

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 31/01/2026.



**PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOENERGIA**

**RECONSTRUÇÃO EM *ESCHERICHIA COLI* DE ALELOS IDENTIFICADOS POR
EVOLUÇÃO ADAPTATIVA EM SACAROSE USANDO O SISTEMA EASYGUIDE
CRISPR**

JONECLEI ALVES BARRETO

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Bioenergia.

Orientador: Dr. Jeferson Gross

Coorientador: Dr. Jonas Contiero

**PROGRAMA INTEGRADO (UNESP, USP E UNICAMP) DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOENERGIA**

**RECONSTRUÇÃO EM *ESCHERICHIA COLI* DE ALELOS IDENTIFICADOS POR
EVOLUÇÃO ADAPTATIVA EM SACAROSE USANDO O SISTEMA EASYGUIDE
CRISPR**

JONECLEI ALVES BARRETO

Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, USP/UNICAMP/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de Bioenergia.

Orientador: Dr. Jeferson Gross

Coorientador: Prof. Jonas Contiero

**Rio Claro – SP
2025**

B273r

Barreto, Joneclei Alves

Reconstrução em *Escherichia coli* de alelos identificados por evolução adaptativa em sacarose usando o sistema EasyGuide CRISPR / Joneclei Alves Barreto. -- Rio Claro, 2025

191 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Pesquisa em Bioenergia, Rio Claro

Orientador: Jeferson Gross

Coorientador: Jonas Contiero

1. CRISPR/Cas9. 2. Evolução adaptativa em laboratório. 3. *Escherichia coli*. 4. Sacarose. 5. Engenharia metabólica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA TESE: RECONSTRUÇÃO EM ESCHERICHIA COLI DE ALELOS IDENTIFICADOS POR EVOLUÇÃO ADAPTATIVA EM SACAROSE USANDO O SISTEMA EASYGUIDE CRISPR

AUTOR: JONECLEI ALVES BARRETO


ORIENTADOR: JEFERSON GROSS

COORIENTADOR: JONAS CONTIERO


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área: Bioenergia pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **JEFERSON GROSS**
Data: 31/01/2025 12:54:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Pesquisador JEFERSON GROSS (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia IPBEN

Documento assinado digitalmente
 **JOSE GREGORIO CABRERA GOMEZ**
Data: 04/02/2025 18:06:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSÉ GREGÓRIO CABRERA GOMEZ (Participação Virtual)
Departamento de Microbiologia / Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP)

Documento assinado digitalmente
 **DANIELLE BISCARO PEDROLI**
Data: 06/02/2025 12:11:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **LEANDRO VIEIRA DOS SANTOS**
Data: 31/01/2025 15:12:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. LEANDRO VIEIRA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Chemical Biology and Biological Chemistry / Instituição: Universidade de Manchester, UK

Rio Claro, 31 de janeiro de 2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à bolsa recebida processo nº 2020/02246-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao apoio financeiro do projeto temático 2017/50249-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e à UNESP e ao IPBEN e pela disponibilização do espaço físico para a execução desse projeto.

Ao Dr. Jeferson Gross principalmente pela oportunidade concedida e pela orientação desse trabalho, além de ser o idealizador de estratégias fundamentais para execução do mesmo. Além de aprendizados dentro e fora do laboratório. Sendo que, ao final desse trabalho, tornou-se mais que um orientador, um grande amigo.

À Dra Ana Paula Jacobus por me acolher no laboratório na minha chegada e pelo apoio, principalmente no aprendizado de técnicas que pouco conhecia e hoje tenho domínio, além do apoio moral e emocional nesse período.

Ao meu colega de laboratório e apartamento Lucas de Bem e seus gatos (Mazda, Geraldo, Melanina e Amálgama), que após esse período tornou-se um grande amigo.

Ao professor Dr. Jonas Contiero pela oportunidade de trabalharmos juntos e por todo o apoio no período.

Ao Dr. Michel Brienzo e a Daniele Marin pelo auxílio nas quantificações de sacarose.

Ao Matheus Lacôrte pelas quantificações e produção dos filmes de PHB.

Aos meus colegas de laboratório Yasmine, Isabelle, Fernanda, Sara, Stella e Dandara que mesmo que, com alguns, passamos pouco tempo juntos, mas foram momentos marcantes.

A Dona Maria, Edna, Roberto, Álvaro, Cleber, Luís e aos demais pessoas do corpo técnico e administrativo do IPBEN-Rio Claro pelo grande auxílio nesse período.

Aos meus colegas de laboratório do SENAI Dione, Juliana e Diego e que nesses últimos meses me suportaram e me auxiliaram nos momentos difíceis.

A Fernanda Andrade e ao Prof. Gregório pelo compartilhamento de cepas e plasmídeos usados.

E por último e não menos importantes gostaria de agradecer à minha família pelo apoio moral, mesmo tão distantes e com seus problemas não deixam de me ouvir nos momentos difíceis.

RESUMO

A evolução adaptativa em laboratório é uma poderosa ferramenta para o desenvolvimento de cepas de microrganismos que tenham capacidade de crescimento superior em fontes de carbono não tradicionais, de baixo custo e renováveis. Entretanto, para utilizar as informações obtidas, é necessário selecionar, reconstruir e testar as mutações encontradas durante a evolução na cepa progenitora, um processo conhecido como engenharia reversa. Para a reconstrução desses alelos mutados é imprescindível o uso de técnicas de modificação genômica de fácil execução e baixo custo. Nesse trabalho foram desenvolvidas técnicas de edição genômica usando CRISPR/Cas9 para serem realizadas para a reconstrução e teste de mutações observadas em experimento de evolução realizada em sacarose com populações de *Escherichia coli*. Nesse experimento, três populações de *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pCscBKA para consumo de sacarose e quatro populações de *E. coli* E2348/69 foram cultivadas através de passagens sucessivas em meio mínimo contendo sacarose como única fonte de carbono, ao longo de 637 a 690 gerações. Ao final do processo, o DNA genômico das populações finais foi sequenciado e mutações encontradas foram selecionadas para reconstrução. Para a construção dessas linhagens mutadas foram desenvolvidos sistemas para clonagem de gRNAs e montagem de *donors* que foram chamados *EasyGuide*. Nesse contexto, foram projetados cinco plasmídeos base para as diferentes estratégias de clonagem de gRNAs. Para a produção de *donors* foi empregado um sistema para a montagem de fragmentos de DNA *in vivo* em *Saccharomyces cerevisiae*. Outra inovação implementada foi a utilização de oligonucleotídeos para montagem de gRNAs e *donors* para deleções e modificações de nucleotídeos únicos (abordagem EasyOligo). Com as técnicas desenvolvidas foi possível construir linhagens para testar mutações individuais e introduzir diferentes construções gênicas voltadas para o consumo de sacarose. Entre as mutações identificadas nas populações, a integração do operon *cscBKA* e a deleção do *cluster* formador do flagelo foram responsáveis pelos maiores ganhos de *fitness* (30-35% e 5%, respectivamente), medidos por ensaios de competição. Outra mutação que chamou a atenção foi a deleção de 81 pb no gene *pcnB*, associada a redução de número de cópias do plasmídeo pCscBKA e consequente aumento de *fitness* propagativo. Para demonstrar a capacidade do sistema EasyGuide CRISPR foram integrados ao genoma da DH5 α os operons *cscBKA* (consumo de sacarose) e *phaCAB*, para produção de polihidroxibutirato (PHB) a partir da sacarose. Com essas integrações, foi possível produzir ~31% massa celular seca de PHB a partir de 20 g/L sacarose.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; evolução adaptativa em laboratório; *Escherichia coli*; engenharia metabólica; sacarose; operon *cscBKA*.

ABSTRACT

Adaptive evolution is a powerful tool for developing strains of microorganisms that have superior growth capacity on non-traditional, low-cost, and renewable carbon sources. However, to make use of the obtained information, it is necessary to select, reconstruct, and test the mutations found during evolution in the progenitor strain, a process called reverse engineering. To reconstruct these mutated alleles, it is necessary to use easy-to-perform and low-cost genomic modification techniques. Genomic modification techniques using CRISPR/Cas9 were developed in this work for the reconstruction and testing of mutations obtained in an evolution experiment carried out in sucrose with *Escherichia coli*. In this experiment, three populations of *E. coli* DH5 α , carrying the plasmid pCscBKA for sucrose consumption, and four populations of *E. coli* E2348/69 were cultivated through successive passages in minimal medium containing sucrose as the sole carbon source for 637-690 generations. At the end of the process, the genomic DNA of the final populations was sequenced, and mutations found were selected for reconstruction. To obtain these mutated strains, gRNA cloning systems and donor assembly systems called EasyGuide were developed. Five base plasmids were developed for different gRNA cloning strategies. To produce donors, a system was used for the assembly of DNA fragments in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. Another advance was the use of oligonucleotides for the assembly of gRNAs and donors for deletions and modifications of single nucleotides (The EasyOligo approach). With these developed techniques, it was possible to construct strains for testing individual mutations and different genetic constructs for sucrose consumption. Among the mutations found in the populations, the integration of the *cscBKA* operon and the deletion of the flagellum assembly cluster were responsible for the highest fitness obtained (30-35% and 5%, respectively), measured by competition assays. Another mutation that attracted attention was the 81 bp deletion in the *pcnB* gene, which is associated to a reduction in the plasmid pCscBKA copy numbers and an increase in growth fitness. To demonstrate the capacity of the EasyGuide system, the *cscBKA* (sucrose consumption) and *phaCAB* operons were integrated into the genome of DH5 α cells to produce polyhydroxybutyrate (PHB) from sucrose. These integrations made it possible to produce ~31% of dry cell weight of PHB.

Keywords: CRISPR/Cas9; adaptive laboratory evolution; *Escherichia coli*; metabolic engineering; sucrose; operon *cscBKA*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO.....	13
2.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.2 Evolução adaptativa.....	14
2.2.1 Objetivos dos experimentos de evolução adaptativa com microrganismos	15
2.3 Engenharia reversa.....	16
2.4 CRISPR/Cas9.....	17
2.5 <i>In vivo cloning</i> em <i>E. coli</i>	23
2.6 Competições.....	24
2.7 Polihidroxicanoatos	26
2.8 Sacarose	28
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Linhagens celulares, armazenamento, condições de crescimento e plasmídeos.....	31
4.2 Procedimentos de clonagem.....	31
4.3 Preparação das células bacterianas para transformações	32
4.4 Modificações genômicas por CRISPR/Cas9	33
4.5 Experimento de ALE	34
4.5.1 Meio mínimo suplementado com sacarose	34
4.5.2 Clonagem do <i>operon cscBKA</i>	35
4.5.3 Construção das linhagens parentais (progenitoras) para a ALE.....	36
4.5.4 Condução do experimento de ALE.....	37
4.5.5 Sequenciamento genômico das populações evoluídas.....	38
4.5.5 Ensaio de competição	39
4.6 Quantificação de sacarose.....	40
4.6 Quantificação de PHB.....	40
4.6.1 Produção dos filmes de PHB	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Experimento de ALE em meio mínimo com sacarose	43
5.1.4 Avaliação das taxas de crescimento das populações finais do experimento de Evolução	43

5.2.1	Mutações encontradas nas populações evoluídas de DH5α	45
5.2.2	Mutações encontradas nas populações evoluídas de E2348/69	49
5.3	Estabelecimento de técnicas de genética molecular e edição genômica	50
5.3.1	Técnica de CRISPR/Cas9.....	50
5.3.2	Otimização da clonagem de gRNAs na técnica de CRISPR/Cas9	52
5.3.3	Método de clonagem em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de DNAs <i>donors</i> para uso em edições CRISPR/Cas9 em <i>E. coli</i>	57
5.3.4	Abordagem EasyOligo para a geração de <i>Donors</i>	60
5.4	Engenharia reversa das mutações encontradas no experimento de evolução	64
5.4.1	Avaliação de <i>fitness</i>	65
5.4.2	Construção do sistema de competição	65
5.4.4	Ensaio de competição e <i>fitness</i> das populações evoluídas	66
5.4.5	<i>Fitness</i> das linhagens com alelos evoluídos	67
5.4.6	Variações estruturais do operon para consumo da sacarose	70
5.4.7	Efeito do número de cópias de plasmídeos.....	71
5.4.8	Integração do operon <i>phaCAB</i>	73
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES.....	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A- Linhagens utilizadas no trabalho	98
	APÊNDICE B – Plasmídeos usados neste trabalho	101
	APÊNDICE C – Figuras detalhadas de plasmídeos	104
	pTargetAmp.....	104
	pSpec5'.....	105
	pSpec3'.....	106
	pOliSpec5'	107
	pOliSpec3'	108
	pCscBKA	109
	APÊNDICE D – Mutações encontradas no experimento de Evolução	110
	APÊNDICE E – Procedimentos de genética molecular	116
	APÊNDICE F – Primers usados nas mutações e clonagens.....	133
	ANEXO A – Publicações em periódicos especializados.....	146

1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa que é considerada um organismo modelo por ter diversas características biológicas bem estudadas e estabelecidas, além de possuir o seu genoma caracterizado. Essa bactéria também apresenta grande importância para estudos que visam a construção de plataformas para a produção de diversos bioprodutos (MOHAMED; MUNDHADA; LANDBERG; CANN *et al.*, 2019).

A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação de uma molécula de glicose a uma de frutose. É um açúcar que, além de ser usado para a alimentação, pode ser empregado como fonte de carbono para produção industrial, tendo como principal destaque a produção do etanol. Principalmente quando derivada da cana-de-açúcar, a sacarose é tida como uma fonte de energia barata e renovável, também atrativa para a produção de outros bens além do etanol. Em adição a isso, a exploração desse carboidrato com destino a síntese de bioprodutos com maior valor agregado é interessante para nós, em virtude do Brasil ser um dos maiores produtores mundiais de açúcar da cana-de-açúcar (MOHAMED; MUNDHADA; LANDBERG; CANN *et al.*, 2019; OLAVARRIA; FINA; VELASCO; VAN LOOSDRECHT *et al.*, 2019).

Entretanto, somente algumas linhagens de *E. coli* metabolizam a sacarose, sendo que as laboratoriais ou industriais normalmente não utilizam o dissacarídeo (BRUSCHI; BOYES; SUGIARTO; NIELSEN *et al.*, 2012). Com isso, técnicas de engenharia genética são empregadas para transformar linhagens de interesse em cepas capazes de metabolizar esse açúcar. Mas, tanto linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas, como cepas que naturalmente metabolizam a sacarose, não tem uma taxa alta de crescimento se comparada ao uso da glicose como fonte de carbono (MOHAMED; MUNDHADA; LANDBERG; CANN *et al.*, 2019). Com isso, são necessários aprimoramentos para que a bactéria possa utilizar a sacarose de forma eficiente.

Nesse sentido, a evolução adaptativa em laboratório (em inglês: *Adaptive Laboratory Evolution*, ALE) é uma poderosa ferramenta que pode ser usada para se entender as possibilidades de adaptação de um microrganismo quando desafiado a crescer em condições que não são as ideais. Desta forma, a ALE pode fornecer possibilidades para o desenvolvimento de cepas industriais capazes de ter a sua

produção otimizada (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013). Assim, o uso da ALE para construir cepas de *E. coli* que apresentem um desenvolvimento adequado na sacarose é uma empolgante possibilidade para a obtenção de cepas superiores e plataformas industriais para bioprodutos interessantes comercialmente.

Para explorar as mutações observadas ao final de um experimento ALE é importante reconstruir e testar tais alterações nas cepas progenitoras do experimento (OUD; FLORES; GANCEDO; ZHANG *et al.*, 2012). Esse processo é chamado de engenharia reversa e é neste momento em que as mutações-chave são investigadas em relação ao *fitness*. As mutações que contribuem positivamente podem ser assim selecionadas e usadas para construção de cepas superiores (JACOBUS; CAVASSANA; DE; BARRETO *et al.*, 2024).

7 CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foram propostas melhorias no sistema de CRISPR/Cas9 para serem aplicadas na edição genômica de *E. coli*. A primeira melhoria citada foi a implementação de três sistemas de clonagem de plasmídeos para expressão de gRNA, sendo o sistema mais avançado o uso do sistema com oligos, que aumenta a velocidade de clonagem da molécula de RNA guia. Também foram propostos sistemas de clonagem de *donor* usando amplificações de oligos e montagem de fragmentos de DNA em levedura. Com essas ferramentas foi possível a reconstrução de mutações identificados em experimento de evolução de populações de *E. coli* em sacarose. A avaliação das mutações reconstruídas demonstrou que a redução do número de cópias do plasmídeo *cscBKA* e a inativação do flagelo aumentaram a capacidade de crescimento. Com os sistemas para otimização de CRISPR/Cas9 apresentados foi possível integrar a via metabólica para produção de PHB e foi detectada a produção de ~31% da massa celular seca, partir da sacarose.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, M.; SIDDIQUI, A. J.; ASHRAF, S. A.; SNOUSSI, M. *et al.* Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization. **Polymers (Basel)**, 14, n. 19, Sep 23 2022.
- AHMAD, M.; PRENSKY, H.; BALESTRIERI, J.; ELNAGGAR, S. *et al.* Tradeoff between lag time and growth rate drives the plasmid acquisition cost. **Nat Commun**, 14, n. 1, p. 2343, Apr 24 2023.
- AKKOYUNLU, B.; GABARRE, C.; DALY, S.; CASEY, E. *et al.* Process modelling for industrial scale polyhydroxybutyrate production using fructose, formic acid and CO(2): Assessing carbon sources and economic viability. **Bioresour Technol**, 393, p. 130139, Feb 2024.
- ALMARIO, M. P.; REYES, L. H.; KAO, K. C. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. **Biotechnol Bioeng**, 110, n. 10, p. 2616-2623, Oct 2013.
- ALMEIDA, L. J. M.; SILVA, A. V.; SILVA, J. S. L.; SILVA, J. F. *et al.* Sugarcane productivity and economic viability in response to planting density. **Brazilian Journal of Biology**, 84, 2024.
- ANBUKARASU, P.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. **Sci Rep**, 5, p. 17884, Dec 7 2015.
- ANTON, B. P.; RALEIGH, E. A. Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of *Escherichia coli* K-12 DH5alpha. **Genome Announc**, 4, n. 6, Nov 10 2016.
- ARCHER, C. T.; KIM, J. F.; JEONG, H.; PARK, J. H. *et al.* The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. **BMC Genomics**, 12, p. 9, Jan 6 2011.
- ARIFIN, Y.; ARCHER, C.; LIM, S.; QUEK, L. E. *et al.* *Escherichia coli* W shows fast, highly oxidative sucrose metabolism and low acetate formation. **Appl Microbiol Biotechnol**, 98, n. 21, p. 9033-9044, Nov 2014.
- BAESHEN, N. A.; BAESHEN, M. N.; SHEIKH, A.; BORA, R. S. *et al.* Cell factories for insulin production. **Microb Cell Fact**, 13, p. 141, Oct 2 2014.
- BAEZ, A.; SHARMA, A. K.; BRYUKHANOV, A.; ANDERSON, E. D. *et al.* Iron availability enhances the cellular energetics of aerobic *Escherichia coli* cultures while upregulating anaerobic respiratory chains. **N Biotechnol**, 71, p. 11-20, Nov 25 2022.
- BANDYOPADHYAY, K.; PARUA, P. K.; DATTA, A. B.; PARRACK, P. Studies on *Escherichia coli* HflK suggest the presence of an unidentified lambda factor that influences the lysis-lysogeny switch. **BMC Microbiol**, 11, p. 34, Feb 17 2011.
- BAREMBRUCH, C.; HENGGE, R. Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. **Mol Microbiol**, 65, n. 1, p. 76-89, Jul 2007.

BASSALO, M. C.; GARST, A. D.; HALWEG-EDWARDS, A. L.; GRAU, W. C. *et al.* Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. **ACS Synth Biol**, 5, n. 7, p. 561-568, Jul 15 2016.

BEHERA, S.; PRIYADARSHANEE, M.; VANDANA; DAS, S. Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. **Chemosphere**, 294, p. 133723, May 2022.

BESSMAN, M. J. A cryptic activity in the Nudix hydrolase superfamily. **Protein Sci**, 28, n. 8, p. 1494-1500, Aug 2019.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G., 3rd; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, 277, n. 5331, p. 1453-1462, Sep 5 1997.

BLOUNT, Z. D. The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, 4, Mar 25 2015.

BLOUNT, Z. D.; BORLAND, C. Z.; LENSKI, R. E. Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 23, p. 7899-7906, Jun 10 2008.

BOCANEGRA, J. K.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; DA SILVA, L. F.; TACIRO, M. K. *et al.* Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. **Appl Biochem Biotechnol**, 170, n. 6, p. 1336-1347, Jul 2013.

BRUSCHI, M.; BOYES, S. J.; SUGIARTO, H.; NIELSEN, L. K. *et al.* A transferable sucrose utilization approach for non-sucrose-utilizing *Escherichia coli* strains. **Biotechnol Adv**, 30, n. 5, p. 1001-1010, Sep-Oct 2012.

BUBECK, P.; WINKLER, M.; BAUTSCH, W. Rapid cloning by homologous recombination in vivo. **Nucleic Acids Res**, 21, n. 15, p. 3601-3602, Jul 25 1993.

BUSKIRK, S. W.; PEACE, R. E.; LANG, G. I. Hitchhiking and epistasis give rise to cohort dynamics in adapting populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 31, p. 8330-8335, Aug 1 2017.

CALLONI, G.; CHEN, T.; SCHERMANN, S. M.; CHANG, H. C. *et al.* DnaK functions as a central hub in the *E. coli* chaperone network. **Cell Rep**, 1, n. 3, p. 251-264, Mar 29 2012.

CHILCOTT, G. S.; HUGHES, K. T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiol Mol Biol Rev**, 64, n. 4, p. 694-708, Dec 2000.

CHOTCHINDAKUN, K.; PATHOM-AREE, W.; DUMRI, K.; RUANGSURIYA, J. *et al.* Low Crystallinity of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Bioproduction by Hot Spring *Cyanobacterium Cyanosarcina* sp. AARL T020. **Plants (Basel)**, 10, n. 3, Mar 8 2021.

CONLEY, E. C.; SAUNDERS, V. A.; SAUNDERS, J. R. Deletion and rearrangement of plasmid DNA during transformation of *Escherichia coli* with linear plasmid molecules. **Nucleic Acids Res**, 14, n. 22, p. 8905-8917, Nov 25 1986.

CONRAD, T. M.; FRAZIER, M.; JOYCE, A. R.; CHO, B. K. *et al.* RNA polymerase mutants found through adaptive evolution reprogram *Escherichia coli* for optimal growth in minimal media. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 47, p. 20500-20505, Nov 23 2010.

COOPER, V. S.; LENSKI, R. E. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. **Nature**, 407, n. 6805, p. 736-739, Oct 12 2000.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 12, p. 6640-6645, Jun 6 2000.

DE FREITAS, C.; BRIENZO, M. Enzymatic Hydrolysis Applied to Banana Pseudostem Biomass Compared to Solubilized Xylan for Xylooligosaccharides Production with High Substrate Concentration. **BioEnergy Research**, 16, n. 2, p. 1040-1050, 2023/06/01 2023.

DEATHERAGE, D. E.; BARRICK, J. E. High-throughput characterization of mutations in genes that drive clonal evolution using multiplex adaptome capture sequencing. **Cell Syst**, 12, n. 12, p. 1187-1200 e1184, Dec 15 2021.

DELUNA, A.; VETSIGIAN, K.; SHORESH, N.; HEGRENESS, M. *et al.* Exposing the fitness contribution of duplicated genes. **Nat Genet**, 40, n. 5, p. 676-681, May 2008.

DOS SANTOS, L. V.; CARAZZOLLE, M. F.; NAGAMATSU, S. T.; SAMPAIO, N. M. *et al.* Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Sci Rep**, 6, p. 38676, Dec 21 2016.

DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Adaptive laboratory evolution -- principles and applications for biotechnology. **Microb Cell Fact**, 12, p. 64, Jul 1 2013.

DUNNE, K. A.; CHAUDHURI, R. R.; ROSSITER, A. E.; BERIOTTO, I. *et al.* Sequencing a piece of history: complete genome sequence of the original *Escherichia coli* strain. **Microb Genom**, 3, n. 3, p. mgen000106, Mar 2017.

ECHOLS, H.; GREEN, L. Establishment and maintenance of repression by bacteriophage lambda: the role of the *cl*, *cII*, and *c3* proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 68, n. 9, p. 2190-2194, Sep 1971.

FANG, H.; KANG, J.; ZHANG, D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. **Microbial Cell Factories**, 16, n. 1, p. 15, 2017/01/30 2017.

FANG, H.; ZHAO, J.; ZHAO, X.; DONG, N. *et al.* Standardized Iterative Genome Editing Method for *Escherichia coli* Based on CRISPR-Cas9. **ACS Synth Biol**, 13, n. 2, p. 613-623, Feb 16 2024.

FENG, X.; ZHAO, D.; ZHANG, X.; DING, X. *et al.* CRISPR/Cas9 Assisted Multiplex Genome Editing Technique in *Escherichia coli*. **Biotechnol J**, 13, n. 9, p. e1700604, Sep 2018.

FOLSOM, J. P.; PARKER, A. E.; CARLSON, R. P. Physiological and proteomic analysis of *Escherichia coli* iron-limited chemostat growth. **J Bacteriol**, 196, n. 15, p. 2748-2761, Aug 2014.

GASSLER, T.; BAUMSCHABL, M.; SALLABERGER, J.; EGERMEIER, M. *et al.* Adaptive laboratory evolution and reverse engineering enhances autotrophic growth in *Pichia pastoris*. **Metab Eng**, 69, p. 112-121, Jan 2022.

GECSE, G.; LABUNSKAITE, R.; PEDERSEN, M.; KILSTRUP, M. *et al.* Minimizing acetate formation from overflow metabolism in *Escherichia coli*: comparison of genetic engineering strategies to improve robustness toward sugar gradients in large-scale fermentation processes. **Front Bioeng Biotechnol**, 12, p. 1339054, 2024.

GETZ, H. P. Sucrose accumulation and synthesis in sugar beet. *In*: GUPTA, A. K. e KAUR, N. (Ed.). **Developments in Crop Science**: Elsevier, 2000. v. 26, p. 55-77.

GORKE, B.; STULKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 8, p. 613-624, Aug 2008.

GULLBERG, E.; CAO, S.; BERG, O. G.; ILBACK, C. *et al.* Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. **PLoS Pathog**, 7, n. 7, p. e1002158, Jul 2011.

HAN, J. H.; JUNG, S. T.; OH, M. K. Improved Yield of Recombinant Protein via Flagella Regulator Deletion in *Escherichia coli*. **Front Microbiol**, 12, p. 655072, 2021.

HANAHAHAN, D. J. J. o. m. b. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HERMAN, C.; THEVENET, D.; D'ARI, R.; BOULOC, P. The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII. **J Bacteriol**, 179, n. 2, p. 358-363, Jan 1997.

HERRING, C. D.; RAGHUNATHAN, A.; HONISCH, C.; PATEL, T. *et al.* Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. **Nat Genet**, 38, n. 12, p. 1406-1412, Dec 2006.

HOBSON, N.; PRICE, N. L.; WARD, J. D.; RAIVIO, T. L. Generation of a restriction minus enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 strain that is efficiently transformed with large, low copy plasmids. **BMC Microbiol**, 8, p. 134, Aug 5 2008.

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y.; SAUNDERS, D. *et al.* Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **J Bacteriol**, 191, n. 1, p. 347-354, Jan 2009.

JACOBUS, A. P.; BARRETO, J. A.; DE BEM, L. S.; MENEGON, Y. A. *et al.* EasyGuide Plasmids Support in Vivo Assembly of gRNAs for CRISPR/Cas9 Applications in *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Synth Biol**, 11, n. 11, p. 3886-3891, Nov 18 2022.

JACOBUS, A. P.; CAVASSANA, S. D.; DE, O., II; BARRETO, J. A. *et al.* Optimal trade-off between boosted tolerance and growth fitness during adaptive evolution of yeast to ethanol shocks. **Biotechnol Biofuels Bioprod**, 17, n. 1, p. 63, May 10 2024.

JACOBUS, A. P.; GROSS, J. Optimal cloning of PCR fragments by homologous recombination in *Escherichia coli*. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0119221, 2015.

- JANG, B. K.; JU, Y.; JEONG, D.; JUNG, S. K. *et al.* L-Lactic Acid Production Using Engineered *Saccharomyces cerevisiae* with Improved Organic Acid Tolerance. **J Fungi (Basel)**, 7, n. 11, Oct 31 2021.
- JIANG, N.; WANG, M.; SONG, L.; YU, D. *et al.* Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21. **Microbial Cell Factories**, 22, n. 1, p. 129, 2023/07/14 2023.
- JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D.; ZHANG, F. *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nat Biotechnol**, 31, n. 3, p. 233-239, Mar 2013.
- JIANG, Y.; CHEN, B.; DUAN, C.; SUN, B. *et al.* Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. **Appl Environ Microbiol**, 81, n. 7, p. 2506-2514, Apr 2015.
- JOHNSON, M. S.; GOPALAKRISHNAN, S.; GOYAL, J.; DILLINGHAM, M. E. *et al.* Phenotypic and molecular evolution across 10,000 generations in laboratory budding yeast populations. **eLife**, 10, p. e63910, 2021/01/19 2021.
- JUNG, S. C.; SMITH, C. L.; LEE, K. S.; HONG, M. E. *et al.* Restoration of growth phenotypes of *Escherichia coli* DH5alpha in minimal media through reversal of a point mutation in *purB*. **Appl Environ Microbiol**, 76, n. 18, p. 6307-6309, Sep 2010.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 2, p. 123-140, Feb 2004.
- KATAYAMA, T.; KASHO, K.; KAWAKAMI, H. The DnaA Cycle in *Escherichia coli*: Activation, Function and Inactivation of the Initiator Protein. **Front Microbiol**, 8, p. 2496, 2017.
- KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. **EMBO J**, 15, n. 22, p. 6122-6131, Nov 15 1996.
- KIM, K.; HOU, C. Y.; CHOE, D.; KANG, M. *et al.* Adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli* W enhances gamma-aminobutyric acid production using glycerol as the carbon source. **Metab Eng**, 69, p. 59-72, Jan 2022.
- KOSTYLEV, M.; OTWELL, A. E.; RICHARDSON, R. E.; SUZUKI, Y. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5alpha-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0137466, 2015.
- LEE, J. W.; CHOI, S.; PARK, J. H.; VICKERS, C. E. *et al.* Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production. **Appl Microbiol Biotechnol**, 88, n. 4, p. 905-913, Oct 2010.
- LEE, M. J.; PARK, J.; PARK, K.; KIM, J. F. *et al.* Reverse Engineering Targets for Recombinant Protein Production in *Corynebacterium glutamicum* Inspired by a Fast-Growing Evolved Descendant. **Front Bioeng Biotechnol**, 8, p. 588070, 2020.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol Bioeng**, 49, n. 1, p. 1-14, Jan 5 1996.

LEI, D.; QIU, Z.; WU, J.; QIAO, B. *et al.* Combining Metabolic and Monoterpene Synthase Engineering for de Novo Production of Monoterpene Alcohols in Escherichia coli. **ACS Synth Biol**, 10, n. 6, p. 1531-1544, Jun 18 2021.

LENSKI, R. E. Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. **ISME J**, 11, n. 10, p. 2181-2194, Oct 2017.

LENSKI, R. E. Revisiting the Design of the Long-Term Evolution Experiment with Escherichia coli. **J Mol Evol**, 91, n. 3, p. 241-253, Jun 2023.

LENSKI, R. E.; MONGOLD, J. A.; SNIEGOWSKI, P. D.; TRAVISANO, M. *et al.* Evolution of competitive fitness in experimental populations of E. coli: what makes one genotype a better competitor than another? **Antonie Van Leeuwenhoek**, 73, n. 1, p. 35-47, Jan 1998.

LENSKI, R. E.; ROSE, M. R.; SIMPSON, S. C.; TADLER, S. C. Long-Term Experimental Evolution in Escherichia coli. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. **The American Naturalist**, 138, n. 6, p. 1315-1341, 1991.

LI, B.; LIU, N.; ZHAO, X. Response mechanisms of Saccharomyces cerevisiae to the stress factors present in lignocellulose hydrolysate and strategies for constructing robust strains. **Biotechnol Biofuels Bioprod**, 15, n. 1, p. 28, Mar 15 2022.

LI, M.; WANG, J.; GENG, Y.; LI, Y. *et al.* A strategy of gene overexpression based on tandem repetitive promoters in Escherichia coli. **Microb Cell Fact**, 11, p. 19, Feb 6 2012.

LI, M.; WILKINS, M. R. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments. **Int J Biol Macromol**, 156, p. 691-703, Aug 1 2020.

LI, Q.; SUN, B.; CHEN, J.; ZHANG, Y. *et al.* A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in Escherichia coli. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 53, n. 5, p. 620-627, Apr 15 2021.

LI, Q.; SUN, M.; LV, L.; ZUO, Y. *et al.* Improving the Editing Efficiency of CRISPR-Cas9 by Reducing the Generation of Escapers Based on the Surviving Mechanism. **ACS Synth Biol**, 12, n. 3, p. 672-680, Mar 17 2023.

LI, Y.; LIN, Z.; HUANG, C.; ZHANG, Y. *et al.* Metabolic engineering of Escherichia coli using CRISPR-Cas9 mediated genome editing. **Metab Eng**, 31, p. 13-21, Sep 2015.

LI, Z.; YANG, J.; LOH, X. J. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. **NPG Asia Materials**, 8, n. 4, p. e265-e265, 2016/04/01 2016.

LI, Z. H.; WANG, J.; XU, J. P.; WANG, J. *et al.* Recent advances in CRISPR-based genome editing technology and its applications in cardiovascular research. **Mil Med Res**, 10, n. 1, p. 12, Mar 10 2023.

LIANG, L.; LIU, R.; FREED, E. F.; ECKERT, C. A. Synthetic Biology and Metabolic Engineering Employing Escherichia coli for C2-C6 Bioalcohol Production. **Front Bioeng Biotechnol**, 8, p. 710, 2020.

LILIC, M.; JOVANOVIĆ, M.; JOVANOVIĆ, G.; SAVIĆ, D. J. Identification of the CysB-regulated gene, hslJ, related to the Escherichia coli novobiocin resistance phenotype. **FEMS Microbiol Lett**, 224, n. 2, p. 239-246, Jul 29 2003.

LIM, S. R.; LEE, H. J.; KIM, H. J.; LEE, S. J. Multiplex Single-Nucleotide Microbial Genome Editing Achieved by CRISPR-Cas9 Using 5'-End-Truncated sgRNAs. **ACS Synth Biol**, 12, n. 7, p. 2203-2207, Jul 21 2023.

LIN, P.-C.; ZHANG, F.; PAKRASI, H. B. Enhanced production of sucrose in the fast-growing cyanobacterium Synechococcus elongatus UTEX 2973. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 390, 2020/01/15 2020.

LOPILATO, J.; BORTNER, S.; BECKWITH, J. Mutations in a new chromosomal gene of Escherichia coli K-12, pcnB, reduce plasmid copy number of pBR322 and its derivatives. **Mol Gen Genet**, 205, n. 2, p. 285-290, Nov 1986.

MA, D.; CAMPBELL, J. L. The effect of dnaA protein and n' sites on the replication of plasmid ColE1. **J Biol Chem**, 263, n. 29, p. 15008-15015, Oct 15 1988.

MALDONADO, N.; LOPEZ-HERNANDEZ, I.; GARCIA-MONTANER, A.; LOPEZ-CORTES, L. E. *et al.* Whole-genome characterisation of Escherichia coli isolates from patients with bacteraemia presenting with sepsis or septic shock in Spain: a multicentre cross-sectional study. **Lancet Microbe**, 5, n. 4, p. e390-e399, Apr 2024.

MANIATIS, T. J. A. I. m. Molecular cloning. 1982.

MASTERS, M.; COLLOMS, M. D.; OLIVER, I. R.; HE, L. *et al.* The pcnB gene of Escherichia coli, which is required for ColE1 copy number maintenance, is dispensable. **J Bacteriol**, 175, n. 14, p. 4405-4413, Jul 1993.

MCADAM, B.; BRENNAN FOURNET, M.; MCDONALD, P.; MOJICEVIC, M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. 12, n. 12, p. 2908, 2020.

MENEGON, Y. A.; GROSS, J.; JACOBUS, A. P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. **Curr Genet**, 68, n. 3-4, p. 319-342, Aug 2022.

MOHAMED, E. T.; MUNDHADA, H.; LANDBERG, J.; CANN, I. *et al.* Generation of an E. coli platform strain for improved sucrose utilization using adaptive laboratory evolution. **Microb Cell Fact**, 18, n. 1, p. 116, Jun 29 2019.

MONDAY, S. R.; MINNICH, S. A.; FENG, P. C. A 12-base-pair deletion in the flagellar master control gene flhC causes nonmotility of the pathogenic German sorbitol-fermenting Escherichia coli O157:H- strains. **J Bacteriol**, 186, n. 8, p. 2319-2327, Apr 2004.

MOREB, E. A.; HOOVER, B.; YASEEN, A.; VALYASEVI, N. *et al.* Managing the SOS Response for Enhanced CRISPR-Cas-Based Recombineering in E. coli through Transient Inhibition of Host RecA Activity. **ACS Synth Biol**, 6, n. 12, p. 2209-2218, Dec 15 2017.

MORENO, A. D.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; TOMÁS-PEJÓ, E. Insights into cell robustness against lignocellulosic inhibitors and insoluble solids in bioethanol production processes. **Scientific Reports**, 12, n. 1, p. 557, 2022/01/11 2022.

MURPHY, K. C. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, 180, n. 8, p. 2063-2071, Apr 1998.

NADRATOWSKA-WESOŁOWSKA, B.; SŁOMIŃSKA-WOJEWODZKA, M.; LYZEN, R.; WĘGRZYŃ, A. *et al.* Transcription regulation of the *Escherichia coli* *pcnB* gene coding for poly(A) polymerase I: roles of ppGpp, DksA and sigma factors. **Mol Genet Genomics**, 284, n. 4, p. 289-305, Oct 2010.

NI, D.; CHEN, Z.; TIAN, Y.; XU, W. *et al.* Comprehensive utilization of sucrose resources via chemical and biotechnological processes: A review. **Biotechnology Advances**, 60, p. 107990, 2022/11/01/ 2022.

NOZAKI, S.; NIKI, H. Exonuclease III (XthA) Enforces In Vivo DNA Cloning of *Escherichia coli* To Create Cohesive Ends. **J Bacteriol**, 201, n. 5, Mar 1 2019.

OLAVARRIA, K.; FINA, A.; VELASCO, M. I.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. *et al.* Metabolism of sucrose in a non-fermentative *Escherichia coli* under oxygen limitation. **Appl Microbiol Biotechnol**, 103, n. 15, p. 6245-6256, Aug 2019.

OLINER, J. D.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. **Nucleic Acids Res**, 21, n. 22, p. 5192-5197, Nov 11 1993.

ODD, B.; FLORES, C. L.; GANCEDO, C.; ZHANG, X. *et al.* An internal deletion in MTH1 enables growth on glucose of pyruvate-decarboxylase negative, non-fermentative *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact**, 11, p. 131, Sep 15 2012.

PANDEY, A.; ADAMA, N.; ADJALLE, K.; BLAIS, J. F. Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review. **Int J Biol Macromol**, 221, p. 1184-1201, Nov 30 2022.

PATEL, U. R.; GAUTAM, S.; CHATTERJI, D. Unraveling the Role of Silent Mutation in the omega-Subunit of *Escherichia coli* RNA Polymerase: Structure Transition Inhibits Transcription. **ACS Omega**, 4, n. 18, p. 17714-17725, Oct 29 2019.

PENA, C.; CASTILLO, T.; GARCIA, A.; MILLAN, M. *et al.* Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. **Microb Biotechnol**, 7, n. 4, p. 278-293, Jul 2014.

PEÑA, C.; LÓPEZ, S.; GARCÍA, A.; ESPÍN, G. *et al.* Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). **Annals of Microbiology**, 64, n. 1, p. 39-47, 2014/03/01 2014.

PYNE, M. E.; MOO-YOUNG, M.; CHUNG, D. A.; CHOU, C. P. Coupling the CRISPR/Cas9 System with Lambda Red Recombineering Enables Simplified Chromosomal Gene Replacement in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, 81, n. 15, p. 5103-5114, Aug 2015.

- RAFFAELLI, N.; LORENZI, T.; MARIANI, P. L.; EMANUELLI, M. *et al.* The Escherichia coli NadR regulator is endowed with nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase activity. **J Bacteriol**, 181, n. 17, p. 5509-5511, Sep 1999.
- REID, C. J.; BLAU, K.; JECHALKE, S.; SMALLA, K. *et al.* Whole Genome Sequencing of Escherichia coli From Store-Bought Produce. **Front Microbiol**, 10, p. 3050, 2019.
- REISCH, C. R.; PRATHER, K. L. The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in Escherichia coli. **Sci Rep**, 5, p. 15096, Oct 14 2015.
- RIGGS, A. D. Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. **Endocr Rev**, 42, n. 3, p. 374-380, May 25 2021.
- RODRIGUEZ, A.; MARTINEZ, J. A.; FLORES, N.; ESCALANTE, A. *et al.* Engineering Escherichia coli to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. **Microb Cell Fact**, 13, n. 1, p. 126, Sep 9 2014.
- RONDA, C.; PEDERSEN, L. E.; SOMMER, M. O.; NIELSEN, A. T. CRMAGE: CRISPR Optimized MAGE Recombineering. **Sci Rep**, 6, p. 19452, Jan 22 2016.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, 5, p. 172, 2014.
- RUIZ, N.; SILHAVY, T. J. How Escherichia coli Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology. 204, n. 9, p. e00230-00222, 2022.
- SABRI, S.; NIELSEN, L. K.; VICKERS, C. E. Molecular control of sucrose utilization in Escherichia coli W, an efficient sucrose-utilizing strain. **Appl Environ Microbiol**, 79, n. 2, p. 478-487, Jan 2013.
- SANTOS, T. M. A.; LAMMERS, M. G.; ZHOU, M.; SPARKS, I. L. *et al.* Small Molecule Chelators Reveal That Iron Starvation Inhibits Late Stages of Bacterial Cytokinesis. **ACS Chem Biol**, 13, n. 1, p. 235-246, Jan 19 2018.
- SCHWECHHEIMER, C.; KULP, A.; KUEHN, M. J. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. **BMC Microbiol**, 14, p. 324, Dec 21 2014.
- SHABBIR, M. A. B.; SHABBIR, M. Z.; WU, Q.; MAHMOOD, S. *et al.* CRISPR-cas system: biological function in microbes and its use to treat antimicrobial resistant pathogens. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 18, n. 1, p. 21, Jul 5 2019.
- SHARMA, V.; SEHGAL, R.; GUPTA, R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. **Polymer**, 212, p. 123161, 2021/01/06/ 2021.
- SHINOHARA, A.; OGAWA, H.; OGAWA, T. Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein. **Cell**, 69, n. 3, p. 457-470, May 1 1992.
- SHUKAL, S.; LIM, X. H.; ZHANG, C.; CHEN, X. Metabolic engineering of Escherichia coli BL21 strain using simplified CRISPR-Cas9 and asymmetric homology arms recombineering. **Microb Cell Fact**, 21, n. 1, p. 19, Feb 5 2022.

- SOUTOURINA, O. A.; BERTIN, P. N. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, 27, n. 4, p. 505-523, Oct 2003.
- SPIRA, B.; OSPINO, K. Diversity in *E. coli* (p)ppGpp Levels and Its Consequences. 11, 2020-August-12 2020. Review.
- STOVICEK, V.; DATO, L.; ALMQVIST, H.; SCHOPPING, M. *et al.* Rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of dicarboxylic acids from lignocellulosic biomass and exploring genetic mechanisms of the yeast tolerance to the biomass hydrolysate. **Biotechnol Biofuels Bioprod**, 15, n. 1, p. 22, Feb 27 2022.
- SUN, D.; WANG, L.; MAO, X.; FEI, M. *et al.* Chemical transformation mediated CRISPR/Cas9 genome editing in *Escherichia coli*. **Biotechnol Lett**, 41, n. 2, p. 293-303, Feb 2019.
- SUN, H.; WANG, M.; LIU, Y.; WU, P. *et al.* Regulation of flagellar motility and biosynthesis in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Gut Microbes**, 14, n. 1, p. 2110822, Jan-Dec 2022.
- SUTHERLAND, C.; MURAKAMI, K. S. An Introduction to the Structure and Function of the Catalytic Core Enzyme of *Escherichia coli* RNA Polymerase. **EcoSal Plus**, 8, n. 1, Aug 2018.
- SUZUKI, M.; TACHIBANA, Y.; KASUYA, K.-i. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. **Polymer Journal**, 53, n. 1, p. 47-66, 2021/01/01 2021.
- TANG, Q.; LOU, C.; LIU, S. J. Construction of an easy-to-use CRISPR-Cas9 system by patching a newly designed EXIT circuit. **J Biol Eng**, 11, p. 32, 2017.
- TONG, Y.; JORGENSEN, T. S.; WHITFORD, C. M.; WEBER, T. *et al.* A versatile genetic engineering toolkit for *E. coli* based on CRISPR-prime editing. **Nat Commun**, 12, n. 1, p. 5206, Sep 1 2021.
- TRAKUNJAE, C.; BOONDAENG, A.; APIWATANAPIWAT, W.; KOSUGI, A. *et al.* Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. **Scientific Reports**, 11, n. 1, p. 1896, 2021/01/21 2021.
- TRAXLER, M. F.; SUMMERS, S. M.; NGUYEN, H. T.; ZACHARIA, V. M. *et al.* The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 68, n. 5, p. 1128-1148, Jun 2008.
- VILA, J.; SAEZ-LOPEZ, E.; JOHNSON, J. R.; ROMLING, U. *et al.* *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiol Rev**, 40, n. 4, p. 437-463, Jul 1 2016.
- VRENTAS, C. E.; GAAL, T.; ROSS, W.; EBRIGHT, R. H. *et al.* Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. **Genes Dev**, 19, n. 19, p. 2378-2387, Oct 1 2005.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H. *et al.* Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnol J**, 8, n. 3, p. 263-276, Apr 2010.

WADA, T.; HATAMOTO, Y.; KUTSUKAKE, K. Functional and expressional analyses of the anti-FlhD4C2 factor gene *ydiV* in *Escherichia coli*. **Microbiology (Reading)**, 158, n. Pt 6, p. 1533-1542, Jun 2012.

WANG, G.; LI, Q.; ZHANG, Z.; YIN, X. *et al.* Recent progress in adaptive laboratory evolution of industrial microorganisms. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 50, n. 1, Feb 17 2023.

WANG, J.; SUI, X.; DING, Y.; FU, Y. *et al.* A fast and robust iterative genome-editing method based on a Rock-Paper-Scissors strategy. **Nucleic Acids Res**, 49, n. 2, p. e12, Jan 25 2021.

WATSON, J. F.; GARCIA-NAFRIA, J. In vivo DNA assembly using common laboratory bacteria: A re-emerging tool to simplify molecular cloning. **J Biol Chem**, 294, n. 42, p. 15271-15281, Oct 18 2019.

WEI, J.; LI, Y. CRISPR-based gene editing technology and its application in microbial engineering. **Eng Microbiol**, 3, n. 4, p. 100101, Dec 2023.

WU, F.; ZHOU, Y.; PEI, W.; JIANG, Y. *et al.* Biosynthesis of Poly-(3-hydroxybutyrate) under the Control of an Anaerobically Induced Promoter by Recombinant *Escherichia coli* from Sucrose. **Molecules**, 27, n. 1, Jan 4 2022.

YAMAGUCHI, K.; INOUE, M. Lipoprotein 28, an inner membrane protein of *Escherichia coli* encoded by *nlpA*, is not essential for growth. **J Bacteriol**, 170, n. 8, p. 3747-3749, Aug 1988.

YAMAMOTO, K.; YAMANAKA, Y.; SHIMADA, T.; SARKAR, P. *et al.* Altered Distribution of RNA Polymerase Lacking the Omega Subunit within the Prophages along the *Escherichia coli* K-12 Genome. **mSystems**, 3, n. 1, Jan-Feb 2018.

YIN, J.; WANG, H.; FU, X. Z.; GAO, X. *et al.* Effects of chromosomal gene copy number and locations on polyhydroxyalkanoate synthesis by *Escherichia coli* and *Halomonas* sp. **Appl Microbiol Biotechnol**, 99, n. 13, p. 5523-5534, Jul 2015.

ZERBINI, F.; ZANELLA, I.; FRACCASCIA, D.; KONIG, E. *et al.* Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact**, 16, n. 1, p. 68, Apr 24 2017.

ZHANG, Y.; MUYRERS, J. P.; TESTA, G.; STEWART, A. F. DNA cloning by homologous recombination in *Escherichia coli*. **Nat Biotechnol**, 18, n. 12, p. 1314-1317, Dec 2000.

ZHAO, D.; YUAN, S.; XIONG, B.; SUN, H. *et al.* Development of a fast and easy method for *Escherichia coli* genome editing with CRISPR/Cas9. **Microb Cell Fact**, 15, n. 1, p. 205, Dec 1 2016.

ZHAO, J.; BABA, T.; MORI, H.; SHIMIZU, K. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. **Metab Eng**, 6, n. 2, p. 164-174, Apr 2004.

ZHAO, W.; GUO, Y. Increasing the efficiency of gene editing with CRISPR-Cas9 via concurrent expression of the Beta protein. **Int J Biol Macromol**, 270, n. Pt 2, p. 132431, Jun 2024.

ZHENG, W.; LI, Z.; SKARSTAD, K.; CROOKE, E. Mutations in DnaA protein suppress the growth arrest of acidic phospholipid-deficient Escherichia coli cells. **EMBO J**, 20, n. 5, p. 1164-1172, Mar 1 2001.