



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara



Laura Araujo da Silva Amorim

**Aplicação de um sistema sintético de controle da expressão gênica
para a produção de vitamina B₂ em *Bacillus subtilis***

Araraquara, SP

2021

Laura Araujo da Silva Amorim

**Aplicação de um sistema sintético de controle da expressão gênica
para a produção de vitamina B₂ em *Bacillus subtilis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas.

Orientadora: Prof(a). Dr(a) Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara, SP.

2021

A524a Amorim, Laura Araujo da Silva.
Aplicação de um sistema sintético de controle da expressão gênica para a produção de vitamina B2 em *Bacillus subtilis* / Laura Araujo da Silva Amorim. – Araraquara: [S.n.], 2021.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Pequeno RNA. 2. RNA não codificante. 3. Riboswitch. 4. *Bacillus subtilis*. 5. Biologia sintética. 6. Riboflavina. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Aplicação de um sistema sintético de controle da expressão gênica para a produção de vitamina B2 em *Bacillus subtilis*

AUTORA: LAURA ARAUJO DA SILVA AMORIM

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DANIELLE BISCARO PEDROLI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / Universidade Federal de Viçosa

Dra. ALINE SILVA ROMÃO-DUMARESQ (Participação Virtual)
Braskem

Araraquara, 31 de agosto de 2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças e, mais importante, esperança durante toda a minha trajetória.

Aos meus pais, Laercio e Ronivete, por serem meu porto seguro, a rede de segurança que me permite pular no desconhecido sabendo que não importa o que aconteça eu vou ter vocês ao meu lado, me apoiando. Obrigada por todo amor, apoio, encorajamento e por sempre acreditarem em mim, essa conquista é de vocês e para vocês!

À minha irmã Luiza, por ser meu pontinho de luz e me fazer rir em momentos que a pressão se tornava muito pesada, mesmo sem saber. Tenho muito orgulho da mulher bondosa e carinhosa que você está se tornando.

Às minhas avós, Eunice's, que ao acreditarem e torcerem por mim tão intensamente me deram força e motivação para persistir e correr atrás dos meus objetivos. Amo vocês veinhas!

À toda a minha família, por me apoiarem, mesmo à distância. Sentir o amor, admiração e torcida de vocês fez toda diferença no meu caminho. Espero que vocês saibam como são importantes para mim e como sou grata por fazer parte dessa família.

Aos meus amigos, que mesmo distantes, espalhados por todo o Brasil, se fizeram presentes na minha vida. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e torcerem por mim. Amo muito vocês!

À minha orientadora, Danielle, que aceitou orientar uma aluna desconhecida sem muita experiência e apresentou o mundo fantástico da biologia sintética a ela. Serei eternamente grata pela oportunidade e por todos os conhecimentos e ensinamentos que eu aprendi com a senhora.

Às pessoas que fazem parte do grupo de pesquisa Synbio AQA, por me acolherem e me guiarem de forma tão generosa. Vou sempre ser grata pela paciência que vocês tiveram de me explicar e me ensinar como trabalhar com biologia sintética. Com toda certeza, eu não teria concluído este trabalho se não fosse a ajuda de vocês. Além disso, agradeço muito por terem feito o meu dia-a-dia mais leve e feliz, fico contente em saber que fiz bons amigos aqui!

Ao meu companheiro nessa aventura, Caio, que me acompanha desde a graduação e que se tornou meu porto seguro nessa nova etapa de nossas vidas. Você sabe que já é parte da minha família.

À Milca, que além de ter se tornado uma grande amiga, é uma das melhores pesquisadoras que eu já tive o prazer de trabalhar. Obrigada por ter me acompanhado e ajudado nesse projeto, sua paciência e generosidade foram essenciais para que eu conseguisse.

À Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) e ao Programa de Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, por possibilitar a realização deste trabalho.

À secretaria de pós-graduação, que atendeu prontamente aos questionamentos relacionados às burocracias do programa BBAF. Obrigada em especial à Claudia, Anielle e Denise, que tiveram paciência para tirar todas as minhas dúvidas e me ajudaram desde o momento da submissão até a finalização do mestrado.

Ao Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia: diretoria, docentes, técnicos, servidores, terceirizados e discentes. Em especial o técnico do nosso laboratório, Flavio, que entre reclamações e estresses ofereceu suporte e dedicação a todos nós.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido como a bolsa de mestrado e à FAPESP por incentivar a pesquisa em nosso laboratório com o projeto jovem pesquisador da minha orientadora.

Finalmente, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta com o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada! Não é fácil fazer pesquisa no Brasil, ainda mais no momento atual, mas com o apoio e incentivo de pessoas como vocês tudo se tornou um pouco mais real e possível.

**“Não tenho medo de tempestades porque
aprendi como navegar”**

Louisa May Alcott

RESUMO

A riboflavina é uma vitamina solúvel em água que possui papel essencial no crescimento e desenvolvimento celular, sua produção anual total é de aproximadamente 9000 toneladas, sendo um bioprocesso rentável. As cepas industriais utilizadas para a produção de riboflavina foram obtidas através de técnicas de mutagênese, porém as mesmas apresentam limitações referentes ao crescimento celular e a produtividade da biomolécula. Com o avanço no conhecimento sobre a diversidade, estrutura e função dos RNAs não codificantes houve a possibilidade da sua utilização na regulação de diversos metabolismos microbianos. Sendo o metabolismo de purinas e riboflavina em *Bacillus subtilis* controlado por mecanismo de regulação do término prematuro da transcrição, os *riboswitches*, o uso de RNAs como mecanismo regulador se torna uma possível ferramenta para criação de cepas industriais superprodutoras destes compostos. Sendo assim, ambicionou-se a criação de cinco sRNAs sintéticos para avaliação da interferência dos mesmos na regulação negativa causada pelos *riboswitches* do metabolismo de purinas e riboflavina em *B. subtilis*. Foram desenvolvidas, então, linhagens de *B. subtilis* contendo um sRNA, sendo específico para cada *riboswitch* presente no metabolismo de purinas e na produção de riboflavina, além de um sRNA capaz de parear com o RBS do mRNA contendo o gene *purR*. Além desses sRNAs serem introduzidos no cromossomo de *B. subtilis* individualmente, foram introduzidos os dois sRNAs com os resultados mais promissores (*ribDG* e *purR*) e também um operon contendo todos os sRNAs, estando esses conjugados a diferentes ribozimas, em um transcrito único. Dessa forma, observou-se que as linhagens desenvolvidas apresentaram o crescimento esperado indicando que a inserção não promoveu estresse metabólico para a célula, em alguns casos até melhoraram a densidade populacional em relação à linhagem parental. Porém, ao analisar a produção de riboflavina quantificada via HPLC, conclui-se que as cepas contendo os sRNAs *xpt*, *purR* e *ribDG* apresentaram aumento da produção em 48%, 34% e 30%, respectivamente. Essas três linhagens foram cultivadas aumentando a escala para frasco de Erlenmeyer, onde observou-se que os sRNAs *ribDG* e *purR*, tiveram cerca de 50% maior produção de riboflavina que o controle. Dessa forma construiu-se um operon composto pelos sRNAs *purR* e *ribDG* e a linhagem contendo este operon no genoma aumentou 10% a produção de riboflavina em comparação com *B. subtilis* com um sRNA apenas, representando aumento de 65% em comparação com a linhagem parental. Em relação ao sistema com todos os sRNAs desenvolvidos em um transcrito único, este foi introduzido no cromossomo de três linhagens diferentes de *B. subtilis*. Essas linhagens também não apresentaram problemas no crescimento, sendo que a produção de riboflavina em escala de

Erlenmeyer alcançou níveis superiores em comparação ao seu controle em 44% para a cepa de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina e 65% para a cepa de *B. subtilis* RFAi. Sendo assim, ao utilizar sRNAs sintéticos para desenvolver cepas produtoras de riboflavina aprimoradas, provamos que os sRNAs são adequados para a regulação da expressão em *B. subtilis*. A facilidade de projetar e construir, e o fato de que o sRNA direcionado ao *riboswitch* funciona com uma única cópia do genoma, o tornam uma ferramenta atraente para a engenharia de cepas produtoras de metabólitos industriais. Além disso comprovamos a interferência na regulação gênica de *riboswitches* no metabolismo de purinas e riboflavina em *B. subtilis* resultando em linhagens aprimorada para produção desses compostos de interesse industrial.

Palavras-chave: pequeno RNA, RNA não codificante, riboswitch, *Bacillus subtilis*, biologia sintética, riboflavina.

ABSTRACT

Riboflavin is a water-soluble vitamin that plays an essential role in cell growth and development, its total annual production is approximately 9000 tons, making it a profitable bioprocess. The industrial strains used for the production of riboflavin were obtained through mutagenesis techniques, but they have limitations regarding cell growth and biomolecule productivity. With the advance in knowledge about the diversity, structure, and function of non-coding RNAs, there was the possibility of their use in the regulation of several microbial metabolisms. Since the metabolism of purines and riboflavin in *Bacillus subtilis* is controlled by a mechanism that regulates the premature termination of transcription, the riboswitches, the use of RNAs as a regulatory mechanism becomes a possible tool for the creation of industrial strains that overproduce these compounds. Therefore, the creation of five synthetic sRNAs was aimed at evaluating their interference in the down-regulation caused by riboswitches of purine and riboflavin metabolism in *B. subtilis*. Then, strains of *B. subtilis* containing an sRNA were developed, specific for each riboswitch present in the metabolism of purines and the production of riboflavin, in addition to an sRNA capable of pairing with the RBS of the mRNA containing the *purR* gene. In addition to these sRNAs being introduced into the chromosome of *B. subtilis* individually, the two sRNAs with the most promising results were introduced (*ribDG* and *purR*) and also an operon containing all sRNAs, these being conjugated to different ribozymes, in a single transcript. Thus, it was observed that the strains developed presented the expected growth, indicating that the insertion did not promote metabolic stress for the cell, in some cases, they even improved the population density with the parental strain. However, when analyzing the production of riboflavin quantified via HPLC, it is concluded that the strains containing the sRNAs *xpt*, *purR*, and *ribDG* showed an increase in production of 48%, 34%, and 30%, respectively. These three strains were grown upscale to Erlenmeyer flask, where it was observed that the sRNAs *ribDG* and *purR* had about 50% greater production of riboflavin than the control. Thus, an operon composed of *purR* and *ribDG* sRNAs was constructed and the strain containing this operon in the genome increased riboflavin production by 10% compared to *B. subtilis* with only one sRNA, representing an increase of 65% compared to the parental strain. Regarding the system with all sRNAs developed in a single transcript, this was introduced into the chromosome of three different strains of *B. subtilis*. These strains did not show growth problems either, with Erlenmeyer scale riboflavin production reaching higher levels compared to its control in 44% for the riboflavin super-producing *B. subtilis* strain and 65% for the *B. subtilis* strain RFAi. Therefore, by using synthetic sRNAs to develop improved

riboflavin-producing strains, we proved that sRNAs are suitable for the regulation of expression in *B. subtilis*. The ease of design and construction, and the fact that riboswitch-targeted sRNA works with a single copy of the genome, make it an attractive tool for engineering strains producing industrial metabolites. Furthermore, we proved the interference in the gene regulation of riboswitches in the metabolism of purines and riboflavin in *B. subtilis*, resulting in improved strains for the production of these compounds of industrial interest.

Keywords: small RNA, non-coding RNA, riboswitch, *Bacillus subtilis*, synthetic biology, riboflavin.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	Produção industrial de riboflavina (Vitamina B ₂)	14
1.2.	<i>B. subtilis</i> como chassis	17
1.3.	Metabolismo de purinas e produção de riboflavina em <i>B. subtilis</i>	18
1.4.	Riboswitches	21
1.5.	Pequenos RNAs regulatórios	23
2.	OBJETIVO	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1.	Linhagens utilizadas	25
3.2.	Meios de cultivos utilizados.....	25
3.3.	Integração dos sRNAs individualmente no cromossomo de <i>B. subtilis</i>	26
3.4.	Construção da linhagem contendo dois sRNAs	27
3.5.	Construção da linhagem contendo o sistema de sRNAs.....	29
3.5.1.	Clonagem do operon de sRNAs	29
3.5.2.	Mutação sítio-dirigida.....	31
3.6.	Cultivo das linhagens obtidas em tubos.....	32
3.7.	Aumento de escala	32
3.8.	Produção de Riboflavina.....	33
3.9.	Análises estatísticas.....	34
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1.	Calibração para quantificação da riboflavina em HPLC	34
4.2.	Determinação do meio a ser utilizado e avaliação de crescimento celular utilizando as cepas contendo os sRNAs individuais.....	35
4.3.	Produção de riboflavina em linhagens contendo sRNAs individuais.....	38
4.3.1.	Crescimento celular e produção de riboflavina em escala de tubo.....	38
4.3.2.	Aumento de escala para frascos Erlenmeyer.....	40
4.4.	Produção de riboflavina por linhagem contendo dois sRNAs	44
4.5.	Produção de riboflavina em linhagens contendo operon de sRNAs.....	45

4.5.1.	Integração do sistema de sRNAs no cromossomo de <i>B. subtilis</i>	45
4.5.2.	Crescimento celular e produção de riboflavina em escala de tubo	50
4.5.3.	Aumento de escala para frasco Erlenmeyer	53
4.6.	Produção de riboflavina pelas linhagens mais promissoras	56
4.7.	Método de quantificação de riboflavina utilizando fluorescência	58
5.	CONCLUSÕES	60
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
	ANEXOS.....	67

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos processos químicos ainda serem utilizados na indústria, a demanda global para o desenvolvimento de processos sustentáveis tem aumentado, visando a substituição destes processos que utilizam recursos de combustíveis fósseis, para processos com menos impactos ambientais (LEE *et al.*, 2011).

Neste contexto, a utilização de microrganismos para a produção industrial de moléculas de interesse se tornou uma possível solução à redução de resíduos industriais. Para isso, o desenvolvimento de novas técnicas da biologia molecular, e mais recentemente, da biologia sintética tem sido essencial para possibilitar a construção racional de processos biológicos mais eficientes, atendendo assim as demandas industriais (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

Os novos conceitos desenvolvidos pela biologia sintética mostram que a pesquisa por novos produtos, novas vias de produção e por novas funções não precisa se restringir ao lento processo de seleção de organismos com propriedades interessantes. Cada vez mais se torna real a ideia da construção de células como biofábricas, bioprocessadores e biossensores capazes de desempenhar funções complexas para as quais foram programados (CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014).

Dentre as diversas tecnologias moleculares para desenvolvimento de linhagens para a aplicação industrial, uma com grande potencial é a regulação da expressão gênica por RNAs. Esses possuem grande importância no metabolismo natural dos microrganismos, sendo o processo de regulação dependente das estruturas primária, secundária e terciária dos RNAs (IRNOV *et al.*, 2010).

A reprogramação de vias metabólicas utilizando processos regulatórios possibilita a manipulação de uma via metabólica essencial, sem acarretar na redução da velocidade de crescimento celular ou inviabilidade da célula, já que dessa forma há a regulação acontece após o início do crescimento, direcionando assim o fluxo de recursos celulares para um determinado produto. Essa abordagem é uma alternativa para a técnica de deleção gênica, comumente empregada em engenharia metabólica, que não é viável para genes essenciais (LINS, 2019).

1.1. Produção industrial de riboflavina (Vitamina B₂)

A riboflavina [7,8-dimetil-10-(D-1'-ribitol)-isoaloxazina], também conhecida como vitamina B₂, é uma vitamina solúvel em água que possui papel essencial no crescimento e desenvolvimento celular. Sendo precursora das coenzimas flavina mononucleotídeo (FMN) e dinucleotídeo de flavina adenina (FAD), envolvidas no metabolismo oxidativo e em outros processos, a riboflavina é um componente necessário na dieta de humanos e animais (ABBAS; SIBIRNY, 2011; FORAKER; KHANTWAL; SWAAN, 2003).

As células animais são incapazes de produzir riboflavina, sendo então dependentes da absorção da mesma através de transportadores especializados. Entretanto algumas células vegetais e microrganismos são capazes de sintetizar essa vitamina utilizando a via *de novo* a partir de guanosina-5-trifosfato (GTP), derivado do metabolismo de purinas, e ribulose-5-fosfato, derivada da via das pentoses fosfato (GARCÍA-ANGULO, 2017).

Estima-se que a dose diária de riboflavina necessária seja de 1,1 mg para mulheres adultas, e 1,3 mg para homens adultos. A deficiência de riboflavina na dieta humana pode causar, entre outros sintomas, lesão cutânea e vascularização da córnea. Algumas fontes naturais dessa vitamina são leite, ovos, vegetais folhosos verdes, entre outros. Comercialmente, grande parte da produção industrial de riboflavina é usada como aditivo alimentar e para aplicações farmacêuticas (SCHWECHHEIMER *et al.*, 2016).

Durante quase cinco décadas a produção industrial de riboflavina foi realizada através de processos de síntese química, consistindo de seis a oito etapas a partir da glicose. Entretanto, essas várias etapas químicas demandam a utilização de agentes tóxicos, além de produzirem resíduos que exigem rigoroso controle ambiental e um tratamento de efluentes especial. Dessa forma, se fez necessário a busca por alternativas para a produção dessa vitamina. Assim, na década de 1940, iniciou-se a utilização de microrganismos para produção de riboflavina através de bioprocessos (REVUELTA *et al.*, 2017).

Porém, apesar de apresentar vantagens ambientais em comparação à produção química, a produção de riboflavina via bioprocessos possuía grande desvantagem quanto à sua produção e custo, fazendo com que apenas 5% da produção mundial de vitamina B₂ fosse produzida por essa via. Com o desenvolvimento de ferramentas de engenharia genética, a porcentagem de produção biotecnológica aumentou, chegando em 75% em 2002. Atualmente, a síntese química foi substituída completamente, sendo a produção de riboflavina feita exclusivamente por

bioprocesso, tornando assim a produção mais econômica e ecologicamente mais viável (SCHWECHHEIMER *et al.*, 2016).

Linhagens bacterianas modificadas geneticamente para a produção industrial de biomoléculas são comumente construídas usando-se promotores constitutivos para controlar a expressão dos genes envolvidos na biossíntese da molécula em questão. Promotores induzíveis não são desejados em linhagens industriais devido aos custos associados à adição do composto indutor e posterior eliminação do mesmo no processo de purificação da biomolécula de interesse. Porém, o atual modelo, empregando promotores constitutivos fortes, força a célula a sintetizar intensamente a biomolécula desejada durante todas as fases do crescimento celular. A fase lag de crescimento é especialmente prejudicada por esse sistema, pois o stress causado pela intensa expressão de genes sob controle do promotor forte leva ao prolongamento excessivo dessa fase do crescimento celular e à redução da capacidade de crescimento da cultura, retardando todo o processo produtivo (ABBAS; SIBIRNY, 2011).

Atualmente, a produção de riboflavina é feita por meio de cepas industriais, como de *B. subtilis* e *Ashbya gossypii*, desenvolvidas através de técnicas de mutagenese. Entretanto essas linhagens apresentam limitações referentes ao crescimento e quantidade de riboflavina produzida (GU *et al.*, 2018; REVUELTA *et al.*, 2017). A liderança da produção mundial da riboflavina obtida por processos biotecnológicos é composta por quatro empresas: A Alemã BASF, a holandesa DSM, e as chinesas Hubei Guangji Pharmaceuticals e Shanghai Acebright Pharmaceuticals (antiga Desano). Essas empresas utilizam diferentes tipos de bioprocessos, obtendo riboflavina de células da levedura *Candida famata* var. *flareri*, do fungo *A. gossypii* e da bactéria *B. subtilis* (AVERIANOVA *et al.*, 2020). O melhoramento dos três microrganismos foi inicialmente realizado selecionando-se linhagens resistentes a antimetabólitos (STAHMANN; REVUELTA; SEULBERGER, 2000). Posteriormente, deleções e inserções de genes possibilitaram adicional melhoria na produtividade de riboflavina pelas três linhagens.

Sendo um produtor natural de riboflavina e conseguindo sintetizar grande quantidade desta molécula, *Candida* sp. se tornou um forte candidato para a produção industrial da mesma, porém essas leveduras precisam superar a inibição de ferro para conseguir superproduzir a riboflavina. Na síntese bioquímica da riboflavina por esses microrganismos, há indícios de que o ferro reprime quase todas as enzimas biossintéticas da riboflavina. Para superar a inibição por ferro foram utilizadas técnicas de mutações para criação de uma linhagem de *C. famata* com resistência ao ferro e também a tubercidina. Essa linhagem, utilizada industrialmente, conseguiu alcançar a produção de 20 a 30 g/L de riboflavina, porém alguns estudos relataram

instabilidade genética da cepa mutante (LIM; CHOI; PARK, 2001; SCHWECHHEIMER *et al.*, 2016).

Diferentemente, o fungo *A. gossypii*, que também é um produtor natural de riboflavina, não apresenta como um fator limitante a inibição por ferro. A síntese de riboflavina por esse fungo começou a ser estudada e seu processo de produção desenvolvido a partir da década de 1970 por Merck Sharp e Dohme, nos EUA. Posteriormente, o bioprocesso foi adquirido pela BASF, que o implementou em escala industrial. Ao longo dos anos, a cepa de *A. gossypii* passou por melhorias constantes na sua capacidade de produção através de técnicas de mutagênese e seleção clássica, bem como de engenharia metabólica. O fluxo metabólico da via biossintética da riboflavina foi melhorado por uma abordagem racional e cópias adicionais dos genes, que codificam as enzimas biossintéticas da riboflavina, foram introduzidas no genoma. O processo de produção de riboflavina baseado nesse fungo utiliza óleos vegetais como matéria-prima, necessitando, portanto, da β -oxidação dos ácidos graxos e subsequente utilização eficiente da acetil-CoA produzida. A riboflavina produzida é acumulada em vacúolos por um processo de transporte ativo, e cristais intracelulares são formados em concentrações elevadas. A liberação é feita por lise induzida pelo calor da biomassa após a conclusão da fermentação. Esse processo industrial de síntese de riboflavina utilizando *A. gossypii* alcança níveis de produção de 15 a 20 g/L (EGGERSDORFER *et al.*, 2012; LIM; CHOI; PARK, 2001).

Já a linhagem de *B. subtilis* construída pela Roche, e atualmente em uso pela DSM, foi desenvolvida primeiramente isolando mutantes resistentes a análogos de purina e de riboflavina que influenciam na regulação intracelular das vias de produção de purina e riboflavina. A principal mutação induzida pela seleção com a antivitamina roseoflavina ocorreu na flavokinase. A mutação resultou em redução drástica na capacidade de síntese da enzima, levando a baixos níveis de FMN na célula. Como o FMN, mas não a riboflavina, atua como um composto efetor que ativa o sistema de repressão da riboflavina baseado em *riboswitch* em *B. subtilis*, os mutantes produzem e secretam riboflavina em grande quantidade (EGGERSDORFER *et al.*, 2012). A mutação pontual no gene *ribC*, que codifica a flavokinase, foi posteriormente reproduzida e a enzima caracterizada. A flavokinase mutante apresenta atividade reduzida a 1% em comparação ao tipo selvagem, provocando uma drástica redução na reação de fosforilação da riboflavina a FMN (MACK; LOON; VAN; HOHMANN, 1998). Nesta linhagem, o operon contendo os genes da via biossintética da riboflavina também teve, posteriormente, seu promotor natural trocado pelo promotor *veg*, um promotor constitutivo e forte em *B. subtilis*. A última alteração feita nessa linhagem foi a mutação do gene *tkl*. O gene

mutante codifica uma transketolase menos ativa, gerando um acúmulo de ribulose 5'-fosfato, um dos precursores da biossíntese de riboflavina. O bioprocesso realizado em escala industrial por essa linhagem produz níveis de riboflavina entre 30 e 40 g/L (PERKINS *et al.*, 1999).

A produção anual total de riboflavina é de aproximadamente 9000 toneladas, sendo um bioprocessos rentável apesar do baixo preço do produto de 15,00 a 50,00 USD por kg. Apesar disso, os microrganismos empregados atualmente ainda apresentam desvantagens, principalmente em relação à produtividade da biomolécula, já que geralmente não mais que 4% da fonte de carbono é convertida em riboflavina (ABBAS; SIBIRNY, 2011; AVERIANOVA *et al.*, 2020).

1.2. *B. subtilis* como chassis

B. subtilis é uma bactéria Gram-positiva aeróbia, comumente encontrada no solo, fontes de água e em associação com plantas. Por possuir uma capacidade de secretar enzimas de forma eficiente, ela apresenta um grande interesse comercial (KUNST *et al.*, 1997).

Ao longo dos anos, esse microrganismo se destacou como sendo uma grande biofábrica industrial para a produção de proteínas recombinantes, se beneficiando de sistemas de expressão eficientes, desenvolvidos nas últimas décadas. Além disso, apresenta alta taxa de crescimento, facilidade de cultivo em fontes de carbono baratas, e um sistema de secreção superior a outros microrganismos (GU *et al.*, 2018).

Tendo um rápido crescimento celular e fácil manipulação genética em laboratório, e apresentando um alto rendimento de produto, esse microrganismo vem sendo utilizado em vários sistemas para a expressão heteróloga (CAI *et al.*, 2019). Além disso, por ter grande parte do metabolismo e suas conversões metabólicas bem descritas, e ser considerada uma bactéria GRAS (Generally recognized as safe), *B. subtilis* tornou-se um chassis altamente relevante na biologia sintética (PARK *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

Considerando todas as vantagens apresentadas e em decorrência do desenvolvimento de tecnologias de engenharia metabólica, o portfólio de produtos utilizando *B. subtilis* como plataforma de expressão está cada vez mais se expandindo, adicionando bioprodutos como: acetoína, ácido lático, isobutanol, etanol, riboflavina, N-acetilglucosamina, ácido poli- γ -glutâmico, ácido hialurônico, entre outros (GU *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

Em relação à biomolécula riboflavina, *B. subtilis* se tornou um organismo modelo entre as cepas industriais produtoras de riboflavina devido à alta produção e ao fato de a molécula atravessar a membrana celular e acumular no meio de cultivo. Dessa forma, a via biossintética da riboflavina foi bem estudada nessa bactéria, tendo o seu metabolismo elucidado (Averianova *et al.*, 2020).

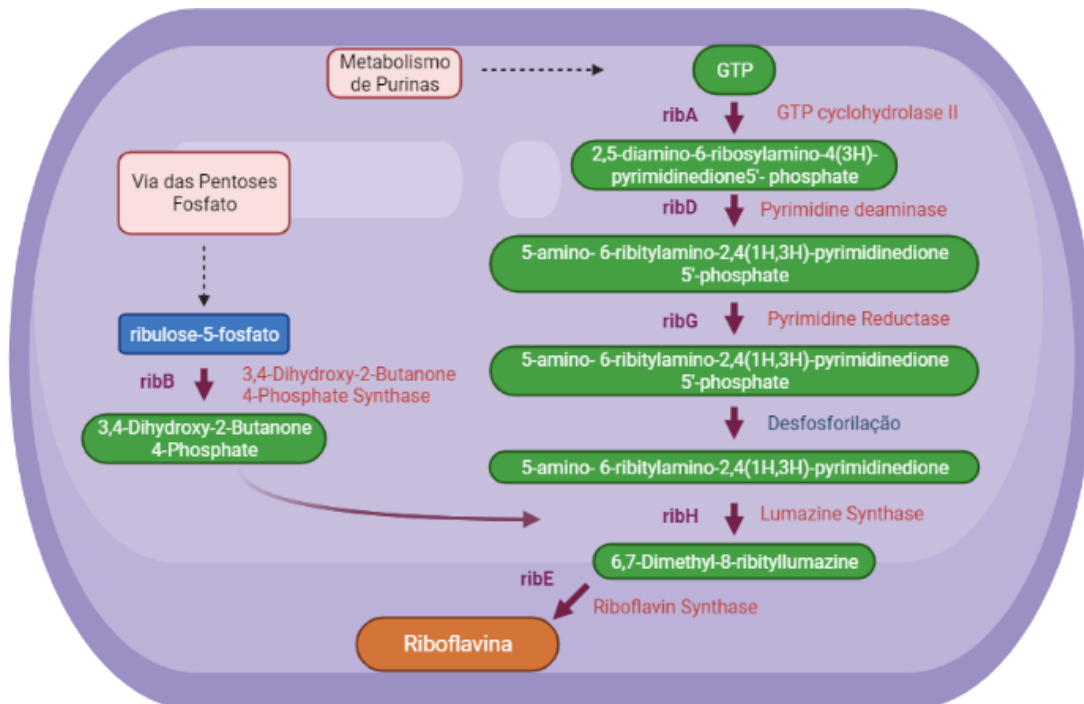
1.3. Metabolismo de purinas e produção de riboflavina em *B. subtilis*

O metabolismo alvo desse trabalho é a biossíntese de riboflavina em *B. subtilis* (Figura 1), que é sintetizada através de sete reações catalisadas enzimaticamente a partir de guanosina trifosfato (GTP), proveniente da via biossintética de purinas, e ribulose-5-fosfato, proveniente da via das pentoses fosfato (GARCÍA-ANGULO, 2017).

As enzimas responsáveis pela catálise das etapas da via biossintética da riboflavina encontram-se codificadas em um único operon denominado *ribDGEABHT*. Esse operon foi mapeado na 209ª posição do cromossomo de *B. subtilis*, possuindo o tamanho de 4,3 kbp (MACK; LOON; VAN; HOHMANN, 1998).

O operon *rib* agrupa os genes *ribDG*, *ribE*, *ribAB*, *ribH* e *ribT* em uma unidade de transcrição, sendo regulado pelo *riboswitch* *ribDG*, que é localizado na região não traduzida 5'-UTR do mRNA, anterior ao sítio de iniciação da tradução. A regulação da expressão desses genes é feita de acordo com a concentração intracelular de FMN. A terminação precoce da transcrição é promovida em altas concentrações de FMN, a partir da ligação dessa molécula ao aptâmero do *riboswitch* (HEMBERGER *et al.*, 2011; PEDROLI *et al.*, 2015).

Figura 1: Via biossintética de riboflavina em *B. subtilis*.



Fonte: Adaptado de: García-Ângulo, 2017 e Abbas & Sibirny, 2011.

As purinas são elementos essenciais que compõe o DNA e RNA, e que apresentam um importante papel celular, estando envolvidas em diversas vias metabólicas. Além de serem fundamentais no processo de síntese de ácidos nucleicos e biossíntese de aminoácidos, as purinas também podem ser utilizadas como carreadores e suplementos de energia para a célula, tanto na forma de ATP (adenosina trifosfato), quanto como GTP (guanosina trifosfato) (SHI *et al.*, 2014).

Ao analisar o metabolismo de purinas em *B. subtilis*, verifica-se que este é responsável não somente pela síntese das mesmas através da síntese *de novo*, como também pela importação de purinas do meio extracelular (Figura 2) (LINS, 2019).

e genes para transporte de purinas interagindo com o DNA numa região entre os nucleotídeos -147 e -21 em relação ao local de início da transcrição no operon *pur*. A finitude da proteína só é afetada pelo 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) (BERA *et al.*, 2003).

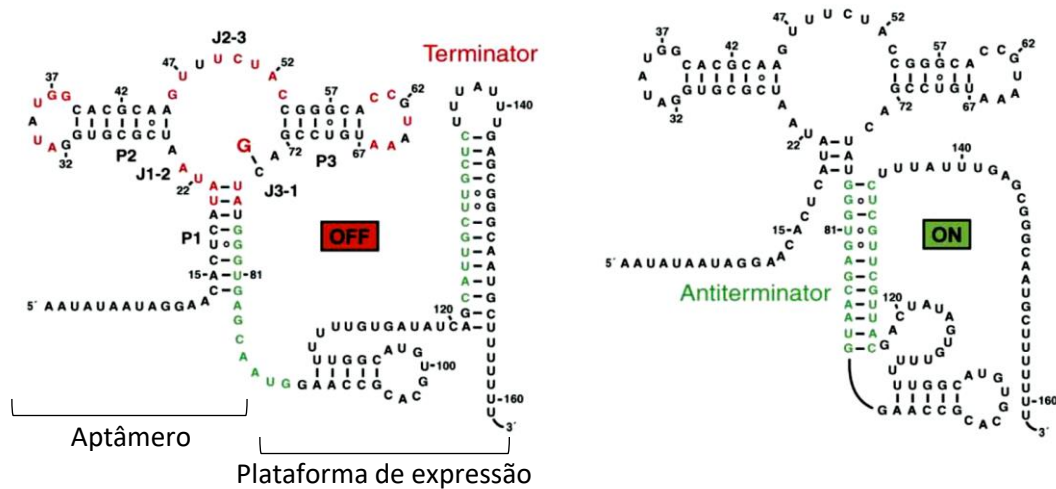
Assim como a biossíntese de riboflavina, o metabolismo de purinas em *B. subtilis* é rigidamente controlado por mecanismo de regulação do término prematuro da transcrição com emprego de cinco *riboswitches* de purina. Esses são modulados pela concentração citoplasmática de guanina e adenina (MANDAL *et al.*, 2003).

1.4. Riboswitches

Processos regulatórios executados por moléculas de RNA são bastante comuns e diversos em microrganismos, especialmente em procariotos. O termo *riboswitch* foi definido para distinguir RNAs que são capazes de controlar a expressão de genes sem a influência de fatores proteicos. Estes são capazes de reconhecer e determinar a dose necessária para a síntese de proteínas ou metabólitos de acordo com as necessidades celulares (BREAKER, 2012; SHERLOCK *et al.*, 2018).

Riboswitches são sequências de RNA quase exclusivamente localizadas na extremidade 5'- da região não codificadora do mRNA (5'-UTR) cuja expressão eles controlam. Estão presentes em plantas, fungos, arqueias e bactérias, sendo que, nesse último grupo, apresentam maior variedade de tipos e mecanismos funcionais. Os genes controlados por *riboswitches* estão geralmente envolvidos na biossíntese e transporte dos seus ligantes cognatos. A estrutura terciária formada por esses RNAs é capaz de ligar-se diretamente a um metabólito específico e controlar a expressão gênica sem o auxílio de proteínas. A capacidade de um *riboswitch* de reconhecer e se ligar a uma molécula em particular se fundamenta nas suas estruturas primária, secundária e terciária (Figura 3). A sequência completa dos *riboswitches* é formada por duas porções: o aptâmero, responsável pela ligação ao metabólito específico; e a plataforma de expressão, que se conecta por um lado ao aptâmero e pelo outro ao gene controlado, sendo responsável por interpretar e executar a regulação da expressão gênica de acordo com o estado do aptâmero – ligado/ não ligado (BREAKER, 2012; GONG *et al.*, 2018; PEDROLLI; LINS; CORREA, 2017).

Figura 3: Representação da estrutura do *riboswitch* de guanina na região 5'-UTR de um mRNA: aptâmero [região estruturada capaz de se ligar à guanina (G)] e plataforma de expressão (formação de *hairpin* terminador).



Fonte: Serganov et al., 2004.

Essas estruturas são capazes de responder a uma variedade de ligantes, como aminoácidos, purinas, cofatores ou metais e, por causa da sua especificidade, podem ser agrupados de acordo com o metabólito que reconhecem. Outra forma de classificar os *riboswitches* é através da modulação genética que realizam. Por exemplo, os *riboswitches* reguladores da tradução controlam a expressão gênica regulando a acessibilidade ao sítio de ligação do ribossomo (RBS) e ao códon de iniciação. Já os *riboswitches* reguladores da transcrição controlam a formação de um terminador independente que inibe a transcrição ao desestabilizar o complexo RNA/RNA polimerase. Além desses exemplos, *riboswitches* já foram elucidados exercendo o controle da expressão gênica através de variados mecanismos (KIRCHNER; SCHNEIDER, 2017).

Geralmente o gene controlado pelo *riboswitch* está envolvido na biossíntese e transporte de um metabólito, sendo esse capaz de ligar-se ao *riboswitch* e assim, induzir uma mudança estrutural, tanto pela sua ligação, quanto pela falta dela. A regulação da expressão no metabolismo de riboflavina e de purinas ocorre pela mudança de conformação do *riboswitch*, a partir da ligação a uma purina (adenina ou guanina) ou de FMN. A alteração leva a formação da estrutura do terminador da transcrição ou do anti-terminador (GARST; EDWARDS; BATEY, 2011; SERGANOV *et al.*, 2004).

1.5. Pequenos RNAs regulatórios

Regulação gênica por emprego de RNAs não codificadores (ncRNA) é um mecanismo naturalmente empregado por bactérias através de diversas maneiras, desempenhando papel central na regulação da fisiologia celular. Pequenos RNAs regulatórios (sRNA) compõem um grupo de RNAs não codificadores formados por aproximadamente 50 a 250 nucleotídeos estruturados, podendo modular diretamente a atividade de proteínas ou ligar-se a mRNAs e regular a expressão gênica. Suas características fazem deles um sistema poderoso para a concepção racional de novas ferramentas, pois são modulares, facilmente sintetizáveis e manipuláveis, podendo atingir uma diversidade enorme de sequência, estrutura e função (IRNOV *et al.*, 2010; WATERS; STORZ, 2009).

De acordo com a transcrição, os RNAs reguladores podem ser divididos em duas classes: aqueles que são cotranscritos (em cis) ao mRNA alvo, geralmente localizados na região 5' do transcrito alvo, e aqueles que são transcritos independentemente (em trans) ao mRNA alvo. Ambas as classes são capazes de ativar ou reprimir a expressão dos genes que elas regulam (IRNOV *et al.*, 2010).

sRNAs vem sendo cada vez mais usados como uma ferramenta na biologia sintética, com grande aplicação na engenharia metabólica. A técnica de reprogramação de vias metabólicas utilizando sRNAs possui vantagem sobre as técnicas comumente utilizadas, por ter a possibilidade de manipular uma via metabólica essencial sem reduzir a velocidade do crescimento celular, otimizando as condições de cultivo e aumentando a produção dos metabólicos (IRNOV *et al.*, 2010; LINS *et al.*, 2021).

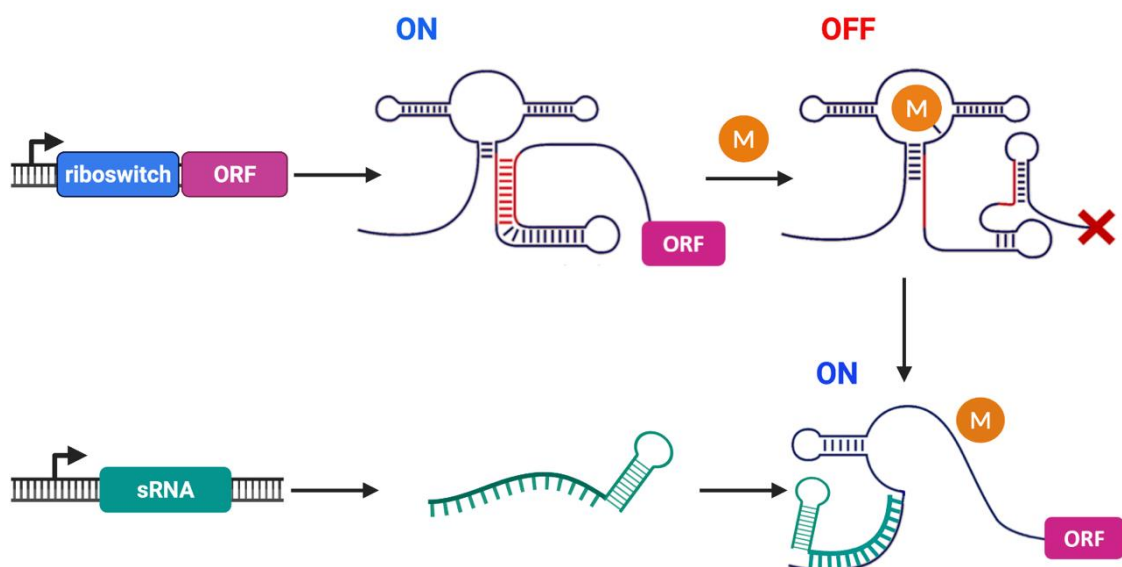
Os sRNAs podem controlar a expressão de um gene tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional, utilizando o pareamento Watson-Crick em regiões complementares do mRNA alvo. Dessa forma, vem sendo desenvolvido dispositivos empregando esses sRNAs utilizando seleção *in vitro*, assim como desenhando racionalmente os mesmos através de softwares, e realizando simulação *in silico*, com o objetivo de obter um sRNA mais estável e eficiente. Dispositivos desenvolvidos foram capazes de modificar e programar células, integrando sinais internos e/ou externos com processos celulares (MARS *et al.*, 2016; YOO; NA; LEE, 2013).

Moléculas sintéticas de sRNAs foram desenvolvidas anteriormente no grupo de pesquisa SynBio por Lins *et al.* (2021) utilizando o software Ribomaker, ferramenta de desenho de RNAs reguladores que adapta técnicas de deslocamento de fita derivadas da nanotecnologia

combinadas com computação evolutiva (RODRIGO; JARAMILLO, 2014; ROSTAIN *et al.*, 2015). A mesma também utilizou o software NUPACK (ZADEH *et al.*, 2012) para avaliar computacionalmente as propriedades termodinâmicas das sequências dos sRNAs em conjunto com os *riboswitches* numa solução com concentração determinada, prevendo a estrutura secundária formada pelo sistema *riboswitch*-sRNA.

Os sRNAs sintéticos foram projetados para acionarem os *riboswitches* que controlam o metabolismo de purinas e de riboflavina em *B. subtilis* ao atingirem o limiar de concentração na célula. Foi desenhado um sRNA para cada um dos seis *riboswitches* de purinas, *purE*, *xpt*, *nupG*, *pbuE* e *pbuG*, e para o *riboswitch* de FMN, *ribDG*. Neste sistema, o *riboswitch* endógeno, localizado *downstream* ao promotor, controla a expressão gênica de modo a mantê-la desligada quando a concentração de guanina, adenina ou FMN aumenta na célula. Em outra unidade de transcrição se encontra o gene do sRNA, cuja síntese é dependente do crescimento. Assim, a síntese do sRNA será contínua, devendo atingir o limiar de ação no início da fase exponencial de crescimento. Neste ponto, o sRNA parecia com o *riboswitch* na extremidade 5'-UTR do mRNA e ativa a expressão gênica (Figura 4). Uma variação do sRNA-*purE* também foi construída com a fusão da sequência da ribozima RiboJ à extremidade 5' do sRNA (LINS *et al.*, 2021).

Figura 4: sRNA direcionado a *Riboswitch*. O sRNA pareia-se com o aptâmero do *riboswitch*, induz um dobramento alternativo de aptâmero e evita a terminação da transcrição.



Fonte: o autor.

Posteriormente também foi projetado um sRNA capaz de parear com o RBS do mRNA contendo o gene *purR*, para assim bloquear o início da tradução do gene. *PurR* é proteína uma repressora que regula o início da transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de purina. O desenvolvimento do sRNA-*purR* antisenso foi realizado para comparar o desempenho dos sRNAs projetados para ligar-se à *riboswitch* com sRNAs antisenso tradicionais.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi construir um novo modelo de controle da expressão gênica em *B. subtilis* utilizando sRNAs sintéticos, desenvolvidos previamente no grupo de pesquisa SynBio, para serem empregados como ferramentas de engenharia metabólica para controle da biossíntese de riboflavina na bactéria *B. subtilis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

No presente trabalho utilizou-se *E. coli* Top10 e DH5 α para as clonagens gênicas e propagação de plasmídeos. Também foram utilizadas diferentes linhagens de *B. subtilis*:

- *B. subtilis* Marburg 168;
- *B. subtilis* KO7, uma linhagem que não secreta proteases, gerada por deleções marker-free a partir da linhagem PY79 (BGSC ID 1A1133).
- *B. subtilis* superprodutora de riboflavina (RF-SP), possui o operon *rib* sob controle do promotor P_{veg} e mutações nos genes *ribC*, *tkt*, e no *riboswitch* de FMN.
- *B. subtilis* RFAi, construída em trabalhos anteriores no grupo de pesquisa SynBio AQA, a partir de *B. subtilis* KO7, cujo operon *rib* foi colocado sob controle do sistema de autoindução S1R7 (CORRÊA *et al.*, 2020).

3.2. Meios de cultivos utilizados

- Meio de cultura LB (Luria-Bertani): 10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl; pH 7,0-7,2.

Para meio sólido adicionar 16g/L ágar.

Suplementado com sacarose 2% m/v nos cultivos realizados.

- Meio Power (PW): 1 g.L⁻¹ extrato de levedura, 25 g.L⁻¹ NaNO₃, 0.333 g.L⁻¹, KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ Na₂HPO₄·12H₂O, 0.15 g.L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 7.5 mg.L⁻¹ CaCl₂, 6 mg.L⁻¹ MnSO₄·H₂O, 6 mg.L⁻¹, FeSO₄ 7H₂O, pH 7.0

Suplementado com sacarose 4% m/v nos cultivos realizados.

3.3. Integração dos sRNAs individualmente no cromossomo de *B. subtilis*

Os plasmídeos utilizados nesta etapa, e listados abaixo, foram desenvolvidos em trabalho anterior do grupo de pesquisa SynBio AQA (LINS *et al.*, 2021).

pBS2E_Pgrac-sRNA-purE

pBS2E_Pgrac-RiboJ-sRNA-purE

pBS2E_Pgrac-sRNA-xpt

pBS2E_Pgrac-sRNA-pbuE

pBS2E_Pgrac-sRNA-ribDG

pBS2E_Pgrac-sRNA-purR

Os plasmídeos acima listados foram extraídos utilizando o Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), seguindo as orientações do fabricante, a partir das linhagens de *E. coli*. Estes plasmídeos possuem Promotor Pgrac (induzível por IPTG) controlando a transcrição do sRNA desenhado especificamente para ligar-se aos riboswitches *purE*, *xpt*, *pbuE* e *ribDG* e ao mRNA *purR*. Os mesmos integram-se no locus *lacA* do genoma de *B. subtilis*, conferindo a esse, resistência à eritromicina.

Para integração no cromossomo de *B. subtilis* RF-SP, os plasmídeos (500 a 1500 ng) foram adicionados a 250 µL de células competentes e 250 µL do meio SPII+EGTA [2 g/L (NH₄)₂SO₄; 18,3 g/L K₂HPO₄·3H₂O; 6 g/L KH₂PO₄; 1 g/L citrato trissódico x 2H₂O; 2 mL glicose 50%; 14 mL MgSO₄·3H₂O 1,2%; 2 mL extrato de levedura 10%; 2 mL casaminoácidos 1%; triptofano 20 µg/mL + 4 mL EGTA a 0,1 M, pH 8,0] e incubados a 37°C por 1 hora a 220 rpm. As amostras (50 e 100 µL) foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com eritromicina em concentração final de 1 µg/mL. As placas

foram incubadas a 37°C overnight em estufa microbiológica. As colônias crescidas foram repassadas para LB líquido contendo eritromicina (1 µg/mL) e incubadas a 37°C overnight sob agitação de 220 rpm.

DNAs genômicos das linhagens construídas foram purificados utilizando o kit comercial *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher) após incubação da suspensão de células com lisozima (10mg/mL) a 37°C por 30 min para digestão da membrana celular. gDNA foi utilizado como molde para reações de PCR com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Invitrogen) para confirmar a integração das partes no cromossomo. As condições da PCR foram 4 µL de tampão 5x Phusion HF, 0,4 µL de dNTPs 10mM, 1 µL de *primer forward* 10 µM, 1 µL de *primer reverse* 10 µM, 200ng gDNA, 0,2 µL de Phusion DNA polimerase (2 U/µL), água ultrapura para completar 20 µL. A reação foi desenvolvida no termociclador com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 98°C por 30 s, desnaturação 98°C por 10 s, anelamento 60°C por 30 s, extensão 72°C a 1 min/kb (30 ciclos) e extensão final 72°C por 10 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose a 1% (m/v) submetido à eletroforese a 110 volts por 40 minutos. As bandas após corrida eletroforética foram visualizadas utilizando fotodocumentador.

3.4. Construção da linhagem contendo dois sRNAs

A partir dos resultados das linhagens desenvolvidas no item anterior, selecionou-se os dois sRNAs que exibiram os melhores resultados de produção de riboflavina e construiu-se uma linhagem contendo os dois sRNAs, ambos controlados pelo promotor Pgrac separadamente. A sequência do sRNAs *purR* foi amplificada por reação de PCR utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Invitrogen) e utilizando como molde o plasmídeo construído anteriormente contendo o sRNAs *purR*. A reação constituiu de água ultrapura para completar 50 µL, 10 µL tampão 5x Phusion HF, 1 µL de dNTPs 10 mM, 2,5 µL *primer forward* 10 µM, 2,5 µL *primer reverse* 10 µM, 100 ng DNA, 0,5 µL Phusion DNA polimerase (2U/µL). No termociclador, as condições foram desnaturação inicial a 98°C por 30 s, desnaturação 98°C por 10 s, anelamento 55,2°C por 30 s, extensão 72°C por 1:30 s (30 ciclos) e extensão final 72°C por 10 min. Os *primers* utilizados para amplificação foram desenhados contendo o sítio de ligação para o padrão de biobrick prefix (BBp – possui as sequências das enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) e biobrick suffix (BBs – possui as sequências das enzimas de restrição *SpeI* e *PstI*). A qualidade do DNA amplificado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%

desenvolvida a 110 volts por 40 min. As bandas após a migração eletroforética foram visualizadas utilizando fotodocumentador.

A sequência obtida por PCR foi fosforilada utilizando 1 µL de *dpnI* e após então clonada em plasmídeo integrativo pBS2E já contendo o sRNA *ribDG* construído anteriormente, usando as enzimas de restrição *SpeI* e *PstI* no plasmídeo, e *XbaI* e *PstI* na sequência do sRNA *purR* para a digestão (FastDigest, ThermoFisher). As condições para a digestão foram as seguintes: 3µL de tampão 10x FastDigest; água miliQ para 30 µL; 800 ng de DNA; 1 µl de cada enzima. O plasmídeo foi desfosforilado utilizando 1 µl da enzima FastAP adicionada simultaneamente na reação. A incubação foi feita por 2 horas à 37°C para o inserto e 6 horas para o plasmídeo, sendo logo após purificada seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher).

A enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) foi utilizada para ligação das partes. A reação constituiu em 2 µL de tampão 10x T4 DNA ligase, água ultrapura para 20 µL e 1 µL da enzima T4 DNA ligase (400.000U/µL), utilizando 100 ng de plasmídeo e 82 ng de inserto. As amostras foram incubadas a 22°C por 2 horas e a enzima inativada a 65°C por 15 min.

A transformação foi realizada em células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10. À 50 µL das células foram adicionados 10 µL da reação de ligação. As amostras foram mantidas no gelo por 30 m, incubadas à 42°C por 30 s, e por fim em gelo por 2 min para choque térmico. Aliquotas de 250 µL de meio SOC líquido (5 g/L extrato de levedura; 0,5 g/L cloreto de sódio; 20 g/L triptona; 0,186 g/L cloreto de potássio; 2,4 g/L sulfato de magnésio; glicose 20mM; pH 7,0-7,2) foram adicionadas às amostras e incubadas a 37°C por uma hora a 220 rpm. Após incubação, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com ampicilina com concentração final de 100 µg/mL. As placas foram cultivadas a 37°C overnight em estufa microbiológica. As colônias crescidas foram repassadas para meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C overnight sob agitação de 220 rpm.

Os plasmídeos extraídos das colônias crescidas foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para confirmação da clonagem. A reação de PCR para sequenciamento continha 1 µL *Big Dye Mix*, 3,5 µL tampão de sequenciamento 5X, 2 µL *primer reverse* ou *primer forward* 3,2 µM, 500 ng plasmídeo purificado e água ultrapura para 20 µL. As condições do termociclador foram desnaturação inicial a 96°C por 1 min, desnaturação 96°C por 10 s, anelamento 50°C por 5 s e extensão 60°C por 5 min. As amostras amplificadas foram

purificadas com o *BigDye Xterminator Purification Kit* (Applied Biosystems) seguindo as condições fornecidas pelo fabricante. As sequências obtidas foram analisadas nos softwares *Sequence Scanner v 2.0* (Applied Biosystems) e *Serial Clonner v 2.6.1* (Serial Basics).

Após confirmação, o plasmídeo contendo os dois sRNAs foi integrado no cromossomo de *B. subtilis* RF-SP como descrito no item 3.3. A confirmação da integração feita por PCR.

3.5. Construção da linhagem contendo o sistema de sRNAs

3.5.1. Clonagem do operon de sRNAs

Para a construção do operon de sRNAs, foram adquiridos 28 oligonucleotídeos (Tabela 1) semicomplementares de DNA, os quais foram anelados e estendidos utilizando a técnica de PCR Overlap Extension. Para tanto, foi necessário realizar primeiramente quatro reações de PCR com diferentes conjuntos das sequências em cada uma (sequências 1 a 8; 7 a 12; 13 a 20; e 19 a 28), a fim de evitar formação de estruturas secundárias e pareamento inespecífico. As reações foram montadas com 2,5 μ M de cada oligonucleotídeo. A partir dessas reações foram realizadas mais duas reações, sendo a primeira realizada com o produto obtido dos dois primeiros conjuntos de sequências e a outra reação feita utilizando o produto obtido dos dois últimos conjuntos de sequências. Para finalizar uma última reação foi realizada utilizando o produto obtido das duas reações anteriores. Todas as reações foram feitas seguindo o protocolo do fabricante da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (Invitrogen), que constituiu de água miliQ para 20 μ l; 0,4 μ l de dNTP's (10 mM); 1 μ l de *primer forward* (10 μ M); 1 μ l de *primer reverse* (10 μ M); 4 μ l de tampão 5x Phusion HF; 0,2 μ l de Phusion DNA polimerase (2U/ μ L). As reações foram desenvolvidas no termociclador nas condições: desnaturação inicial igual à 98°C por 30 s; desnaturação igual à 98°C por 30 s, anelamento à 55°C por 30 s, extensão à 72°C por 40 s (30 ciclos), e extensão final à 72°C por 5 min. Após cada reação, a qualidade do DNA amplificado foi analisada por eletroforese em gel de agarose. As bandas após corrida eletroforética foram visualizadas em transiluminador, e cortadas do gel para purificação seguindo o protocolo do fabricante do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Tabela 1: Sequências 5' – 3' dos oligonucleotídeos geradas no software GenDesign: Building Block Design (RE Overlap) e arranjadas de forma a formar um único sistema de sRNAs.

Numeração	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')
1	CTATCGAATTCAAAAAAAAAATCTAGAGGGTACCAGCTATTGTAACATAATCGGTA
2	GCTCCCTTTTCCGTTAGCTTTTTCACCCCGTACCGATTATGTTACAATAGCTGG
3	GAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTT T
4	ATCTCCCTTCCAATTTCAAGTGATAAGATAAAAAATTTTTCACGCTTACATCATT
5	ATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTGGAATTGTGAGC
6	TCCGGTGACAGCTAATTGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAATTCTTATA
7	AATTCCCAATTAGCTGTCACCGGATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTG
8	TTAAACAAAATTATTTGTAGAGGCTGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGA
9	GCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAGATTCAACAATTATGTGAGGTCGTGTTTCTA
10	CATCAGAAGTGCAAGCACAGCACTTGACGACTAGAAACACGACCTCACATAATTG
11	AGTGCTGTGCTTGCACTTCTGATGAGGCAGTGATGCCGAAACGACCTCTACAAAT
12	AGTTCATGAAGTTTCGTCGTTAAACAAAATTATTTGTAGAGGTCGTTTCGGCATC
13	TTTAACGACGAAACTTCATGAACCTACCCCGAGTCGTCAAGTGCTGTGCTTGC
14	CGTTTCGGCATCACTGCCTCATCAGAAGTGCAAGCACAGCACTTGACGACT
15	GAGGCAGTGATGCCGAAACGACCTCTACAAATAATTTTGTTTAAGATCATGTACG
16	CGTTGAGCGCTGTCAGAAACAAGCCATCCTCGTACATGATCTTAAACAAAATTA
17	CTTGTTTCTGACAGCGCTCAACGGGTGTGCTTCCCGTTCTGATGAGTCCGTG
18	TAAACAAAATTATTTGTAGAGGCGCTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGAACGGGA
19	CGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAACCATATCTACGATGAGAGTTGTGTTCCAAG
20	TCAGAATTAAGACACATTAATTGACTCCTCTTGGAACACAACCTCTCATCGTAGA
21	TCAATTAATGTGCTTTTAAATTCTGATGAGACGGTGACGTCGAAACTCCCT
22	TTGTATAACCTATGGTTAAACAAAATTATTTGTAGAGGGAGTTTCGACGTCACCG
23	TTTTGTTTAACCATAGGTTATACAAGTGATGAGAGACGCCAGCTGTCACC
24	CACGGACTCATCAGACCGGAAAGCACATCCGGTGACAGCTGGCGTCTCTC
25	TCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAA
26	CAGAGATCAACGGATGAATGTCGCATAATTTAAACAAAATTATTTGTAGAGGCT
27	GCGACATTCATCCGTTGATCTCTGACAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTT
28	GTGACTGCAGTTTTTTTTTACTAGTAACAGAAAAGCCCGCCTTTCGGCGGG

Fonte: o autor. GenDesign: Building Block Design (RE Overlap) - <http://54.235.254.95/cgi-bin/gd/gdOliDes.cgi>

O sistema com sRNAs sintéticos foi então clonado no plasmídeo integrativo pBS2E utilizando as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI* para a digestão tanto do inserto quanto do plasmídeo. Como dito anteriormente, este plasmídeo se integra no locus *lacA* do *B. subtilis* e possui o gene *erm* de resistência à eritromicina. Contém também o gene da RFP (Red Fluorescent Protein) e de resistência a ampicilina (*bla*) para clonagens em *E. coli* (RADECK *et al.*, 2013).

As condições para a digestão do plasmídeo pBS2E foram as mesmas descritas no item 3.4., sendo que as condições da digestão do sistema de sRNAs utilizadas foram: 1µL de tampão 5x FastDigest; água miliQ para 20µL; 400 ng de DNA; 0,5 µL de cada enzima. A incubação foi realizada por 90 min à 37°C e a inativação a 80°C por 20 min. Para a ligação das partes digeridas o protocolo utilizado também foi o mesmo do item 3.4., bem como a transformação em células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10 e a confirmação por meio de sequenciamento do tipo Sanger.

3.5.2. Mutação sítio-dirigida

O sequenciamento do plasmídeo pBS2E com o operon de sRNAs, mostrou a necessidade da realização de mutação sítio-dirigida com a finalidade de reparar mutações pontuais com potencial de alterar a estrutura, e consequente função, das RiboJs presentes no operon. Para tanto, foram desenhados primers específicos através do software PrimerX (LAPID; GAO, 2006), uma ferramenta capaz de projetar pares de iniciadores mutagênicos com base na sequência de DNA molde e na sequência de DNA com a mutação incorporada. As sequências iniciadoras são calculadas analisando o comprimento apropriado que codifica a mutação e seguem as restrições específicas, além da temperatura de fusão e conteúdo de CG.

Sendo assim, o plasmídeo pBS2E_Pgrac-sRNAoperon foi submetido a reação de mutação sitio dirigida nas seguintes condições: 50ng DNA molde; água miliQ para 20 µL; *primer foward* 125 ng; *primer reverse* 125 ng; 0,4 µL de dNTP's (10 mM); 4 µL de tampão 5x Phusion HF; 0,4 µL de Phusion DNA polimerase (2U/µL). A reação foi desenvolvida no termociclador nas condições: desnaturação inicial à 95°C por 60 s, desnaturação à 95°C por 50 s, anelamento à 60°C por 50 s, extensão à 72°C por 7 min, sendo um minuto para cada kb (18 ciclos); e extensão final à 72°C por 7 min. Logo após, foi adicionado à reação 1 µL de *Dpn1*, e a reação foi incubada por 1 h a 37°C. a fim de digerir o DNA molde.

A transformação foi realizada em células quimicamente competentes de *E. coli* TOP10, como já descrito no item 3.4., utilizando 20 µL da reação.

Para a transformação em *B. subtilis*, foram escolhidas três diferentes linhagens para testar a eficiência do sistema *B. subtilis* KO7, o *B. subtilis* RF-SP e *B. subtilis* RFAi (linhagem KO7 cujo operon *rib* está sob controle de um sistema de autoindução). O plasmídeo foi integrado no locus *lacA* do cromossomo.

3.6. Cultivo das linhagens obtidas em tubos

As linhagens de *B. subtilis* construídas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com eritromicina (1µg/mL). Também foram inoculados *B. subtilis* 168 (para controle negativo), nos testes iniciais, e *B. subtilis* RF-SP, KO7 e RFAi em placas de Petri contendo meio LB sólido. As placas foram incubadas a 37°C overnight em estufa microbiológica. As colônias crescidas foram passadas para LB líquido (suplementado com eritromicina 1 µg/mL quando necessário) e incubadas a 37°C *overnight* sob agitação de 220 rpm. Uma alíquota deste foi então inoculada em meio PW e em meio LB, e os cultivos incubados novamente a 37°C *overnight* sob agitação de 220 rpm.

Após o tempo de incubação foi determinada a OD a 600nm no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan) e realizado novo inoculo de forma a padronizar a OD₆₀₀ inicial em 0,1 em 5 mL de meio PW e em 5 mL de meio LB. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm

3.7. Aumento de escala

De acordo com os dados obtidos nos testes realizados em tubo nos experimentos com os sRNAs individuais e com o sistema de sRNAs, foram selecionadas as linhagens que apresentaram melhor produção e produtividade (produção/OD) de riboflavina. Essas linhagens foram então submetidas aos mesmos processos de preparação do inoculo descritos anteriormente com o cultivo principal desenvolvido em frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de meio PW. O cultivo foi desenvolvido a 37°C sob agitação de 220 rpm por 27 h. Vale ressaltar que a linhagem contendo os dois sRNAs não foram avaliadas em escala de tubo, somente em frascos Erlenmeyer.

Após resultados obtidos por esses cultivos, observou-se uma necessidade de otimização das condições de cultivo utilizadas. Sendo assim, optou-se pela diminuição da velocidade de agitação para 150 rpm, pela suposição de que a aeração obtida pela maior área do frasco e agitação anterior poderiam estar favorecendo o crescimento em detrimento da produção de riboflavina. Além disso, o cultivo foi desenvolvido por 40 h, visto que a agitação mais lenta prolongou a fase produtiva.

3.8. Produção de Riboflavina

Em todos os cultivos foram coletadas amostras de 1 mL para análises. As amostras foram coletadas no início do cultivo às 15h, 20h, 24h e 40h após o início.

As amostras foram analisadas quanto à densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) no leitor de microplacas Infinite M200 (Tecan) e no espectrofotômetro UV-Vis Genesys 10S (Thermo) para determinar o crescimento da cultura. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 16.000 xg por 30 min, para sedimentação das células. O sobrenadante foi recolhido e analisado quanto à fluorescência (excitação 445nm e emissão 524nm) no leitor de microplacas.

A leitura de fluorescência foi realizada principalmente nos testes iniciais em tubo, por ser mais simples e ter tempo de análise mais rápido, permitia uma análise rápida do perfil de produção de riboflavina das cepas cultivadas. Para isso, foi realizada uma calibração utilizando soluções padrões de riboflavina (Sigma Aldrich) que foram preparadas nas seguintes concentrações: 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M. A partir dessas soluções foi feita uma curva-padrão para calcular a produção de riboflavina pelas cepas construídas.

Vale ressaltar que nos últimos experimentos, após a otimização das condições de cultivo em frascos Erlenmeyer, foi observado o acúmulo da riboflavina em forma de cristais, devido à baixa solubilidade da mesma, dessa forma para evitar perda de riboflavina durante a centrifugação, as amostras foram diluídas anteriormente para solubilizar a riboflavina acumulada, tendo os valores de concentração corrigidos de acordo com a diluição após a quantificação.

Em seguida foi adicionado ao sobrenadante das amostras ácido Tricloroacético (concentração final igual a 1%), sendo, após misturar bem, centrifugado em velocidade máxima por 20 minutos com o objetivo de precipitar as proteínas existentes. O sobrenadante então foi diluído de acordo com a curva de calibração feita para análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O sistema de HPLC utilizado foi da classe Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments) consistindo de bomba modelo LC-20AD, controlador de sistema CBM-20A, detector fotodiodo SPD-M20A e coluna Poroshell 120 EC-C18 de 50 x 3 mm com tamanho de partícula 2.7 μ m (Agilent Technologies) em forno isotérmico a 30°C. Para detectar a riboflavina a absorbância foi monitorada em 445 nm pelo detector de fotodiodo. Uma alíquota de 20 μ L de padrão ou amostra foi injetada na coluna e a separação foi realizada usando fluxo contínuo de 0,5 mL/min

em fase móvel contendo 82% do solvente A (20 mM de Ácido fórmico + 20 mM de Formiato de amônio) e 18% do solvente B (Metanol padrão HPLC). O solvente A foi filtrado com microfiltro 0,45 μm e ambos os solventes foram degaseificados usando ultrassom por 10 minutos.

A curva de calibração também foi feita utilizando soluções padrões de riboflavina (Sigma Aldrich) que foram preparadas nas seguintes concentrações: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . A partir dessas soluções foi feita uma curva-padrão para calcular a produção de riboflavina pelas cepas construídas.

As amostras já diluídas e os padrões preparados foram então filtrados utilizando filtro hidrofílico PTFE 0,20 μm e injetadas no sistema de HPLC, de acordo com o que foi apresentado anteriormente.

3.9. Análises estatísticas

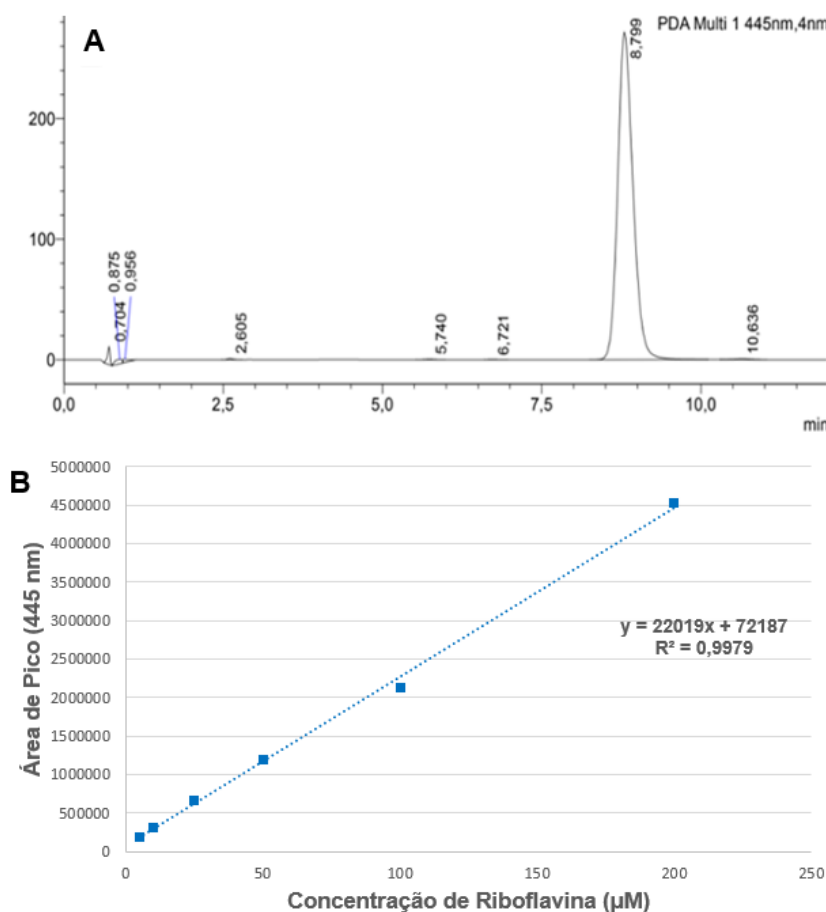
Todos os experimentos realizados neste projeto foram efetuados em triplicata e nas mesmas condições para obtenção de médias e desvios padrão. Nos dados de produção e produtividade obtidos dos cultivos realizados foi feita análise de variância (ANOVA) e teste Tukey (95% de confiança) utilizando o software Minitab (versão 10.0.19041) para comparar as médias e observar a significância dos resultados. Quando os dados se apresentaram não-paramétricos o teste Kruskal-Wallis foi utilizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Calibração para quantificação da riboflavina em HPLC

Inicialmente foram injetadas amostras de riboflavina em diferentes concentrações no HPLC para verificação do tempo de retenção na coluna e quantificação da área do pico de detecção. Como pode ser observado, a riboflavina apresentou picos e áreas bem definidos (Figura 5 A), permitindo o desenvolvimento de uma reta-padrão eficaz na determinação de concentração desta molécula, com base na área de pico obtida no cromatograma (Figura 5 B). A equação da reta foi calculada e o R^2 foi adequado para prever as concentrações de riboflavina das amostras analisadas.

Figura 5: Calibração do HPLC com riboflavina. **A.** Cromatograma para riboflavina a concentração de 200 µM obtido em HPLC. **B.** Curva de calibração do HPLC para diferentes concentrações de riboflavina, contendo a equação da reta e o R^2 calculados.



Fonte: o autor.

4.2. Determinação do meio a ser utilizado e avaliação de crescimento celular utilizando as cepas contendo os sRNAs individuais

O teste foi realizado com dois diferentes meios, o meio Pw e o meio LB, com o objetivo de determinar qual seria o melhor deles para o crescimento das linhagens e produção de riboflavina.

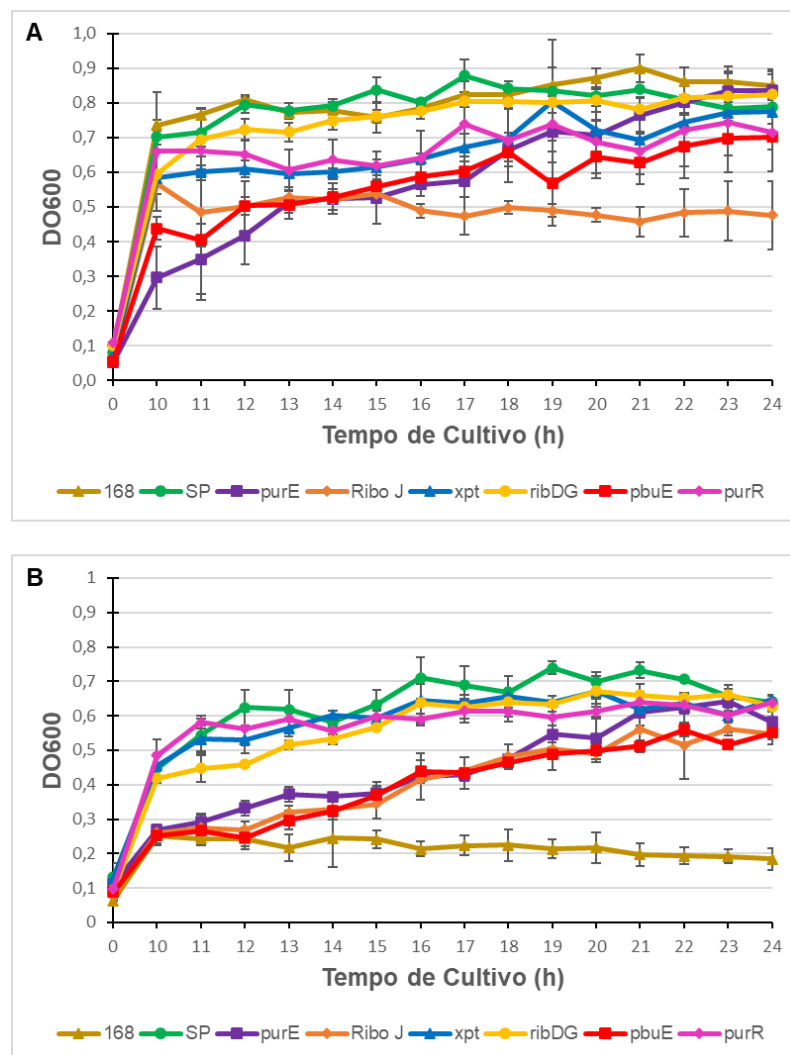
Foram inoculadas em ambos os meios as linhagens de *B. subtilis* do tipo selvagem 168 (controle negativo), *B. subtilis* RF-SP (controle positivo), e as seis linhagens de *B. subtilis* RF-SP contendo cada um dos sRNAs. Para análise foram coletadas amostras no início e após dez horas de cultivo foram feitas coletas a cada hora até completar 24 horas de cultivo.

Comparando os meios testados, as linhagens engenheiradas de *B. subtilis* cresceram de forma similar (Figura 6). Apenas a linhagem 168 apresentou crescimento restrito em meio PW.

As linhagens *B. subtilis* RF-SP::sRNA-purR, *B. subtilis* RF-SP::sRNA-ribDG e *B. subtilis* RF-SP::sRNA-xpt apresentaram um padrão de crescimento similar à linhagem parental nos dois meios. Isso é um indicio de que a expressão dos sRNAs não representa um fardo metabólico para as células.

Os resultados obtidos tanto com o meio LB quanto com o meio Pw mostraram-se não-paramétricos, exigindo a utilização do método estatístico de Kruskal-Wallis que demonstrou diferença significativa entre os resultados de crescimento entre as cepas, no meio Power a cepa parental acabou sofrendo uma decaída no seu crescimento, provavelmente pela constituição do meio.

Figura 6: Crescimento celular de diferentes linhagens de *B. subtilis* RF-SP. **A.** Em meio LB. **B.** Em meio PW.

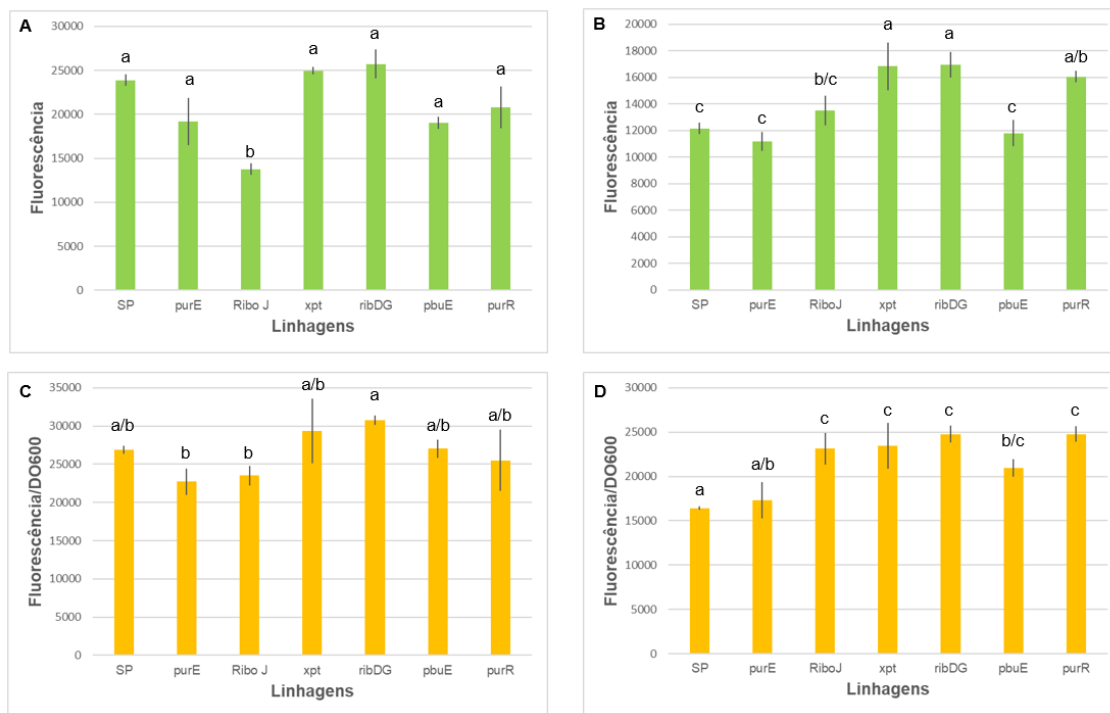


Fonte: o autor.

Em relação à produção de riboflavina, nota-se que no meio Pw (Figura 7 B) essa se deu de forma similar, e nos casos do *B. subtilis* RF-SP::sRNA-purR, *B. subtilis* RF-SP::sRNA-ribDG e *B. subtilis* RF-SP::sRNA-xpt superior ao do controle positivo, mostrando assim eficiência na reprogramação do metabolismo de riboflavina na célula. Como demonstrado por Lins *et al.* (2021) em estudo realizado *in vitro* os sRNAs sintéticos foram capazes de contrapor a regulação dos *riboswitches*, bloqueando a formação do terminador e favorecendo a formação do anti-terminador. Como resultado, ocorre a transcrição integral do gene, mesmo com a presença de altas concentrações de purinas. A autora também demonstrou que sistemas de *riboswitch*-sRNA em *B. subtilis* apresentam-se funcionais a partir de testes com gene repórter.

Entretanto ao analisar os dados obtidos em meio LB (Figura 7 A) observa-se que a produção de riboflavina das linhagens contendo os sRNAs foram mais baixas que o controle positivo, com exceção de *B. subtilis*::sRNA-xpt e *B. subtilis*::sRNA-ribDG. Estes produziram riboflavina em níveis similares ao controle. O mesmo também ocorre quando se avalia a produtividade (produção/OD₆₀₀) (Figura 1 C). Já nos cultivos em meio Pw é possível observar que em todos os casos a produtividade foi maior que a do controle positivo (Figura 1 D), única exceção *B. subtilis*::sRNA-purE, que teve um resultado estatisticamente igual à cepa parental. A análise da produção/OD₆₀₀ permite identificar potenciais bons produtores com dificuldades de crescimento na condição estabelecida, o que pode indicar necessidade de otimização mais extensa do meio e condições de cultivo.

Figura 7: Produção de riboflavina em diferentes linhagens de *B. subtilis* em meio LB (A) e em meio PW (B) e Produtividade em meio LB (C) e em meio Power (D). Onde: SP = *B. subtilis* RF-SP; purE = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-purE; RiboJ = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-RiboJ-sRNA-purE; xpt = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-xpt; ribDG = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-ribDG; pbuE = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-pbuE; purR = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-purR. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a, b e c) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Com base nos resultados apresentados, observou-se que a produção de riboflavina pelas linhagens engenheiradas foi mais eficiente utilizando o meio Pw do que em LB, levando a utilização deste meio nos experimentos subsequentes.

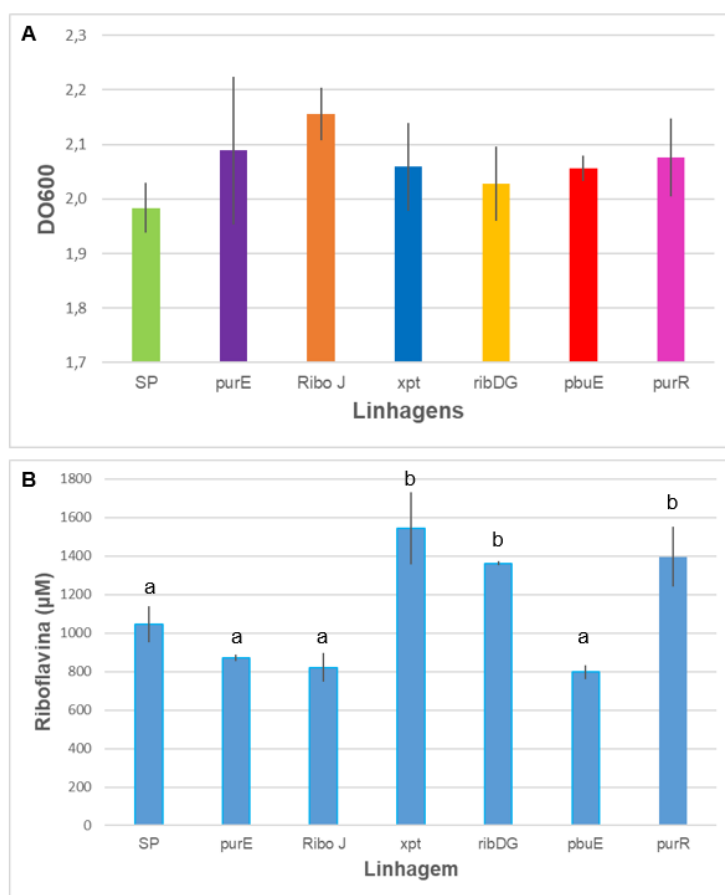
4.3. Produção de riboflavina em linhagens contendo sRNAs individuais

4.3.1. Crescimento celular e produção de riboflavina em escala de tubo

Definido o meio no qual iria se seguir os experimentos, o cultivo utilizando as linhagens contendo os sRNAs individuais foram realizados novamente, coletando-se, dessa vez, amostras do início do cultivo e após 20 h de cultivo. A partir desta etapa, a quantificação de riboflavina passou a ser realizada por HPLC.

Observou-se que, em relação ao crescimento não houve diferença significativa do teste realizado anteriormente, tendo as linhagens de *B. subtilis* contendo os sRNAs crescimento estatisticamente similar à linhagem de *B. subtilis* RF-SP (parental). Destacaram-se aqui as linhagens *B. subtilis*::sRNA-*purE* e *B. subtilis*::RiboJ-sRNA-*purE*, que apresentaram um crescimento levemente superior ao controle (Figura 8 A).

Figura 8: **A.** Crescimento de diferentes linhagens de *B. subtilis* em meio PW. **B.** Produção de riboflavina pelas linhagens de *B. subtilis* após 20 horas. Onde: SP = *B. subtilis* RF-SP; *purE* = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*purE*; RiboJ = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-RiboJ-sRNA-*purE*; *xpt* = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*xpt*; *ribDG* = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*ribDG*; *pbuE* = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*pbuE*; *purR* = *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*purR*. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Entretanto, ao considerar a produção de riboflavina (Figura 8 B), notou-se que *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*purR*, *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*ribDG* e *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*xpt* foram os únicos que apresentaram produção maior de riboflavina que o controle, apesar de todas as amostras apresentarem picos com áreas de forma bem definida e isoladas de quaisquer

interferentes. A produção foi tão superior nessas cepas que a cepa com *xpt*, que foi a com melhor resultado, produziu quase 48% a mais que a cepa controle. Importante ressaltar aqui, que a unidade de transcrição desses sRNAs se encontram em cópia única no genoma em uma linhagem estável, demonstrando um resultado muito promissor. É importante ressaltar também que o desempenho baixo dos outros sRNAs não significa necessariamente que eles não estão agindo corretamente. É possível que as conversões pela enzima cuja expressão é regulada já funcionem em capacidade máxima, ou seja, pode ser que seja funcional, como já foi demonstrado em trabalhos anteriores (LINS *et al.*, 2021), porém no metabolismo o aumento da expressão gênica não resulte no aumento do fluxo pela via.

Outra possível causa para a baixa produção das linhagens restantes são as taxas de transcrição e degradação (RNA *turnover*) que determinam a quantidade de RNA transcrito em uma célula. Como o RNA possui um tempo de meia vida baixo sendo degradado por RNases, pode-se sugerir que isso tenha ocorrido com os sRNAs inseridos, diminuindo assim a capacidade de ação na regulação gênica dos *riboswitches* (CASCANTE-ESTEPA; GUNKA; STÜLKE, 2016). Uma possível solução é justamente a inserção de sequências com estruturas secundárias complexas ao sRNA, aumentando assim a estabilidade na célula (CONDON, 2003). Essa estratégia foi utilizada na linhagem de *B. subtilis*:: RiboJ-sRNA-*purE*, que possui uma RiboJ fusionada à extremidade 5' do sRNA. Apesar de ter se mostrado eficaz anteriormente (LINS *et al.*, 2021), a estratégia não resultou em maior produção de riboflavina, reforçando a indicação de que a expressão do operon *pur* não é limitante para a biossíntese de riboflavina na linhagem parental.

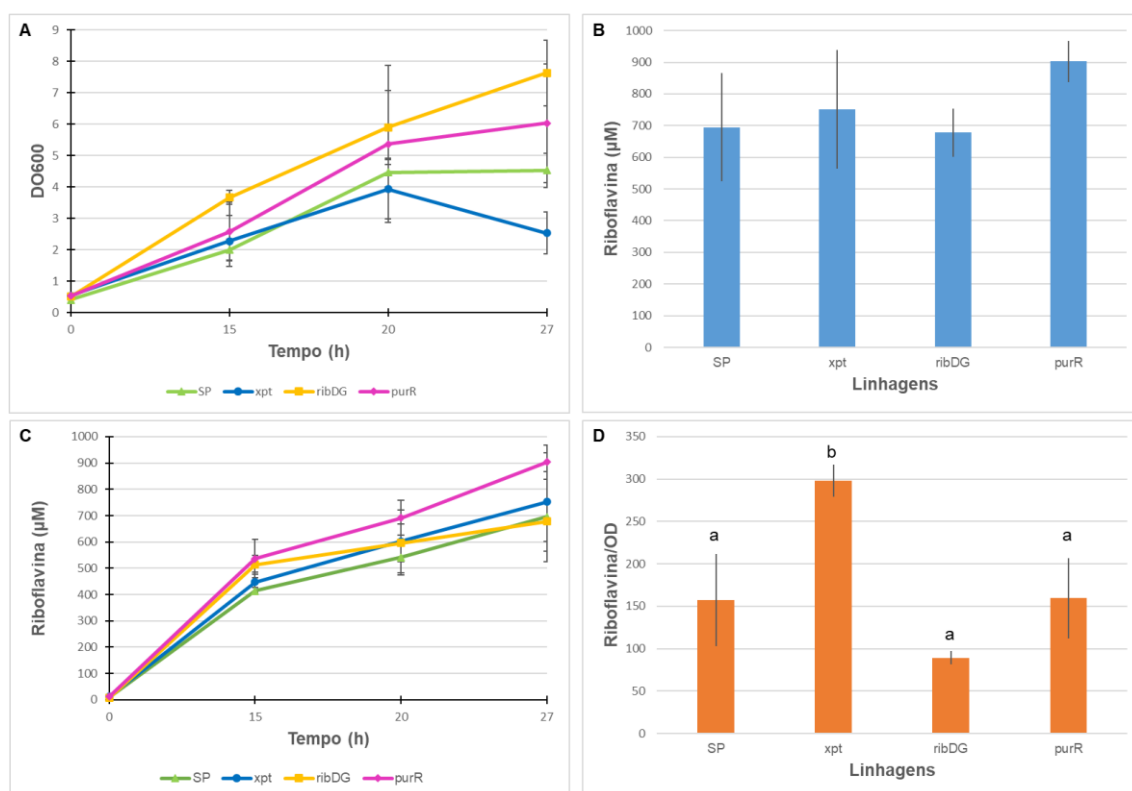
4.3.2. Aumento de escala para frascos Erlenmeyer

A partir dos dados obtidos nos experimentos descritos anteriormente, selecionou-se as linhagens *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*purR*, *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*ribDG* e *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*xpt* que apresentaram os melhores resultados em relação à produção de riboflavina, assim como a linhagem de *B. subtilis* RF-SP como controle, para cultivo em frascos Erlenmeyer de 250 mL preenchidos com 20 mL de meio Pw. Foram feitas coletas de amostras para avaliar crescimento e produção no início do cultivo e após 15, 20 e 27 h de cultivo.

O crescimento das linhagens foi favorecido no cultivo em frasco Erlenmeyer (Figura 9 A), como esperado, devido à melhor distribuição de oxigênio e nutrientes. Dentre as linhagens

analisadas, a que se destacou foi a linhagem contendo o sRNA-*ribDG* que, mesmo após 27 h, ainda apresentava crescimento aparentemente exponencial.

Figura 9: **A.** Crescimento celular medido em espectrofotômetro das linhagens de *B. subtilis* RF-SP contendo os sRNAs *xpt*, *ribDG* e *purR*, separadamente, bem como da linhagem parental (SP) após 27h de cultivo em frasco Erlenmeyer sob agitação de 220 rpm. **B.** Produção de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis*. **C.** Produção de riboflavina em relação ao tempo das linhagens de *B. subtilis*. **D.** Produtividade de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis*. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Em relação à produção de riboflavina analisada por HPLC, as linhagens construídas não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e em comparação à linhagem controle (Figura 9 B). Entretanto ao analisar a produção de riboflavina de acordo com o tempo (Figura 9 C), é possível notar que todas as linhagens construídas produziram maior quantidade de riboflavina em relação ao controle até às 20h de cultivo. Contudo, às 27h é possível notar que a cepa contendo o sRNA-*ribDG* diminui consideravelmente a sua velocidade de produção. Ao analisar a produtividade (Figura 9 D) a única linhagem que foi melhor que o controle foi *B. subtilis*::sRNA-*xpt*, sendo o resultado estatisticamente diferente dos demais.

Entretanto essa limitação de produção pode ser proveniente de um problema com as condições de cultivo aplicadas ao realizar aumento de escala, tendo em vista que o tempo de produção de riboflavina em *B. subtilis* é relativamente alto, como já foi averiguado em diversos estudos. Um exemplo foi demonstrado no trabalho realizado por Perkins e seus colaboradores (1999), onde utilizando uma cepa de *B. subtilis* contendo várias cópias do operon *rib* em seu cromossomo, produziu-se cerca de 15 g/L de riboflavina em 56h de cultivo, em fermentador com condições já otimizadas.

Outro fator que pode ter contribuído para a baixa produção é a agitação do meio, essa hipótese foi levantada ao se comparar os resultados obtidos em tubo com os obtidos em Erlenmeyer. Enquanto que nos cultivos em Erlenmeyer nenhuma linhagem ultrapassou a concentração de 900 µM de riboflavina, em tubo a melhor linhagem atingiu produção em torno de 1600 µM. Ao contrário do Erlenmeyer, o tubo de ensaio não permite uma boa oxigenação do meio. Assim, pode-se inferir que essa diferença de oxigenação esteja fazendo com que o microrganismo priorize o acúmulo de massa celular em detrimento da produção de riboflavina.

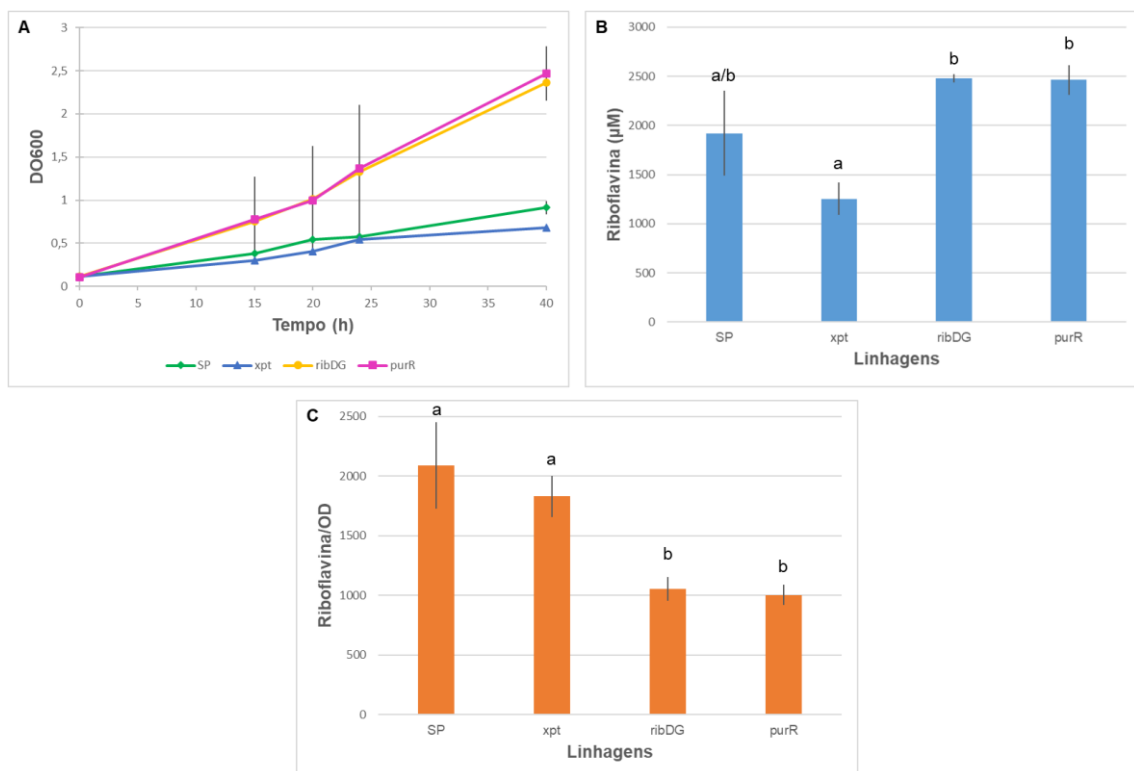
Então, visando contornar este problema outro cultivo em Erlenmeyer foi realizado utilizando uma velocidade de agitação menor (150rpm) e aumentando o tempo de cultivo para 40h.

Como esperado, o crescimento celular das cepas foi prejudicado pela diminuição da aeração (Figura 10 A), apesar das linhagens contendo os sRNAs *ribDG* e *purR* ainda apresentarem crescimento elevado para as condições de cultivo. Outro estudo realizado com cepas com modificações no riboswitch *ribDG* e no gene *purR* editadas através da técnica de CRISPR-Cas9, com o mesmo objetivo de criar uma cepa produtora de riboflavina, também apresentou uma melhoria na densidade celular semelhante a encontrada neste trabalho. As modificações foram realizadas tanto em *B. subtilis* 168 quanto em *B. subtilis* RF-SP, e em ambas alcançaram densidades celulares acima das cepas parentais. Principalmente a cepa *B. subtilis* RF-SP, que apresentou aumento de 53% no crescimento celular em 16h (Boumezbeur *et al.*, 2020). Já as linhagens *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*purR* e *B. subtilis* RF-SP::sRNA-*ribDG*, construídas neste trabalho, apresentaram aumento da densidade populacional em 170% e 160%, respectivamente, após 40h. Alcançar melhorias de crescimento análogas usando ferramentas diferentes indica que há níveis não previstos de limitação de crescimento de expressão gênica nas vias de purina e riboflavina que foram aliviados por ambas as abordagens.

Em relação à produção de riboflavina (Figura 10 B), os sRNAs *ribDG* e *purR* promoveram maior produção em relação ao controle. Mas a diferença não foi estatisticamente relevante, já que o controle apresentou um alto desvio. Ainda assim, a produção de riboflavina para essas linhagens superou os valores obtidos em tubo em cerca de 82% e 76%, respectivamente. A linhagem contendo o sRNA *xpt* apresentou produção menor do que o restante, mas não estatisticamente diferente do controle. A produção de riboflavina para essa linhagem manteve o mesmo nível que em escala de tubo. O desempenho do sRNA-*xpt* mostrou-se abaixo do esperado, com base nos resultados anteriores.

Em relação à produtividade (Figura 10 C), a única linhagem estatisticamente similar ao controle foi a que continha o sRNA *xpt*, sendo que as outras duas linhagens apresentaram valores menores.

Figura 10: Crescimento celular (A), produção (B) e produtividade (C) das linhagens de *B. subtilis* contendo os sRNAs *xpt*, *ribDG* e *purR*, separadamente, bem como da linhagem parental (SP) após 40h de cultivo em frasco Erlenmeyer sob agitação de 150 rpm. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



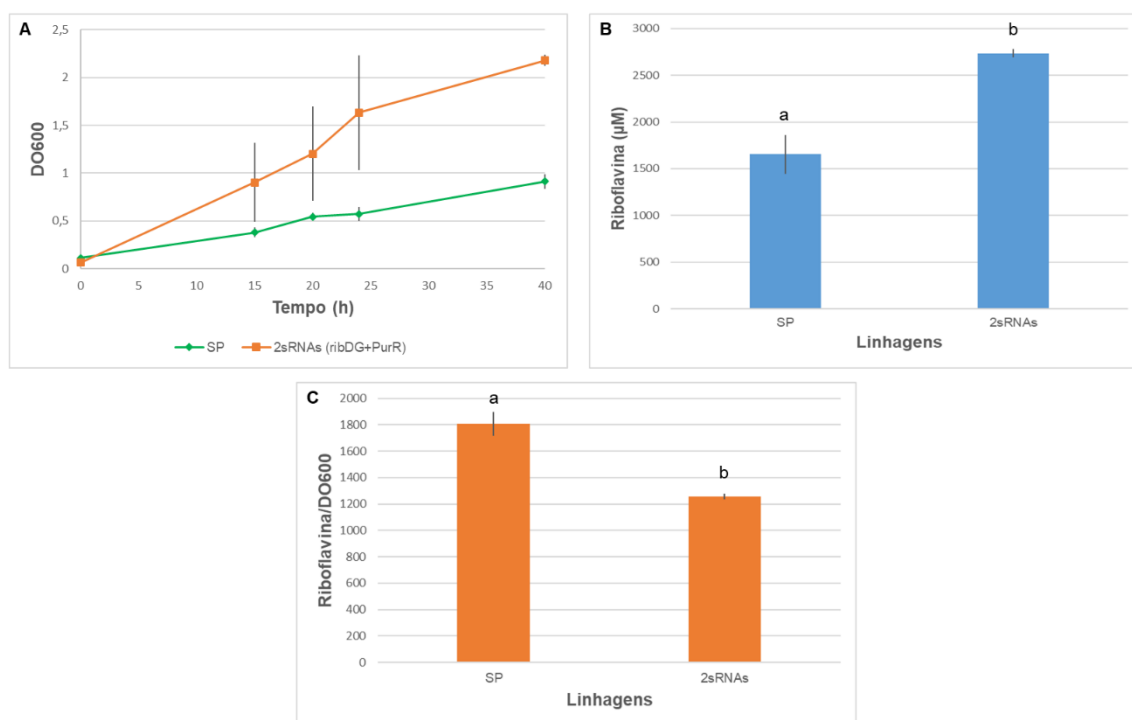
Fonte: o autor.

4.4. Produção de riboflavina por linhagem contendo dois sRNAs

De acordo com os resultados obtidos no item anterior, analisou-se a possibilidade de construção de uma cepa que possuísse os dois sRNAs que se mostraram mais promissores, sendo eles o sRNA-*ribDG* e o sRNA-*purR*, para mensurar se o efeito obtido individualmente poderia ser somatório ao se colocar os dois juntos. Sendo assim, cada sRNA formando sua própria unidade de transcrição foi integrado no genoma de *B. subtilis* RF-SP.

A linhagem obtida foi cultivada utilizando os parâmetros já estabelecidos no item anterior de agitação e tempo de cultivo, em frascos Erlenmeyer. A inserção de dois sRNAs no cromossomo de *B. subtilis* RF-SP, aparentemente, não interferiu na capacidade da célula de acumular biomassa, tendo seu crescimento celular superior ao controle. Isso demonstra que, apesar de ter adicionando mais uma unidade de transcrição, os sRNAs não parecem apresentar carga metabólica significativa para a célula (Figura 11 A).

Figura 11: **A.** Crescimento celular realizado pelas linhagens de *B. subtilis* contendo os sRNAs *ribDG* e *purR*, no mesmo lócus, bem como o controle sem nenhum sRNA (SP) após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW com agitação de 150 rpm. **B.** Produção de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis*. **C.** Produtividade de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis*. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Analisando a produção (Figura 11 B), a linhagem contendo os dois sRNAs apresentou um aumento na concentração de riboflavina de 65% em relação ao controle, demonstrando que a estratégia de se utilizar os sRNAs *ribDG* e *purR* simultaneamente para o aumento da produção foi eficiente.

Entretanto, é importante observar que a produtividade (Figura 11 C) demonstrou diferença estatística entre as linhagens cultivadas, o que pode ser explicado pelo melhor crescimento das culturas da linhagem *B. subtilis*::sRNA-*ribDG*-sRNA-*purR* comparado ao crescimento da linhagem parental. A melhora na capacidade de crescimento foi anteriormente observada para as linhagens expressando os sRNAs individualmente. O baixo crescimento é um problema da linhagem *B. subtilis* RF-SP em diferentes meios de cultura, que, aparentemente, foi solucionado pelos sRNAs.

A fim de melhor avaliar a produção de riboflavina por essa linhagem, um novo cultivo foi desenvolvido em paralelo com outras linhagens promissoras, e será apresentado no item 4.6.

4.5. Produção de riboflavina em linhagens contendo operon de sRNAs

4.5.1. Integração do sistema de sRNAs no cromossomo de *B. subtilis*

A fim de avaliar a atividade conjunta dos sRNA no metabolismo de riboflavina, foi construído um operon de sRNAs. A inserção de muitas sequencias repetitivas, neste caso promotor e terminador, pode resultar em recombinação homóloga no cromossomo da célula, resultando em excisão das sequencias inseridas. Para evitar esse problema e ainda assim construir uma linhagem portando mais de dois sRNAs, foi construído um operon onde apenas um promotor e um terminador governam a transcrição de cinco sRNAs. Para promover a separação dos sRNAs e permitir que individualmente encontrem seus alvos, foram adicionadas ribozimas do tipo RiboJ. As RiboJs foram testadas em fusão com os sRNA *in silico* no pacote Nupack (ZADEH *et al.*, 2012). Nenhuma alteração de estrutura e função foi detectada na simulação.

Ao sequenciar o plasmídeo contendo o operon de sRNAs construído por *overlapping* PCR, foi possível observar cinco mutações pontuais na sequência de nucleotídeos codificadora (Figura 12 e Figura 13). Nota-se que as mutações ocorreram nas sequências das diferentes RiboJs presentes no sistema.

Figura 12: Alinhamento entre sequência do sistema de sRNAs clonados em *E. coli* TOP10 (na imagem Seq_1) e sequência obtida através de sequenciamento realizado com primers forward (A) e reverse (B) (na imagem Seq_2). Onde em: **Azul** observa-se os nucleotídeos correspondentes ao promotor P_{grac}; **Roxo** os nucleotídeos correspondentes à ribozima RiboJ; **Marrom** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch purE*; **Laranja** os nucleotídeos correspondentes à ribozima RiboJ60; **Verde-claro** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch purR*; **Amarelo** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch nupG*; **Cinza** os nucleotídeos correspondente à ribozima RiboJ10; **Rosa** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch xpt*; **Vermelho** os nucleotídeos correspondentes à ribozima RiboJ64; **Verde** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch pbuE*; **Azul escuro** os nucleotídeos correspondentes ao sRNA regulador do *riboswitch pbuG*; **Vinho** o terminador T500; A seta indica onde os nucleotídeos foram deletados durante o processo de síntese e clonagem do sistema.

A	Seq_1	1	-----AATCGGTACGGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGA	42
	Seq_2	6241	TACCAGCTATTGTAACATAATCGGTACGGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGA	6300
	Seq_1	43	AAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTTTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATT	102
	Seq_2	6301	AAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTTTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATT	6360
	Seq_1	103	CTTTATTATAAGAATTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAGCTGTCACCGG	162
	Seq_2	6361	CTTTATTATAAGAATTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCAATTAGCTGTCACCGG	6420
	Seq_1	163	ATGTGCTTTCCGGT--GATGAGTCCGT-AGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTT	219
	Seq_2	6421	ATGTGCTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTT	6480
	Seq_1	220	TAAGATTCAACAATTATGTGAGGTCGTGTTTCTAGTCGTCAAGTGCTGTGCTTGCACTTC	279
	Seq_2	6481	TAAGATTCAACAATTATGTGAGGTCGTGTTTCTAGTCGTCAAGTGCTGTGCTTGCACTTC	6540
	Seq_1	280	TGATGAGGCAGTGATGCCGAA-CGACCTCTACAAATAATTTTGTTTAACGACGAAACTTC	338
	Seq_2	6541	TGATGAGGCAGTGATGCCGAAACGACCTCTACAAATAATTTTGTTTAACGACGAAACTTC	6600
	Seq_1	339	ATGAACTCACCCCGAGTCGTCAAGTGCTGTGCTTGCACTTCTGATGAGGCAGTGATGCCG	398
	Seq_2	6601	ATGAACTCACCCCGAGTCGTCAAGTGCTGTGCTTGCACTTCTGATGAGGCAGTGATGCCG	6660
	Seq_1	399	AAACGACCTCTACAAATAATTTTGTTTAAGATCATGTACGAGGATGGCTTGTTTCTGACA	458
	Seq_2	6661	AAACGACCTCTACAAATAATTTTGTTTAAGATCATGTACGAGGATGGCTTGTTTCTGACA	6720
	Seq_1	459	GCGCTCAACGGGTGTGCTTCCCGT-CTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCGCCTCTACAA	517
	Seq_2	6721	GCGCTCAACGGGTGTGCTTCCCGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAGCGCCTCTACAA	6780
	Seq_1	518	ATAATTTTGTTTAACCATATCTACGATGAGAGTTGTGTTCCAAGAGGAGTCAATTAATG-	576
	Seq_2	6781	ATAATTTTGTTTAACCATATCTACGATGAGAGTTGTGTTCCAAGAGGAGTCAATTAATGT	6840
	Seq_1	577	GCTTTTAATTCTGATGA-----	593
	Seq_2	6841	GCTTTTAATTCTGATGAGACGGTGACGTCGAACTCCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAC	6900

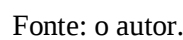
B

Seq_1	461	GCTTGTCTTCTGACAGCGCTCAACGGGTGTGCTTCCCGT-CTGATGAGTCCGTGAGGACGA	519
Seq_2	6707		
Seq_1	520	AAGCGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAACCATATCTACGATGAGAGTTGTGTTCCAAGAG	579
Seq_2	6767		
Seq_1	580	AAGCGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAACCATATCTACGATGAGAGTTGTGTTCCAAGAG	6826
Seq_2	6827		
Seq_1	580	GAGTCAATTAATG-GCTTTTAATTCTGATGAGACGGTGACGTCGAAACTCCCTCTACAAA	638
Seq_2	6827		
Seq_1	639	GAGTCAATTAATGTGCTTTTAATTCTGATGAGACGGTGACGTCGAAACTCCCTCTACAAA	6886
Seq_2	6887		
Seq_1	639	TAATTTTGTTTAACCATAGGTTATACAAGTGATGAGAGACGCCAGCTGTCACCGGATGTG	698
Seq_2	6887		
Seq_1	699	TAATTTTGTTTAACCATAGGTTATACAAGTGATGAGAGACGCCAGCTGTCACCGGATGTG	6946
Seq_2	6947		
Seq_1	699	CTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAAT	758
Seq_2	6947		
Seq_1	759	CTTTCCGGTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACAGCCTCTACAAATAATTTTGTTTAAAT	7006
Seq_2	7007		
Seq_1	759	TATGCGACATTCATCCGTTGATCTCTGACAA-GCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTA	817
Seq_2	7007		
Seq_1	818	TATGCGACATTCATCCGTTGATCTCTGACAAAGCCCGCCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTA	7066
Seq_2	7067		
Seq_1	818	CTAGTCAACAAAACACTCGATATCGATTTCAAGCTATAAATTGAAAAAAATTATCTACA	877
Seq_2	7067		
Seq_1	818	CTAGT-----	7071
Seq_2	7067	CTAGT-----	

Fonte: o autor.

Figura 13: Cromatograma do sequenciamento realizado com primers forward (A) e reverse (B).

A



De acordo com estudos realizados anteriores, as RiboJs são compostas de dois elementos: uma ribozima com estrutura *hammerhead*, que cliva seu próprio RNA na extremidade 5' e, assim, remove as sequências *upstream* que derivam do promotor; e uma estrutura “hairpin” adicional na extremidade 3' da ribozima. Essas sequências foram elucidadas, apresentando quais as sequências de nucleotídeos conservadas para a formação da estrutura secundária da ribozima e quais as regiões mutáveis. O autor salienta que ao todo a sequência da RiboJ totaliza 75 pares de base, sendo grande o suficiente para sofrer recombinação homóloga se usada mais de uma vez em um circuito genético, justificando assim a utilização de diferentes ribozimas no sistema de sRNAs desenvolvido neste trabalho (NIELSEN *et al.*, 2016).

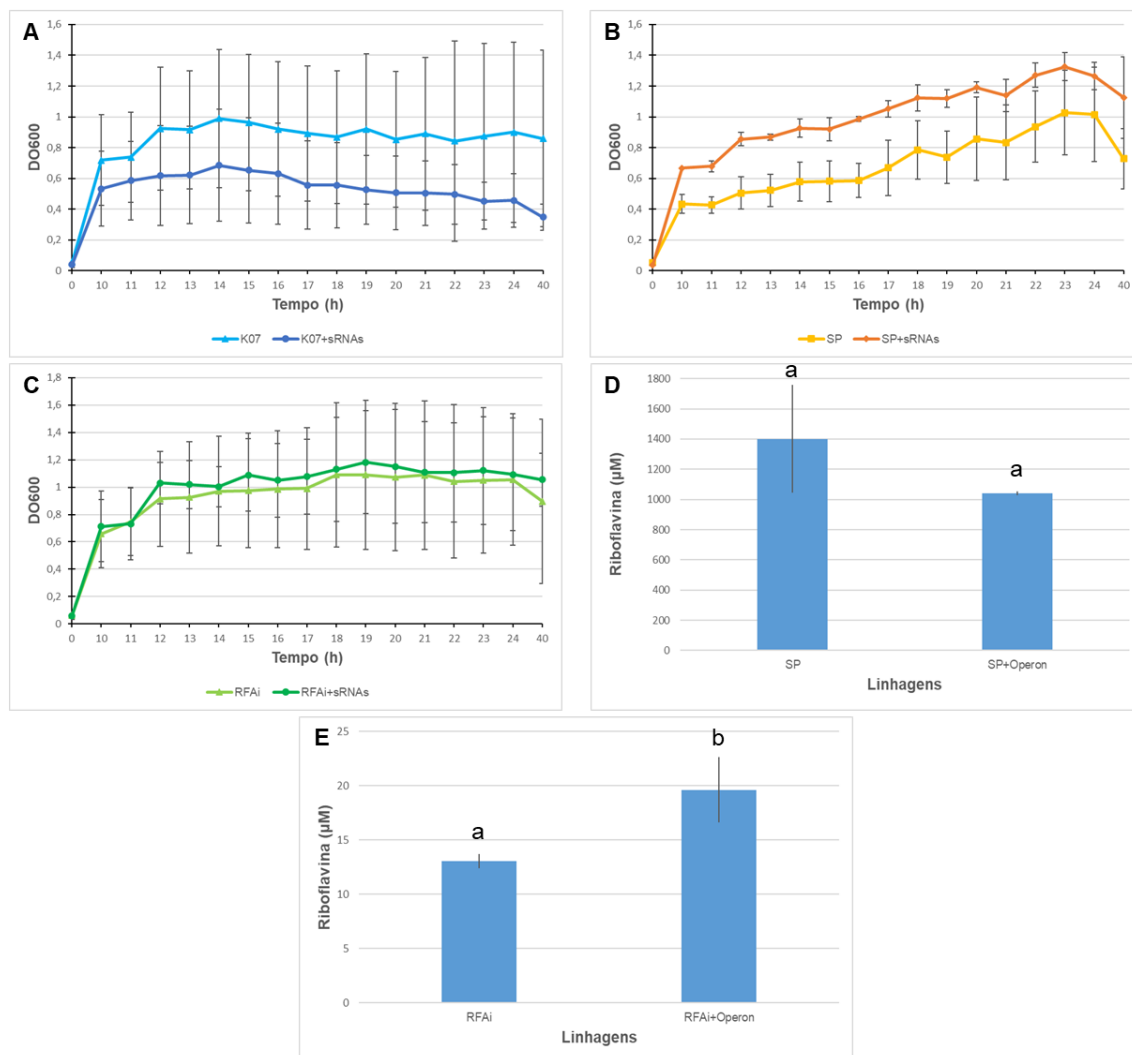
Dessa forma, realizou-se a análise da localização estrutural dos nucleotídeos deletados revelando que a mutação localizada na RiboJ10 se encontra na região mutável, na RiboJ e na RiboJ64 estão presentes na região livre dos loops da ribozima, não sendo então necessária a correção dessas mutações devido às mesmas não interferirem na estrutura e função das RiboJs.

Entretanto a deleção de um nucleotídeo presente no núcleo catalítico da RiboJ60 exigiu correção. Para tanto foi realizada reação para mutação sítio-dirigida utilizando primers específicos. O procedimento foi capaz de corrigir a mutação identificada.

4.5.2. Crescimento celular e produção de riboflavina em escala de tubo

Para análise do operon de sRNAs optou-se por inseri-lo no genoma de três diferentes cepas de *B. subtilis*: KO7, RF-SP e RFAi. Assim, as linhagens resultantes dessa integração foram cultivadas junto com as cepas parentais. A maioria das linhagens construídas cresceu de forma similar ao seu controle (Figura 14 A, B e C), com exceção do *B. subtilis* KO7 com o sistema de sRNAs que, apesar de apresentar um padrão de crescimento parecido ao controle, não conseguiu crescer tanto quanto o mesmo. Esse resultado demonstrou que, na maioria dos casos, o sistema de sRNAs não apresentou um estresse metabólico significativo à célula.

Figura 14: **A.** Curva de crescimento da linhagem de *B. subtilis* KO7 com e sem o operon de sRNAs, em meio PW. **B.** Curva de crescimento da linhagem de *B. subtilis* RF-SP (SP) com e sem o operon de sRNAs, em meio PW. **C.** Curva de crescimento da linhagem de *B. subtilis* RFAi, com e sem o operon de sRNAs, em meio PW. **D.** Produção de riboflavina, quantificada por HPLC, pelas linhagens de *B. subtilis* RF-SP, com e sem o sistema de sRNAs, após 20 horas de cultivo em meio PW. **E.** Produção de riboflavina pelas linhagens de *B. subtilis* RFAi com e sem o operon de sRNAs, após 20h de cultivo. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Segundo alguns autores, apesar da engenharia metabólica racional ser a melhor opção na otimização de vias metabólicas e no rendimento de produtos de interesse, nem sempre os fenótipos desejados são alcançados em certas linhagens, pois a regulação dos fluxos metabólicos intercelulares é, geralmente, mais complexa. Esse fluxo metabólico inesperado causado pelo sistema de sRNAs pode ter sido a causa para que o crescimento da cepa de *B. subtilis* KO7 construído nesse projeto fosse prejudicado (KANG *et al.*, 2014).

Por outro lado, as linhagens de *B. subtilis* RF-SP e RFAi contendo o operon de sRNAs apresentaram crescimento melhor dos que os respectivos controles, indicando que esse operon não apresentou fardo metabólico significativo para essas células. Esses dados corroboram com o entendimento de que a utilização de sRNAs sintéticos apresentam vantagens sobre as técnicas comumente usadas, como deleções e seleções de mutantes, já que foi possível realizar a manipulação de uma via metabólica essencial para a célula sem afetar a sua velocidade de crescimento ou levar à morte celular (LINS *et al.*, 2021).

Em todas as linhagens construídas foi possível averiguar que o pico referente à riboflavina, assim como a sua área, se apresentou de forma bem definida e isolada de quaisquer interferentes. Entretanto, apesar de apresentar picos que indicam a presença de riboflavina nas células de *B. subtilis* KO7 e *B. subtilis* KO7::sRNAoperon, a área equivalente aos mesmos não alcança o tamanho mínimo para entrar na curva de calibração feita anteriormente, indicando assim que a concentração de riboflavina presente no cultivo é menor que 1 μ M.

Ao analisar as linhagens de *B. subtilis* RF-SP, é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas (Figura 14 D), indicando que o operon foi ineficaz nessa cepa nas condições de cultivo empregadas, apesar de não atrapalhar o crescimento ou a produção de riboflavina.

Tendo em vista os dados obtidos com as cepas *B. subtilis* KO7 e RF-SP é possível deduzir que o operon de sRNAs não funcionou da forma prevista. Por outro lado, a linhagem *B. subtilis* RFAi contendo o operon de sRNAs apresentou uma melhora estatisticamente significativa para a produção de riboflavina em relação ao seu controle (Figura 14 E). Esse resultado indica a importância do background genético e metabólico para a eficácia do operon de sRNAs. Como o operon contém sRNAs que não se mostraram eficazes na linhagem RF-SP quando utilizados isoladamente, como *purE* e *pbuE*, supõe-se que nesta linhagem altamente engenheirada, é possível que a presença destes sRNAs no operon tenha anulado um possível efeito positivo dos outros sRNAs. Por outro lado, a linhagem RFAi apresenta um maior potencial para melhoramento, já que não passou por processos de otimização da suplementação de precursores.

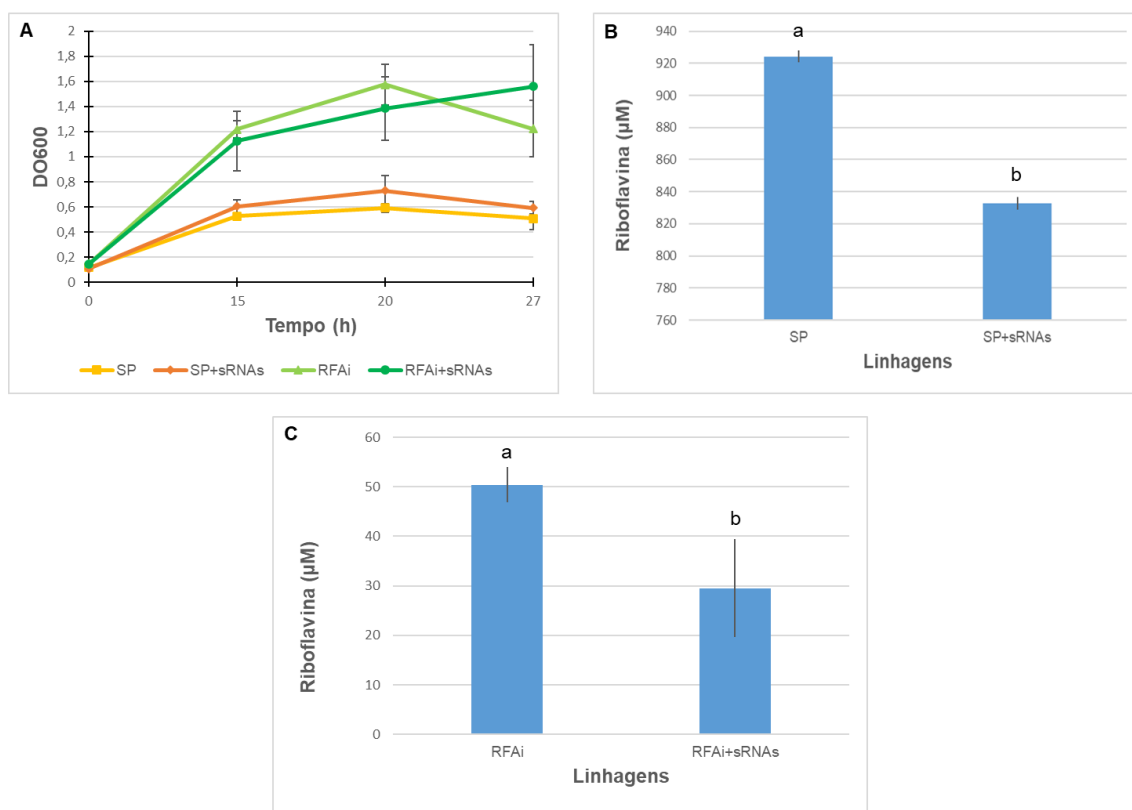
4.5.3. Aumento de escala para frasco Erlenmeyer

A partir dos dados obtidos nos testes descritos anteriormente, selecionou-se as linhagens de *B. subtilis* RF-SP e *B. subtilis* RFAi para cultivo em volume maior, sendo um passo em direção ao aumento de escala para cultivo em biorreatores.

Como os experimentos utilizando tanto os sRNAs de forma individual quanto com o operon de sRNAs foram feitos de forma simultânea, as linhagens mencionadas no parágrafo anterior foram cultivadas, primeiramente, em frascos Erlenmeyer, com agitação de 220 rpm, assim como seus controles. Foram feitas coletas de amostras para avaliar crescimento e produção no início do cultivo e às 15, 20 e 27h após o mesmo.

O crescimento das linhagens (Figura 15 A) melhorou com o aumento de escala, principalmente a linhagem de *B. subtilis* RFAi contendo o operon de sRNAs, que, aparentemente, mesmo após 27h ainda permaneceu na fase exponencial de crescimento. Esses dados reforçam o princípio de que o sistema de sRNAs não aparenta apresentar estresse metabólico significativo para interferir no crescimento celular dessas linhagens.

Figura 15: **A.** Crescimento celular das linhagens de *B. subtilis* RF-SP e *B. subtilis* RFAi, com e sem o sistema de sRNAs, após 27h de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW. **B.** Produção de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis* RF-SP, com e sem o sistema de sRNAs, após 27h de cultivo em frasco Erlenmeyer sob agitação de 220 rpm. **C.** Produção de riboflavina realizada pelas linhagens de *B. subtilis* RFAi, com e sem o sistema de sRNAs, após 27 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW. Análise feita via HPLC. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



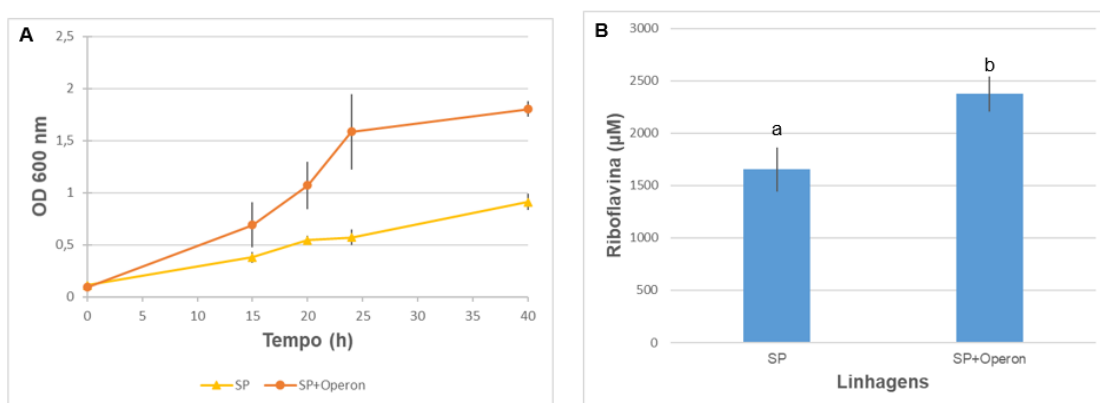
Fonte: o autor.

Os resultados de produção de riboflavina (Figura 15 B e C) demonstraram que as linhagens que continham o sistema de sRNAs não apresentaram aumento da produção de riboflavina em frasco de Erlenmeyer. Entretanto, como já foi discutido no item 4.3.2., o aumento de escala proporcionou uma maior aeração do meio, que pode ter induzido a um maior crescimento celular, fazendo com que as cepas utilizassem os recursos para crescer, não priorizando a produção de riboflavina. Um estudo realizado anteriormente demonstrou que ao reduzir a taxa de manutenção do metabolismo, através de nocaute da enzima citocromo oxidase, que é o ramo menos eficiente da cadeia respiratória de *B. subtilis*, foi possível observar um aumento da produção de riboflavina (ZAMBONI *et al.*, 2003).

Portanto, as condições de cultivo também foram otimizadas para a linhagem de *B. subtilis* RF-SP contendo o operon de sRNAs, cultivando este junto com sua cepa parental sob agitação de 150 rpm e tempo de cultivo de 40h.

Assim como nos resultados obtidos utilizando as linhagens com os sRNAs individuais, ao diminuir a velocidade de agitação do cultivo, a linhagem de *B. subtilis* RF-SP contendo o sistema de sRNAs produziu níveis superiores de riboflavina àqueles alcançados no cultivo realizado com agitação a 220 rpm, chegando a superar a produção de riboflavina realizada pela cepa parental (Figura 16 B). Além disso, foi possível constatar que apesar de diminuir o crescimento celular, a diminuição da aeração do meio não foi prejudicial ao acúmulo de biomassa, sendo que a cepa contendo o operon de sRNAs ainda alcançou densidade populacional maior que o controle (Figura 16 A).

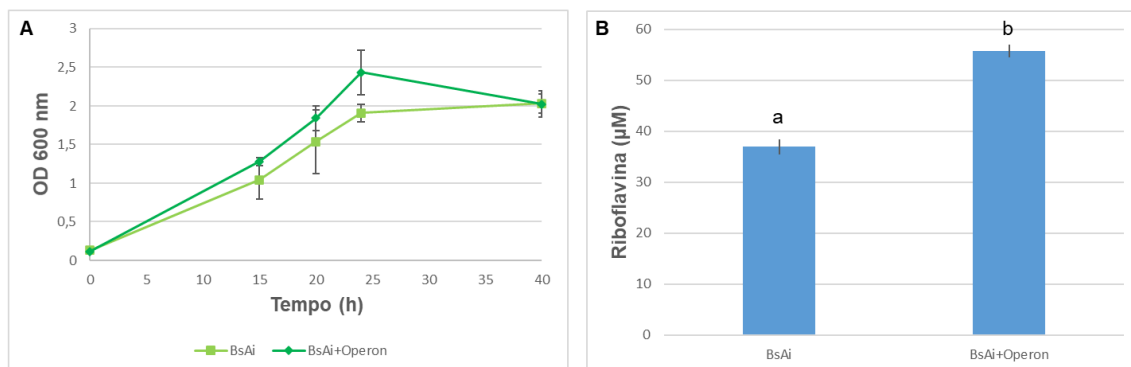
Figura 16: **A.** Crescimento celular das linhagens de *B. subtilis* RF-SP com e sem o sistema de sRNAs, após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW com agitação de 150 rpm. **B.** Produção de riboflavina realizadas linhagens de *B. subtilis* RF-SP, com e sem o sistema de sRNAs, após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW, com agitação de 150 rpm. Análise feita via HPLC. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

Ao analisar as cepas RFAi, observou-se que ao realizar a otimização das condições de cultivo houve aumento da produção de riboflavina na cepa com o operon de 65% em relação a cepa parental, reproduzindo os resultados observados no tubo (Figura 17 B). A cepa com o operon demonstrou crescimento similar a cepa parental (Figura 17 A).

Figura 17: **A.** Crescimento celular das linhagens de *B. subtilis* RF*Ai* com e sem o sistema de sRNAs, após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW com agitação de 150 rpm. **B.** Produção de riboflavina realizadas linhagens de *B. subtilis* RF*Ai*, com e sem o sistema de sRNAs, após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio PW, com agitação de 150 rpm. Análise feita via HPLC. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



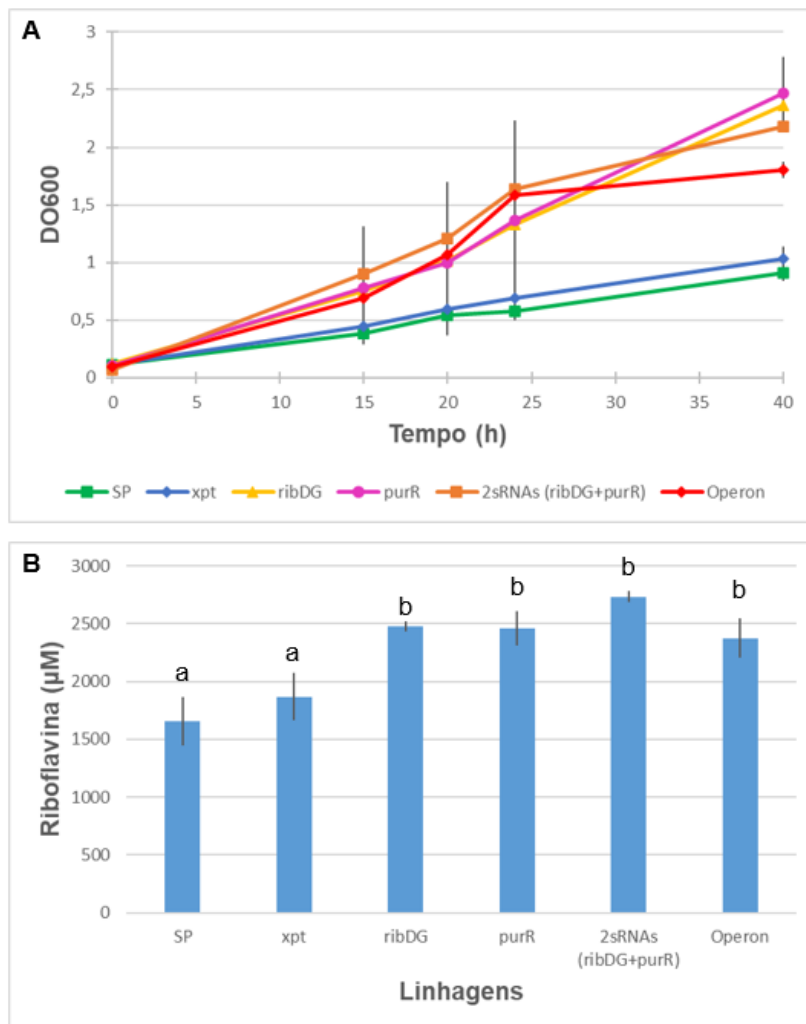
Fonte: o autor.

4.6. Produção de riboflavina pelas linhagens mais promissoras

Todas as cepas desenvolvidas nesse trabalho tiveram como objetivo demonstrar o potencial do sRNA direcionado ao *riboswitch* para a engenharia metabólica, através da produção de riboflavina. Então, as cepas de *B. subtilis* RF-SP construídas que apresentaram os resultados mais promissores nos testes realizados anteriormente foram cultivadas paralelamente à cepa parental para avaliar o mecanismo mais eficiente no aumento do fluxo metabólico para a riboflavina. As cepas selecionadas foram as que continham os sRNAs *xpt*, *ribDG* e *purR* individualmente; a que continha os dois sRNAs *ribDG* e *purR* em um só lócus com unidades de transcrição separadas; e a que continha o operon com o sistema de sRNAs fusionados com ribozimas em um único transcrito.

As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de acordo com a metodologia adotada neste trabalho (37°C e 150 rpm) por 40h. Todas as cepas alcançaram densidade populacional maior que a cepa controle, indicando a eficiência dos sRNAs em promover o crescimento (Figura 18 A). A exceção foi cepa contendo o sRNA-*xpt*, que apresentou um crescimento lento, parecido com o controle, efeito observado anteriormente para esse sRNA. No entanto, os outros dois sRNAs individuais, *ribDG* e *purR*, parecem restaurar a capacidade de crescimento da cepa produtora atingindo densidades celulares em torno de 2,5 vezes maiores do que a linhagem parental.

Figura 18: Crescimento celular (A) e produção de riboflavina (B) das linhagens de *B. subtilis* RF-SP construídas e seu controle após 40 horas de cultivo em frasco Erlenmeyer contendo meio Power com agitação de 150 rpm. Análise feita via HPLC. Análise de variância com valor $p < 0,05$; médias identificadas com letras diferentes (a e b) são significativamente diferentes.



Fonte: o autor.

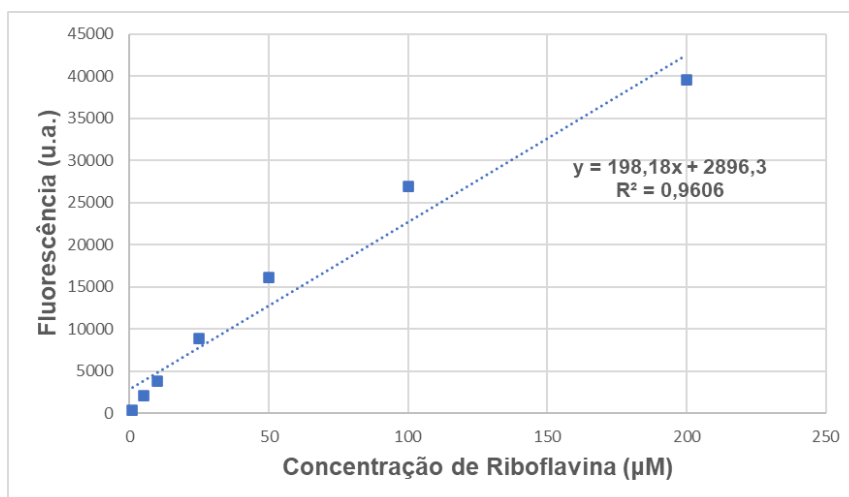
Em relação a produção de riboflavina (Figura 18 B), as linhagens com os sRNAs *ribDG* e *purR* individualmente atingiram quase 2500 µM, o que é cerca de 50% maior do que o controle. Esse resultado foi superior ao encontrado em estudo realizado com a edição do *riboswitch ribDG* e do gene *purR* através da técnica de CRISPR-Cas9, que gerou aumento de 44% em relação à cepa parental *B. subtilis* RF-SP (BOUMEZBEUR *et al.*, 2020). O sRNA *xpt* não repetiu o desempenho mostrado em resultado obtido no cultivo em tubo de ensaio onde a produção de riboflavina aumentou 60% em relação ao controle, e apenas aumentou ligeiramente a produção de riboflavina nesse experimento, embora não significativamente, alcançando somente 13% de aumento na produção de riboflavina em relação à cepa parental. A combinação

dos dois melhores sRNAs *purR* e *ribDG* aumentou 10% a produção de riboflavina em comparação com apenas um deles, o que representa um aumento de 65% em comparação com a cepa parental. O operon sRNA integrado no *B. subtilis* RF-SP, resultou em um aumento de 44% no título de riboflavina em comparação com a cepa parental. Embora funcional, o operon de sRNAs mostrou um efeito menor do que os melhores sRNAs individualmente, o que pode ser atribuído a uma combinação da influência positiva de alguns sRNAs (*xpt*, *purR* e *ribDG*) e a influência negativa de outros (*purE* e *pbuE*) na biossíntese de riboflavina.

4.7. Método de quantificação de riboflavina utilizando fluorescência

Para obter a quantificação de riboflavina por fluorescência, amostras com diferentes concentrações de riboflavina foram preparadas para a construção de uma curva-padrão eficaz na determinação de concentração desta molécula, com base no valor de fluorescência obtido (Figura 19). A equação da reta foi calculada e o R^2 foi condizente para predizer as concentrações de riboflavina das amostras analisadas.

Figura 19: Curva de calibração de leitora de microplacas para diferentes concentrações de riboflavina, utilizando fluorescência, contendo a equação da reta e o R^2 calculados.



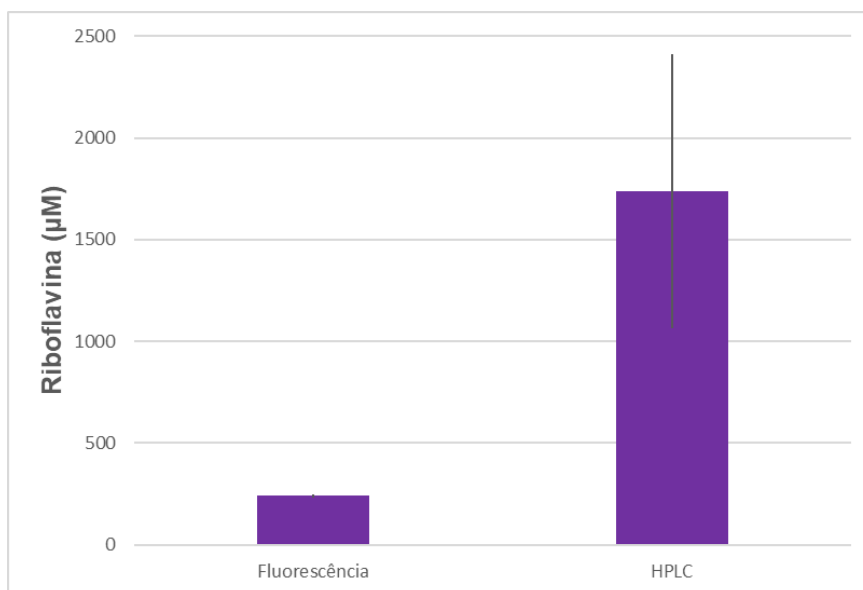
Fonte: o autor.

Durante os cultivos realizados nesse trabalho, todas as amostras passaram por medições de fluorescência, com o objetivo de se observar a produção de riboflavina durante o desenvolvimento do experimento, de forma rápida e dinâmica. Entretanto observou-se que a

quantificação de riboflavina realizada por fluorescência não era tão precisa, dando resultados divergentes dos obtidos por análises no HPLC, um método mais eficiente e seguro.

Como exemplo citarei a cepa de *B. subtilis* RF-SP cultivado em frasco Erlenmeyer por 40h (Figura 20). Apesar das amostras serem as mesmas e ambas passarem pelo processo de retirada de célula, é possível notar que o método de fluorescência foi menos eficiente, conseguindo medir somente 13% do valor alcançado por HPLC. O que indicou possíveis problemas na quantificação por fluorescência, método que deveria apresentar grau de precisão maior devido a especificidade do processo de excitação/emissão. Qualquer interferência devido a existência de compostos no meio com sobreposição de espectro de fluorescência deveria resultar em uma produção superestimada, não subestimada.

Figura 20: Comparação dos valores de riboflavina quantificados utilizando dois métodos diferentes: Fluorescência e HPLC.

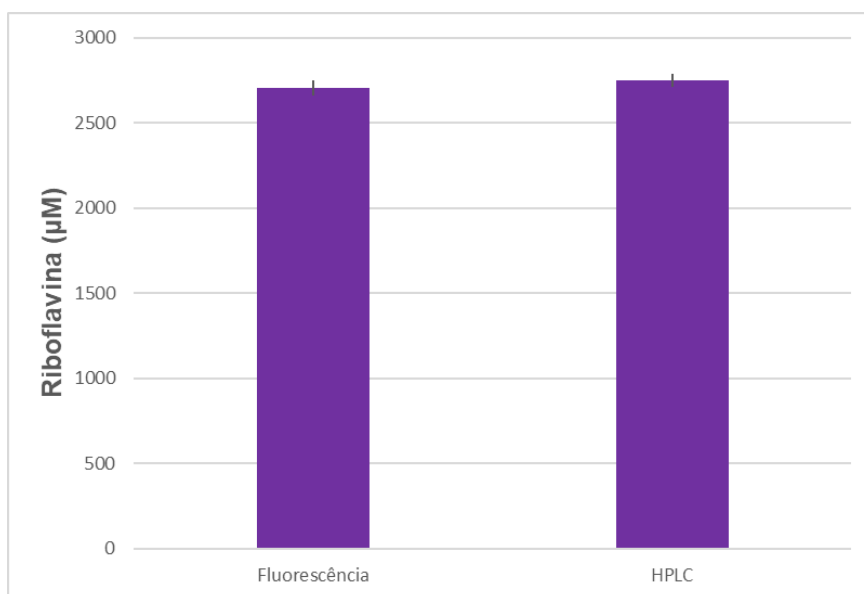


Fonte: o autor.

Entretanto, como já foi revelado anteriormente, foi observado durante os últimos cultivos realizados em frascos Erlenmeyer, após a otimização das condições de cultivo, o acúmulo da riboflavina em forma de cristais, devido à baixa solubilidade da mesma. Dessa forma, havia a possibilidade que a riboflavina ali presente pudesse ser perdida durante a centrifugação para eliminar células, ou mesmo se permanecesse no meio, não solubilizasse de forma homogênea, impedindo sua análise de forma correta.

Sendo assim, optou-se por realizar diluições antes da centrifugação, garantindo que a riboflavina acumulada fosse apropriadamente solubilizada, tendo os valores de diluição corrigidos após a quantificação. Com a aplicação dessa metodologia observou-se que a quantificação por fluorescência ficou mais eficiente (Figura 21), tendo seu valor estatisticamente igual ao obtido por HPLC.

Figura 21: Comparação dos valores de riboflavina quantificados utilizando dois métodos diferentes: Fluorescência e HPLC.



Fonte: o autor.

Dessa forma, a utilização da fluorescência para quantificação de riboflavina mostrou-se eficiente diante do tratamento correto da amostra, sinalizando que este método pode ser usado como um parâmetro na avaliação de cultivos. Apesar do HPLC ainda ser o método mais preciso para quantificação de riboflavina, por ser mais complexo e demorado, muitas vezes não há a possibilidade de analisar em tempo real a produção de riboflavina durante o cultivo, o que pode ser alcançado pela fluorescência, que é muito mais rápida e prática.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no presente trabalho, é possível inferir que a utilização de sRNAs capazes de interferir na regulação gênica de *riboswitches* no metabolismo de riboflavina, estejam eles presentes individualmente na célula ou em conjunto, é uma

estratégia promissora a fim de construir uma linhagem capaz de produzir vitamina B₂ de forma eficiente sem gerar um fardo metabólico excessivo ou inviabilizar o crescimento celular. O uso de genes sRNA integrados ao genoma, em vez de derivados de plasmídeo, favorece a estabilidade da cepa para a engenharia de produtores de metabólitos adequados para cultivo em larga escala.

As linhagens contendo os sRNAs individualmente mostraram-se hábeis na produção de riboflavina sem acarretar limitação na velocidade de crescimento da célula. As cepas com os sRNAs *xpt*, *ribDG* e *purR* foram capazes de aumentar a produção de riboflavina, comprovando a funcionalidade dos sRNAs e sua eficácia em reprogramar de maneira específica o metabolismo de purinas ou da riboflavina. As cepas resultantes foram capazes de atingir 50% de aumento no título de riboflavina.

Ao se analisar a combinação de dois sRNAs no genoma, observou-se uma ação cumulativa, sendo a linhagem construída capaz de alcançar um nível de produção de riboflavina 65% maior que a cepa parental. Já a utilização do operon contendo o sistema de sRNAs, não se mostrou tão eficiente na linhagem de KO7, não sendo capaz de contribuir para o aumento da produção de riboflavina. Em contraste, as linhagens de *B. subtilis* RF-SP e RFAi contendo o operon de sRNAs alcançaram um aumento na produção de riboflavina de 44% e 65%, respectivamente, em relação ao controle.

Além disso, vale ressaltar que conseguimos otimizar as condições de cultivo com o aumento de escala, identificando que a oxigenação do meio favorece o crescimento celular, porém limita a produção de riboflavina. Dessa forma, fomos capazes de adequar o cultivo para que houvesse um maior rendimento dessa molécula, apresentando aumento de produção de até 65% em relação à cepa parental. Essa linhagem se mostra promissora para aplicação industrial, apresentando produção de riboflavina e crescimento populacional bastante superiores à linhagem parental.

Por fim, as ferramentas que desenvolvemos neste trabalho são amplamente aplicáveis a *riboswitches* bacterianos e são úteis para modular a expressão de genes essenciais que não podem ser eliminados, oferecendo uma forma útil de desenvolvimento de linhagens produtoras de metabólitos de interesse industrial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 321–360, 2011.
- AVERIANOVA, L. A. *et al.* Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, Article 570828, November, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>.
- BERA, A. K. *et al.* Functional dissection of the *Bacillus subtilis* pur operator site. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 14, p. 4099–4109, 2003.
- BOUMEZBEUR, A. H. *et al.* Rational engineering of transcriptional riboswitches leads to enhanced metabolite levels in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 58–68, 2020.
- BREAKER, R. R. Riboswitches and the RNA world. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, a003566, 2012. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003566>.
- CAI, D. *et al.* Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 6, p. 1632–1642, 2019.
- CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 381–390, 2014.
- CASCANTE-ESTEPA, N.; GUNKA, K.; STÜLKE, J. Localization of components of the RNA-degrading machine in *Bacillus subtilis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–9, 2016.
- CONDON, C. RNA Processing and Degradation in *Bacillus subtilis*. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 67, n. 2, p. 157–174, 2003.
- CORRÊA, G. G. *et al.* A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, n. December 2019, p. 326–334, 2020.
- EBBOLE, D. J.; ZALKIN, H. Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for de novo purine nucleotide synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8274–8287, 1987.
- EGGERSDORFER, M. *et al.* One hundred years of vitamins - A success story of the natural

- sciences. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 52, p. 12960–12990, 2012.
- FORAKER, A. B.; KHANTWAL, C. M.; SWAAN, P. W. Current perspectives on the cellular uptake and trafficking of riboflavin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 11, p. 1467–1483, 2003.
- GARCÍA-ANGULO, V. A. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 196–209, 2017.
- GARST, A. D.; EDWARDS, A. L.; BATEY, R. T. Riboswitches : Structures and Mechanisms. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 6, a003533, 2011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003533>.
- GONG, S. *et al.* Folding behaviors of purine riboswitch aptamers. **Wuhan University Journal of Natural Sciences**, v. 23, n. 1, p. 43–50, 2018.
- GU, Y. *et al.* Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, n. December 2017, p. 109–121, 2018.
- HEMBERGER, S. *et al.* RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 119, 2011. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-119>.
- IRNOV, I. *et al.* Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 19, p. 6637–6651, 2010.
- KANG, Z. *et al.* Small RNA regulators in bacteria: Powerful tools for metabolic engineering and synthetic biology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3413–3424, 2014.
- KIRCHNER, M.; SCHNEIDER, S. Gene expression control by *Bacillus anthracis* purine riboswitches. **Rna**, v. 23, n. 5, p. 762–769, 2017.
- KUNST, F. *et al.* The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. **Nature**, v. 390, p. 249–256, 1997.
- LAPID, C.; GAO, Y. Primer X. 2006. Last updated: Aug. 14 2006. <https://www.bioinformatics.org/primerx/>.
- LEE, J. W. *et al.* Systems metabolic engineering for chemicals and materials. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 370–378, 2011.

- LIM, S. H.; CHOI, J. S.; PARK, E. Y. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An overview. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 2, p. 75–88, 2001.
- LINS, M. R. C. R. *et al.* Characterization of five purine riboswitches in cellular and cell-free expression systems. **bioRxiv**, p. 2021.04.14.439898, 2021.
- LINS, M. R. DA C. R. **Reprogramação do metabolismo de purina na bactéria *Bacillus subtilis* por tecnologia de pequenos RNAs não codificadores (sRNAs)**. 2019. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biologia Sintética) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.
- MACK, M.; LOON, A. P. G. M. VAN; HOHMANN, H. P. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 950–955, 1998.
- MANDAL, M. *et al.* Riboswitches control fundamental biochemical pathways in *Bacillus subtilis* and other bacteria. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 577–586, 2003.
- MANDAL, M.; BREAKER, R. R. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 29–35, 2004.
- MARS, R. A. T. *et al.* Regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*: a Gram-Positive Perspective on Bacterial RNA-Mediated Regulation of Gene Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1029–1057, 2016.
- NIELSEN, A. A. K. *et al.* Genetic circuit design automation. **Science**, v. 352, n. 6281, aac7341, 2016. <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.aac7341>.
- NYGAARD, P.; SAXILD, H. H. The purine efflux pump PbuE in *Bacillus subtilis* modulates expression of the PurR and G-box (XptR) regulons by adjusting the purine base pool size. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 791–794, 2005.
- PARK, S. A. *et al.* *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 827–848, 2021.
- PEDROLI, D. B. *et al.* A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 112, n. 45, p. 14054–14059, 2015.

PEDROLI, D. B.; LINS, M. R. C. R.; CORREA, G. G. Riboswitches. *In*: PEREIRA, T. C. **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. organizador. Ribeirão Preto: SBG - Sociedade Brasileira de Genética, 2017. Capítulo 2, Seção 13, p. 84–88. ISBN:978-85-89265-25-6.

PERKINS, J. B. *et al.* **Bacterial strains which overproduce riboflavin**. Assignee: Roche Vitamins Inc., Parsippany, N. J. United States Patent. Patent Number: US 5,925,538. Date of Patent: July, 20, of 1999. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/bd/08/e4/a9bcfaf948ef60/US5925538.pdf>.

RADECK, J. *et al.* The Bacillus BioBrick Box: Generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Engineering**, v. 7, n. 1, Article number: 29, 2013. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-29>.

REVUELTA, J. L. *et al.* Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 4–5, p. 659–665, 2017.

RODRIGO, G.; JARAMILLO, A. RiboMaker: Computational design of conformation-based riboregulation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 17, p. 2508–2510, 2014.

ROSTAIN, W. *et al.* Regulatory RNA design through evolutionary computation and strand displacement. **Methods in Molecular Biology**, v. 1244, p. 63–78, 2015.

SAXILD, H. H. *et al.* Definition of the *Bacillus subtilis* PurR operator using genetic and bioinformatic tools and expansion of the PurR regulon with *glyA*, *guaC*, *pbuG*, *xpt-pbuX*, *yqhZ*-fold, and *pbuO*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6175–6183, 2001.

SCHWECHHEIMER, S. K. *et al.* Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2107–2119, 2016.

SERGANOV, A. *et al.* Structural basis for discriminative regulation of gene expression by adenine- and guanine-sensing mRNAs. **Chemistry and Biology**, v. 11, n. 12, p. 1729–1741, 2004.

SHERLOCK, M. E. *et al.* Tandem riboswitches form a natural Boolean logic gate to control purine metabolism in bacteria. **eLife**, v. 7, n. subtype 1, p. 1–17, 2018.

SHI, T. *et al.* Dereglulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin

biosynthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2014.

STAHMANN, K. P.; REVUELTA, J. L.; SEULBERGER, H. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 509–516, 2000.

WATERS, L. S.; STORZ, G. Regulatory RNAs in Bacteria. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 615–628, 2009.

YOO, S. M.; NA, D.; LEE, S. Y. Design and use of synthetic regulatory small RNAs to control gene expression in *Escherichia coli*. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1694–1707, 2013.

ZADEH, J. *et al.* Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, p. 174–182, 2012.

ZAMBONI, N. *et al.* Reducing maintenance metabolism by metabolic engineering of respiration improves riboflavin production by *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p. 49–55, 2003.

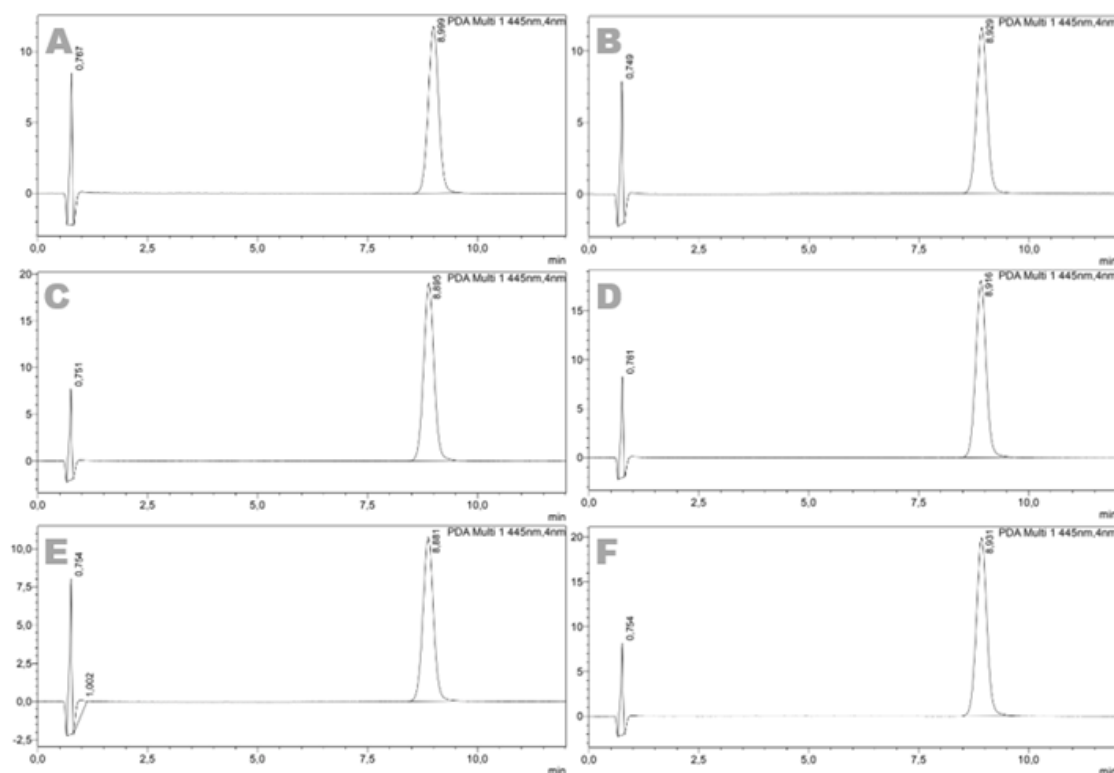
ZHANG, Q. *et al.* Production of proteins and commodity chemicals using engineered *Bacillus subtilis* platform strain. **Essays in Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 173–185, 26 jul. 2021.

ANEXOS

Anexo I: Cepas de *B. subtilis* usadas ou construídas neste estudo.

Linhagem	Descrição	Referência
<i>E. coli</i> Top 10	Cepa de clonagem	Invitrogen
<i>B. subtilis</i> 168	Cepa selvagem, <i>trpC2</i>	
<i>B. subtilis</i> riboflavin super-producing strain (BsRF)	Agrupamento de genes de riboflavina conduzido por Pveg, mutações em <i>ribC</i> , <i>tkl</i> e riboswitch FMN	Lab collection
<i>B. subtilis</i> KO7	linhagem que não secreta proteases, gerada por deleções marker-free a partir da linhagem PY79 (BGSC ID 1A1133)	
<i>B. subtilis</i> RF autoinduction (RFAi)	$\Delta amyE$: operon de riboflavina sob o controle do dispositivo de autoindução S1-R6	(Correa et al., 2020)
<i>B. subtilis</i> ::2E	$\Delta lacA$: pBs2E vector vazio	
BsRF:: <i>P_{grac}-ribDG-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de <i>ribDG-rtRNA</i>	
BsRF:: <i>P_{grac}-purR-asRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de <i>purR-asRNA</i>	
BsRF:: <i>P_{grac}-xpt-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de <i>xpt-rtRNA</i>	
BsRF:: <i>P_{grac}-pbuE-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de <i>pbuE-rtRNA</i>	
BsRF:: <i>P_{grac}-purE-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de <i>purE-rtRNA</i>	
BsRF:: <i>P_{grac}-RiboJpurE-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: promotor <i>grac</i> controlando a transcrição de RiboJ <i>purE-rtRNA</i>	Esse estudo
BsRF:: <i>purR-asRNA-ribDG-rtRNA</i>	$\Delta lacA$: transcrição conduzida pelo promotor <i>grac</i> de <i>purR-asRNA</i> e uma segunda transcrição conduzida pelo promotor <i>grac</i> de <i>ribDG-rtRNA</i>	
BsRF:: <i>sRNA_Operon</i>	$\Delta lacA$: operon impulsionado pelo promotor <i>grac</i> de cinco sRNAs (<i>purE-rtRNA</i> , <i>xpt-rtRNA</i> , <i>ribDG-rtRNA</i> , <i>pbuE-rtRNA</i> e <i>purR-asRNA</i>) intercalados por RiboJs sintéticos	
BsKO7:: <i>sRNA_Operon</i>	$\Delta lacA$: operon impulsionado pelo promotor <i>grac</i> de cinco sRNAs (<i>purE-rtRNA</i> , <i>xpt-rtRNA</i> , <i>ribDG-rtRNA</i> , <i>pbuE-rtRNA</i> e <i>purR-asRNA</i>) intercalados por RiboJs sintéticos	
BsAi:: <i>sRNA_Operon</i>	$\Delta lacA$: operon impulsionado pelo promotor <i>grac</i> de cinco sRNAs (<i>purE-rtRNA</i> , <i>xpt-rtRNA</i> , <i>ribDG-rtRNA</i> , <i>pbuE-rtRNA</i> e <i>purR-asRNA</i>) intercalados por RiboJs sintéticos	

Anexo IV: **A.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *purE*; **B.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *purE* fusionado à RiboJ; **C.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *xpt*; **D.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *ribDG*; **E.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *pbuE*; **F.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *purR*.



Anexo V: Alinhamento entre sequência do plasmídeo pBS2E com a unidade de transcrição do sRNA *ribDG* e a unidade de transcrição do sRNA *purR* clonados em *E. coli* TOP10 (na imagem Seq_2) e sequência obtida através de sequenciamento realizado com primers (na imagem Seq_1). Onde em: **Azul escuro** os nucleotídeos correspondentes ao promotor Pgrac; **Vinho** sequência de nucleotídeos correspondentes ao sítio de ligação para o padrão de biobrick prefix (BBp – possui as sequências das enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*); **Azul** observa-se os nucleotídeos correspondentes ao gene *LacO*; **Rosa** os nucleotídeos correspondentes aos sRNAs, primeiro o sRNA *ribDG* e depois *purR*; **Verde** os nucleotídeos correspondentes ao terminador T500; **Roxo** os nucleotídeos correspondentes ao sítio de ligação para o padrão de biobrick suffix (BBs – possui as sequências das enzimas de restrição *SpeI* e *PstI*); **Marrom** cicatriz formada pela junção das duas unidades de transcrição;

```

Seq_1  1      ATGATTCTGGAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTACCAGCTATTGTAACATAATCGGTAC  60
              |||
Seq_2  1      -----GAATTCGCGGCCGCTTCTAGAGGTACCAGCTATTGTAACATAATCGGTAC  50

Seq_1  61      GGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTT  120
              |||
Seq_2  51      GGGGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTT  110

Seq_1  121     TTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTGGAATTGTG  180
              |||
Seq_2  111     TTTATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTGGAATTGTG  170

Seq_1  181     AGCGGATAACAATTCCCAATTCCTATCCTGGCTCCGAAGGGTGCATATTCACAAAGCCCG  240
              |||
Seq_2  171     AGCGGATAACAATTCCCAATTCCTATCCTGGCTCCGAAGGGTGCATATTCACAAAGCCCG  230

Seq_1  241     CCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTACTAGAGG-TACCAGCTATTGTAACATAATCGGTACGG  299
              |||
Seq_2  231     CCGAAAGGCGGGCTTTTCTGTTACTAGAGGGTACCAGCTATTGTAACATAATCGGTACGG  290

Seq_1  300     GGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTTTT  359
              |||
Seq_2  291     GGGTGAAAAAGCTAACGGAAAAGGGAGCGGAAAAGAATGATGTAAGCGTGAAAAATTTTT  350

Seq_1  360     TATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTTGAATTGTGAG  419
              |||
Seq_2  351     TATCTTATCACTTGAAATTGGAAGGGAGATTCTTTATTATAAGAATTGTTGAATTGTGAG  410

Seq_1  420     CGGATAACAATTCCCAATTCGACGAACTTCATGAACACACCCCAAGCCCGCGGAAA  479
              |||
Seq_2  411     CGGATAACAATTCCCAATTCGACGAACTTCATGAACACACCCCAAGCCCGCGGAAA  470

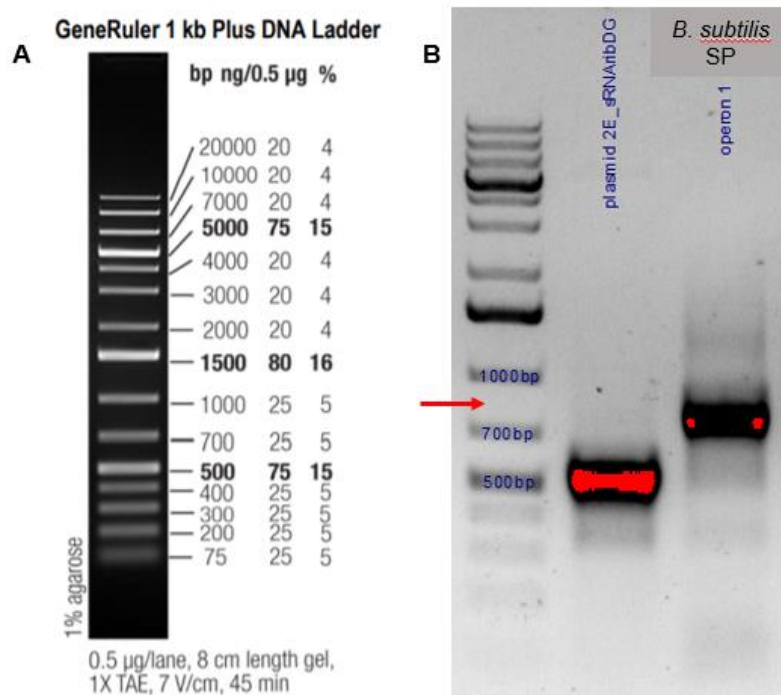
Seq_1  480     GGCGGGCTTTTCTGTTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGAGATATCGATTCAAGCTATATTT  539
              |||
Seq_2  471     GGCGGGCTTTTCTGTTACTAGTAGCGGCCGCTGCAGAGATATCGATTCAAGCTATATTT  530

Seq_1  540     GGAGTTGAGCCTCTTGAAACGGACACCCTGTATCCGAAGGATCGAAACGCTGTCAGCTAC  599
              |||
Seq_2  531     GGAGTTGAGCCTCTTGAAACGGACACCCTGTATCCGAAGGATCGAAACGCTGTCAGCTAC  590

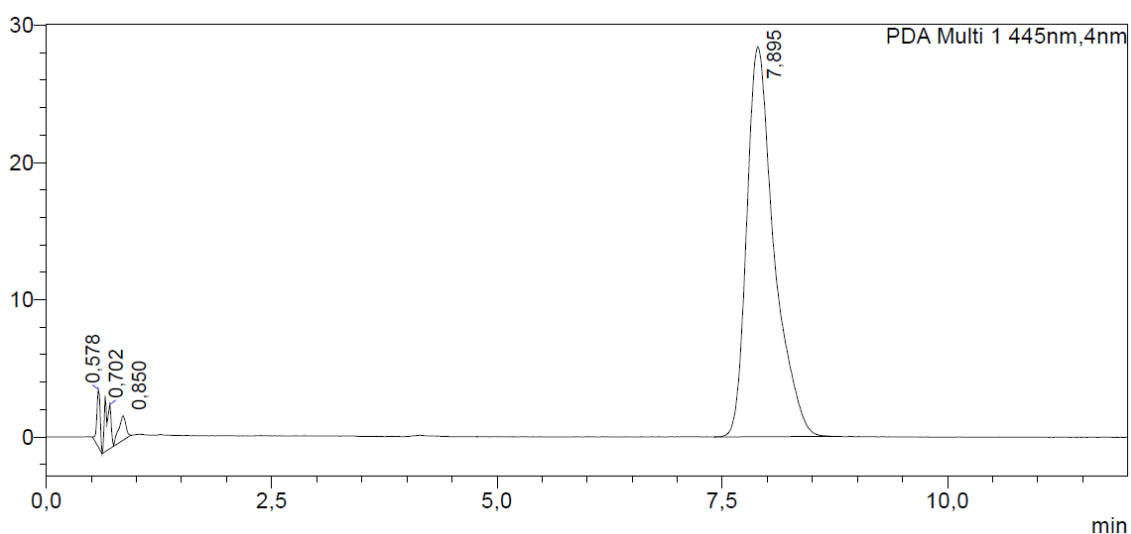
Seq_1  600     CGCAGCC-----  606
              |||
Seq_2  591     CGCAGCCAAATATATGAAATGAAGGATTATGCAACCGTGATTGATGTAAAGACAGCTTCA  650

```

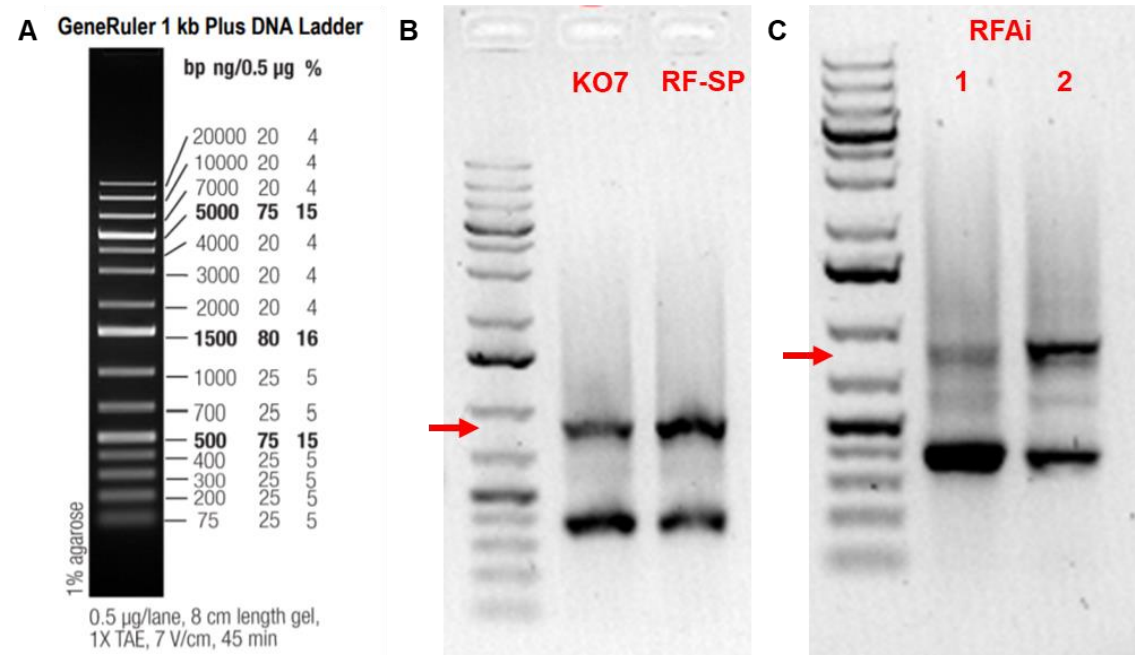
Anexo VI: Confirmação de integração do plasmídeo contendo os sRNAs ribDG e purR no genoma de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina através de reação de PCR observada por bandas em gel de eletroforese. Onde: plasmid2E_sRNAribDG se refere ao plasmídeo ao sRNA ribDG como forma de controle e Operon1 se refere aos sRNAs ribDG e purR. **A.** Padrão de bandas difusas feita por marcador Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder de fragmentos de DNA em gel de agarose. **B.** Reação de PCR de *B. subtilis*::sRNA-ribDG e *B. subtilis*::sRNA-ribDG-sRNA-purR.



Anexo VII: Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sRNA *ribDG* e *purR* após 40 horas de cultivo.



Anexo VIII: **A.** Padrão de bandas difusas feita por marcador Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder de fragmentos de DNA em gel de agarose. Confirmação de integração do plasmídeo contendo o sistema de sRNAs no genoma de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina (**B**), KO7 (**B**) e KO7 (*LuxRI*+Operon *rib*) (**C**) através de reação de PCR observada por bandas em gel de eletroforese. Onde: RF-SP= *B. subtilis* superprodutor de riboflavina; KO7= *B. subtilis* KO7; e RFAi = KO7 (*LuxRI*+Operon *rib*) colônias 1 e 2.



Anexo IX: Análise por HPLC da produção de riboflavina. **A.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* KO7 contendo o sistema de sRNAs; **B.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* superprodutor de riboflavina contendo o sistema de sRNAs; **C.** Cromatograma referente à amostra obtida do cultivo de *B. subtilis* KO7 (*LuxRI*+Operon *rib*) contendo o sistema de sRNAs

