). Elas exercem um papel no aumento da qualidade nutricional, visto que as mesmas detêm a capacidade de aumentar a biodisponibilidade de determinados nutrientes e de produzir compostos benéficos para a saúde, como vitaminas e

peptídeos bioativos (Meruvu, Haritha *et al.*, 2023).

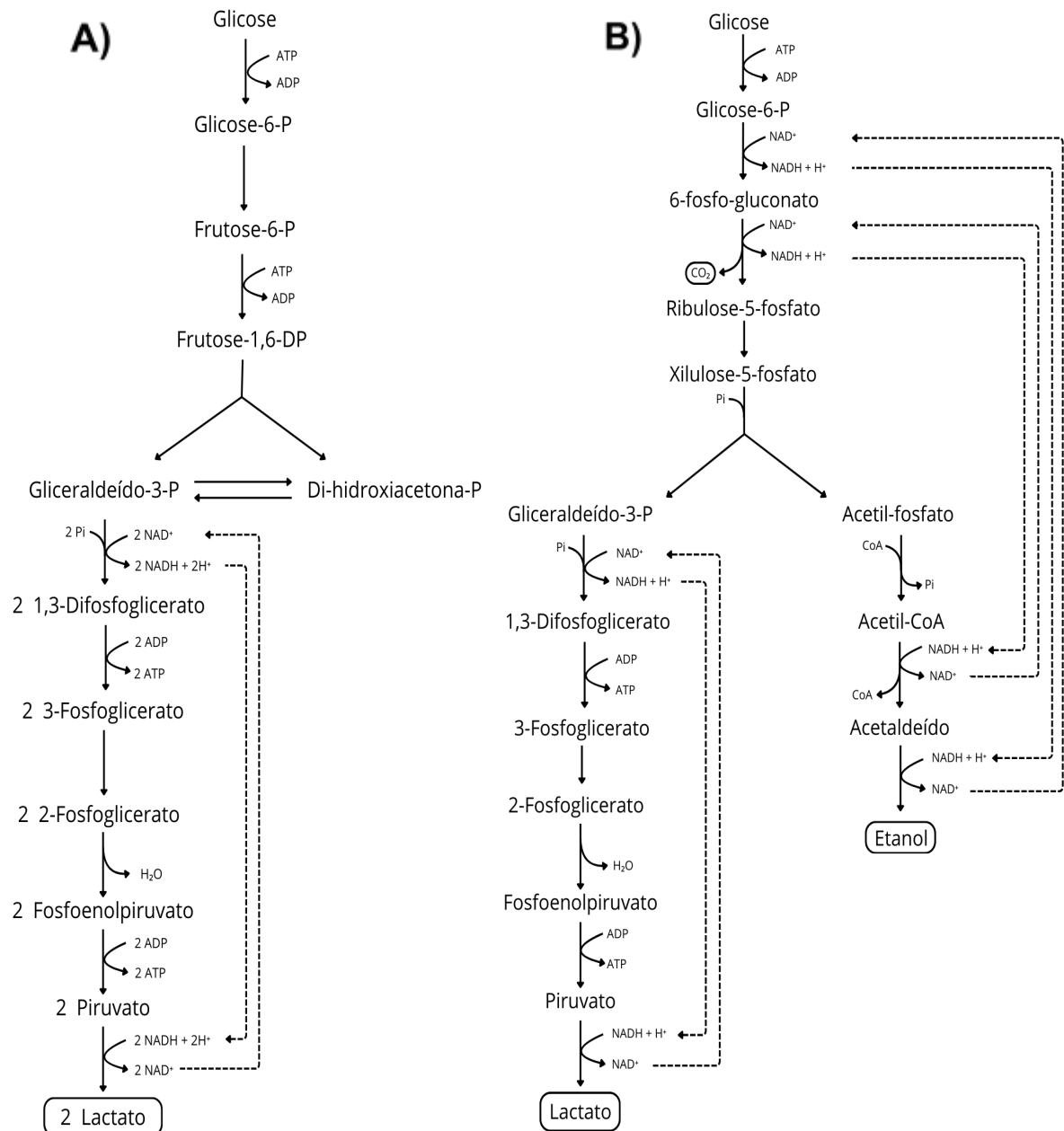


Figura 3. Tipos de fermentação pelas bactérias ácido lácticas. A) Homofermentação: via metabólica da Glicólise, com produto final de ácido láctico; B) Heterofermentação: via metabólica das pentoses-fosfatos, com produção final de ácido láctico, etanol (ou ácido acético) e CO₂.

Fonte. Reis *et al* 2012 (Adaptado)

Outro aspecto relevante é a capacidade de atuação das BAL na biopreservação dos alimentos. A síntese de ácido láctico e outros compostos antimicrobianos, como bacteriocinas (polipeptídeos sintetizados pelo ribossomo), peróxido de hidrogênio, ácido acético, ácido benzoico e propiônico (figura 3) inibem o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Devido à competição

por nutrientes e da produção desses metabólitos antimicrobianos, as BAL tornam mais difícil a sobrevivência desses microrganismos (Coelho, Márcia *et al* 2022; Reis *et al* 2012). Essa propriedade é de grande interesse na indústria de laticínios, pois permite o aumento da vida útil dos produtos, evitando o crescimento de patógenos e garantindo a segurança alimentar. Haja visto o amplo desenvolvimento de resistência bacteriana patogênica atualmente, é possível constatar que essa é uma significativa qualidade para uso de tais bactérias, cujo seu desempenho auxilia com a crescente demanda por alimentos mais naturais e saudáveis. (Coelho, Márcia *et al* 2022; Meruvu, Haritha *et al.*, 2023).

2.5 VETORES E SUAS APLICAÇÕES

Segundo Resende e Soccol 2015, o vetor é uma molécula de DNA capaz de transportar a sequência gênica a ser clonada para o interior da célula, ou permite a expressão de proteínas recombinantes em células hospedeiras, sendo um dos primeiros vetores construídos por meio dos plasmídeos (DNA circular dupla fita autorreplicantes) naturais de *Escherichia coli*, como o vetor pBR322 (Figura 4). Existem outros tipos de vetores como os comídeos ou os derivados de bacteriófagos, entretanto para essa pesquisa importa que os plasmídeos sejam melhor abordados. Essa molécula deve conter alguns elementos, como demonstrados na figura 3 e tabela 1, essenciais para sua replicação. Os plasmídeos que são utilizados para clonagem dos genes inseridos no DNA são denominados Vetores de Clonagem. Já os plasmídeos que traduzem o gene inserido ao seu DNA em RNA mensageiros estáveis, e sintetizam as proteínas recombinantes, são classificados como Vetores de Expressão. Esse último supracitado detém a necessidade da presença da região promotora e região codificadora, entre outros (Resende e Soccol 2015).

No que se refere às bactérias ácido lácticas, elas têm sido participante atualmente nas formulações de diversos produtos lácteos como mencionado anteriormente, e detêm também uma considerável capacidade para construção de vetores. Hodiernamente, as BAL são extensivamente exploradas para a síntese de proteínas recombinantes, isso se deve não apenas a sua eficiência, como também dado seu papel no bem-estar humano, não conferindo risco à saúde humana. Segundo Kazi, Tawsif Ahmed *et al.* 2022, os BAL são considerados candidatos emergentes para a expressão de proteínas de relevância médica, industrial e

biotecnológica. A título de exemplo está o seu uso para o auxílio na manutenção e restauração adequada das funções digestivas perante o câncer colorretal, infecções virais, parasitárias e de bactérias patogênicas, diabetes, doenças autoimunes (como a Doença de Crohn) e, imunização de mucosas por meio de anticorpos e antígenos, como pode ser observado na figura 5 e figura 6. Igualmente deve ser pontuada a sua aplicação alimentar e nutricional. (Cano-Garrido, O. 2015; Kazi *et al.* 2022).

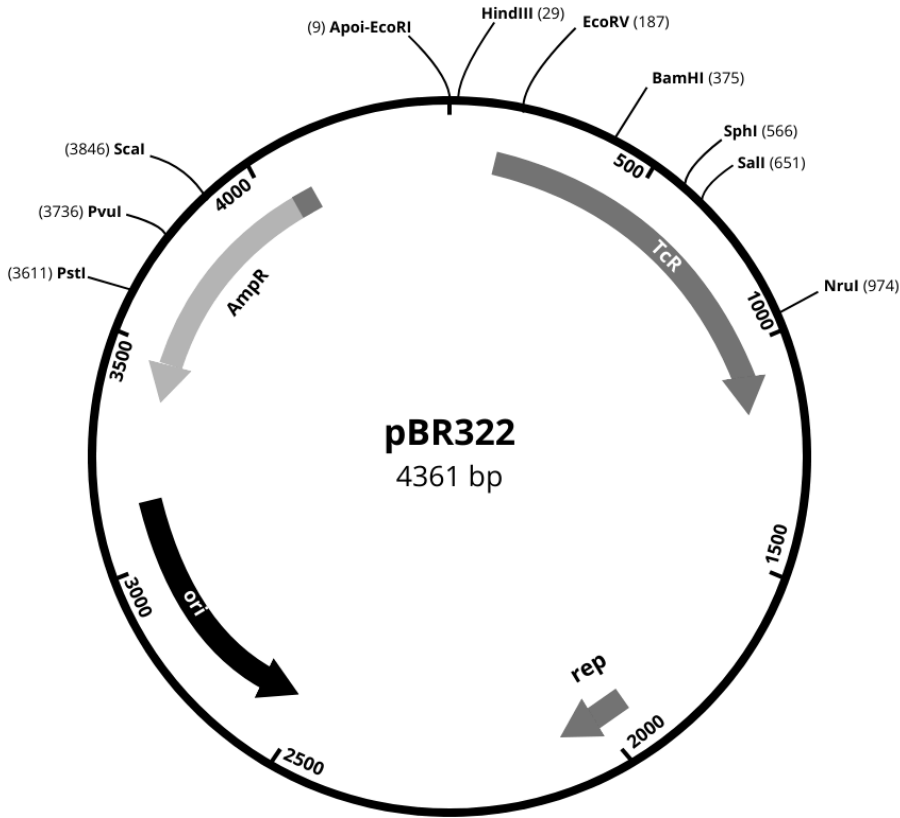


Figura 4: Vetor de Clonagem pBR322: plasmídeo natural de *Escherichia coli*
Fonte: Resende e Soccol 2015 (adaptado)

Tabela 1: Elementos Fundamentais para Clonagem, essenciais para replicação

Elementos	Função
Origem de replicação	Permite a propagação do vetor
Marcador de seleção	Confere resistência a um determinado antibiótico
Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS)	Permite a inserção da sequência codificadora de interesse.

Fonte: Autor

Todavia, as limitações relacionadas à aplicação das BALs a engenharia genética estão concernentes ao uso restrito dessas bactérias a aplicações de baixa complexidade, dado a disponibilidade recente de ferramentas moleculares, onde ainda há uma falta de sistemas eficazes de expressão gênica para as BAL e, quando desenvolvidas, há um uso restrito a alguns seletos grupos de cepas de lactobacilos, como *L. casei* e *Lac. lactis*. Haja vista tais fatores, um vetor de amplo espectro estável para as diversas bactérias lácticas com diferentes aplicações com replicons obtidos de uma bactéria lácteas foi o enfoque desta pesquisa visando sanar esses impasses supracitados. (Kazi, T. A. et al. 2022)

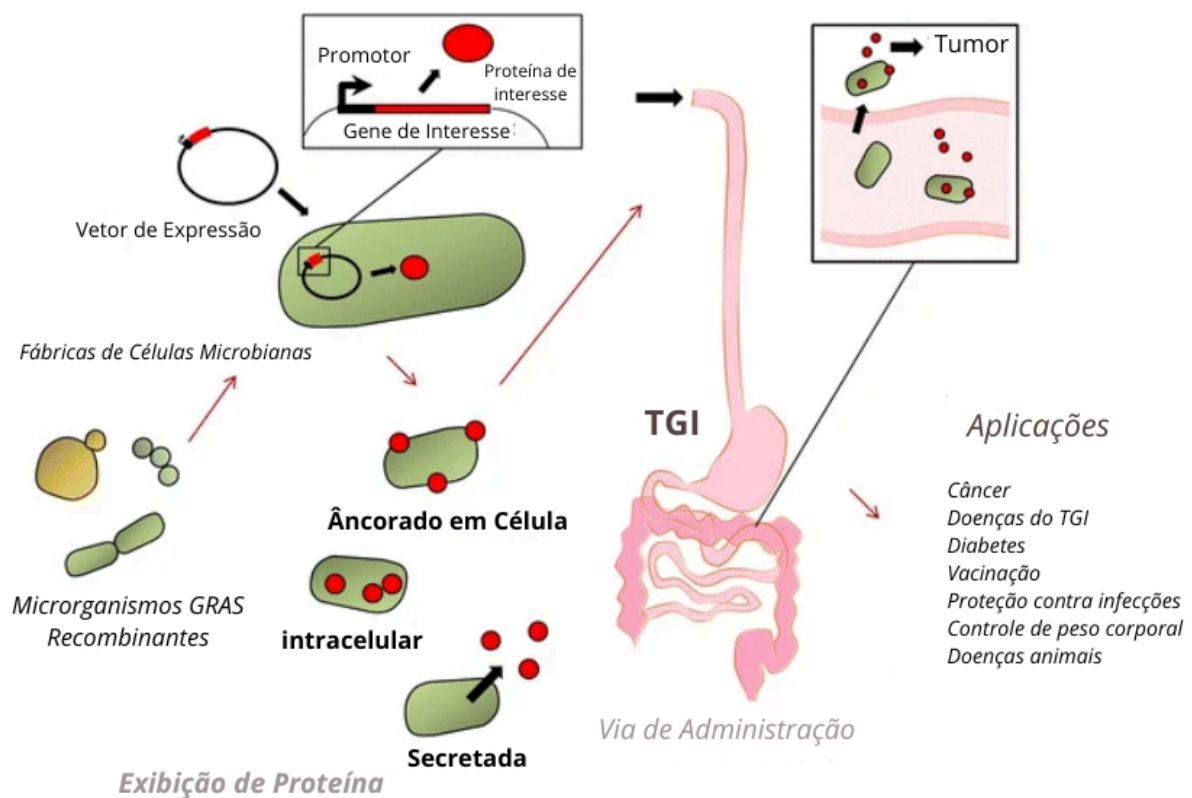


Figura 5: Ilustração da construção e o uso das Bactérias Ácido Lácticas por meio da via de administração oral para aplicações médicas. **Fonte:** Cano-Garrido, O. et al 2015 (Adaptado)

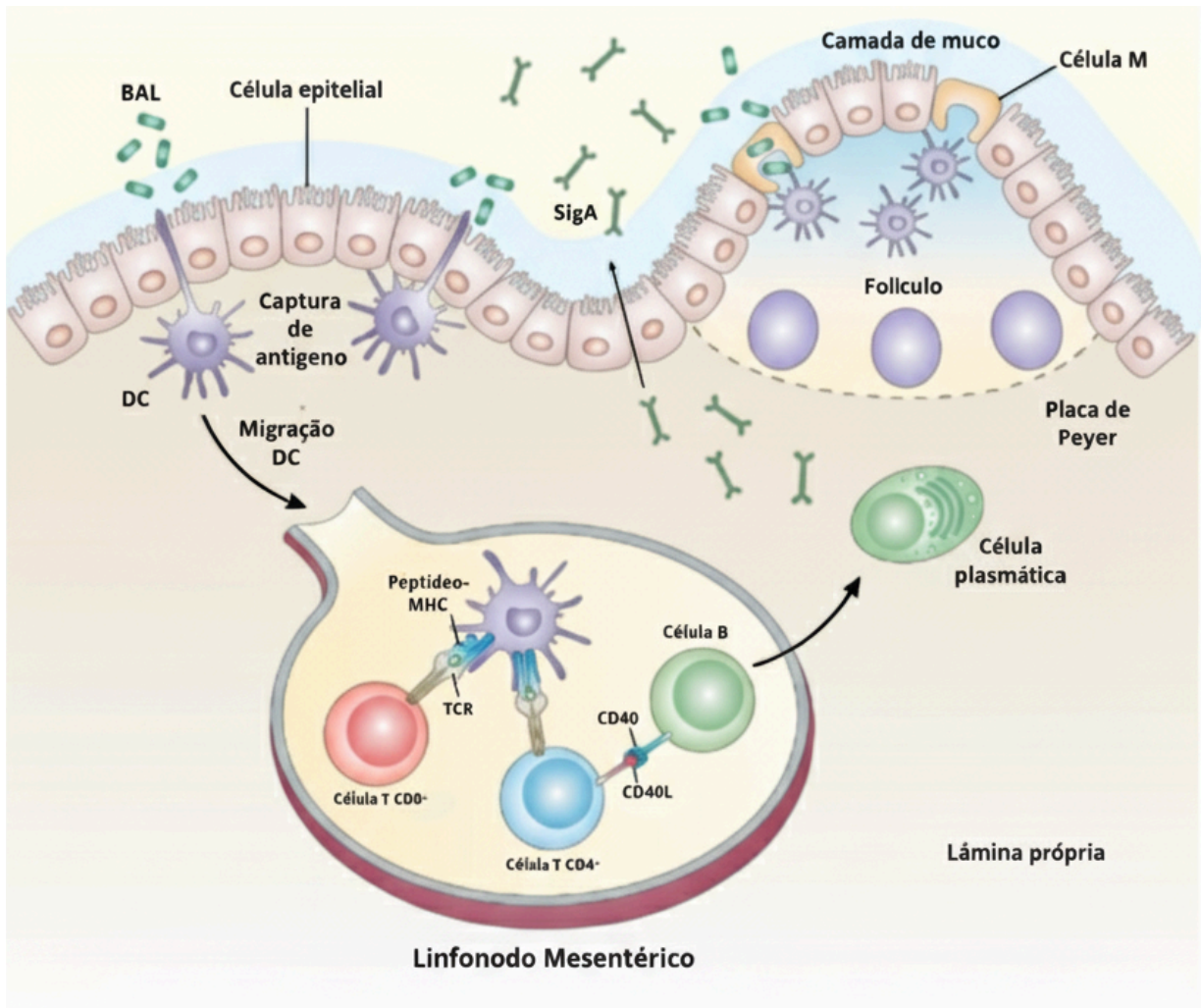


Figura 6: Esquema de Ativação Imunológica por Bactérias Ácido Láticas recombinantes presentes no Sistema Intestinal: a fagocitose das BAL pelas células dendríticas, ou o contato com as BAL por essas células, torna possível o transporte dos antígenos para o linfonodo mesentérico, onde ocorre a resposta das células T e ativação das células B.

Fonte: Qiao, N. et al. 2021 (Adaptado).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um vetor de amplo espectro para bactérias láticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar sistemas de replicação e segregação plasmidial no genoma de *L. vini* JP 789.
2. Construir um sistema plasmidial piloto com os sistemas de replicação e segregação de plasmídeos naturais presentes em *L. vini* JP 789.
3. Identificar o espectro de espécies em que os sistemas de segregação e replicação são funcionais.
4. Determinar a estabilidade dos sistemas de segregação e replicação em cada espécie.

4. METODOLOGIA

4.1 MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizados no trabalho as linhagens de *Escherichia coli* DH10B, *Lactococcus lactis* MG1363, *Lactobacillus casei* BL23, *Lactobacillus plantarum* WCSF 1, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus rhamnosus* GG, cedidas pelo *Lactic acid bacteria and probiotic laboratory* (IATA-Espanha) em colaboração, e atualmente presentes na coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (LGM). Adicionalmente, foi utilizada a linhagem JP 789 de *Lactobacillus vini*. As linhagens de lactobacilos foram cultivadas em meio MRS (Merck®) a 37°C em culturas estáticas. A linhagem de *Lac. lactis* MG 1363 foi cultivada em meio M17 (Oxoid) com 0.5% de glicose (M/V) a 30°C em cultivos estáticos. A linhagem de *E. coli* DH10B foi cultivada em meio LB (5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio e 10 g/L de triptona, pH de 7,0) a 37°C a 180 RPM. Para formulações sólidas dos meios, foi adicionado ágar numa concentração final de 2% (M/V). Quando necessário, foi adicionado eritromicina (Merck®) ou ampicilina (Sigma-Aldrich) na concentração final de 5 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Adicionalmente, foram utilizadas placas de meio LB suplementadas com X-Gal e IPTG nas concentrações finais de 0.2 g/L e 1mM, respectivamente. Todas as linhagens estão preservadas a -80°C no Laboratório Central do Centro de Biociências da UFPE, em seus respectivos meios de cultivo acrescido de glicerol numa concentração final de 15%. Nos isolados obtidos através de seleção por marca de resistência, o antibiótico apropriado foi adicionado aos estoques congelados.

4.2 ANÁLISE PLASMIDIAL DE *LIQUORILACTOBACILLUS VINI*

Como fonte doadora dos sistemas de replicação e segregação de plasmídeo e de promotores, foi utilizada a linhagem JP 7.8.9 de *L.vini*, cujo genoma está disponível (DDBJ/EMBL/GenBank). Como o genoma não está montado e se encontra apenas na forma de sequência de contigs, foi utilizada a ferramenta online plasmidFinder2.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), para identificação das sequências plasmidiais. Por conseguinte, foi utilizado a ferramenta ori-finder 2.0 (<http://tubic.tju.edu.cn/Ori-Finder2/>), para identificação da origem de replicação de

cada plasmídeo, e a plataforma Proksee (<https://proksee.ca/tools/prokka>), para manuseio do genoma.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

As bactérias foram cultivadas por 24h, coletadas e submetidas à extração plasmática. Os diferentes procedimentos baseados nos protocolos clássicos de extração foram testados e otimizados para aumento da eficiência de extração, onde o protocolo de extração de DNA por Fenol/Clorofórmio por Sambrook e Green, 2012 foi adaptado e escolhido conforme descrito no anexo A. Em seguida efetuamos a análise molecular de acordo com protocolos definidos por Sambrook et al 1989, e utilizamos os primers para amplificação dos replicons.

4.4 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Foram preparados cultivos em meio de cultivo fresco para as bactérias lácticas e para *E. coli* DH10B, de acordo com o descrito no item 4.1. Após 24 horas, essa cultura foi utilizada para preparo de células competentes. Para *E. coli* DH10B, a partir do cultivo recente, foi realizado um inóculo em novo meio LB fresco numa proporção de 1/50, a DO foi acompanhada até atingir um valor entre 0.55 a 0.6. Ao atingir a DO indicada, as células foram incubadas em gelo por 20 minutos e, posteriormente, coletadas por centrifugação a 4.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão e as células foram lavadas com solução estéril de CaCl₂ a 0.1 M no mesmo volume do cultivo inicial. Novamente, a suspensão celular foi centrifugada, nas condições descritas anteriormente, o sobrenadante foi desprezado por inversão, as células foram lavadas novamente com solução de CaCl₂ a 0.1 M e centrifugadas. Após a última centrifugação as células foram ressuspensas em solução de CaCl₂ a 0.1 M e Glicerol 15% numa proporção de 1/100 do volume inicial de cultivo. Alíquotas de 50 µL dessa preparação de células foram estocadas em ultra-freezers a -80°C e utilizadas até 2 meses após o preparo.

Para a transformação, foi utilizado até 500 ng de DNA plasmidial extraído. O DNA plasmidial e as células foram homogeneizados gentilmente e incubados em gelo por 40 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida a um choque térmico de 42°C por 45 segundos e incubada novamente em gelo por 5 minutos. Por fim, foi adicionado 1 mL de meio SOC (Tryptona 20 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, NaCl 0,5

g/L, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 7 mM, Glicose 20 mM, pH de 7,0) estéril e fresco e as células foram incubadas a 30°C em agitação, como descrito no item 4.1, por 1 h para recuperação. Ao final da incubação, 200 µL do cultivo foi aplicado na superfície de placas de meio LB contendo ampicilina e incubadas por 24h a 30°C. Após o cultivo, as colônias dos transformantes foram selecionadas aleatoriamente para testar a presença da construção por PCR de colônia, como indicado no item 4.5.

No caso do preparo das células de bactérias lácticas, foram produzidas culturas de até 24h nos seus respectivos meios, MRS para os lactobacilos e M17 suplementado com 0.5% de glicose (M/V) para a linhagem de lactococcus. Após o cultivo, as cepas foram inoculadas numa proporção de 1/50 em novo meio de cultura suplementado com glicina. Exceto para as linhagens de *L. plantarum* WCSF1 e *Lac. lactis* MG 1363, todas as demais foram cultivadas em meio com 2% (M/V) de glicina. Para *L. plantarum* WCSF1 e *Lac. lactis* MG 1363 o meio foi suplementado com 1% (M/V) de glicina. As cepas foram mantidas em cultivo até atingir a DO de 0.55-0.65, exceto para as cepas de *L. plantarum* WCSF1 que foi cultivada até atingir a DO entre 0.6-0.65, de *Lac. lactis* MG 1363 que foi cultivada até atingir a DO entre 0.4-0.7 e *L. rhamnosus* GG que foi cultivada até atingir uma DO entre 0.4-0.6. Uma etapa adicional foi realizada na preparação das células eletrocompetentes de *L. rhamnosus* GG, ao atingir uma DO de 0.3, foi adicionado ampicilina em concentração final de 10 µg/mL e mantido o cultivo.

Ao atingir as DO necessárias, as células das bactérias lácticas foram coletadas por centrifugação a 4.000 RPM, 4°C por 10 minutos, lavadas com tampão de transformação, em igual volume de cultivo. Esse passo foi realizado duas vezes e por fim as células foram ressuspensas em 1/100 do volume inicial em tampão de transformação, distribuídas 50µl da suspensão celular em microtubos e estocadas em ultrafreezers a -80°C. O tampão de transformação A (Sacarose a 0.3M; fosfato de sódio a 5 mM a pH de 7.4 e MgCl₂ a 1mM) foi utilizado para todas as linhagens de lactobacilos, exceto *L. plantarum* WCSF1, e o tampão de transformação B [Sacarose a 0.5M e glicerol 10% (V/V)] foi utilizado para *Lac. lactis* MG 1363. No caso de *L. plantarum* WCSF1 a primeira lavagem foi realizada com solução de MgCl₂ a 1 mM e as demais etapas foram realizadas com solução de PEG 1500 a 30% (M/V). Todas as soluções utilizadas nesta etapa do preparo de células eletrocompetentes foram preparadas com água mili-Q.

Para eletroporação, foi utilizado entre 100 – 300ng de DNA plasmidial e os parâmetros ajustados para 1500V e 200mA para maioria dos lactobacilos, exceto *L. rhamnosus* GG em que foi utilizado 1700V e em *L. plantarum* WCSF1 em que foi alterado o valor da corrente para 400mA e mantido o valor de tensão elétrica em 1500V. Imediatamente após o pulso, as células foram ressuspensas em meio de recuperação, meio MRS suplementado com 2 mM de CaCl_2 , 20 mM de MgCl_2 e 0.3M sacarose. No caso de *Lac. lactis* MG1363 os parâmetros de eletroporação foram 2250V de tensão elétrica e 200 mA de corrente e o meio de recuperação utilizado foi o meio M17 suplementado com glicose 0.5% (M/V), sacarose 0.5 M, 20 mM de MgCl_2 e 2 mM de CaCl_2 . As células foram cultivadas no meio de recuperação entre 2 a 3h e, posteriormente, 200 μL da suspensão celular foi distribuída homogeneamente, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de meio MRS. Para *Lac. lactis* foram utilizadas placas de meio de recuperação produzidas com a adição de ágar, como descrito no item 4.1. Após as transformações, as colônias em cada placa foram aleatoriamente selecionadas e testadas por PCR de colônias para identificação das construções, como descrito no item 4.5.

4.5 DESENHO DE PRIMERS PARA PCR CONVENCIONAL E CONDIÇÕES DE REAÇÃO

Os primers empregados no trabalho foram utilizados para amplificação dos elementos genéticos utilizados na construção do vetor episomal e para confirmação dos transformantes. Os primers foram desenhados manualmente a partir da identificação dos componentes do sistema de replicação de segregação plasmidial identificados na análise descrita no item 4.2. Como base da construção, foi utilizado o vetor integrativo pRV-300 (Figura 7), replicante apenas na linhagem DH10B de *E. coli* que complementa de maneira trans o gene *repA* ausente no vetor.

Para conversão do vetor pRV-300 num sistema episomal funcional em bactérias lácticas, foi adicionado uma nova origem de replicação e um gene *repA*, identificados nas análises de bioinformática. Deste modo, esses elementos genéticos foram amplificados por PCR utilizando a polimerase de alta fidelidade Phusion® (ThermoFisher). Os primers foram desenhados manualmente e analisados na plataforma online com os parâmetros ajustados para Phusion ([Tm Calculator for Primers | Thermo Fisher Scientific - US](#)).

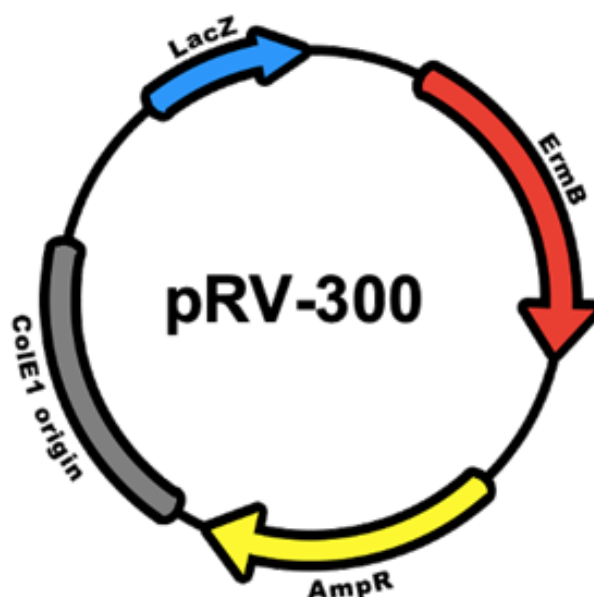


Figura 7. Vetor utilizado como base para construção. As flechas indicam a região ocupada por genes plasmidiais e a orientação da transcrição. Em azul está o gene lacZ, em vermelho o marcador de resistência para eritromicina, para seleção de transformantes de bactérias lácticas, o gene ermB e em amarelo o gene marcador de resistência a ampicilina, para seleção de transformantes de *E. coli*. Em cinza temos a região da origem de replicação funcional em *E. coli*.

Fonte: Autor

Cada par de primer foi desenhado para evitar temperaturas de hibridização menores que 58°C e para que cada primer do par tivesse temperaturas de anelamento próximas, no máximo 1°C de diferença. O mix padrão de reação foi composto dos reagentes nas concentrações finais de 1X do tampão da enzima, 0.25 mM de cada dextronucleotídeo, 1.2 µM do mix do par de primers, 1.9 mM de MgCl₂ e 1U da enzima, sendo da GOTAq 2 (Promega) ou da Phusion. A ciclagem das reações de PCR convencional foram compostas de 5 minutos iniciais a 90°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundo a 90°C, 45 segundo a 60°C e 1 minuto a 72°C. Ao término dos ciclos, as reações foram mantidas a 72°C por 7 minutos, concluindo a ciclagem. As reações com a polimerase Phusion seguiram a mesma ciclagem, diferindo apenas na temperatura de anelamento, ajustada, de acordo com cada par, e o tempo de alongamento que foi ajustado para 20 segundo/Kb, como orienta o fabricante.

Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (M/V) e foram corados com 0.5% de gelRed ou 0.5 µg/mL de brometo de etídio. Os géis de eletroforese foram produzidos com tampão TBE a 0.5X (44,5mM de base Tris, 44,5mM de borato e 1mM de EDTA com pH 8,0) que também foi usado como

tampão da corrida. Foi aplicado no gel 5µL de produto da PCR juntamente com tampão de amostra (0.6 mM de Azul de bromofenol e 200 mM de sacarose, preparada com TE [Tris base a 45 mM e EDTA a 1 mM], pH ajustado para 8.0). O tamanho dos fragmentos será estimado com a utilização de generuler de 1 kb ou 100 pb (ThermoFisher), segundo as orientações do fabricante. Os parâmetros da corrida foram ajustados para tensão elétrica de 75V com corrente de 35mA. O tempo de cada corrida variou entre 30 a 60 minutos. Ao fim das corridas, os géis foram expostos a luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação e as imagens foram preservadas para análise.

Reações de PCR convencional também foram utilizadas para confirmar a presença das construções nos transformantes de *E. coli* DH10B e das bactérias lácticas. As reações de PCR utilizaram polimerase convencional 1U e o mix de reação composto de reações tiveram um mix padrão com os reagentes nas concentrações de 1X do tampão da enzima, 0.25 mM de cada dextronucleotídeo, 1.2 µM do mix do par de primers e 1.9 mM de MgCl₂. O ciclo utilizado foi composto de 5 minutos iniciais a 90°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundo a 90°C, 45 segundo a 55-60°C e 1-3 minuto a 72°C. Ao término dos ciclos, as reações serão mantidas a 72°C por 7 minutos, concluindo a ciclagem. A temperatura de anelamento foi ajustada para cada primer, não sendo inferior a 55°C nem superior a 60°C, e o tempo de alongamento foi ajustado para cada amplicon não excedendo 3 minutos. O produto desta reação foi analisado por eletroforese como descrito anteriormente neste item. Quando necessário, a identidade do produto amplificado foi confirmada através de sequenciamento. Os amplicons foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as orientações do fabricante e submetidos ao sequenciamento na plataforma de sequenciamento do CB-UFPE, seguindo as orientações da unidade de serviço. Os eletroferogramas foram analisados com o software BioEdit versão 7.0 para comparação entre a sequência amplificada e a sequência alvo.

4.6 DESENHO DE PRIMERS PARA PCR QUANTITATIVA E CONDIÇÕES DE REAÇÃO

Os ensaios de PCR quantitativa (qPCR) foram utilizados para estimar o número de cópias do vetor em relação ao cromossomo bacteriano. Para tal, foram utilizados primers com alvos no vetor e primers com alvo no cromossomo bacteriano.

O número de cópias do vetor foi estimado em relação ao cromossomo. Para os alvos cromossomais, foram testados primers utilizados em trabalhos prévios do grupo, com alvos nos genes *rpoD*, *recA*, *fusA*, *pcrA*, *rpoB*, *groES*, *glmS*, *glmU*, *murB*, *nagA*, *usp I*, *usp II*, *pspC*, *psR*, *pbp1A*, *pbp1A*, *dltA*, *dltB* e *dltC* (Mendonça *et al.* 2019, 2020). Por sua vez, os primers com alvos plasmidiais foram desenhados como parte deste trabalho. Para esta análise foram utilizados como alvos plasmidiais os genes *ermB* e *ampR*.

Os primers foram desenhados com o uso da ferramenta online Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os parâmetros padrão ajustados para: tamanho do amplicon de 70 a 150 pb; tamanho do primer de 19-21 pb; conteúdo de GC mínimo de 20% e máximo de 80%; temperatura de melting do primer mínima de 59°C, máxima de 61°C e ideal de 60°C; máximo de dois G ou C nas últimas 5 bases da extremidade 3'; temperatura de melting máxima do amplicon $\geq 80^\circ\text{C}$; máximo de 4 repetições de um mesmo nucleotídeo em qualquer posição do primer. Eventualmente algum parâmetro padrão foi alterado para permitir que algum par de primer pudesse ser desenhado pela ferramenta online. Todos os primers desenhados foram analisados com a ferramenta online oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para a determinação de formação de estruturas secundárias intra e interprimers de cada par. Os pares com estruturas secundárias mais termolábeis até 50°C, serão utilizados no trabalho.

A eficiência de amplificação desses primers foram analisadas através de qPCR com diferentes concentrações de DNA inicial, variando de $1 \cdot 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ até $1 \cdot 10^{-5} \text{ ng}/\mu\text{L}$, as reações foram realizadas em triplicata técnica. A eficiência de amplificação foi estimada através da relação entre os valores de Ct obtido nas reações com diferentes concentrações de DNA inicial e a quantidade de DNA utilizada. Deste modo, foi construída uma curva Ct x quantidade de DNA e a inclinação na curva foi utilizada com parâmetro de eficiência, como preconizado na literatura (Ginzinger, D.G. 2002). Os primers foram considerados validados quando apresentaram uma inclinação na curva entre -3.1 a -3.5, correspondente a uma eficiência de amplificação de 90% e 110 %, respectivamente (Ginzinger, D.G. 2002). O mix reação utilizado foi composto de Sybr Green TM 1x, 0,2 μM de cada primer do par, 1 μL de amostra de DNA e o volume final foi ajustado para 10 μL com água mili-Q estéril. Eventualmente foram alteradas as concentrações de primer utilizados como teste para otimização da eficiência.

4.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR EPISSOMAL

Nesta metodologia, podem ser unidos fragmentos de DNA que compartilhem um segmento de pelo menos 20 pb de homologia por suas extremidades. Cada segmento de 20 pb é referido como uma tail. Na reação, a fita 5' de ambos os fragmentos será encurtada por ação de uma exonuclease 5'→3', produzindo uma região com DNA unifilamentar. Devido a homologia da tail com uma das extremidades do segundo fragmento, os dois fragmentos se hibridizam por essa região de DNA unifilamentar complementar. Nas reações seguintes, eventuais polimerizações serão realizadas e a formação de uma nova ligação fosfodiéster será processada, ligando os dois fragmentos (Figura 8).

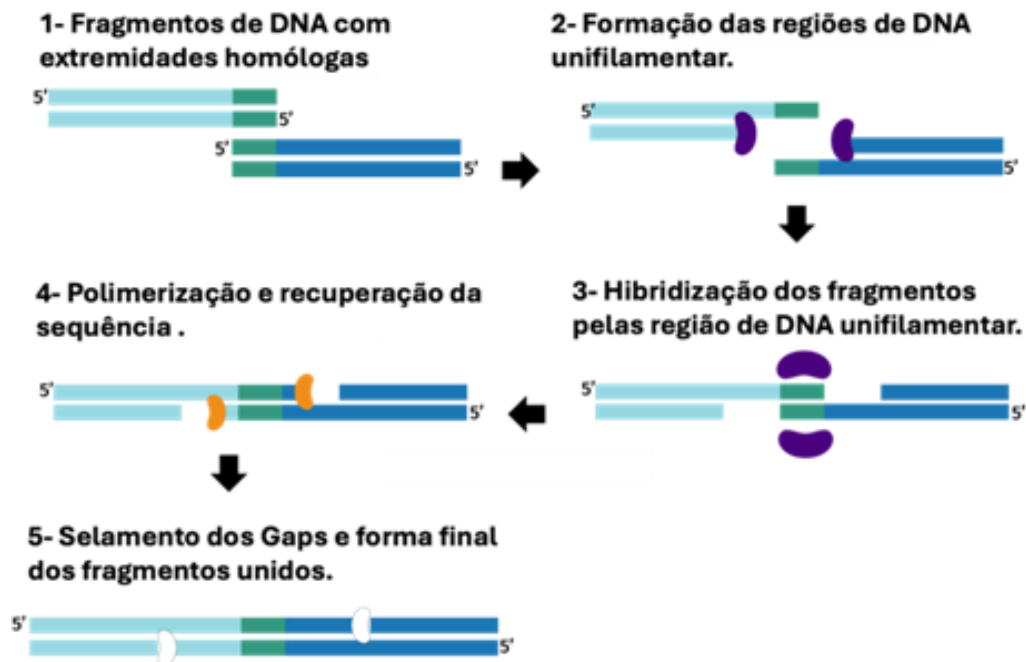


Figura 8. Esquema do processo de clonagem pela técnica de Gibson Assembly. Os fragmentos de DNA a serem unidos terão uma das fitas de DNA encurtada pela ação de uma exonuclease 5'→3' e formação de uma região de DNA unifilamentar. Como as moléculas de DNA compartilham homologia de sequência em, ao menos, uma das extremidades, os filamentos de DNA unifilamentares complementares se hibridizam. Uma vez hibridizadas, as extremidades 3'-OH livre de cada fragmento é alongada pela ação de uma polimerase e o gap entre as duas fitas de DNA será selado pela ação de uma DNA ligase.

Fonte: Adaptado de Gibson Assembly <<https://www.snapgene.com/guides/gibson-assembly>>

Para moléculas de DNA circular, é necessário ter uma tail em cada extremidade do segmento que se deseja inserir. Cada tail terá homologia com uma extremidade diferente da molécula de DNA circular, gerando dois sítios de hibridização na reação (Figura 9). Para isso, a molécula de DNA circular precisará ser linearizada a partir do sítio que se pretende inserir o novo fragmento. Cada uma

das tails deve ser homóloga a extremidades diferentes do vetor linearizado. Revisões detalhadas da metodologia estão disponíveis na literatura (Avilan, L. 2023).

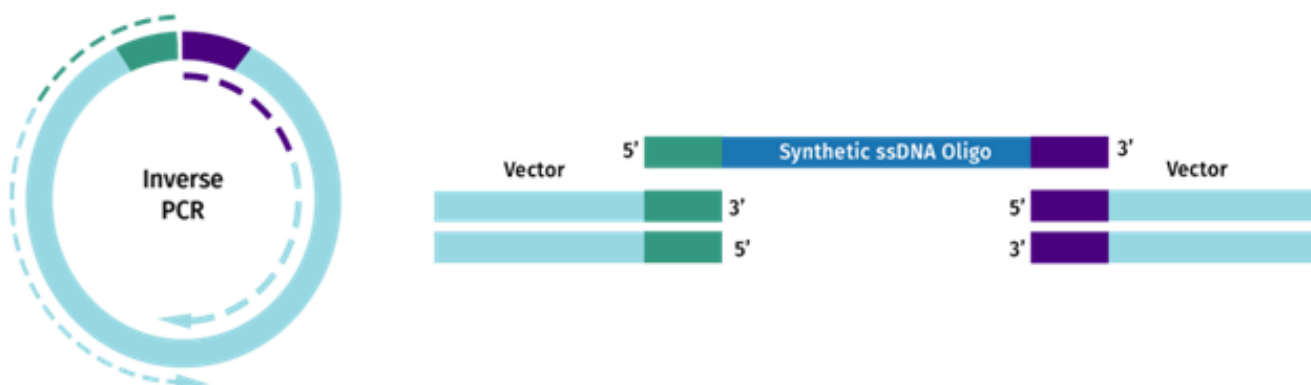


Figura 9. Esquema do processo de clonagem pela técnica de Gibson Assembly para moléculas de DNA circular. A molécula de DNA circular precisará ser linearizada e o fragmento de DNA a ser unido precisará ter duas extremidades homólogas, cada uma com homologia para uma extremidade diferente da molécula de DNA circular que foi linearizada. Através dessas regiões homólogas, os dois fragmentos de DNA estarão unidos, recircularizando a molécula de DNA.

Fonte: Adaptado de Gibson Assembly <<https://www.snapgene.com/guides/gibson-assembly>>

Deste modo, foram desenhados primers para amplificar os segmentos de DNA contendo a origem de replicação e o gene *repA* dos plasmídeos de *L. vini* JP 789. Adicionalmente, foram desenhados primers para linearizar o vetor pRV-300 entre o gene *lacZ* e o gene *ermB* no vetor pRV-300. Os primers desenhados para a origem de replicação e o gene *repA* dos plasmídeos de *L. vini*, tiveram adicionadas tails homólogas para as extremidades do vetor pRV-300 linearizado. Os amplicons foram produzidos como descrito previamente, utilizando a polimerase Phusion®. O produto da reação foi analisado por eletroforese, os resultados positivos e livres de amplificação inespecífica, foram purificados e quantificados.

Em seguida, os fragmentos foram unidos aplicando a tecnologia Gibson-Assembly com o emprego do kit GeneArt Gibson Assembly® (Thermofisher). Para as reações, foi ajustado a concentração molar do vetor e do inserto para 0.04 picomol de acordo com a fórmula ($Concentração_{(picomol)} = \frac{Fragmento\ purificado\ (ng/\mu l) \cdot 1000}{Tamanho\ do\ fragmento\ (pb) \cdot 650}$). Uma vez adicionado quantidades equimolares dos fragmentos a serem unidos, foi seguido o procedimento como orienta o fabricante. Ao fim, foi utilizado entre 1 a 3 µL da reação para transformar células de *E. coli* DH10B. Todos os transformantes

obtidos foram testados para presença do fragmento de DNA no vetor, em orientação correta, por PCR com combinação de primers, utilizando o primer forward para linearização do vetor juntamente com o primer reverse utilizado na amplificação do fragmento. Os transformantes que obtiveram resultados positivos quanto a presença dos insertos e na orientação correta, foram preservados e utilizados para obtenção do DNA plasmidial empregado na transformação das bactérias lácticas, como descrito no item 4.3 e 4.4, respectivamente.

4.8 ANÁLISE FUNCIONAL DO SISTEMA DE REPLICAÇÃO E ESTABILIDADE DOS TRANSFORMANTES

A estabilidade da construção do plasmídeo pLVR-3 foi testada em cada espécie através de cultivos sucessivos na ausência de pressão seletiva. Como a manutenção do vetor é forçada através da adição de eritromicina, no teste de estabilidade a droga foi suprimida dos meios de cultura. A cada ciclo de cultivo, com duração de 24 a 48h, a DO foi aferida e as células do ciclo anterior foram utilizadas para iniciar um novo ciclo de cultivo. Periodicamente, ao fim do ciclo, foram coletadas alíquotas para estimar a porcentagem da população que mantinha o vetor. Para tal, as amostras do cultivo tiveram sua DO medida e foram utilizadas para preparar uma suspensão em salina estéril a DO de 0,1. A partir dessa suspensão, foi realizada uma diluição seriada até 10^{-5} e 200 μ L dessa suspensão foram distribuídos na superfície de placas com meio de cultura MRS, ou M17, com o auxílio de uma alça de Drigalski. Foram utilizadas placas com eritromicina, placas teste, para estimar a parcela da população que reteve o vetor, e placas sem o antibiótico, placas controle, para estimar o número total de unidades formadoras de colônias na população. Os cultivos foram mantidos por até 48h e o número de colônias foi registrado. A porcentagem da população que reteve o vetor pRLV-3 foi estimado a partir do número de colônias nas placas teste e relativizado pelo número de colônias observado nas placas controle. O experimento foi realizado em triplicata técnica e em duplicata biológica.

Para fins de cálculo, o número de colônias observado nas unicatas das placas teste foi relativizado pelo número de colônias de cada unicata das placas controle das duas réplicas biológicas. Deste modo, para cada unicata de placa teste, foram obtidos 6 valores, resultado da relativização pelo número de colônias das 6 placas do meio sem antibiótico. Os valores obtidos foram registrados e utilizados para cálculo de média e desvio padrão. O número de gerações entre cada ciclo de cultivo

foi estimado através da aplicação da fórmula $\text{Gerações} = 1,4427 \ln(\text{DO}) + 9,9658$. A fórmula foi obtida através de uma curva modelo utilizando uma DO inicial conhecida, 0,001, e considerando uma geração o equivalente para dobrar o valor de DO. Assim, cada ciclo de cultivo iniciou com uma DO igual, 0,001, e ao final, a partir do valor de DO obtido, foi estimado o número de gerações que se passaram entre cada ciclo sucessivo de cultivo.

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DOS SISTEMAS DE REPLICAÇÃO DE SEGREGAÇÃO PLASMIDIAL

A análise in silico do genoma da bactéria *L. vini* JP789 identificou a presença de 4 unidades plasmidiais, que foram comprovadas através de extração e digestão com enzimas de restrição (Figura 10). Os quatro plasmídeos de *L. vini* JP 789, foram identificados quanto ao seu tamanho e nomeados como pLV-1 (2.9 Kb), pLV-2 (3.0 Kb), pLV-3 (3.9 Kb) e pLV-4 (11.9 Kb). A análise com a ferramenta online plasmidFinder 2.1 identificou que pLV-2 possui um sistema de replicação e segregação restritivo, com replicon tipo RepA_N. Por ter um replicon com espectro restrito de hospedeiros, o plasmídeo pLV-2 foi abandonado e não seguiu para as etapas seguintes.

Por sua vez, os plasmídeos pLV-1, pLV-3 e pLV-4 todos foram identificados com replicons de amplo espectro de hospedeiro. pLV-1 obteve o replicon tipo Rep1, grupo II, enquanto pLV-3 e pLV-4 apresentaram o mesmo replicon, Rep3, mas de grupos diferentes, grupo I-4 e grupo I, respectivamente. Identificados os plasmídeos, sua origem de replicação foi encontrada com a ferramenta ori-finder 2.0 e a anotação das ORFs desses plasmídeos foi realizada na plataforma Proksee. O resultado dessas análises foi utilizado para produzir, manualmente, o mapa dos plasmídeos com o software de manuseio de sequência Ape na versão 3.1.15. A versão final da anotação dos plasmídeos está na figura 11.

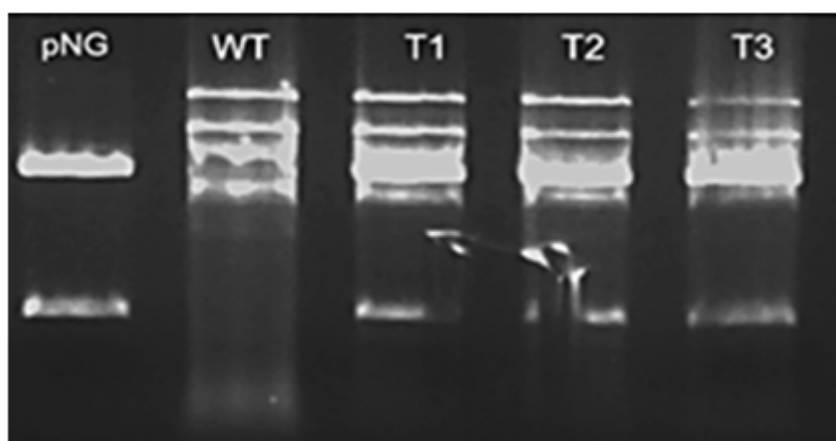


Figura 10. Digestão plasmidial da linhagem de *L. vini* JP 789 (WT) com a enzima de restrição *sma*I, juntamente com seus transformantes isogênicos (T1, T2 e T3) portando o vetor pNG 8048e (pNG).
Fonte: Autor.

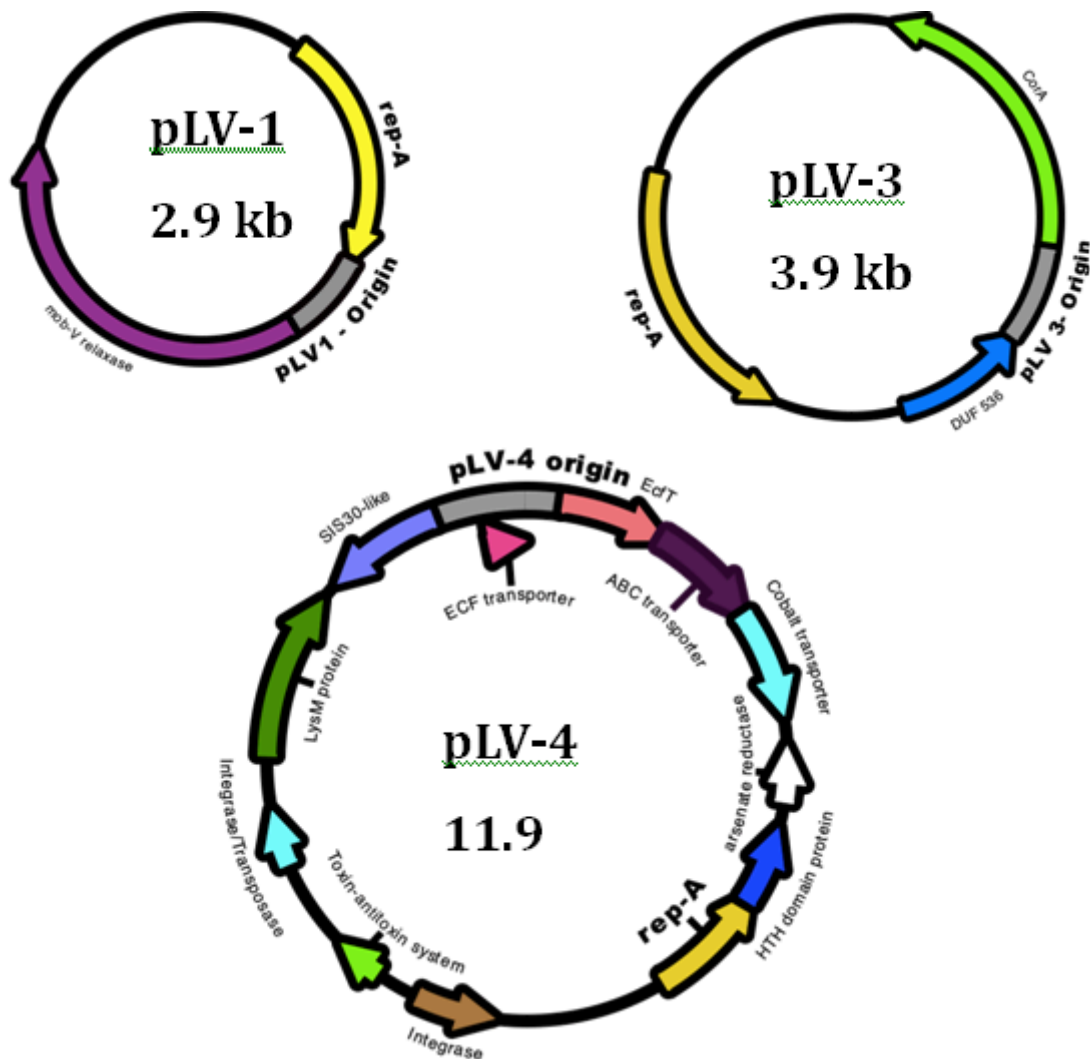


Figura 11. Mapa dos plasmídeos de *L. vini* JP 7.8.9 com réplicons de amplo espectro de hospedeiro.
Fonte: Autor

Com base nas sequências dos plasmídeos, foram desenhados dois conjuntos de primers, o primeiro foi voltado para linearização do vetor pRV-300, composto por um único par, e o segundo conjunto foi produzido para amplificar a origem de replicação e o gene repA dos plasmídeos pLV-1, pLV-3 e pLV-4. Nos primers do segundo conjunto, foi adicionado as tails para a reação de clonagem com o plasmídeo linearizado (tabela 2). Para os plasmídeos pLV-1 e pLV-3 a origem de replicação e o gene repA estavam contínuos e puderam ser amplificados com um único par de primers. O mesmo não foi possível com o sistema de replicação e segregação do plasmídeo pLV-4, visto que o gene repA e a origem de replicação estavam muito distantes. Deste modo, foram desenhados 2 pares de primers, para amplificar isoladamente o gene repA e a origem de replicação de pLV-4. A esses primers foi adicionado uma nova tail para unir estes segmentos. Essa tail adicional,

foi desenhada para ser homóloga a região 5' do gene *repA* e foi adicionada ao primer pLV4or-R e uma tail homóloga a região 3' do fragmento da origem de replicação foi adicionada ao primer pLV4rep-F. Assim, na reação de clonagem o fragmento da origem de replicação seria adicionado upstream ao gene *repA* e eles poderiam ser unidos ao vetor linearizado através das tail 5' e 3' homólogas as extremidades do vetor pRV-300, adicionadas aos primers pLV4or-F e pLV4rep-R, respectivamente.

O plasmídeo pRV-300 foi extraído do clone de *E. coli* DH10B, onde está sendo mantido, juntamente com o DNA da linhagem JP 789 de *L. vini*. Esse material foi utilizado como DNA molde nas reações de PCR e o resultado está presente na figura 12. Após a purificação e quantificação, os produtos de PCR foram utilizados para clonagem com o vetor linearizado. O produto da reação de clonagem foi utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B. Após 24h de incubação, as colônias foram testadas por PCR e o resultado está presente na figura 13. As transformações com o sistema de replicação e segregação do plasmídeo pLV-4 não resultaram em transformantes portando a construção, apenas com o vetor recircularizado e vazio. Assim, o trabalho seguiu apenas com as construções derivadas com os replicons dos plasmídeos pLV-1 e pLV-3.

Para confirmar a inserção dos replicons no local adequado do vetor, foram utilizados os primers da linearização do pRV-300. Esses primers foram utilizados, porque se o fragmento tivesse inserido no local errado do vetor, estaria dentro da região amplificada e o amplicon produzido seria maior. Mas, se estivesse no sítio adequado, o amplicon produzido não teria alteração de tamanho. O resultado da confirmação do sítio de integração está na figura 14 e demonstra que não houve alteração no tamanho da banda, indicando que o fragmento foi inserido no local adequado.

Tabela 2. Primers utilizados no trabalho para linearizar o vetor pRV-300, amplificar os elementos genéticos de cada replicon trabalho e os utilizados nos ensaios de qPCR. Em destaque estão as sequências das tails adicionadas em cada primer.

Aplicação	Identificador	Sequence 5' → 3'
Linearização do vetor pRV-300.	pRVsl-F pRVsl-R	GTCAGCACGAACACGAAC GCACCATATCATAAAAATCGAAAC
Amplificação da origem de replicação e do gene repA do plasmídeo pLV-1	pLV1R-F	CGGTTTCGTGTTTCGTGCTGACTGATATACGGGGTTGTGGCG
	pLV1R-R	CGATTTTTATGATATGGTGCCTGCCCGCTTACTAGCCTTG
Amplificação da origem de replicação e do gene repA do plasmídeo pLV-3	pLV3R-F	CGATTTTTATGATATGGTGCCTTTCATGTATCTCGG
	pLV3R-R	CGGTTTCGTGTTTCGTGCTGACCACTGGTGCCTCTTTTAAACCTC
Amplificação da origem de replicação do plasmídeo pLV-4	pLV4or-F	CGATTTTTATGATATGGTGCCTGCTCCAGAAAACAATG
	pLV4or-R	CACTCTAAAGCGCAACAAAGTCAGCCGAACGCCCATT
Amplificação do gene repA do plasmídeo pLV-4	pLV4rep-F	AAATGGGCGTTCGGCTGACTTTGTTGCGCTTTAGAGTGCC
	pLV4rep-R	CGGTTTCGTGTTTCGTGCTGACGCCTCGTACAGTAGTGCCT
ermB		CTTACCCGCCATACCACAGA ACTTTGGCGTGTTTCATTGCT

Fonte: Autor. 2025

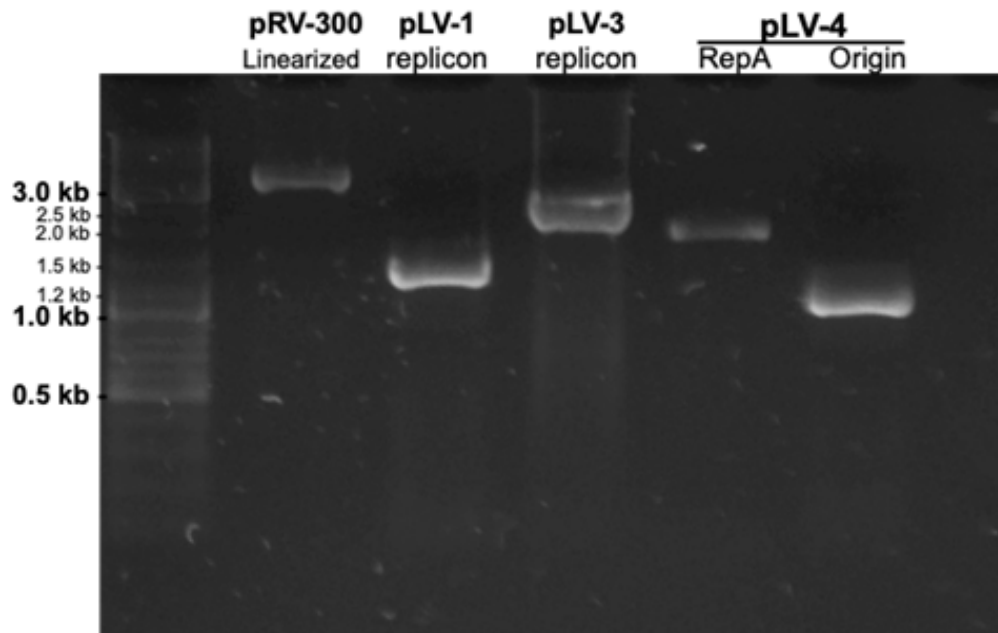


Figura 12. Amplificação dos elementos genéticos utilizados no trabalho para construção do vetor epissomal, o vetor base linearizado e os fragmentos dos réplicons de cada plasmídeo. **Fonte:** Autor

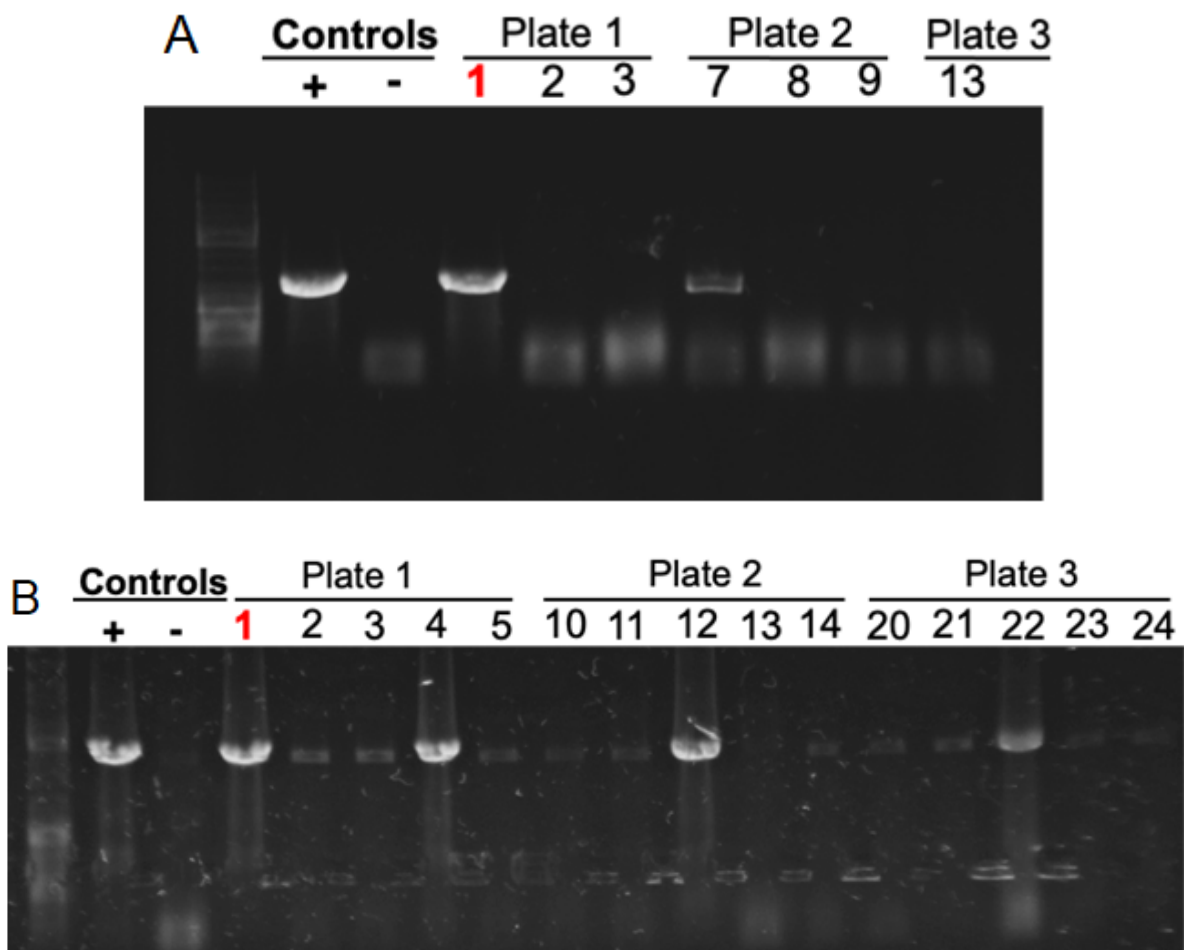


Figura 13. Amplificação teste dos transformantes de *E. coli* com a construção derivada do vetor pRV-300 portando o réplicon do plasmídeo pLV-1 (A) e pLV-3 (B), em destaque está o clone cuja a construção foi utilizada para transformar as bactérias lácticas em etapas posteriores do trabalho. **Fonte:** Autor

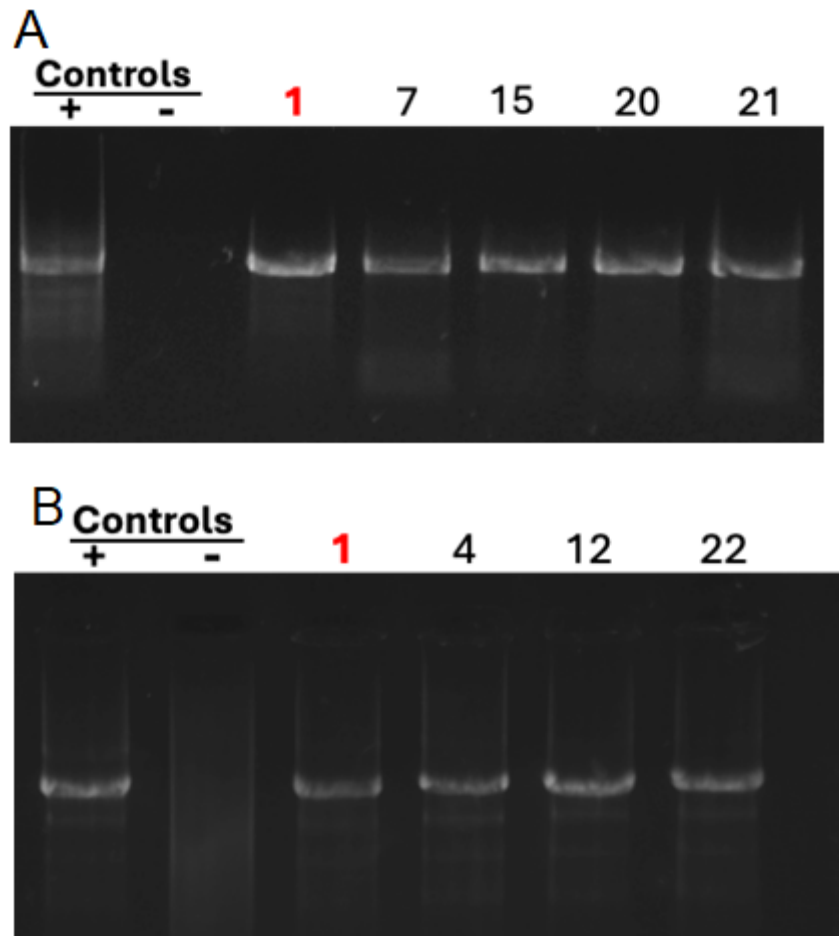


Figura 14. Resultado da confirmação do sítio de inserção dos replicons de pLV-1 (A) e pLV-3 no vetor pRV-300. Em destaque está o clone cuja construção foi utilizada para transformar as bactérias lácticas em etapas posteriores do trabalho. **Fonte:** Autor

5.2 TRANSFORMAÇÃO EM BACTÉRIAS LÁCTICAS, EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO E ESTABILIDADE

As construções obtidas foram utilizadas para transformar as células eletrocompetentes de *L. casei* BL23, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* WCSF1 e *Lac. lactis* MG1363. Todas as cepas foram transformadas com o plasmídeo pRLV-3, derivado do pRV-300 com o replicon do plasmídeo pLV-3. As linhagens apresentaram diferentes eficiências de transformação com *L. acidophilus* apresentando a mais baixa eficiência, $0,009 \pm 0,008 \cdot 10^3$ transformantes por μg de DNA, seguido por *L. rhamnosus* com $0,021 \pm 0,010 \cdot 10^3$ transformantes por μg de DNA. As linhagens mais eficientes na transformação foram *L. casei* com $4,58 \pm 0,5 \cdot 10^3$ e *L. plantarum* com $3,68 \pm 2,38 \cdot 10^3$ transformantes por μg de DNA. *Lac. lactis* também apresentou uma boa eficiência de transformação com $3,98 \pm 1,22$ transformantes por μg de DNA. As colônias obtidas em cada transformação foram testadas por PCR com primers voltados para amplificar a

região do replicon do plasmídeo pLV-3, com os primers pLV3R-F e pLV3R-R. Como demonstrado na figura 15, a maioria dos transformantes obtidos foram positivos para a presença do replicon.

Após a confirmação dos transformantes, foi realizado um teste para estimar o quanto este replicon era estável nas linhagens bacterianas trabalhadas. Foram realizados cultivos sucessivos de cada linhagem na ausência de pressão seletiva. Alíquotas dos cultivos foram diluídas até uma DO de 0,1, submetidas a diluições seriadas e alíquotas destas diluições foram espalhadas na superfície de placas contendo meios de cultura com e sem eritromicina. O número de colônias que cresceram nos meios com droga está relacionado a parcela da população de células bacterianas que mantiveram o plasmídeo. A cada subcultivo, foi registrado a DO final e esta foi utilizada para estimar o número de gerações, os resultados deste experimento podem ser observados na figura 16. Com 30 gerações a linhagem de *Lac. lactis* foi a que demonstrou maior estabilidade do replicon com retenção do vetor por cerca de 83% da população. Em *L. casei* e *L. plantarum* apenas 29,5% e 24,5% da população manteve o vetor, com o mesmo número de gerações. Por sua vez, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* obtiveram os menores níveis de retenção, cerca de 3,5% e 3,4%, respectivamente, após 30 gerações.

Para os ensaios de PCR quantitativa (qPCR), não foi possível a validação dos primers devido a baixa eficiência com slope acima de 3.5. A qPCR foi empregada para determinar o número de cópias do vetor plasmidial observando o gene *ermB*, contido no plasmídeo, em relação ao número de cópias do gene cromossomal (*rpoB*) nas diferentes cinco cepas bacterianas, em que obtiveram distintos resultados quanto ao números de cópias plasmidial por cromossomo. *L. acidophilus* ATCC 4356 apresentou o menor número médio de cópias, $98,7 \pm 70$, em similaridade com *L. rhamnosus* GG, cujo registrou uma média de $208,85 \pm 145$ cópias. Em contrapartida, as cepas de *L. casei* BL 23 e *L. plantarum* WCSF1 mostraram um número elevado de cópias do vetor com médias de $349,64 \pm 92,8$ e 327 ± 50 , respectivamente. *L. plantarum* exibiu uma menor variabilidade nos resultados dado ao menor desvio padrão. A cepa que demonstrou o maior número de cópias do vetor plasmidial foi *Lac. lactis* MG 1363, com valores >500 .

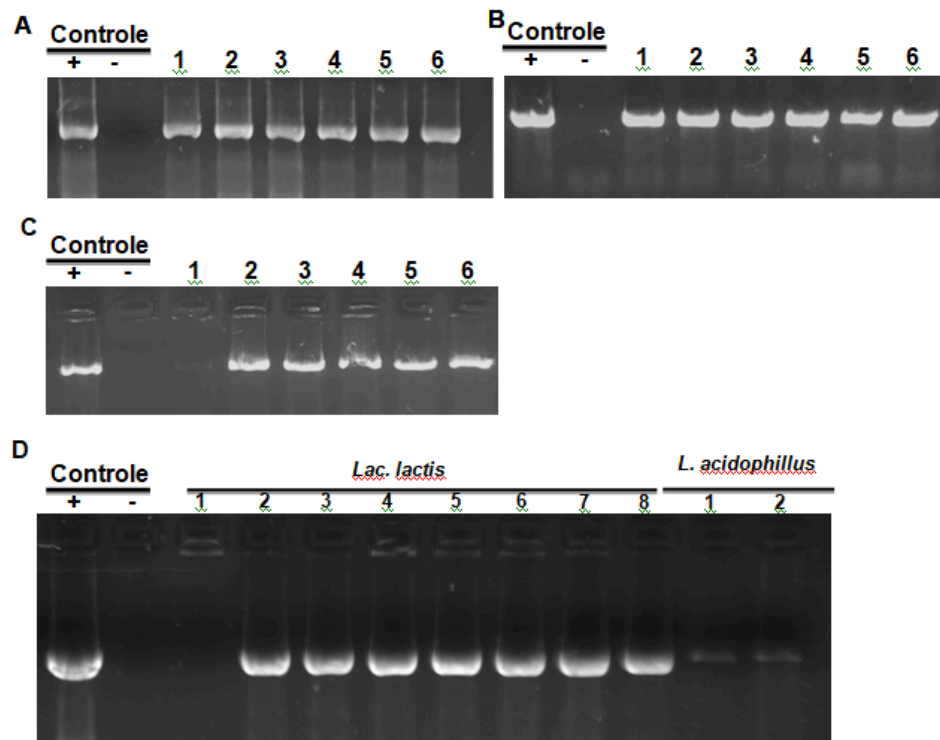


Figura 15. Resultado da PCR para replicon do plasmídeo pRLV-3 nos transformantes de *L. casei* (A), *L. rhamnosus* (B), *L. plantarum* (C) e *Lac. lactis* e *L. acidophilus* (D). **Fonte:** Autor, 2025

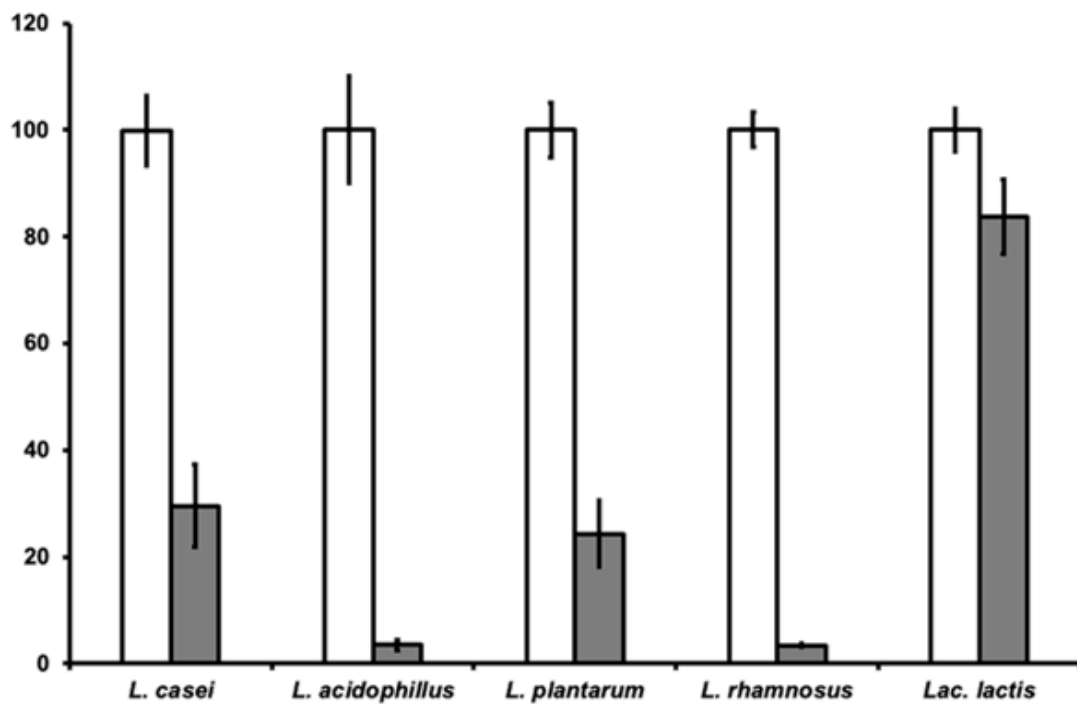


Figura 16. Porcentagem da população bacteriana de cada espécie que reteve o vetor pRLV-3 passadas 30 gerações (em cinza) de cultivo em meio de cultura na ausência de pressão seletiva em comparação com a população inicial (em branco) que foi cultivada em meio seletivo. As barras de erro se referem ao intervalo de confiança ajustado para 95%. **Fonte:** Autor.

6. DISCUSSÃO

Os lactobacilos são organismos com uma longa história de associação a atividades produtivas humanas (Herbel *et al.* 2013; Nishimura, J. 2020; Mendonça *et al.* 2022). Sua baixa virulência e patogenicidade tem sido uma grande vantagem oferecida pelo grupo alinhado as suas propriedades probióticas (Markowiak e Śliżewska 2017; Shokryazdan *et al.* 2017; Zendeboodi *et al.* 2020). Contudo, durante muitas décadas o grupo ficou restrito a aplicações de baixa complexidade devido a falta de conhecimento acerca de sua biologia e distância evolutiva em relação a modelos bacterianos como *E. coli* ou *Bacillus subtilis*. Apenas recentemente novas ferramentas moleculares ficaram disponíveis para eles e tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias, em destaque a chamada de “quarta geração tecnológica de vacinas” (Yu *et al.* 2013; LeCureux e Dean 2018; Lavelle e Ward 2022). Embora tenham permitido o uso dos lactobacilos em tecnologias de maior complexidade, as ferramentas disponíveis têm seu uso muito restrito, prevalecendo as destinadas a modelos como *L. casei*, *L. plantarum* ou para *Lac. lactis*. O desenvolvimento de vetores capazes de se manterem estáveis em diferentes hospedeiros é um ponto de otimização chave para a construção de sistema plasmidial com diversas aplicações em diferentes espécies.

Vetores oferecem os meios para expressão de bioativos de interesse, inativação gênica, adição de genes, entre outras aplicações (Nora *et al.* 2019). Atualmente para bactérias lácticas os vetores disponíveis são classificados em dois grupos: quanto ao espectro de hospedeiro e seu sistema de replicação. Nos vetores de classe 1 encontramos aqueles com replicação tipo teta e com amplo espectro de hospedeiros, como o caso de pAM1 e pIP501 (Kazi, T. A. *et al.* 2022). Enquanto os de classe 2 incluem aqueles que tem replicação do tipo círculo rolante (rolling circle) e tem espectro restrito de hospedeiro (Kazi, T. A. *et al.* 2022). Contudo, mesmo tendo um espectro amplo, pAM1 e pIP501 são plasmídeos derivados de espécies do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus*, respectivamente, que não tem o título de GRAS (Kazi, T. A. *et al.* 2022). Alguns autores têm apontado que isso limitaria o uso desses sistemas em aplicações relacionadas à indústria de alimentos ou aplicações médicas (Kazi, T. A. *et al.* 2022).

Esta limitação não atingiria o vetor desenvolvido no presente trabalho porque seu sistema não é derivado de uma espécie patogênica. O vetor pRLV-3 possui as

características para ser classificado na classe 1, sem a desvantagem elencada para os vetores atuais dessa classe. Adicionalmente, os testes demonstraram que o espectro de hospedeiros de pRLV-3 inclui espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, onde estão classificadas as principais espécies com aplicação biotecnológica (Szatraj *et al.* 2017; Hatti-Kaul *et al.* 2018). Mas, este perfil pode ser ainda mais amplo visto que o sistema é derivado de um replicon tipo Rep3.

Na literatura, plasmídeos do replicon Rep3 já foram documentados em espécies de *Enterococcus*, mobilizando genes de resistência a tetraciclina (Cho, S. *et al.* 2022) e em *Staphylococcus haemolyticus* portando o mecanismo de resistência mecA (Mores *et al.* 2021). Além disso, para os gêneros *Psychrobacter*, plasmídeos desse replicon, foram identificados em populações naturais como os mais prevalentes (Decewicz, P. *et al.* 2023) e em *Fervidacidithiobacillus caldus* esteve entre os mais encontrados também (Pacheco-Acosta *et al.* 2025). Interessantemente, em nenhum desses plasmídeos foi apontado a existência da ORF com domínio DUF 536 (Domain of Unknown Function 536), que parece estar restrito aos plasmídeos desse replicon em bactérias lácticas, como o caso de pLV-3 de *L. vini* (Panya *et al.* 2012; Terán *et al.* 2020a).

O domínio DUF536 tem sido identificado em plasmídeos de replicação tipo teta e recentemente foi associado a proteína RcoS (Regulator of Chromosome Segregation) em *Streptococcus pneumoniae* (Demuysere, M. *et al.* 2024). Em RcoS, o domínio DUF 536 é parte integrado da região C-terminal da proteína e participa do processo de polimerização e, indiretamente, é necessária para segregação do cromossomo, possivelmente para ligação de RcoS a membrana (Demuysere, M. *et al.* 2024). É provável que como parte dos replicon dos plasmídeos, a ORF com esse domínio participe do processo de segregação. Adicionalmente, diferentemente do que foi observado nos plasmídeos do replicon Rep3, o subtipo portando a ORF com domínio 536, parece estar restrito às bactérias lácticas. Plasmídeos deste subtipo foram descritos em *L. curvatus* e em *L. acidophilus* (Panya *et al.* 2012; Terán *et al.* 2020b). Nestes estudos, os sistemas de segregação desses plasmídeos foram transferidos para vetores replicantes em *E. coli* e, posteriormente, foram utilizados para transformar bactérias lácticas, sendo exitoso em todas as espécies testadas (Panya *et al.* 2012; Terán *et al.* 2020b). Esses dados sugerem que além das espécies utilizadas neste trabalho, o vetor pRLV-3 poderia ser utilizado em outras também como *L. curvatus* e *L. sakei*.

7. CONCLUSÃO

A pesquisa desenvolveu um vetor episomal cujo objetivo era a aplicação em diversas cepas hospedeiras de bactérias ácido-láticas. Por meio da realização de análises *in silico* de *Liquorilactobacillus vini*, foi constatado a presença de 4 unidades de plasmídeos. Posteriormente, houve a manipulação molecular na qual se obteve como resultado a perspectiva de êxito nos replicons de pLV-1 e pLV-3. Com base na eficiência da construção dos vetores e nos ensaios de transformação, análise funcional do sistema de replicação, estabilidade dos transformantes e ensaios de qPCR, foi possível observar uma variabilidade entre as células hospedeiras, sendo *Lactobacillus casei* BL23 e *Lactobacillus plantarum* WCSF1 as cepas que apresentaram as maiores taxas de transformação, o que indica maior competência para receber DNA exógeno. A cepa *Lac. lactis* também apresentou resultados significativos de maior estabilidade, seguida das cepas de *L. plantarum* e *L. casei*. Devido à presença de um sistema de replicação tipo Rep3 não patogênica, o vetor pLV-3 apresenta uma vantagem em relação a alguns vetores atuais, os quais têm limitações em aplicações médicas e industriais devido à origem de cepas patogênicas. Com esse projeto, foi possível validar o potencial do pRLV-3 como uma ferramenta molecular de amplo espectro para engenharia genética de bactérias lácticas. Os resultados obtidos são relevantes para o avanço da área, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento probióticos otimizados, plataformas de produção de bioativos e no progresso da "quarta geração tecnológica de vacinas".

REFERÊNCIAS

AVILAN, L. Montagem de múltiplos fragmentos: A Montagem Gibson. **Métodos em biologia molecular** (Clifton, NJ) , v. 2633, p. 45–53, 2023.

CANO-GARRIDO, O.; SERAS-FRANZOSO, J.; GARCIA-FRUITÓS, E. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 137, 2015.

CHO, S. et al. Distribuição e Transferência de Famílias de Réplicas Plasmídicas entre *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* Multirresistentes a Drogas de Aves. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1244, 2022.

COELHO, Márcia C.; MALCATA, Francisco Xavier; SILVA, Célio C. G. Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: From starter cultures to probiotic functions. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 15, p. 2276, 2022.

COUTINHO, HDM et al. Resistência a antibióticos mediada por plasmídeos / Resistência mediada por plasmídeos a antibióticos. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, v. 5, n. 2, pág. 4044–4053, 2022

CIRKOVIC, I. et al. Licheniocin 50.2 and Bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 Inhibit Biofilms of Coagulase Negative Staphylococci and *Listeria monocytogenes* Clinical Isolates. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0167995, 2016.

CUI, Y. et al. Plasmids from food lactic acid bacteria: Diversity, similarity, and new developments. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 13172–13202, 2015.

DECEWICZ, P. et al. Estrutura e funções de um genoma multirreplicon de *Psychrobacter* sp. ANT_H3 da Antártida: caracterização dos módulos genéticos adequados para a construção de vetores plasmídeos para bactérias ativas ao frio. **Journal of applied genetics**, v. 64, n. 3, p. 545–557, 2023.

DEMUYSERE, M.; DUCRET, A.; GRANGEASSE, C. Dissecção molecular da proteína de partição cromossômica RocS e regulação por fosforilação. **Journal of bacteriology**, v. 206, n. 10, p. e0029124, 2024.

GARCÍA-DÍEZ, J.; SARAIVA, C. Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 5, p. 2544, 2021.

Gibson Assembly. Disponível em: <<https://www.snapgene.com/guides/gibson-assembly>>. Acesso em: 1 jun. 2025.

GINZINGER, DG Quantificação genética usando PCR quantitativa em tempo real: uma tecnologia emergente que se torna popular. **Hematologia experimental**, v. 30, n. 6, p. 503–512, 2002.

HATTI-KAUL, R. et al. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of

chemicals. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 20, 2018.

HERBEL, S. R. et al. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 27, 2013.

KAZI, T. A. et al. Plasmid-based gene expression systems for lactic acid bacteria: A review. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1132, 2022.

LANDETE, J. M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: from the laboratory to their application. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 296–308, 2017.

LAVELLE, E. C.; WARD, R. W. Mucosal vaccines - fortifying the frontiers. **Nature reviews. Immunology**, v. 22, n. 4, p. 236–250, 2022.

LECUREUX, J. S.; DEAN, G. A. *Lactobacillus* mucosal vaccine vectors: Immune responses against bacterial and viral antigens. **mSphere**, v. 3, n. 3, 2018.

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 2017.

MENDONÇA, A. A. et al. Gene regulation of the *Lactobacillus vini* in response to industrial stress in the fuel ethanol production. **Microbiological research**, v. 236, n. 126450, p. 126450, 2020.

MENDONÇA, A. A. et al. Journey of the probiotic bacteria: Survival of the fittest. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 95, 2022.

MENDONÇA, A. A. et al. *Lactobacillus vini*: mechanistic response to stress by medium acidification. **Microbiology** (Reading, England), v. 165, n. 1, p. 26–36, 2019.

MERUVU, H.; HARSA, S. T. Lactic acid bacteria: isolation-characterization approaches and industrial applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 63, n. 26, p. 8337–8356, 2023.

MORES, C. R. et al. Investigation of Plasmids Among Clinical *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* Isolates From Egypt. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 659116, 2021

MOTTA, A. D. S.; GOMES, M. D. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: The importance of these microorganisms for food. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172, 2015.

NISHIMURA, Junko. *Lactobacillus reuteri*, Propriedades probióticas e metabolismo de carboidratos. **Ciência do Leite**, v. 69, n. 2, p. 71–82, 2020.

NORA, L. C. et al. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. **Microbial biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 125–147, 2019

PACHECO-ACOSTA, S. et al. **Plasmidome-defensome interactions drive adaptation of *Fervidacidithiobacillus caldus* in natural and industrial**

extreme acidic environments. 2025. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2025.04.02.646953>>.

PANYA, M. et al. Sequencing and analysis of three plasmids from *Lactobacillus casei* TISTR1341 and development of plasmid-derived *Escherichia coli*-*L. casei* shuttle vectors. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 261–272, 2012.

PAPAGIANNI, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 3, n. 4, p. e201210003, 2012.

PAPIZADEH, M. et al. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of the ongoing gene acquisition and genome minimization evolutionary trends. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 118–131, 2017.

QIAO, N. et al. Recombinant lactic acid bacteria as promising vectors for mucosal vaccination. **Exploration** (Beijing, China), v. 1, n. 2, p. 20210026, 2021.

REIS, J. A. et al. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. **Food engineering reviews**, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4o andar 04531-934, São Paulo – SP – Brasil: Edgard Blücher Ltda., 2015.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. Molecular cloning a laboratory manual: Chapter 1 - Protocol 3: Isolation DNA from Gram-negative bacteria. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. v. 1

SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Nova Iorque, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotics: From isolation to application. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.

SZATRAJ, K.; SZCZEPANKOWSKA, A. K.; CHMIELEWSKA-JEZNACH, M. Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 2, p. 325–339, 2017.

TAVARES, L. M. et al. Novel strategies for efficient production and delivery of live biotherapeutics and biotechnological uses of *Lactococcus lactis*: The lactic acid bacterium model. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, p. 517166, 2020.

TERÁN, L. C. et al. Nucleotide sequence and analysis of pRC12 and pRC18, two theta-replicating plasmids harbored by *Lactobacillus curvatus* CRL 705. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0230857, 2020.

VINDEROLA, G. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. [s.l.] Crc Press, 2019.

VINDEROLA, G. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. 6.

Londres, England: CRC Press, 2024.

YU, Q. et al. Mucosal Lactobacillus vectored vaccines. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 4, p. 805–807, 2013.

WANG, C. et al. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes. **Food control**, v. 47, p. 231–236, 2015.

WRIGHT, V.; ATTE; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: an introduction. Em: **Lactic acid bacteria**. [s.l.] CRC Press, 2019. p. 1–16.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZENDEBOODI, F. *et al.* Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current opinion in food science**, v. 32, p. 103–123, 2020.

ZHANG, Heping; CAI, Yimin (ORGS.). **Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice**. Nova Iorque, NY, USA: Springer, 2014.

ANEXO

Protocolo de Extração

1. Utilizar 5 mL de culturas recentes de cada linhagem após 24 horas de cultivo em condições ótimas.
2. Centrifugar as culturas em velocidade máxima (13.000 rpm).
3. Desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em 300 µL de solução I
4. Adicionar 50 µL de lisozima 100 mg/mL e agitar no vórtex
5. Incubar por 25 minutos a 37°C.
6. Adicionar 200 µL de solução de SDS 10% (M/V) e homogeneizar por inversão durante 2 minutos.
7. Incubar no gelo por 10 minutos.
8. Adicionar 50 µL de CTAB e incubar a 70 °C por 10 minutos
9. Adicionar 200 µL da solução de FCA e homogeneizar durante 2 minutos.
10. Centrifugar em velocidade máxima por 15 minutos a 4°C.
11. Coletar a fase aquosa superior para novos tubos por aspiração evitando perturbar a interfase proteica.
12. Adicionar 200 µL da solução de FCA e homogeneizar por inversão durante 2 minutos.
13. Centrifugar em velocidade máxima por 15 minutos a 4°C.
14. Coletar a fase aquosa superior para novos tubos por aspiração evitando perturbar a interfase proteica.
15. Repetir os procedimentos 12, 13 e 14.
16. Precipitar o DNA com 300µL de isopropanol puro gelado (-20 °C) e homogeneizar por inversão durante 2 minutos.
17. Incubar as amostras em gelo por 10 minutos.
18. Centrifugar à velocidade máxima por 12 minutos a 4°C.
19. Desprezar o sobrenadante cuidadosamente.
20. Adicionar 500 µL de etanol 70% (V/V) gelado (-20°C) para lavar o pellet que deve ser desprendido da parede do tubo.
21. Centrifugar à velocidade máxima por 12 minutos a 4°C.
22. Desprezar o sobrenadante por inversão.

23. Secar o pellet por 1 hora à temperatura ambiente com os tubos abertos e invertidos.
24. Adicionar 50 µL água mili-Q e incubar por até 2 h com RNase para hidratação e degradação do RNA restante.
25. Estocar o DNA a -20°C até o dia de uso.

Soluções

- Solução I → Tris-HCl 25 mM; EDTA-NaOH 10mM; Sacarose 50mM, pH de 8.0 e lisozima 0.5 mg/mL.
- Solução de FCA → Fenol saturado pH: 8.0 a 50% (V/V); clorofórmio 48% (V/V) e álcool isoamílico 2% (V/V).