



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

BRUNA FERNANDES SILVA

**Construção de um sistema autônomo da expressão gênica em
*Bacillus subtilis***

Araraquara, SP

2022

BRUNA FERNANDES SILVA

**Construção de um sistema autônomo da expressão gênica em
*Bacillus subtilis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli.

Araraquara, SP

2022

S586c Silva, Bruna Fernandes.
Construção de um sistema autônomo da expressão gênica em
Bacillus subtilis / Bruna Fernandes Silva. – Araraquara: [S.n.], 2022.
59 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio
de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. Expressão gênica. 2. Quorum sensing. 3. *Bacillus subtilis*. 4.
Riboflavina. 5. RibC. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, que acreditou na minha educação e me apoiou durante todos os anos de graduação e pesquisa científica.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Danielle Pedrolli, por todo apoio, confiança e ensinamentos e à Pró-Reitoria de Pesquisa pela bolsa PIBIC durante a realização deste trabalho.

Ao grupo SynBio Lab, obrigada pelo acolhimento e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório. Aos docentes do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e aos técnicos do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, agradeço pelos ensinamentos e pelo suporte. E, por fim, obrigada time Unesp Brazil por ter me apresentado ao mundo da Biologia Sintética e pela nossa jornada de iGEMmers.

Resumo

Os métodos de indução da expressão gênica disponíveis para a construção de linhagens bacterianas envolvem a adição de compostos indutores ao meio de cultura, o que é indesejável para aplicações industriais, pois encarece o processo produtivo. Já a utilização da expressão constitutiva, alternativa à indução, pode ocasionar estresse metabólico durante o crescimento celular por conta da síntese intensa e contínua do produto. Para solucionar este problema, são utilizados sistemas capazes de monitorar e regular de maneira autônoma a expressão gênica, baseado no mecanismo de *quorum sensing* (QS) bacteriano. Em estudos anteriores, um modelo funcional de controle e indução da expressão gênica foi construído em *Bacillus subtilis*, podendo ser conectado à síntese de biomoléculas de interesse industrial, como a riboflavina (vitamina B₂). O metabolismo de riboflavina está diretamente ligado à ação da enzima RibC, que catalisa a conversão desta vitamina em FMN e FAD nas células. Deste modo, a funcionalidade do modelo pode ser ampliada pela repressão gênica da produção de RibC, favorecendo uma maior produção de riboflavina. O design do circuito gênico que conecta o sistema de autoindução à síntese de riboflavina, bem como as simulações *in silico* do funcionamento foram feitos no software iBioSim 3.1. Os resultados mostraram que o modelo de indução combinado com a repressão pelo sistema *LuxRI* leva a um aumento da produção de riboflavina. Os testes com as linhagens de *B. subtilis* construídas evidenciaram que o sistema *LuxRI* foi capaz de induzir e reprimir a expressão gênica de forma autônoma e simultânea, levando a produção de 17,8 mg/L de riboflavina por células.

Palavras-chave: Expressão gênica, *quorum sensing*, *Bacillus subtilis*, riboflavina, RibC.

Abstract

The available methods for induction of gene expression in bacterial strains use inducing compounds added to the culture medium, which is undesirable for industrial applications as it increases the production costs. Constitutive expression, an alternative to induction, can cause metabolic stress during cell growth due to the intense and continuous synthesis of the product. To solve this problem, systems capable of sensing and regulating gene expression autonomously, based on bacterial *quorum sensing* (QS) process are used. In previous studies, a functional model for the control and induction of gene expression has been built in *Bacillus subtilis*. It has been demonstrated to control the synthesis of biomolecules of industrial interest, such as riboflavin (vitamin B₂). Riboflavin metabolism is directly linked to the activity of the enzyme RibC, which catalyzes the conversion of the vitamin into FMN and FAD in the cells. Therefore, the autoinduction process can be extended to gene repression of *ribC*, favoring riboflavin accumulation. The gene circuit design connecting the autoinduction system to riboflavin synthesis as well as *in silico* simulations were performed using the iBioSim 3.1 software. Our results showed that the induction model combined with repression by the *LuxRI* system leads to increased riboflavin production. Tests with engineered *B. subtilis* strains evidenced that the *LuxRI* system was able to induce and repress gene expression autonomously and simultaneously, leading to the production of 17.8 mg/L of riboflavin per cell.

Keywords: Gene expression, *quorum sensing*, *Bacillus subtilis*, riboflavin, RibC.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Representação do funcionamento do dispositivo genético de autoindução baseado no sistema LuxRI de QS de <i>A. fischeri</i>	12
Figura 2. Estrutura química da riboflavina.	13
Figura 3. Rota metabólica de riboflavina.	14
Figura 4. Circuito genético composto pelo sistema <i>LuxRI</i> de autoindução controlando a síntese de riboflavina (vitamina B ₂).	15
Figura 5. Mapa do plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2.....	19
Figura 6. Esquema da ampliação da funcionalidade do sistema <i>LuxRI</i>	21
Figura 7. Mapa do plasmídeo pJOE8999(cas9).	24
Figura 8. Design do modelo construído no software iBioSim 3.1.	32
Figura 9. Gráficos das simulações realizadas do modelo de autoindução conectado à síntese de riboflavina e repressão da expressão gênica de <i>ribC</i>	33
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para verificação da PCR do operon de riboflavina.	35
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para verificação da clonagem em <i>E. coli</i>	36
Figura 12. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2_Ribgenes construído <i>in silico</i> para a verificação da clonagem em <i>E. coli</i>	37
Figura 13. Resultado da análise da região promotora de <i>ribC</i> feita pelo software SoftBerry.	38
Figura 14. DNA doador completo.	39
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose para verificação da PCR do DNA doador.	40
Figura 16. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB) construído <i>in silico</i> para a verificação da clonagem em <i>E. coli</i>	41
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para verificação da clonagem da sequência homóloga em <i>E. coli</i>	42
Figura 18. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) construído <i>in silico</i> para a verificação da clonagem em <i>E. coli</i>	43

Figura 19. Imagem das placas com colônias transformantes em <i>B. subtilis</i> após dois dias de incubação a 30°C.....	45
Figura 20. Imagem das placas com colônias estriadas durante o processo de perda do plasmídeo e verificação.....	46
Figura 21. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) construído <i>in silico</i> para a verificação da clonagem em <i>B. subtilis</i>	48
Figura 22. Gráfico do crescimento celular ao longo do tempo das linhagens de <i>B. subtilis</i> selvagem, com o operon de riboflavina sob o controle do sistema <i>LuxRI</i> e promotor forte <i>Pveg</i>	49
Figura 23. Gráfico da concentração de riboflavina produzida relativa às células ao longo do tempo para as linhagens com o operon de riboflavina sob o controle do sistema <i>LuxRI</i> e promotor forte <i>Pveg</i>	50
Figura 24. Gráfico do crescimento celular ao longo do tempo da linhagem de <i>B. subtilis</i> com o operon de riboflavina sob o controle do sistema <i>LuxRI</i> e da linhagem após edição gênica com CRISPR-Cas9 no promotor <i>PribC</i>	51
Figura 25. Gráfico da concentração de riboflavina produzida relativa às células ao longo do tempo para as linhagens com o operon de riboflavina sob o controle do sistema <i>LuxRI</i> e após a edição gênica com CRISPR-Cas9 no promotor <i>PribC</i>	52
Figura 26. Imagens do pré-inóculo e do cultivo final em frascos tipo Erlenmeyer, para a linhagem não editada (A1-A3) e a linhagem editada (B1-B3).	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do operon da riboflavina.	17
Tabela 2. Componentes da PCR do operon de riboflavina.	17
Tabela 3. Condições da PCR do operon de riboflavina.	18
Tabela 4. Componentes da reação GGA para a clonagem do operon de riboflavina.	20
Tabela 5. Condições da reação GGA para a clonagem do operon de riboflavina.	20
Tabela 6. Oligos utilizados na reação de pareamento do gRNA e PCR das duas partes do DNA doador.	22
Tabela 7. Componentes da PCR das duas partes do DNA doador.	23
Tabela 8. Condições da PCR das duas partes do DNA doador.	23
Tabela 9. Componentes da reação de ligação do gRNA no plasmídeo pJOE8999(cas9).	25
Tabela 10. Condições da reação de ligação do gRNA no plasmídeo pJOE8999(cas9).	25
Tabela 11. Componentes da reação GGA para ligação das duas partes do DNA doador.	26
Tabela 12. Condições da reação GGA para ligação das duas partes do DNA doador.	26
Tabela 13. Componentes da PCR do DNA doador completo.	27
Tabela 14. Condições da PCR da sequência homóloga completa.	27
Tabela 15. Componentes da reação de ligação do DNA doador no plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB).	27
Tabela 16. Condições da reação de ligação do DNA doador no plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB).	28
Tabela 17. Componentes da PCR para o sequenciamento.	29
Tabela 18. Condições da PCR para o sequenciamento.	30
Tabela 19. Sequências guia determinadas pelo software R-genome Cas designer.	38

Sumário

Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de Ilustrações	7
Lista de Tabelas	9
Sumário	10
1. Introdução	10
2. Objetivo	16
3. Metodologia	16
3.1. Simulação	16
3.2. Linhagem bacteriana	16
3.3. Amplificação por PCR do operon da riboflavina	16
3.4. Clonagem do operon sob controle do sistema de autoindução	18
3.5. Ampliando a funcionalidade do sistema de autoindução	21
3.5.1. Construção e amplificação das partes genéticas	22
3.5.2. Clonagem das partes para a edição gênica com CRISPR-Cas9	24
3.6. Transformação de <i>B. subtilis</i>	28
3.7. Edição gênica com CRISPR-Cas9	29
3.8. Sequenciamento	29
3.9. Crescimento celular e produção de riboflavina	30
4. Resultados e discussão	32
4.1. Simulação	32
4.2. Clonagem do operon sob controle do sistema de autoindução	34
4.3. Amplificação da funcionalidade do sistema utilizando edição gênica com CRISPR-Cas9	38
4.3.1. Construção e amplificação das partes genéticas	38
4.3.2. Clonagem das partes para a edição gênica com CRISPR-Cas9	40
4.3.3. Edição gênica com CRISPR-Cas9	45
4.3. Crescimento celular e produção de riboflavina	49
5. Conclusão	53
Referências	55

1. Introdução

A bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* é considerada um hospedeiro atraente para a produção heteróloga de proteínas. *B. subtilis* é naturalmente encontrada no solo e é comumente utilizada como modelo em estudos de genética e metabolismo celular (TRAN et al., 2017). Além disso, por apresentar alta função secretória, alta capacidade de produção, necessidades nutricionais simples e por ser classificada como um microrganismo geralmente considerado seguro (GRAS - *generally regarded as safe*), essa bactéria é tradicionalmente utilizada como uma biofábrica em processos produtivos de nutracêuticos (GU et al., 2018; LIU et al., 2019).

Apesar de apresentar um grande potencial biotecnológico, quando comparado a outros hospedeiros procarióticos e eucarióticos amplamente utilizados como *chassi* em biologia sintética e engenharia metabólica, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, a pesquisa com *B. subtilis* tem sido limitada pela falta de elementos genéticos reguladores (LIU et al., 2019). Neste sentido, trabalhos recentes focam no desenvolvimento de caixas de ferramentas de biologia sintética para *B. subtilis*, úteis na manipulação genética para construção de vias sintéticas e circuitos genéticos (ALTENBUCHNER, 2016; GUIZIOU et al., 2016)

Tradicionalmente, as linhagens de *B. subtilis* utilizadas na indústria são construídas com promotores constitutivos, que são as peças genéticas responsáveis por iniciar a expressão gênica nas células. Esses promotores ditos constitutivos não necessitam do auxílio de outras moléculas para iniciar a síntese gênica e, portanto, não são reguláveis e exigem alta demanda metabólica às células durante o crescimento celular (TRAN et al., 2017). Existem também promotores induzíveis que, em contrapartida, dependem da ação de moléculas externas para acionar a síntese gênica. Estes promotores induzíveis são pouco utilizados na indústria pois, embora possibilite o controle do processo, são mais custosos porque as moléculas indutoras requeridas geralmente são caras (KIM et al., 2019) (GUAN et al., 2015).

Pensando nessas limitações, alguns estudos têm direcionado esforços na busca pelo desenvolvimento de circuitos autônomos, baseados em sistemas de *quorum sensing* (QS), capazes de monitorar e regular a expressão gênica de uma via heteróloga sem a necessidade da intervenção humana e adição de compostos

indutores ao longo do processo, impondo uma carga metabólica mínima às células (GUPTA et al., 2017).

O *quorum sensing* bacteriano é um sistema de comunicação celular que pode controlar processos biológicos por meio de moléculas sinalizadoras específicas, em algumas espécies (MADIGAN et al., 2016). Esse sistema é responsivo à densidade populacional local e ativa a expressão de genes responsáveis, por exemplo, pela produção de antibióticos, formação de biofilmes e virulência (KIM et al., 2017).

Alguns modelos de autoindução utilizando o sistema de QS foram projetados com sucesso na bactéria Gram-negativa *E. coli*. No estudo descrito por Kim et al. (2017), o sistema *LuxRI* de QS de *Aliivibrio fischeri* foi inserido em *E. coli* para a regulação da produção de bisaboleno por uma via heteróloga de mevalonato, visando a produção de um biocombustível. Outra aplicação do mecanismo também foi abordada por Soma e Hanai (2015), em que o sistema *LuxRI* foi desenvolvido em conjunto com promotores sintéticos para redirecionar o metabolismo bacteriano para a produção de isopropanol. Ainda, com foco em engenharia metabólica de *E. coli*, Gupta et al. (2017) utilizou o sistema QS de *Pantoea stewartii* para o redirecionamento do fluxo de carbono para a produção de ácido glucárico e ácido chiquímico, através do desligamento da expressão gênica de vias endógenas.

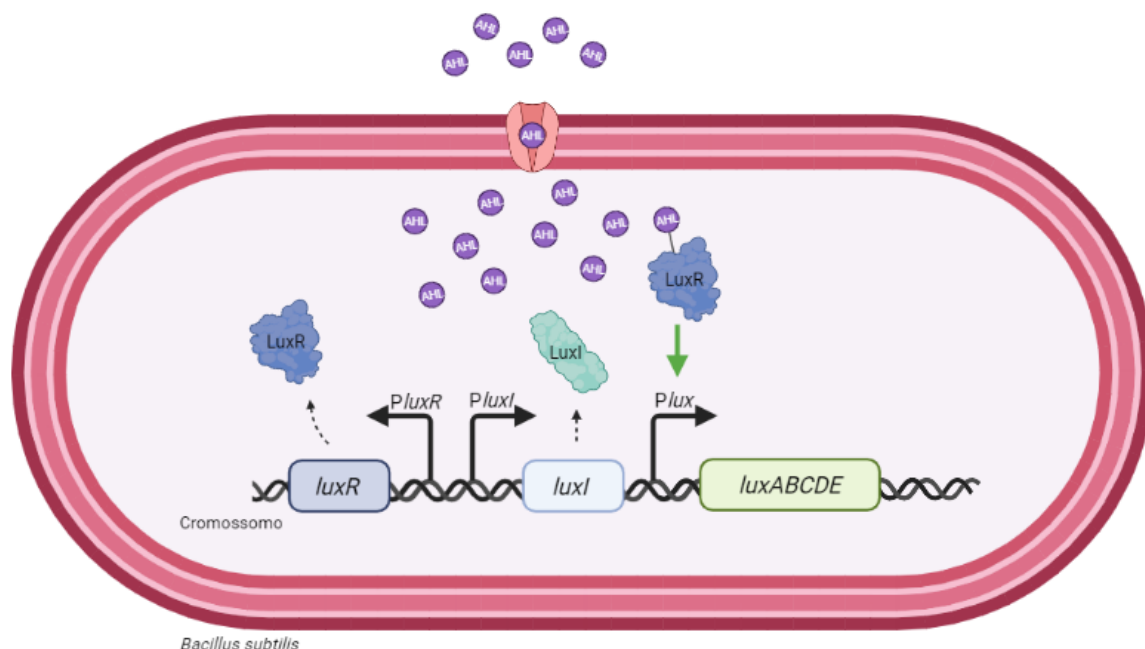
Recentemente, o grupo de pesquisa de biologia sintética de Araraquara propôs uma estratégia baseada no mecanismo de QS bacteriano para criar um dispositivo genético capaz de monitorar e ativar a expressão gênica de forma autônoma em *B. subtilis* e, posteriormente, conecta-lo a biossíntese de moléculas de interesse industrial, como a riboflavina (vitamina B₂) (CORRÊA et al., 2020).

No estudo proposto pelo grupo, o mecanismo utilizado foi o sistema QS da bactéria Gram-negativa *A. fischeri*, que naturalmente regula a emissão de bioluminescência gerada pelas enzimas codificadas no operon *luxABCDE*. Esse sistema funciona sob a ação de duas proteínas regulatórias, LuxI e LuxR, e uma pequena molécula de sinalização capaz de permear a membrana celular, chamada N-acil-homoserina lactona (AHL) (BOO, A.; AMARO, R. L.; STAN, G., 2021).

O dispositivo criado pelo grupo é composto pelo sistema *LuxRI* de QS e por um promotor sintético *P_{lux}* que é regulado pelas moléculas indutoras do sistema, como

ilustrado na figura 1 (CORRÊA et al., 2020). O mecanismo de funcionamento se dá da seguinte forma: a proteína LuxR recruta a molécula sinalizadora AHL, que é produzida pela AHL sintetase LuxI e, em seguida, dimeriza para uma forma de ativador. A transcrição começa depois do ativador se ligar à região *luxbox* do promotor *Plux*. A concentração de AHL aumenta com o crescimento celular, resultando em um nível crescente de transcrição (SAEKI, E. K.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G., 2020).

Figura 1. Representação do funcionamento do dispositivo genético de autoindução baseado no sistema LuxRI de QS de *A. fischeri*.

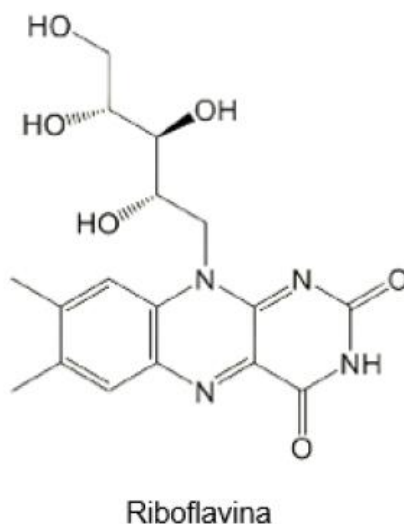


Fonte: próprio autor (2022).

A riboflavina (figura 2) é um composto orgânico amplamente utilizado por apresentar propriedades antioxidantes, anticancerígena, por promover o aumento da imunidade e como aditivo nutricional (DEMUYSER et al., 2020; SU et al., 2020). Esse composto não pode ser sintetizado pelo nosso organismo e deve ser adquirido através da dieta (WU, X.; ZHA, J.; KOFFAS, M. AG., 2020). A produção de riboflavina é feita de forma bem sucedida por fermentação microbiana industrial com linhagens modificadas com a inserção de múltiplas cópias do operon de riboflavina no genoma e com o uso de promotores constitutivos fortes. No entanto, há esforços para o aumento da biossíntese, que consistem em: estratégias de engenharia metabólica para o direcionamento do fluxo de carbono, superexpressão e desregulação do

metabolismo de purinas e o bloqueio da síntese de subprodutos (REVUELTA et al., 2017; SU et al., 2020).

Figura 2. Estrutura química da riboflavina.

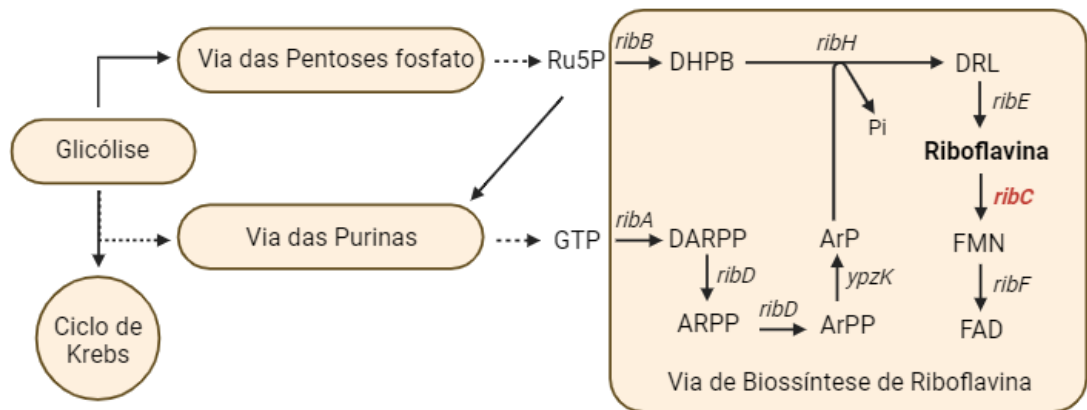


Fonte: adaptado de Wu, X.; Zha, J.; Koffas, M. AG. (2020).

O metabolismo de riboflavina (figura 3) está diretamente ligado à atividade de uma enzima bifuncional flavoquinase/ FAD sintetase (RibC), que converte a riboflavina em flavina mononucleotídeo (FMN), e esta em flavina dinucleotídeo (FAD) (ZHANG et al., 2021). A redução da atividade desta enzima a 1% em relação ao tipo selvagem, obtida por mutação, resulta em superprodução de riboflavina (MACK, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; HOHMANN, H. P., 1998).

Na figura 3, os genes *ribA*, *ribB*, *ribD*, *ypzK*, *ribH* e *ribE* codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese de riboflavina. Em destaque, o gene *ribC* codifica a enzima flavoquinase.

Figura 3. Rota metabólica de riboflavina.



Fonte: adaptado de Wang et al. (2018) e Xu et al. (2015).

Pensando nisso, o sistema *LuxRI* foi explorado para atuar não só como um ativador, mas também como um repressor da expressão gênica, tendo como alvo o gene que codifica a enzima RibC. Para isso, foi utilizada a edição gênica por CRISPR-Cas9 para adicionar o sítio de ligação da proteína reguladora LuxR (*luxbox*) à região promotora do gene-alvo (*PribC*). Desta forma a interação da RNA polimerase na região promotora estará impedida quando LuxR-AHL estiver ligado ao *luxbox*. Com a expressão de *ribC* bloqueada, haverá uma redução drástica na metabolização da riboflavina produzida após o início da fase exponencial do crescimento celular, levando a um acúmulo do composto sem prejuízo às células. A figura 4 mostra o design do circuito.

Bacillus subtilis

Como pode ser observado na figura 4, o sistema é constituído por um módulo de indução e um módulo de resposta. O módulo de indução possui os componentes regulatórios do sistema *LuxRI* com os genes codificadores das proteínas LuxI e LuxR e seus respectivos promotores. Já o módulo de resposta consiste no operon *ribDGEABHT* (em amarelo) que codifica as proteínas responsáveis pela biossíntese de riboflavina, sob controle de um promotor sintético (*Plux*), e no promotor *PribC* modificado à jusante com o sítio de ligação do complexo AHL-LuxR (*luxbox*). A dinâmica deste sistema se dá da seguinte forma: as proteínas reguladoras são sintetizadas constitutivamente pelas células, e assim como no sistema LuxRI descrito anteriormente, o complexo AHL-LuxR atua na indução da transcrição do operon a partir da regulação do promotor sintético. Concomitantemente, AHL-LuxR se liga ao *luxbox* e impede a transcrição de *ribC* pela RNA polimerase.

15

2. Objetivo

Desenhar e simular a dinâmica do sistema de autoindução *LuxRI* conectado à biossíntese de riboflavina *in silico* e construir linhagens de *B. subtilis* portadoras deste sistema, ampliando sua funcionalidade.

3. Metodologia

3.1. Simulação

O design do circuito e as análises *in silico* foram realizadas no software iBioSim 3.1 (WATANABE et al., 2018). Neste software os circuitos genéticos foram construídos utilizando sequências de banco de dados próprios e de repositórios online, como o Registry of Standard Biological Parts e o SynBioHub. As simulações foram feitas mimetizando condições celulares, através de modelo contínuo-determinístico, variando o coeficiente de repressão (Kr) do complexo AHL-LuxR para avaliar os efeitos na expressão gênica.

3.2. Linhagem bacteriana

Linhagens de *E. coli* Top 10 e JM109 foram utilizadas nas clonagens para aumentar o número de cópias dos plasmídeos. A linhagem de *B. subtilis* KO7 foi utilizada como *chassi*. Esta linhagem, assim como muitos outros microrganismos, possui operon endógeno responsável pela produção de riboflavina e é ausente de mutações induzidas para a biossíntese. Além disso, a linhagem KO7 se difere da linhagem selvagem por possuir deleções em genes de proteases extracelulares (GARCÍA-MOYANO et al., 2020).

3.3. Amplificação por PCR do operon da riboflavina

Oligonucleotídeos específicos (tabela 1) foram desenhados para amplificação do operon de riboflavina a partir do DNA genômico de *B. subtilis*. Às extremidades 3' e 5' dos oligos foi adicionado o sítio de restrição da enzima *BsaI* para realizar o protocolo *Golden Gate Assembly* (GGA) de digestão e ligação simultâneas do inserto e do vetor (ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S., 2008). O operon é constituído por 5 genes identificados pelas siglas *ribDGEABHT*, uma sequência 5'-não traduzida e um terminador de transcrição, totalizando 4.2 kb.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do operon da riboflavina.

Oligo	Sequência
ribgenes (Bsal)_fw	TCTGGGTCTCGTACTATCGCTATAATAACCAATAAGGACAAATG
ribgenes (Bsal)_rv	TCTGGGTCTCCAGCGTCTTATCGACAAACACCGTTTG

A sequência sombreada identifica o sítio de reconhecimento da *Bsal*.

O DNA genômico de *B. subtilis* foi extraído e purificado com kit Wizard® Genomic DNA Purification - Promega. Em seguida, o DNA genômico foi utilizado como molde na reação de amplificação em cadeia polimerase (PCR) em termociclador com a enzima DNA polimerase de alta fidelidade, conforme as especificações dos componentes e das condições de reação descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente. O produto gerado foi então verificado em eletroforese horizontal em gel de agarose e purificado com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega.

Tabela 2. Componentes da PCR do operon de riboflavina.

Componente	Volume (µL)
Água MiliQ	31,5
Tampão Hifi 5x	10,0
10 µM oligonucleotídeo direto	2,5
10 µM oligonucleotídeo reverso	2,5
DNA molde (500 ng)	2,0
10 mM dNTPs	1,0
DNA polimerase (Time Hifi ®)	0,5

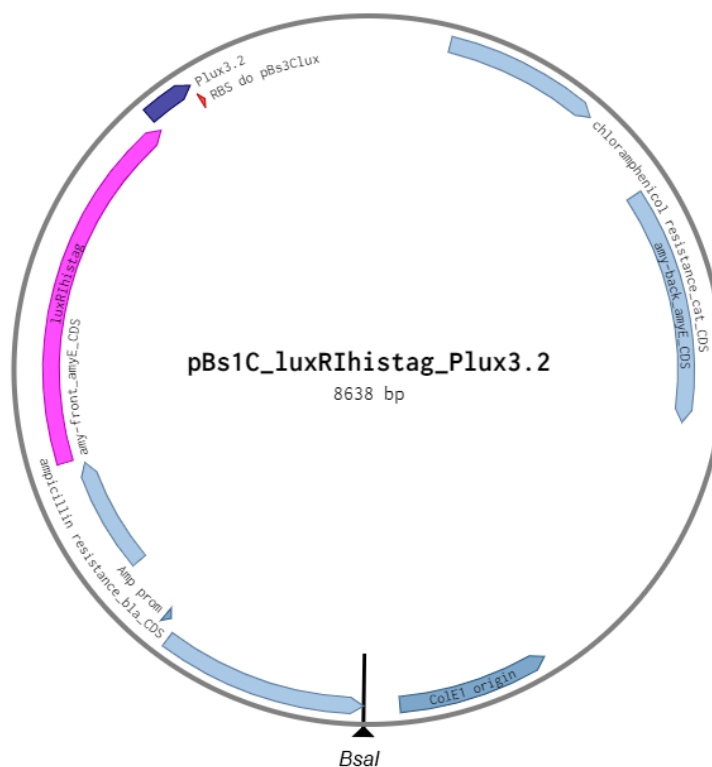
Tabela 3. Condições da PCR do operon de riboflavina.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial		98	30 s
30 ciclos	Desnaturação	98	05 s
	Anelamento	50	20 s
	Ligação	72	4 min
Extensão		72	6 min
Incubação		4	∞

3.4. Clonagem do operon sob controle do sistema de autoindução

O operon da riboflavina foi inserido no plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2 (figura 5), o qual apresenta origem de replicação e gene de resistência a ampicilina para *E. coli*, assim como sítios de integração ao locus *amyE* e gene de resistência a cloranfenicol para *B. subtilis*. O plasmídeo já possuía os sítios de restrição para clonagem GGA e sistema *LuxRI* de QS e também o promotor sintético *Plux*, desenvolvido previamente para permitir alto nível de expressão gênica sob controle da densidade populacional bacteriana.

Figura 5. Mapa do plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2.



Legenda: O plasmídeo contém origem de replicação em *E. coli* (*colE1*), sítios de integração ao locus *amyE* para *B. subtilis*, sistema *LuxRI* (*luxRIhistag*) de QS, marca de resistência a ampicilina (*ampicillin resistance_bla_CDS*) para *E. coli* e cloranfenicol (*chloramphenicol resistance_cat_CDS*) para *B. subtilis*. Fonte: próprio autor (2022).

As reações de digestão e ligação (1:2) das partes foram realizadas em termociclador seguindo o protocolo GGA utilizando a enzima de restrição *BsaI* (FastDigest- Thermo Scientific™) e a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific™). Para fins de controle foi realizada a mesma reação ausente do inserto. O inserto utilizado foi o produto de PCR do operon de riboflavina e o vetor, o plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2 extraído e purificado com kit PureYield™ Plasmid Miniprep System - Promega. As especificações dos componentes e das condições de reação estão descritas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Componentes da reação GGA para a clonagem do operon de riboflavina.

Componente	Volume (μL)
Água MiliQ	15,9
Tampão T4 10x	2,0
pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2 (100 ng)	0,6
Produto de PCR (55 ng)	0,5
<i>Bsal</i>	0,5
T4 ligase	0,5

Tabela 5. Condições da reação GGA para a clonagem do operon de riboflavina.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo (min)
78 ciclos	Ativação da enzima de restrição	37	5
	Ativação da DNA ligase	22	5
Inativação da enzima de restrição		55	15
Inativação da DNA ligase		85	20
Incubação		4	∞

Ao término da reação, a mistura foi transformada em *E. coli* Top10 quimicamente competente por processo padrão de choque térmico para aumentar o número de cópias do plasmídeo. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) (16 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl; pH 7,0-7,2) sólido (acrescido de ágar) com ampicilina (100 μg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C.

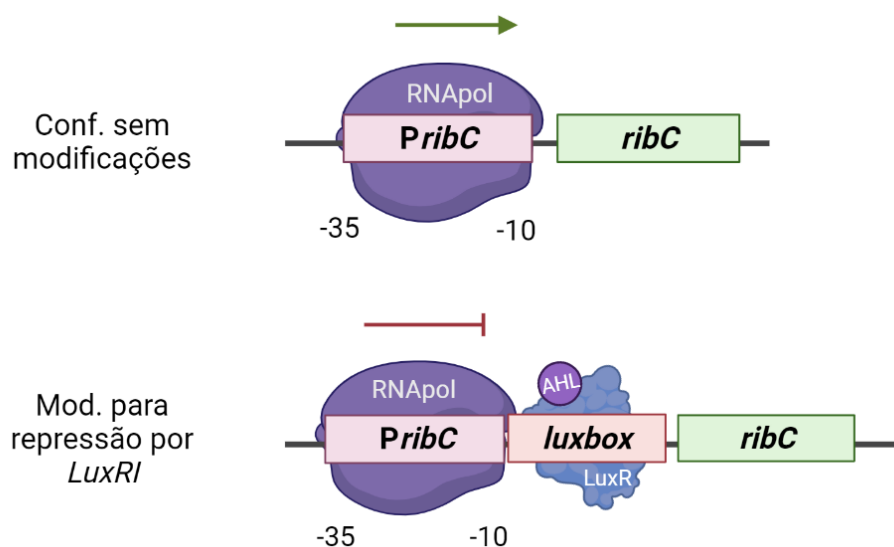
As colônias transformantes foram coletadas, inoculadas em LB líquido em tubos de ensaio e incubadas a 37°C e 220 rpm *overnight*. No dia seguinte, foram submetidas ao processo de extração e purificação de plasmídeos com kit comercial. Os plasmídeos extraídos foram digeridos com a enzima *Pst*I (FastDigest- Thermo Scientific™) e submetidos à eletroforese em gel de agarose para confirmação da ligação. As amostras de tamanho correto foram sequenciadas para confirmação da

clonagem e as células positivas foram criopreservadas em meio LB acrescido de glicerol a concentração final de 20% (v/v).

3.5. Ampliando a funcionalidade do sistema de autoindução

Para ampliar a funcionalidade do sistema *LuxRI*, o sítio de ligação de LuxR (*luxbox*) foi inserido a jusante da posição -10 do promotor *PribC*, ao invés da localização natural a montante do promotor, conforme ilustrado na figura 6.

Figura 6. Esquema da ampliação da funcionalidade do sistema *LuxRI*.



Legenda: A parte superior ilustra a configuração das partes genéticas da síntese de RibC sem modificações. Na parte inferior, as modificações feitas, com a inserção do *luxbox* a jusante da região promotora, impedindo a transcrição de *ribC* pela RNA polimerase. Fonte: próprio autor (2022).

O promotor natural do gene *ribC* foi modificado pela introdução do *luxbox* por edição gênica com CRISPR-Cas9, utilizando sistema desenvolvido por Altenbuchner (2016). Para isso, o RNA guia (gRNA) da enzima Cas9 foi desenhado a partir do software R-genome Cas designer, a fim de promover um corte específico na região da sequência promotora (-35 a -10) do gene *ribC*. A região promotora foi determinada pelo software SoftBerry, a partir do genoma de *B. subtilis*. Concomitantemente, uma sequência sintética (DNA doador), formada pelo promotor *PribC* contendo o *luxbox*, flanqueado por sequências homólogas de 500 pb, foi desenhada para o reparo da sequência promotora por recombinação homóloga.

3.5.1. Construção e amplificação das partes genéticas

A sequência do gRNA (20 pb) foi adquirida pelo pareamento de dois oligonucleotídeos específicos desenhados, já contendo extremidades coesivas para a ligação. O pareamento foi realizado em tubos eppendorfs de 1,5 mL com 10 µL de cada oligo a 100 µM e 80 µL de tampão de eluição (TE). As amostras foram incubadas em banho seco a 100°C por 10 minutos. Em seguida, o banho seco foi desligado e aguardou-se até que a temperatura chegasse a 40°C. Então, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e o DNA foi quantificado.

O DNA doador foi dividido em duas partes, totalizando 1050 pb. As duas partes do DNA doador foram obtidas através de PCR em termociclador com molde de DNA genômico de *B. subtilis*, utilizando primers específicos desenhados com os sítios de restrição das enzimas *Bsal* e *Sfil* nas extremidades 3' e 5', respectivamente. As sequências amplificadas foram verificadas por eletroforese horizontal em gel de agarose e purificadas com kit comercial específico.

Na tabela 6 constam os primers utilizados nas reações de pareamento do gRNA e PCR das duas partes da sequência homóloga. A tabela 7 descreve os componentes utilizados nas reações de PCR das duas partes da sequência homóloga e a tabela 8, as condições utilizadas.

Tabela 6. Oligos utilizados na reação de pareamento do gRNA e PCR das duas partes do DNA doador.

Oligo	Sequência
gRNA(truB_al vo848)_fw	TACGGCTTGGCGATCTATTTCCCT
gRNA(truB_al vo848)_rv	AAACAGGGAAATAGATCGCCAAGC
truB(seq.hom.)_(Sfil)_fw	AA GGCCAACGAGGCC GTATGATAACCATTGAAGACATTGCCC

truB(seq.hom.
)_nt_modifica
do(Bsal)_rv

TCTGGGTCTCTCTATTGTTTCGCTTTTTTGCATCAATACTTTTGC
CGGCTTTAACAGCCCTTTTTTTGCAGGATGAGGGAAATAGATC
GCCAAGCATGTTCCGGATTTCAGTAAAGACGGC

luxbox_linker
_ribC(Bsal)_f
w

GCTAGGTCTCAATAGACCTGTAGGATCGTACAGGTAAAAAAG
GTGACCGTTCTGTGAAGAC

luxbox_linker
_ribC(Sfil)_rv

AAGGCCTTATTGGCC

A sequência sombreada em cinza identifica o sítio de reconhecimento da *Bsal* e, em azul, a enzima *Sfil*.

Tabela 7. Componentes da PCR das duas partes do DNA doador.

Componente	Volume (µL)
Água MiliQ	33
Tampão Hifi 5x	10
10 µM oligonucleotídeo direto	2,5
10 µM oligonucleotídeo reverso	2,5
DNA Molde (300 ng)	0,5
10 mM dNTPs	1
DNA polimerase (Time Hifi ®)	0,5

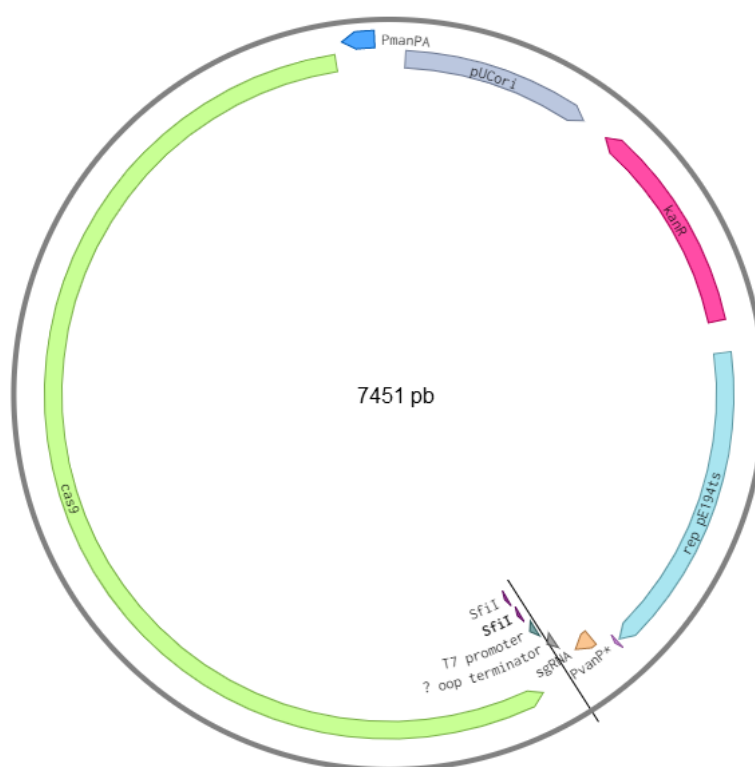
Tabela 8. Condições da PCR das duas partes do DNA doador.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial	98	30 s
30 ciclos	Desnaturação	98
	Anelamento	50
	Ligação	72
Extensão	72	5 min
Incubação	4	∞

3.5.2. Clonagem das partes para a edição gênica com CRISPR

O plasmídeo utilizado na edição com CRISPR foi pJOE8999(cas9) (figura 7) desenvolvido por Altenbuchner (2016). Este plasmídeo contém gene da enzima Cas9 (cas9) sob controle do promotor sensível a manose (*P_{manP}*), origem de replicação mínima (*pUC18*) e sensível à temperatura (*pE194ts*) e gene de resistência a canamicina (*kanR*) em *E. coli* e *B. subtilis*, sítios de restrição das enzimas *BsaI* e *SfiI*. O plasmídeo também possui a sequência universal (*scaffold*) do guia, chamada sgRNA.

Figura 7. Mapa do plasmídeo pJOE8999(cas9).



Fonte: adaptado de Altenbuchner (2016).

Primeiramente, a sequência-guia do gRNA foi inserida no plasmídeo pJOE8999(cas9). O plasmídeo foi extraído e purificado com kit comercial, seguido da digestão com a enzima *BsaI* (FastDigest- Thermo Scientific™). Para diminuir a quantidade de falsos positivos após a transformação, o plasmídeo digerido foi submetido à separação por eletroforese em gel de agarose. A banda correspondente ao plasmídeo digerido foi submetida a um processo de purificação com kit comercial e o DNA foi quantificado.

A ligação (1:150) da sequência-guia do gRNA no plasmídeo foi realizada com a enzima T4 DNA ligase em termociclador. Na tabela 9 consta os componentes e na tabela 10, as condições de reação. Como controle negativo foi utilizada a mesma reação, ausente de sequência-guia do gRNA.

Tabela 9. Componentes da reação de ligação da sequência-guia do gRNA no plasmídeo pJOE8999(cas9).

Componente	Volume (µL)
Água MiliQ	7,1
Tampão T4 10x	1,0
pJOE8999(cas9) (20 ng)	1,0
sequência-guia do gRNA (11 ng)	0,4
T4 ligase	0,5

Tabela 10. Condições da reação de ligação da sequência-guia do gRNA no plasmídeo pJOE8999(cas9).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Ativação da enzima	22	1h
Inativação da enzima	65	15 min
Incubação	4	∞

Após o termino da reação de ligação foi realizada a transformação em *E. coli* Top 10 quimicamente competente pelo protocolo padrão de choque térmico e plaqueadas em meio LB sólido com canamicina (50 µg/mL). As colônias transformantes foram criopreservadas e a clonagem foi confirmada por sequenciamento, utilizando primers específicos para a região do gRNA.

Posteriormente, o plasmídeo contendo o gRNA (pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)) foi utilizado como vetor para a inserção do DNA doador. Para isso, o plasmídeo foi extraído e purificado com kit comercial, digerido com a enzima *SfiI* (HF[®]v2 – NEB) e purificado a partir de eletroforese em gel de agarose para diminuir falsos positivos.

As duas partes do DNA doador foram unidas pelo protocolo simplificado de GGA, utilizando a enzima *Bsa*I (HF®v2 – NEB) para a clivagem e a enzima T4 ligase para unir os fragmentos. Os componentes da reação estão dispostos na tabela 11, e as condições na tabela 12.

Tabela 11. Componentes da reação GGA para ligação das duas partes do DNA doador.

Componente	Volume (µL)
Água MiliQ	16,4
Tampão T4 10x	2,0
DNA doador 1 (100 ng)	0,3
DNA doador 2 (100 ng)	0,3
<i>Bsa</i> I	0,5
T4 ligase	0,5

Tabela 12. Condições da reação GGA para ligação das duas partes do DNA doador.

	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo (min)
100 ciclos	Ativação da enzima de restrição	37	5
	Ativação da DNA ligase	16	5
	Inativação das enzimas	80	20
	Incubação	4	∞

Uma vez tendo um inserto único (1020 pb), foi realizada uma PCR para aumentar o número de cópias para a posterior inserção no plasmídeo. Os componentes e as condições de reação utilizadas estão nas tabelas 13 e 14, respectivamente. Após a PCR, o fragmento foi verificado por eletroforese em gel de agarose, seguido pela purificação com kit comercial e quantificação do DNA.

Tabela 13. Componentes da PCR do DNA doador completo.

Componente	Volume (μL)
Água MiliQ	33,2
Tampão Hifi 5x	10,0
10 μM oligonucleotídeo direto	2,5
10 μM oligonucleotídeo reverso	2,5
DNA Molde (100 ng)	0,3
10 mM dNTPs	1,0
DNA polimerase (Time Hifi ®)	0,5

Tabela 14. Condições da PCR do DNA doador completo.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial	98	30 s
30 ciclos	Desnaturação	10 s
	Anelamento	20 s
	Ligação	40 s
Extensão	72	5 min
Incubação	4	∞

Em seguida, o DNA doador foi digerido com a enzima *SfiI* (FastDigest- Thermo Scientific™), purificado e quantificado. Então, o DNA doador foi inserido no plasmídeo por ligação (1:3) em termociclador utilizando a enzima T4 DNA ligase, conforme especificações das tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Componentes da reação de ligação do DNA doador no plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB).

Componente	Volume (μL)
Água MiliQ	8,2
Tampão T4 10x	2,0
pJOE8999(cas9)_gRNA(truB) (50 ng)	8,3

DNA doador (21 ng)	0,5
T4 ligase	1,0

Tabela 16. Condições da reação de ligação do DNA doador no plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Ativação da enzima	22	1h
Incubação	16	<i>overnight</i>

Por fim, foi realizada a transformação em *E. coli* JM 109 quimicamente competente por protocolo padrão de choque térmico e as células foram plaqueadas em meio LB-ágar com canamicina (50 µg/mL). As colônias transformantes foram confirmadas por digestão seguida de eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, por sequenciamento. Então, as linhagens positivas foram criopreservadas.

3.6. Transformação de *B. subtilis*

Os plasmídeos construídos e extraídos de *E. coli* foram transformados em *B. subtilis*. A transformação seguiu o procedimento Two-step *Bacillus subtilis* Transformation Procedure descrito por Bron et al. 1999, baseado na competência natural da bactéria.

A construção utilizando o plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2 foi plaqueada em meio LB-ágar com cloranfenicol (5 µg/mL), e a construção com pJOE8999(cas9) em LB-ágar com canamicina (5 µg/mL) como marcas de seleção. A confirmação da integração das sequências ao genoma foi realizada por sequenciamento.

A construção do sistema *LuxRI* com o operon da riboflavina foi realizada em *B. subtilis* KO7, que em seguida, foi utilizada como linhagem hospedeira na edição gênica com CRISPR-Cas9 para a amplificação da funcionalidade do sistema.

3.7. Edição gênica com CRISPR-Cas9

Para realizar a edição gênica com CRISPR-Cas9 na linhagem de KO7 contendo o sistema *LuxRI* e o operon da riboflavina, a transformação foi plaqueada em placas de em meio LB-ágar com canamicina (5 µg/mL) e manose (0,2%) para ativar o promotor e a expressão da enzima Cas9. As placas foram incubadas a 30°C por dois dias para a edição gênica.

Em seguida, as colônias transformantes foram estriadas em meio LB sólido e incubadas a 42°C *overnight* para a fazer com que as células perdessem o plasmídeo e, conseqüentemente, não houvesse mais edição pela Cas9.

A verificação da perda do plasmídeo foi feita estriando as colônias que sobreviveram a 42°C em placas com e sem antibiótico e incubando a 37°C *overnight*. Em seguida, o produto de PCR de colônia foi sequenciado para confirmação da edição e criopreservadas em meio LB acrescido de glicerol a concentração final de 20% (v/v).

3.8. Sequenciamento

Os plasmídeos construídos foram confirmados por sequenciamento de Sanger. Para isso, o material genético foi extraído com kit comercial específico, purificado e amplificado por PCR em termociclador com o reagente BigDye® Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.) contendo dNTPs e DNA polimerase. A tabela 17 contém os componentes da e a tabela 18, as condições da PCR.

Tabela 17. Componentes da PCR para o sequenciamento.

Componente	Quantidade
Água MiliQ	(13,5 - x) µL
Tampão de sequenciamento 5X	3,5 µL
DNA (500 ng)	x
Primer direto/reverso (3,2 µM)	2,0 µL
BigDye Mix	1,0 µL

Tabela 18. Condições da PCR para o sequenciamento.

Etapa		Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação Inicial		96	1min
25 ciclos	Desnaturação	96	10s
	Anelamento	TM primer	5s
	Ligação	60	4min
Extensão		60	5min
Incubação		4	∞

Após a PCR, as amostras foram purificadas com o kit *BigDye Xterminator Purification*, com 45 µL do reagente SAM e 10 µL de resina. Então, foram incubadas em banho seco a temperatura ambiente por 30min, com agitação de 12000 rpm. Em seguida, as amostras foram submetidas ao sequenciamento no equipamento SANGER 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no software Benchling.

3.9. Crescimento celular e produção de riboflavina

As linhagens de *B. subtilis* foram cultivadas em frascos tipo Erlenmeyer (500 mL) preenchidos com 50 mL de Meio Power (1 g/L extrato de levedura, 25 g/L NaNO₃, 0.333 g/L, KH₂PO₄, 1 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.15 g/L MgSO₄·7H₂O, 7.5 mg/L CaCl₂, 6 mg/L MnSO₄·H₂O, 6 mg/L, FeSO₄ 7H₂O, pH 7.0) acrescido de sacarose 4% (m/v) e antibiótico (5 µg/mL). Uma linhagem de *B. subtilis* selvagem (*B. subtilis* 168) foi utilizada para fins comparativos da produção pela via endógena da vitamina e uma linhagem com promotor constitutivo forte (Pveg) foi utilizada como controle positivo.

Os cultivos foram feitos em triplicata em incubadora rotativa, mantida a 37°C e 220rpm, e protegidos da luz. O cultivo para o teste de inserção do operon de riboflavina durou 9 horas e o teste de ampliação da funcionalidade após edição com CRISPR-Cas9, 48 horas.

Amostras de 1mL foram coletadas periodicamente para determinação do crescimento celular por densidade óptica (600 nm) e da produção de riboflavina por fluorescência (excitação 445nm e emissão 524nm) em leitor de microplacas Tecan

Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Suíça). Para isso, foi utilizada uma placa de 96 poços, com 200 µL de amostra para a leitura periódica, considerando meio de cultura como branco. Primeiro foi medida a densidade óptica e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000×g por 5 min para a sedimentação das células e o sobrenadante foi utilizado para medir a fluorescência.

Nos testes de ampliação da funcionalidade do sistema após a edição com CRISPR-Cas9, a riboflavina produzida também foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) conforme Lins et al. (2021). Para isso, primeiro as amostras foram centrifugadas a 16.000×g por 30 min e o sobrenadante foi recuperado. Em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético 1% (v/v) ao sobrenadante, seguido pela mistura e centrifugação 16000×g por 20 minutos para a precipitação das proteínas. Então, o sobrenadante foi filtrado com filtro hidrofílico PTFE 0,20 µm e injetado no sistema de HPLC (classe Shimadzu - Shimadzu Scientific Instruments) para detecção de riboflavina por absorbância a 445nm.

O sistema HPLC continha bomba LC-20AD, controlador de sistema CBM-20^a, detector fotodiodo SPD-M20A e coluna Poroshell 120 EC-C18 de 50 x 3 mm com tamanho de partícula 2.7 µm (Agilent Technologies). A fase móvel a 0,5 mL/min, em modo isotérmico a 30°C consistia em 82% de solvente com 20 mM de ácido fórmico e 20mM formato de amônio, e 18% de etanol (LINS et al., 2021).

Para determinar a concentração de riboflavina produzida, riboflavina pura comercial (Sigma Aldrich) foi usada como padrão de calibração, preparada previamente pelo grupo de pesquisa, para fluorescência (equação 1) e absorbância (equação 2).

$$[Riboflavina(uM)] = \frac{\text{Fluorescência} - 109.31}{671.76} \quad (\text{equação 1})$$

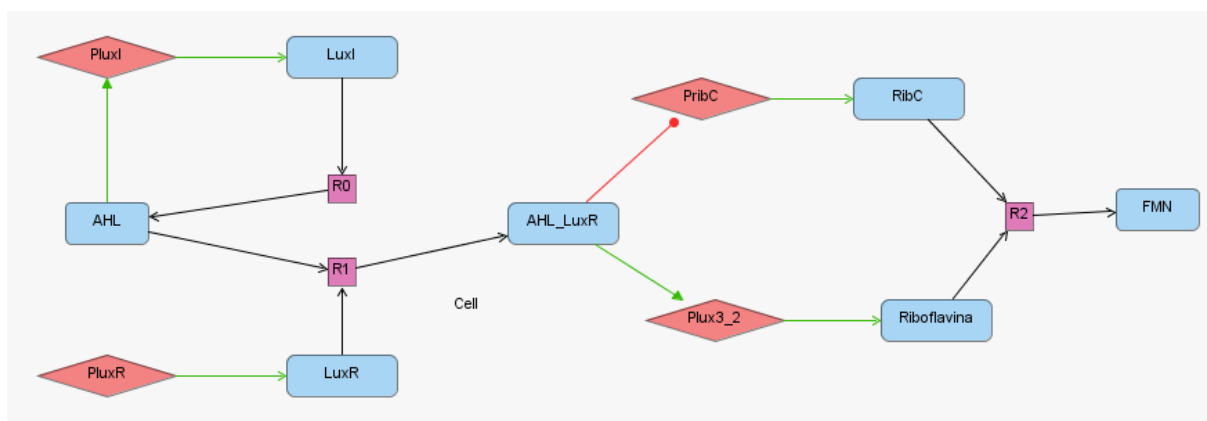
$$[Riboflavina(uM)] = \frac{\text{Absorbância} - 72187}{22019} \quad (\text{equação 2})$$

4. Resultados e discussão

4.1. Simulação

O circuito genético que conecta a biossíntese de riboflavina ao sistema de autoindução *LuxRI* (figura 4) foi construído *in silico* como demonstrado na figura 8. Nestes circuitos os promotores foram representados por losangos vermelhos, proteínas, compostos e complexos por retângulos azuis e, reações de formação e decomposição por quadrados roxos. As setas verdes indicam processos de indução da expressão gênica e a linha vermelha, a repressão.

Figura 8. Design do modelo construído no software iBioSim 3.1.



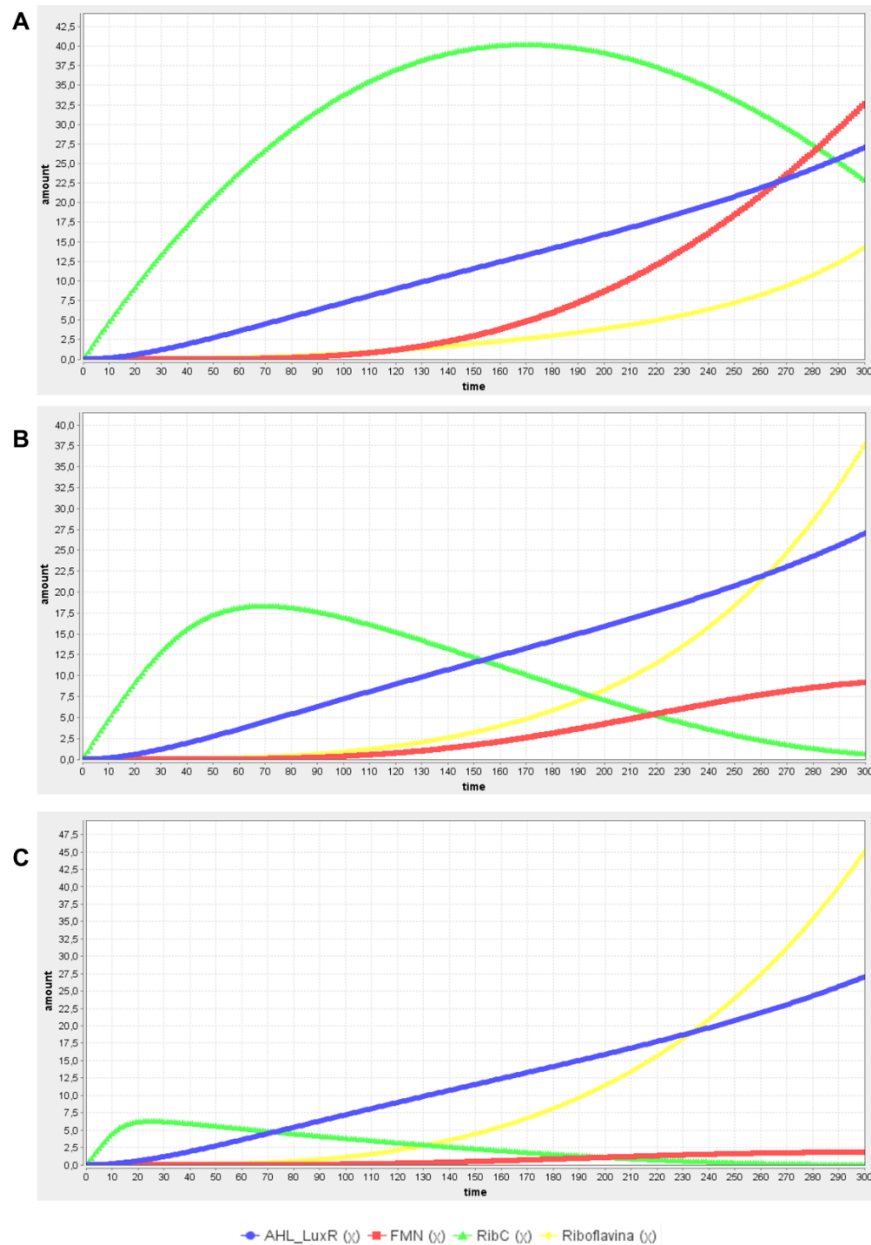
Legenda: Os promotores foram representados por losangos vermelhos; proteínas, compostos e complexos por retângulos azuis; reações de formação e decomposição por quadrados roxos. Fonte: próprio autor (2022).

Após a construção do modelo, foram feitas simulações para avaliar a funcionalidade do sistema. Para isso, os componentes foram definidos como internos às células, uma vez que constituem uma região genética (promotores e genes) ou são derivados de reações bioquímicas (AHL e FMN). As proteínas regulatórias LuxI e LuxR iniciaram com uma concentração diferente de zero, devido à dinâmica do sistema de autoindução que promove uma produção constitutiva desses componentes. Além disso, foi considerado que todas as biomoléculas sofreriam degradação por conta do processamento natural das células.

As simulações foram feitas em tempo contínuo, sem intervalos, mimetizando o crescimento celular sem considerar os eventos aleatórios. Afim de analisar o processo de repressão da expressão gênica de *ribC*, a constante de repressão (K_r) teve o valor

variado em 0,05; 0,5 e 5. Os gráficos resultantes das simulações estão representados na figura 9.

Figura 9. Gráficos das simulações realizadas do modelo de autoindução conectado à síntese de riboflavina e repressão da expressão gênica de *ribC*.



Legenda: As curvas representam a formação do complexo AHL-LuxR (azul); da enzima RibC (verde); da molécula FMN (vermelho) e de riboflavina (amarelo) em mols ao longo do tempo (s). (A) $K_r=0,05$; (B) $K_r=0,5$ e (C) $K_r=5$. Fonte: próprio autor (2022).

Os efeitos de indução e de repressão da expressão gênica exercidos pelo complexo AHL-LuxR são evidentes pela análise gráfica. Nos três gráficos a produção da enzima RibC diminuiu com a formação do complexo, indicando que houve um processo de repressão. Por outro lado, a síntese de riboflavina aumentou quando foi atingida uma concentração limiar do complexo em $t = 110s$, demonstrando o efeito indutivo do sistema.

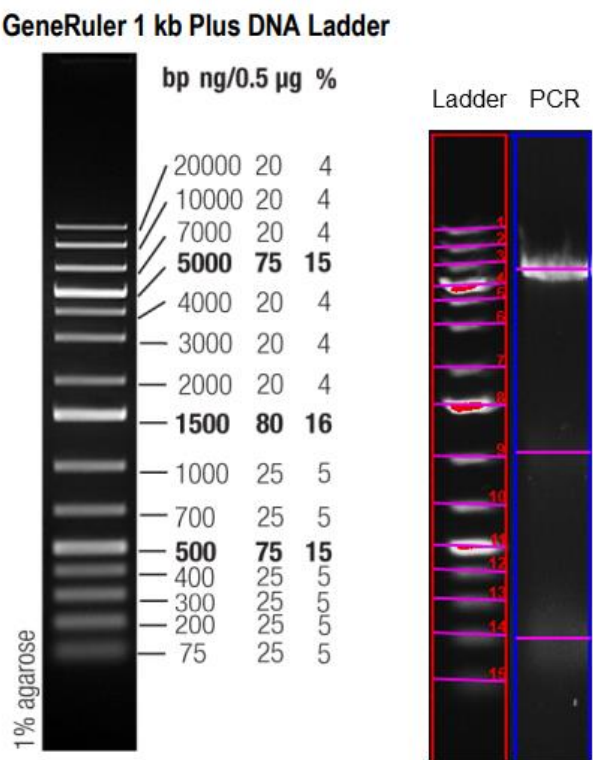
Em relação à constante de repressão, foi observado nas simulações que quanto maior o valor da constante, maior é a produção de riboflavina. Ou seja, a repressão da expressão gênica da enzima RibC ocasiona uma menor metabolização da riboflavina. Isso é ilustrado pelas curvas correspondentes nos gráficos, em que houve um decréscimo conjunto de RibC e FMN, e um aumento de riboflavina conforme o aumento de Kr. Além disso, é válido ressaltar que, em todas as análises, o metabólito FMN é produzido no início do crescimento celular (fase *lag*) e decai na fase exponencial. Isso assegura que as células terão menor prejuízo metabólico durante a fase de preparação para o crescimento da cultura, quando comparado à sistemas de controle constitutivos.

Desta forma, segundo as simulações, o modelo criado se demonstrou capaz de controlar de forma dinâmica a síntese de riboflavina, induzindo a expressão gênica do bioproduto de interesse e, ao mesmo tempo, reprimindo a produção da enzima responsável pela sua metabolização nas células.

4.2. Clonagem do operon sob controle do sistema de autoindução

A amplificação do operon de riboflavina foi verificada, conforme a imagem do gel de agarose na figura 10. Nesta figura, o produto de PCR está identificado como “PCR Rib”, o qual apresentou banda correspondente ao tamanho da sequência do operon (4,2 kb). Desta forma, o produto de PCR foi considerado correto e foi utilizado para a inserção no plasmídeo.

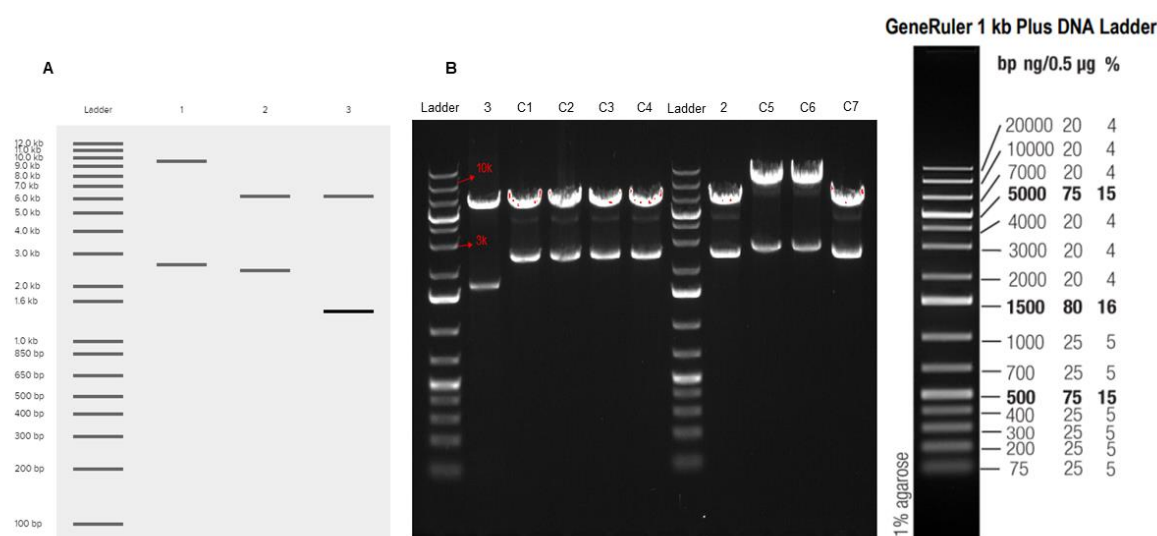
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para verificação da PCR do operon de riboflavina.



Fonte: próprio autor (2022).

A figura 11 representa a imagem de eletroforese em gel de agarose feita para a verificação da clonagem do operon de riboflavina em *E. coli* após as etapas de transformação e digestão do plasmídeo com a enzima *Pst*I (FastDigest- Thermo Scientific™).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para verificação da clonagem em *E. coli*.

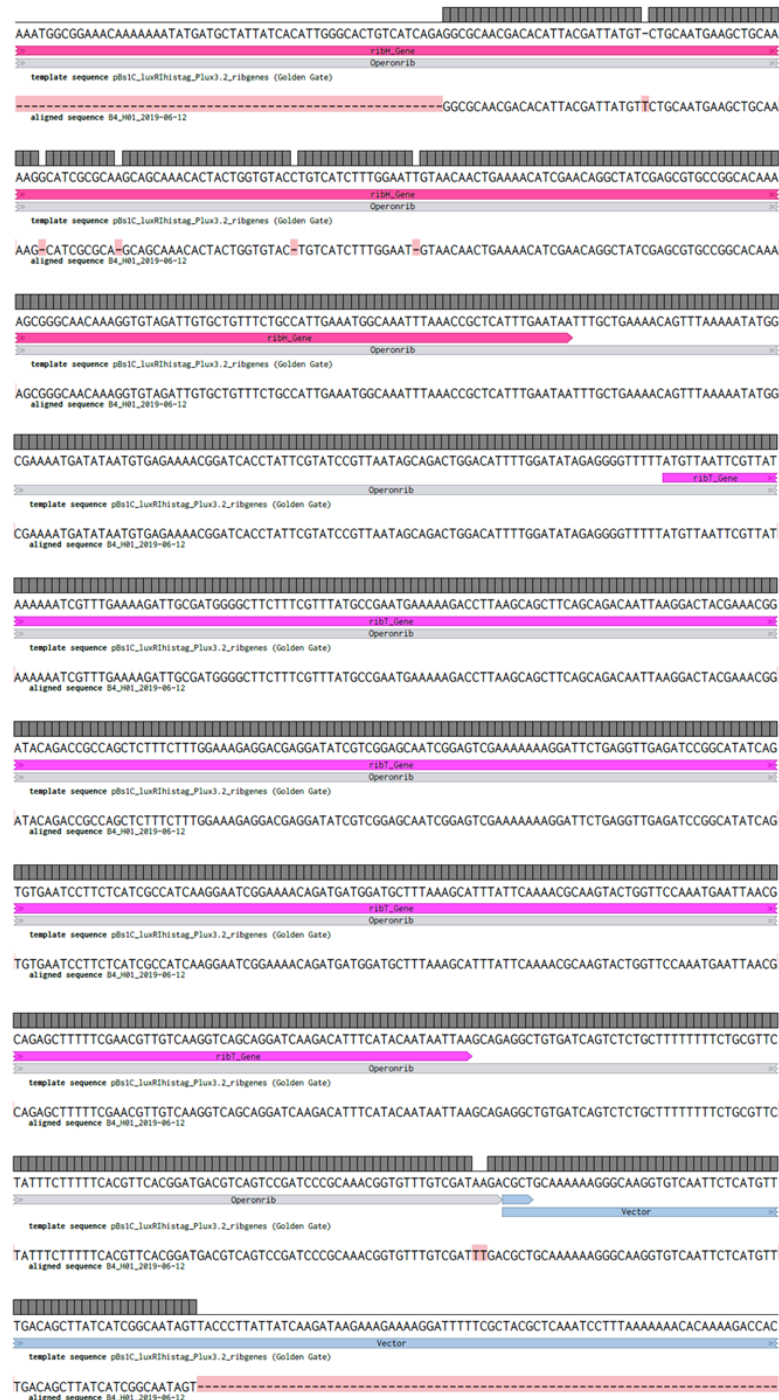


Legenda: (A) Simulação da digestão do plasmídeo com o operon (1), sem o operon (2) e sem operon e o Plux_3.2 (3), utilizando a enzima *Pst*I. (B) Imagem do gel revelado após a digestão com a enzima *Pst*I. De C1-C7: amostras de DNA das colônias transformantes. Fonte: próprio autor (2022).

Como pode ser observado, as amostras C1-C4 e C7 apresentaram bandas semelhantes às do controle negativo (número 2), evidenciando que o operon não foi inserido no plasmídeo. Entretanto, as amostras C5 e C6 apresentaram tamanho de bandas (2936 e 9642pb) correspondentes aos simulados para a construção positiva. Deste modo, as respectivas colônias foram preservadas para posterior confirmação por sequenciamento.

O resultado do sequenciamento está representado na figura 12, na qual a sequência resultante do sequenciador (B4_H01_2019_06_12) foi alinhada com a sequência do plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2_Ribgenes construído *in silico* para a verificação.

Figura 12. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pBs1C_luxRIhistag_Plux3.2_Ribgenes construído *in silico* para a verificação da clonagem em *E. coli*.



Legenda: A barra cinza indica o alinhamento correto. Fonte: próprio autor (2022).

Como a sequência do operon é grande para ser sequenciada completamente, o sequenciamento foi feito utilizando primers que anelam em cada extremidade do

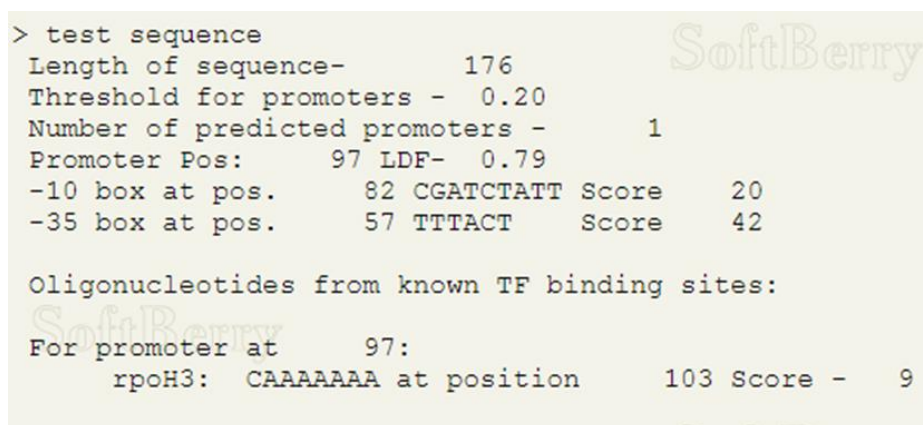
vetor para verificar completamente a sequência. No entanto, somente uma amostra com um dos primers foi sequenciada com sucesso. Deste modo, como dois genes do operon alinharam corretamente (*ribH* e *ribT*), a inserção do operon no plasmídeo foi considerada positiva mesmo não sendo possível avaliar a sequência completa.

4.3. Amplificação da funcionalidade do sistema utilizando edição gênica com CRISPR-Cas9

4.3.1. Construção e amplificação das partes genéticas

A região promotora de *ribC* foi determinada pelo software SoftBerry (figura 13). A partir disso, sequências guia foram desenhadas pelo software R-genome Cas designer (tabela 19). Neste caso, a sequência guia selecionada para a edição foi a de maior afinidade (score = 80,9).

Figura 13. Resultado da análise da região promotora de *ribC* feita pelo software SoftBerry.



```
> test sequence
Length of sequence-      176
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      97 LDF- 0.79
-10 box at pos.      82 CGATCTATT Score      20
-35 box at pos.      57 TTTACT      Score      42

Oligonucleotides from known TF binding sites:
For promoter at      97:
    rpoH3: CAAAAAAA at position      103 Score -      9
```

Fonte: próprio autor (2022).

Tabela 19. Sequências guia determinadas pelo software R-genome Cas designer.

Posição	Fita	Sequência	Score
44	-	ATTCAGTAAAGACGGCAATACGG	66,5
48	+	ATTGCCGTCTTTACTGAATCCGG	66,1
59	+	TACTGAATCCGGAACCTGCTTGG	74,6
67	-	ATAGATCGCCAAGCAGGTTCCGG	72,6

73	-	AGGGAAATAGATCGCCAAGCAGG	80,9
91	+	TCCCTCATCCTGCAAAAAAAGGG	70,2

Em destaque a sequência guia do gRNA selecionada.

Uma vez que a enzima Cas9 cliva o DNA na região definida pelo RNA guia, a maquinaria celular repara o dano a partir de uma sequência de homologia. Então, foi desenhado um DNA doador (1020 pb) (figura 14), contendo porções do DNA genômico de *B. subtilis* que flanqueiam a região de edição, identificadas pelos genes *truB* e *ribC*. Além disso, foi inserida a sequência do *luxbox* para haver a interação com os componentes regulatórios LuxR-AHL, e os sítios de restrição das endonucleases nas extremidades 5' e 3' para o processo de clonagem.

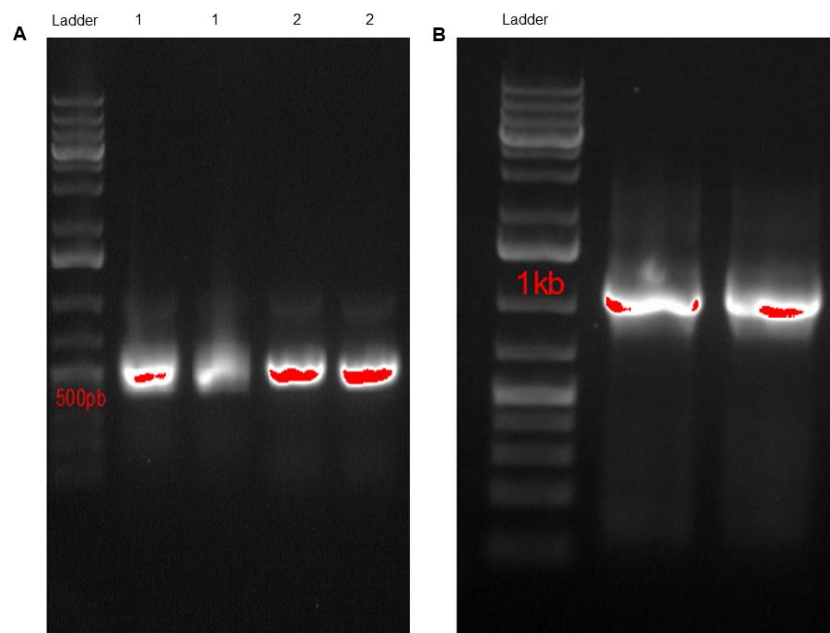
Figura 14. DNA doador completo.



Fonte: próprio autor (2022).

Na figura 15 estão representadas as imagens de eletroforese em gel de agarose realizadas para a verificação da amplificação das duas partes do DNA doador e da sequência completa após o protocolo simplificado de GGA.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose para verificação da PCR do DNA doador.



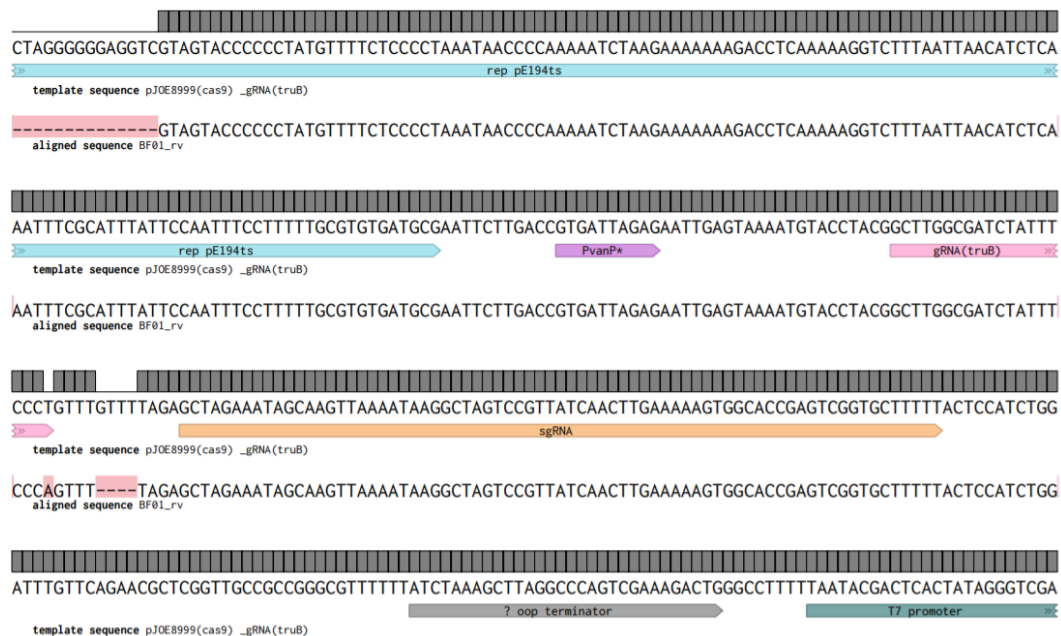
Legenda: (A) PCR das duas partes da sequência homóloga (SH1 e SH2) a partir de molde genômico e (B) PCR da sequência homóloga completa (SH) após o protocolo simplificado de GGA. Fonte: próprio autor (2022).

As duas partes do DNA doador (1 e 2) possuem 500 e 520 pb, respectivamente. Sendo assim, a amplificação a partir de molde genômico foi bem sucedida, pois as bandas de ambas as amostras apresentaram o tamanho correto. O mesmo é válido para a sequência completa (SH), com bandas em aproximadamente 1000pb.

4.3.2. Clonagem das partes para a edição gênica com CRISPR-Cas9

O resultado do sequenciamento da amostra de DNA após o processo de clonagem do plasmídeo pJOE8999(cas9) com a sequência do gRNA em *E. coli* JM109 está ilustrado na figura 16. O alinhamento foi feito entre a sequência da construção *in silico* pJOE8999(cas9)_gRNA(truB) e BF01_rv, que se refere à sequência retornada pelo sequenciador de uma amostra de PCR com primer específico de anelamento no vetor.

Figura 16. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB) construído *in silico* para a verificação da clonagem em *E. coli*.

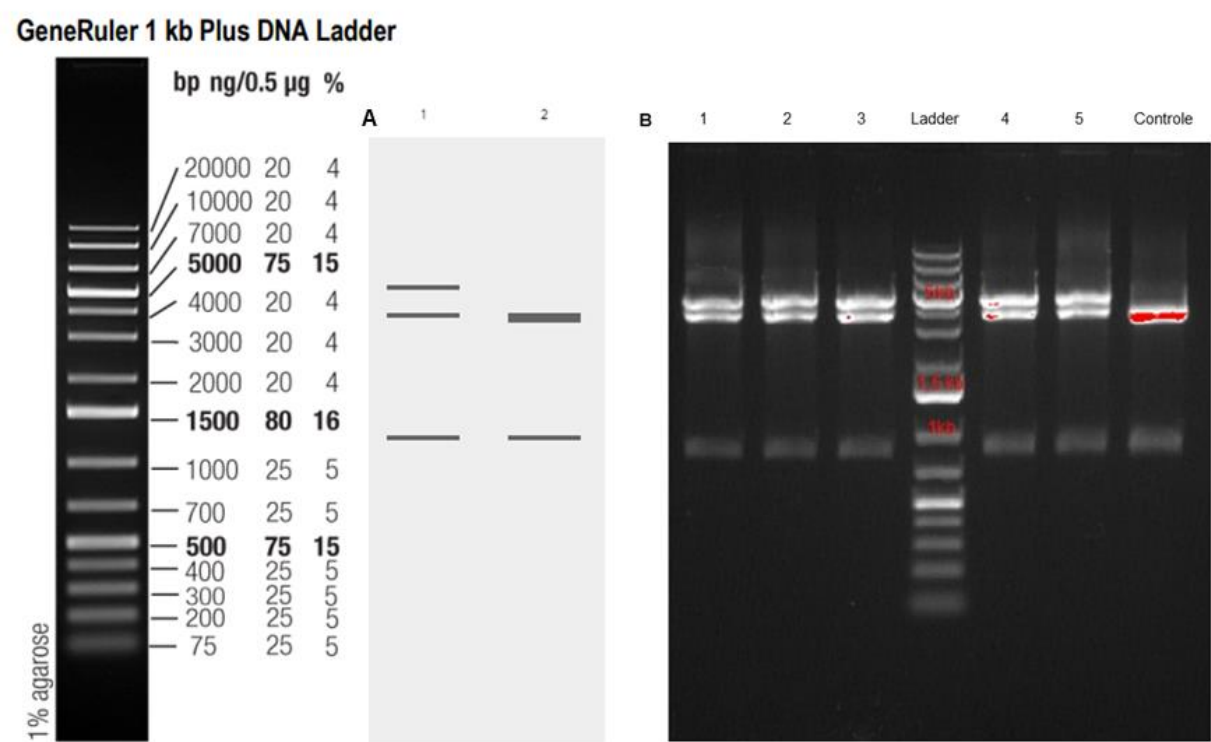


Legenda: A barra cinza indica o alinhamento correto. Fonte: próprio autor (2022).

As sequências alinhadas (barras cinzas) correspondem a partes que constituem o vetor, como rep pE194ts, PvanP, sgRNA e promotor T7. A região de interesse para a verificação da clonagem está identificada como gRNA(truB) em rosa, que corresponde ao inserto inserido. Deste modo, foi considerado que a clonagem foi bem sucedida.

A verificação da clonagem do DNA doador no plasmídeo pJOE899(cas9)_gRNA(truB) em *E. coli* JM109 por eletroforese em gel de agarose está ilustrada na figura 17.

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para verificação da clonagem do DNA doador em *E. coli*.



Legenda: (A) Simulação da digestão do plasmídeo com (1) e sem (2) a sequência homóloga, utilizando as enzimas *EcoRI* e *PstI*. (B) Imagem do gel revelado após a digestão com enzimas *EcoRI* e *PstI*. De 1-5: amostras de DNA das colônias transformantes. Fonte: próprio autor (2022).

Como pode ser observado, todas as amostras testadas apresentaram bandas diferentes do controle negativo (3247 e 3089pb), com tamanho semelhante ao esperado pela simulação (4107 e 3247pb). Desta forma, as colônias foram consideradas positivas e duas destas foram selecionadas para o sequenciamento.

O resultado do sequenciamento está representado na figura 18, o qual consiste no alinhamento entre a construção *in silico* pJOE899(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) e a sequência resultante do sequenciamento de uma amostra de PCR com primer específico para a porção (A) inicial (primer direto) e (B) final (primer reverso). do DNA doador.

Figura 18. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) construído *in silico* para a verificação da clonagem em *E. coli*.



B



Legenda: (A) parte inicial e (B) parte final do DNA doador. A barra cinza indica o alinhamento correto. Fonte: próprio autor (2022).

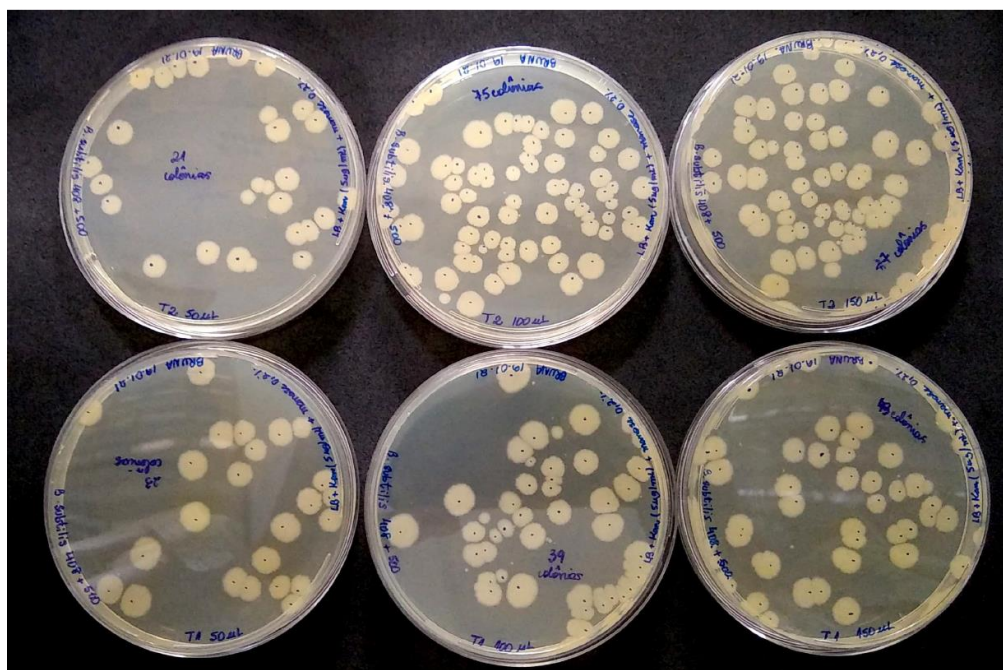
A partir da figura 18 é possível observar que embora algumas regiões não tenham sido sequenciadas com o primer direto (figura 18A), as mesmas podem ser

conferidas no sequenciamento com o primer reverso (figura 18B). Com isso, foi verificado que o DNA doador estava completamente presente nas amostras de DNA analisadas. Além disso, é importante destacar que a *luxbox* está corretamente presente na sequência. Sendo assim, a clonagem desta parte genética também foi considerada positiva.

4.3.3. Edição gênica com CRISPR-Cas9

A figura 19 ilustra as placas da transformação em *B. subtilis*, após dois dias de incubação a 30°C. Todas as placas apresentaram muitas colônias e, por conta disso, foram selecionadas 32 para dar continuidade à metodologia de edição, priorizando as que cresceram no primeiro dia de incubação, menores e mais isoladas.

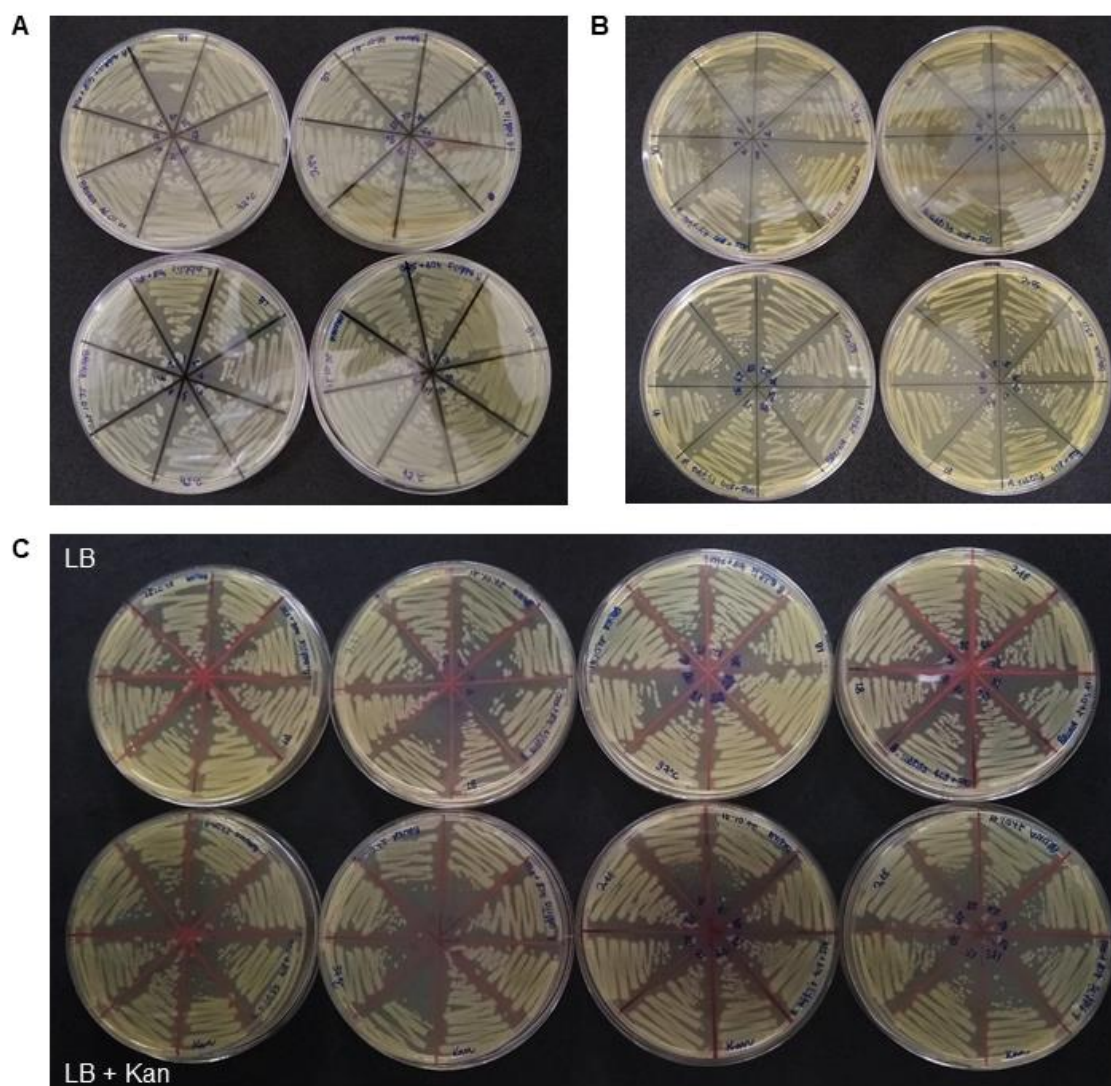
Figura 19. Imagem das placas com colônias transformantes em *B. subtilis* após dois dias de incubação a 30°C.



Fonte: próprio autor (2022).

As etapas de perda do plasmídeo e verificação estão ilustradas na figura 20.

Figura 20. Imagem das placas com colônias estriadas durante o processo de perda do plasmídeo e verificação.



Legenda: (A) Incubação a 42°C, (B) 50°C e (C) 37°C sem antibiótico (placas superiores) e com antibiótico (placas inferiores). Fonte: próprio autor (2022).

A perda do plasmídeo inicialmente foi testada com incubação a 42°C (figura 20 A). No entanto, todas as colônias estriadas cresceram muito bem. Então, foi considerado que todas perderam o plasmídeo para sobreviver em um ambiente de estresse e, em seguida, foi feita a verificação da perda do plasmídeo.

Ao realizar a verificação, foi observado que todas as colônias estriadas cresceram tanto nas placas com somente meio LB-ágar, como nas placas com LB

acrescido de antibiótico. Esta é uma evidência de que as células não perderam o plasmídeo por ainda possuírem resistência ao antibiótico.

Desta forma, a etapa de perda do plasmídeo foi repetida aumentando a temperatura de incubação para 50°C (figura 20 B) e repicando colônias isoladas em novas placas. Novamente, todas as colônias estriadas cresceram. Quando verificadas, todas as colônias cresceram tanto em LB como em LB acrescido de antibiótico (figura 20 C).

Estas etapas foram repetidas várias vezes, com temperaturas superiores a 50°C e em incubadoras diferentes. No entanto, não foi obtido sucesso em avaliar a perda do plasmídeo por esta metodologia. Então, as colônias mais promissoras, com coloração mais amarelada, foram preservadas para posterior análise por sequenciamento.

A figura 21 ilustra o resultado do sequenciamento da amostra de DNA de uma das colônias coletadas (GG02) alinhado com o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) construído *in silico*. Para este sequenciamento foi utilizado o produto de PCR com primers específicos para o DNA doador.

Figura 21. Alinhamento entre a sequência resultante do sequenciamento e o plasmídeo pJOE8999(cas9)_gRNA(truB)_seq_homologa(truB_luxbox_ribC) construído *in silico* para a verificação da clonagem em *B. subtilis*.



Fonte: próprio autor (2022).

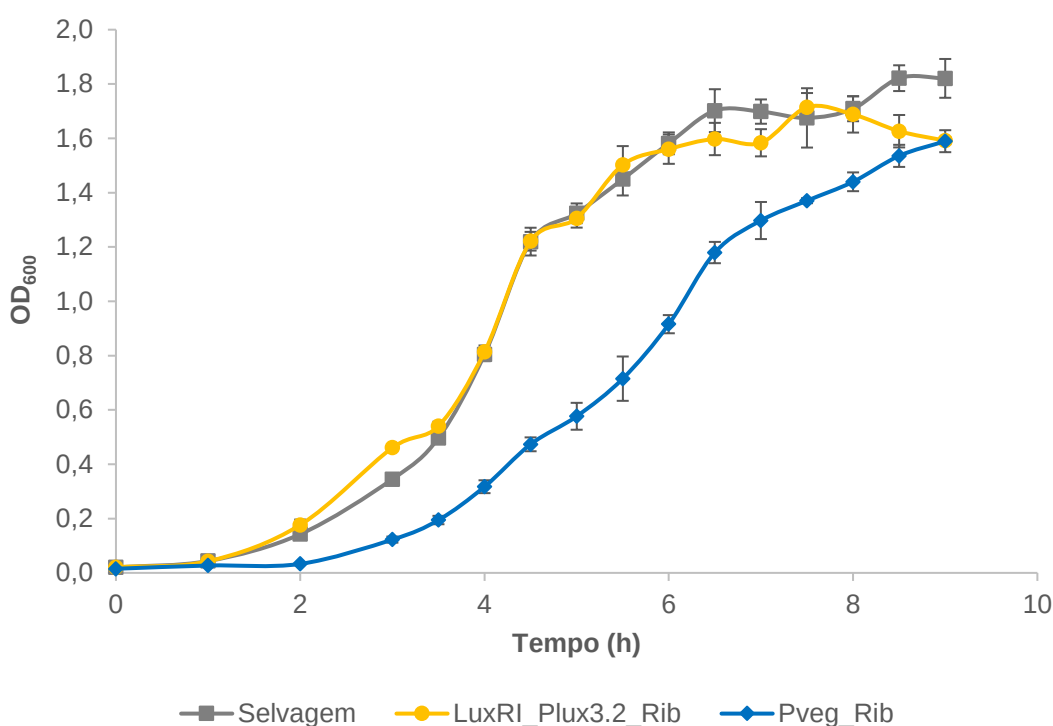
De acordo com a figura 21 é possível observar que parte do DNA doador e o *luxbox* foram alinhados e estão presentes na amostra de DNA analisada. Para tirar a

dúvida quanto a permanência do plasmídeo nas células, foi feito o sequenciamento da mesma amostra com primers específicos para o vetor. Entretanto, não foi obtido êxito nesta análise por erros de sequenciamento. Desta forma, é possível afirmar que o material genético editado está nas células, contudo, não foi possível analisar se esta sequência está no genoma de *B. subtilis* ou somente no plasmídeo.

4.3. Crescimento celular e produção de riboflavina

A figura 22 representa o gráfico do crescimento celular monitorado durante 9 horas de cultivo das linhagens de *B. subtilis* sem modificações (selvagem), com o operon de riboflavina sob o controle do sistema autoindução e, sob controle do promotor constitutivo forte (Pveg).

Figura 22. Gráfico do crescimento celular ao longo do tempo das linhagens de *B. subtilis* selvagem, com o operon de riboflavina sob o controle do sistema *LuxRI* e promotor forte Pveg.



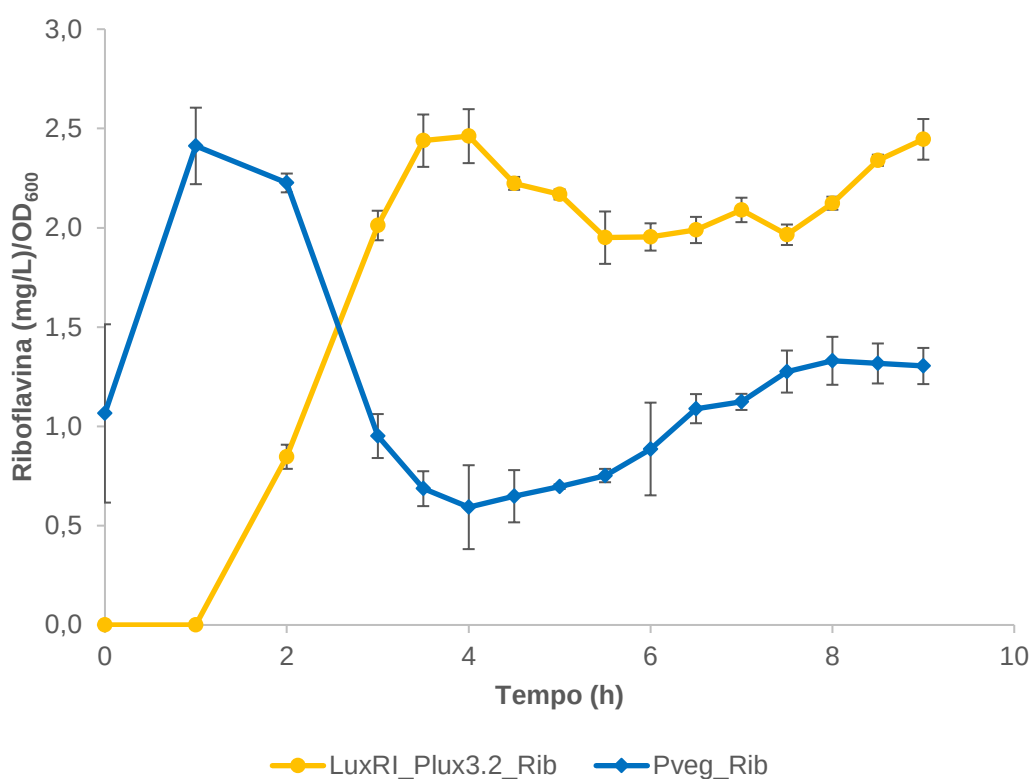
Fonte: próprio autor (2022).

De acordo com o gráfico na figura 22, a linhagem construída com o operon de riboflavina sob o controle do sistema de autoindução apresentou uma curva de crescimento semelhante ao da linhagem sem modificações. Contrariamente, a linhagem com promotor Pveg apresentou crescimento mais tardio. Estas

características evidenciam que o sistema de autoindução causa menos estresse metabólico às células, por não prejudicar o crescimento celular durante a biossíntese.

Em relação à produção de riboflavina, foi avaliada a concentração (mg/L) relativa à quantidade de células durante o ensaio. A figura 23 ilustra o gráfico com os dados de produção ao longo do tempo (h).

Figura 23. Gráfico da concentração de riboflavina produzida relativa às células ao longo do tempo para as linhagens com o operon de riboflavina sob o controle do sistema *LuxRI* e promotor forte *Pveg*.



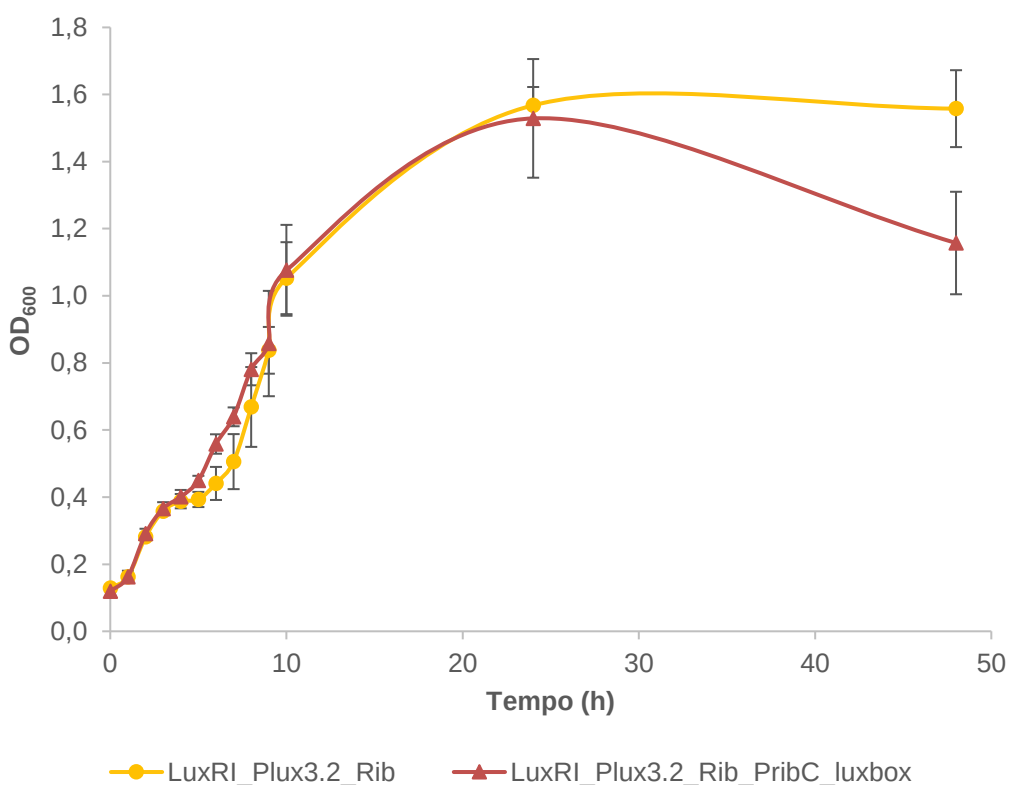
Legenda: Dados adquiridos por fluorescência. Fonte: próprio autor (2022).

Como pode ser observado na figura 23, a quantidade de riboflavina produzida por células foi maior na configuração construída com o sistema de autoindução, chegando a 2,4 mg/L em 9 horas de cultivo. Apesar da construção com o promotor constitutivo apresentar uma produção semelhante no início do cultivo, a mesma não se manteve durante o período monitorado. Isso pode ser explicado pelo fato de que a alta produção inicial causou um desequilíbrio entre o crescimento e a biossíntese nas células. Contrariamente, o sistema de autoindução aumentou expressivamente a

produção após a fase inicial do crescimento celular, evidenciando o correto funcionamento do sistema.

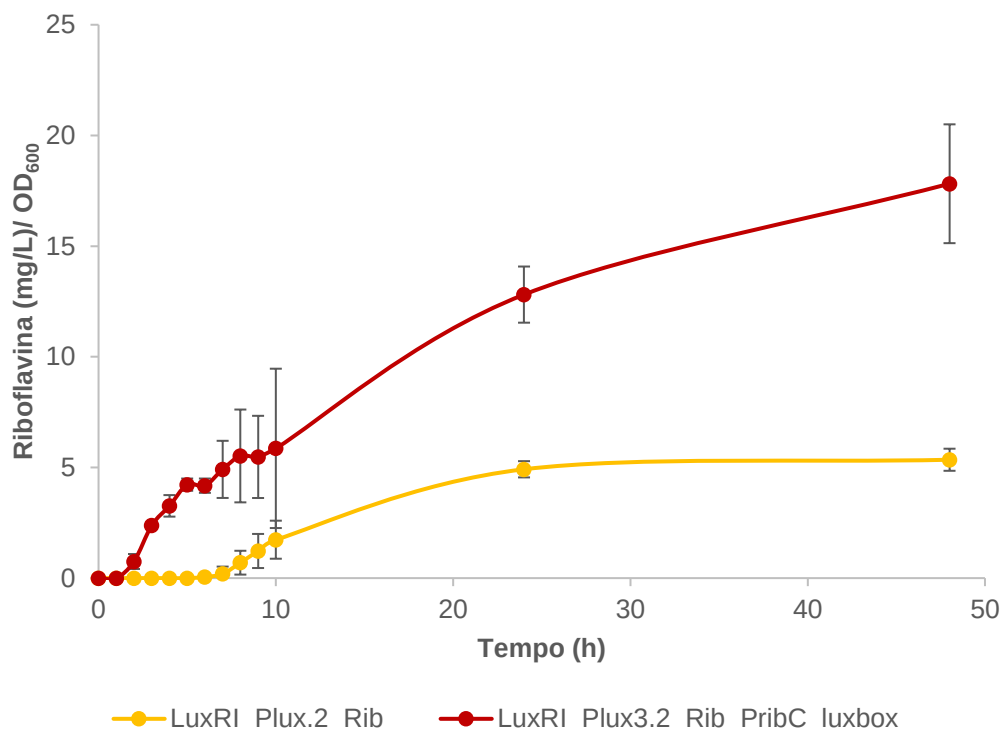
Para aumentar ainda mais a produção, foi realizada uma edição gênica com CRISPR-Cas9 na linhagem construída, conforme descrito na metodologia. Os ensaios de monitoramento do crescimento celular e da produção de riboflavina durante 48 h estão demonstrados nas figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24. Gráfico do crescimento celular ao longo do tempo da linhagem de *B. subtilis* com o operon de riboflavina sob o controle do sistema *LuxRI* e da linhagem após edição gênica com CRISPR-Cas9 no promotor *PribC*.



Fonte: próprio autor (2022).

Figura 25. Gráfico da concentração de riboflavina produzida relativa às células ao longo do tempo para as linhagens com o operon de riboflavina sob o controle do sistema *LuxRI* e após a edição gênica com CRISPR-Cas9 no promotor *PribC*.



Legenda: Dados adquiridos por HPLC. Fonte: próprio autor (2022).

A partir da figura 24 é possível notar que a edição feita não prejudicou o crescimento celular, visto que a curva de crescimento celular para a linhagem editada é semelhante à não editada nas primeiras 24 horas de cultivo. Após as 24 horas, a linhagem editada entra em morte celular mais rápido do que a linhagem não editada. Este comportamento pode ser explicado pela repressão do metabolismo de riboflavina pelo sistema *LuxRI*, que leva a menor produção de FMN e FAD nas células a partir da fase *lag* do crescimento celular.

No entanto, em relação à produção de riboflavina, a linhagem editada produziu aproximadamente 17,8 mg/L por unidade de concentração celular após 48 horas de cultivo (figura 25). Este dado reforça que a edição feita foi capaz de causar o acúmulo de riboflavina, uma vez que a linhagem não editada apresentou 5,3 (mg/L)/OD₆₀₀ para o mesmo período de análise.

Desta forma, é possível afirmar que há uma compensação entre o crescimento e a biossíntese, pois a edição não prejudicou o crescimento celular na fase inicial e levou a um acúmulo de riboflavina produzida.

A figura 26 representa imagens do pré-inóculo e do cultivo final em frascos tipo Erlenmeyers. De forma visual é possível notar os resultados gráficos, pois a linhagem editada (B1-B3) apresentou coloração mais amarelada em ambos os estágios do teste realizado, quando comparado a linhagem não editada (A1-A3). Esta coloração pode ser atribuída à produção de riboflavina acumulada no meio.

Figura 26. Imagens do pré-inóculo e do cultivo final em frascos tipo Erlenmeyer, para a linhagem não editada (A1-A3) e a linhagem editada (B1-B3).



Fonte: próprio autor (2022).

5. Conclusão

As simulações *in silico* mostraram que a conexão do sistema *LuxRI* de autoindução à biossíntese de riboflavina, ativando a expressão do operon *ribDGEABHT* e reprimindo a expressão de *ribC* ocasiona um aumento na produção.

Os testes das linhagens de *B. subtilis* construídas mostraram que o sistema de autoindução promoveu uma maior síntese de riboflavina do que a construção na qual a expressão gênica foi regulada por promotor constitutivo forte, chegando a 2,5 mg/L.DO em 9 horas de cultivo. Além disso, foi possível aumentar 3,4x a produção de riboflavina a partir da ampliação da aplicação do sistema *LuxRI* para também reprimir a expressão gênica. Esse trabalho demonstrou a flexibilidade e modularidade do sistema de autoindução, no qual os processos de indução e repressão da expressão gênica de forma simultânea foram eficientemente demonstrados. Ainda, todo o processo foi executado utilizando cópia única de cada gene integrado ao genoma, demonstrando a eficiência e sensibilidade do processo de controle autônomo da expressão gênica.

Referências

ALTENBUCHNER, J. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5421–5427, 2016.

BRON, S.; MEIMA, R.; VAN DIJL, J.M.; WIPAT, A.; HARWOOD, C. R. Molecular Biology and Genetics of *Bacillus* species. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. **American Society for Microbiology**, 2 ed. p. 392-416, 1999.

BOO, A.; AMARO, R. L.; STAN, G. *Quorum sensing* in synthetic biology: A review. **Current Opinion in Systems Biology**, p. 1-14, 2021.

CORRÊA, G. G.; LINS, M. R. C. R.; SILVA, B. F.; PAIVA, G. B.; ZOCCA, V. F. B.; RIBEIRO, N. V.; PICHELI, F. P.; MACK, M.; PEDROLI, D. B. A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 326-334, 2020.

DEMUYSER, L.; PALMANS, I.; VANDECRUYS, P.; VAN DIJCK, P. Molecular Elucidation of Riboflavin Production and Regulation in *Candida albicans*, toward a Novel Antifungal Drug Target. **American Society for Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 1-15, 2020.

ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. **PLoS ONE**, v. 3, p. e3647, 2008.

GARCÍA-MOYANO, A.; LARSEN, O.; GAYKAWAD, S.; CHRISTAKOU, E.; BOCCADORO, C.; PUNTERVOLL, P.; BJERGA, G. E. K. Fragment Exchange Plasmid Tools for CRISPR/Cas9-Mediated Gene Integration and Protease Production in *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 1, p. e02090-20, 2020.

GU, Y.; XU, X.; WU, Y.; NIU, T.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; LIU, L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. **Metabolic Engineering**, v. 50, p.109-121, 2018.

GUAN, C.; CUI, W.; CHENG, J.; ZHOU, L.; GUO, J.; HU, X.; XIAO, G.; ZHOU, Z. Construction and development of an auto-regulatory gene expression system in *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 150-165, 2015.

GUIZIOU, S.; SAUVEPLANE, V.; CHANG, H.; CLERT, C.; DECLERCK, N.; JULES, M.; BONNET, J. A part toolbox to tune genetic expression in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 7495–7508, 2016.

GUPTA, A.; REIZMAN, I. M. B.; REISCH, C. R.; PRATHER, K. L. J. Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent *quorum-sensing* circuit. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 273-279, 2017.

KIM, E.; WOO, H. M.; TIAN, T.; YILMAZ, S.; JAVIDPOUR, P.; KEASLING, J. D.; LEE, T. S. Autonomous control of metabolic state by a *quorum sensing* (QS)-mediated regulator for bisabolene production in engineered *E. coli*. **Metabolic Engineering**, v. 44, p. 325-336, 2017.

LINS, M. R. C. R.; AMORIM, L. A. S.; CORRÊA, G. G.; PICÃO, B. W.; MACK, M.; CERRI, M. C.; PEDROLI, D. B. Targeting riboswitches with synthetic small RNAs for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 68, p.59-67, 2021.

LIU, Y.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Synthetic Biology Toolbox and Chassis Development in *Bacillus subtilis*. **Trends in Biotechnology**, v. 37, p. 548-562, 2019.

MACK, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; 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.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 14. ed., p. 228-230, 2016.

REVUELTA, J. L.; LEDESMA-AMARO, R.; LOZANO-MARTINEZ, P.; DIAZ-FERNANDEZ, D.; BUEY, R. M.; JIMÉNEZ, A. Bioproduction of ribofavin: a bright yellow history. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology. **Metabolic Engineering and Synthetic Biology** – Review, v. 44, p. 659-665, 2017.

SAEKI, E. K.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. *Quorum sensing* system: Target to control the spread of bacterial infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, p. 1-6, 2020.

SOMA, Y.; HANAI, T. Self-induced metabolic state switching by a tunable cell density sensor for microbial isopropanol production. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 7-15, 2015.

SU, Y.; LIU, C.; FANG, H.; ZHANG, D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. **Microbial Cell Factories**, v. 19, p. 173-185, 2020.

TRAN, D. T. M.; PHAN, T. T. P.; HUYNH, T. K.; DANG, N. T. K.; HUYNH, P. T. K.; NGUYEN, T. M.; TRUONG, T. T. T.; TRAN, T. L.; SCHUMANN, W.; NGUYEN, H. D. Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v.16, p. 130-140, 2017.

WATANABE, L.; NGUYEN, T.; ZHANG, M.; ZUNDEL, Z.; ZHANG, Z.; MADSEN, C.; ROEHNER, N.; MYERS, C. J. iBioSim 3: A Tool for Model-Based Genetic Circuit Design. **ACS Synthetic Biology**, p.2-14, 2018.

WANG, G.; SHI, T.; CHEN, T.; WANG, X.; WANG, Y.; LIU, D.; GUO, J.; FU, J.; FENG, L.; WANG, Z.; ZHAO, X. Integrated whole-genome and transcriptome sequence analysis reveals the genetic characteristics of a riboflavin-overproducing *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 48, p. 138-149, 2018.

WU, X.; ZHA, J.; KOFFAS, M. AG. Microbial production of bioactive chemicals for human health. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 9–16, 2020.

XU, Z.; LIN, Z.; WANG, Z.; CHEN, T. Improvement of the riboflavin production by engineering the precursor biosynthesis pathways in *Escherichia coli*. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 1834-1839, 2015.

ZHANG, J.R.; GE, Y. Y.; LIU, P. H.; WU, D. T.; LIU, H. Y.; LI, H. B.; CORKE, H.; GAN, R. Y. Biotechnological Strategies of Riboflavin Biosynthesis in Microbes. **Engineering**, 2021.