

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo deste trabalho não
será disponibilizado por motivo de
pedido de Patente.

Informamos que a defesa foi realizada em
02/06/2021 em modalidade Restrita (Fechada).

A versão completa deste trabalho será
disponibilizada após 02/06/2025



Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”

Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Araraquara

Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca

**Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de
biossurfactante**

Araraquara

2021

Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca

Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Danielle Biscaro Pedrolli

Araraquara

2021

Z88e

Zocca, Vitória Fernanda Bertolazzi.

Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante / Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca. – Araraquara: [S.n.], 2021.

124 f. : il.

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

Orientadora: Danielle Biscaro Pedrolli.

1. CRISPR-Cas9. 2. Biologia Sintética. 3. Surfactina. 4. Biossurfactante. 5. *Bacillus subtilis*. I. Pedrolli, Danielle Biscaro, orient. II. Título.

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Danielle Biscaro Pedrolli, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 311.889.518-74, portador da cédula de identidade RG nº 34.979.964-7, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante**", desenvolvida pela mestrandia **Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

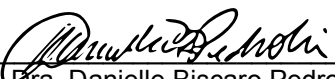
Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 13 de maio de 2021.



Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli
EXAMINADOR

TESTEMUNHA
Nome: Cláudia Lúcia Molina
CPF/MF: 108.957.808-36

TESTEMUNHA
Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Adilson José da Silva, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 291.760.568-56, portador da cédula de identidade RG nº 29.209.673-7, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante**", desenvolvida pela mestrandia **Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 13 de maio de 2021.



Prof. Dr. Adilson José da Silva
EXAMINADOR

TESTEMUNHA

Nome: Cláudia Lúcia Molina
CPF/MF: 108.957.808-36

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

Aline Silva Romão-Dumaresq, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 310.501.798-46, portador da cédula de identidade RG nº 45.947.429-7, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

CLÁUSULA PRIMEIRA. O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante**", desenvolvida pela mestrandia **Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

CLÁUSULA SEGUNDA. A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

Parágrafo único. Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

CLÁUSULA TERCEIRA. O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

CLÁUSULA QUARTA. Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 13 de maio de 2021.

Aline Silva Romão-Dumaresq

Profa. Dra. Aline Silva Romão-Dumaresq
EXAMINADOR

TESTEMUNHA

Nome: Cláudia Lúcia Molina
CPF/MF: 108.957.808-36

TESTEMUNHA

Nome:
CPF/MF:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Engenharia metabólica de *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactante

AUTORA: VITÓRIA FERNANDA BERTOLAZZI ZOCCA

ORIENTADORA: DANIELLE BISCARO PEDROLI

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

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

Prof. Dr. ADILSON JOSÉ DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química / Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. ALINE SILVA ROMÃO-DUMARESQ (Participação Virtual)
Centro de Tecnologia da Indústria Química e Têxtil - CETIQT / SENAI

Araraquara, 02 de junho de 2021

Para minha irmã, Laura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marisol e Marcelo, que sempre me apoiaram e me deram a oportunidade de estudar. Agradeço à minha irmã, Laura, pelo apoio e paciência nos últimos anos.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Danielle, pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pelos ensinamentos e orientação ao longo dos anos. Agradeço ao grupo de pesquisa SynBio Unesp AQA pela amizade, apoio e encorajamento.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, à Unesp e ao CNPq.

RESUMO

Surfactinas são biossurfactantes que combinam potente atividade surfactante com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Desta forma, atraem grande interesse industrial, principalmente no ramo da chamada química verde. A indústria da química verde tem crescido proporcionalmente à preocupação com os impactos ambientais causados pelas ações humanas. Porém, a baixa produtividade de linhagens naturais de *Bacillus* – bactéria produtora de surfactina – inviabiliza a produção em escala industrial. Mesmo a otimização do processo de produção não tem sido suficiente para alcançar os níveis mínimos necessários. Faz-se, portanto, necessária uma abordagem genética para o problema. Neste contexto, o sistema CRISPR-Cas9 foi empregado para edição genômica de três linhagens de *B. subtilis* visando a construção de uma biofábrica de surfactina. As linhagens escolhidas não produzem surfactina naturalmente, assim, a primeira edição do genoma consistiu em restaurar sua capacidade de produção. Os resultados obtidos até o momento são promissores, confirmam a produção de surfactina e a eficácia e especificidade da edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9. A linhagem 434 produz 3,7 g/L em 42 horas de cultivo, o que significa que este projeto está em um patamar 9 vezes maior do que aquele que deu origem a melhor linhagem construída até então para a produção de surfactina. Novas edições genômicas das linhagens foram realizadas para conectar a biossíntese de surfactina a um sistema sintético de autoindução da expressão gênica desenvolvido pelo grupo de pesquisa SynBio Araraquara e para substituição do promotor P_{srfA} no controle do operon da surfatina por um promotor forte constitutivo. As duas edições realizadas para substituir o promotor P_{srfA} prejudicaram a produção de surfactina e o crescimento celular, já a edição genômica que associou o sistema sintético de autoindução da expressão gênica ao promotor P_{srfA} na regulação do operon da surfactina antecipou a produção deste biossurfactante na linhagem 434-2a que alcançou a produtividade de 39,72 mg/L·h em 24 horas de cultivo.

Palavras-chave: CRISPR-Cas9, Biologia Sintética, Surfactina, Biossurfactante, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Surfactins are biosurfactants that combine potent surfactant activity with low toxicity and high biodegradability. They attract great industrial interest, mainly in the branch of the so-called green chemistry. The green chemistry industry has grown proportionally to the concern with environmental impacts caused by human actions. However, the low productivity of natural strains of *Bacillus* - a bacteria that produces surfactin - prevents production on an industrial level. Even the optimization of the production process has not been sufficient to reach the necessary minimum levels. Therefore, a genetic approach to the problem is necessary. In this context, the CRISPR-Cas9 system was used for genome editing of three *B. subtilis* strains to build a surfactin bio-factory. The strains chosen do not produce surfactin naturally, so the first edition of the genome consisted of restoring its production capacity. The results obtained so far are promising, confirming the production of surfactin and the effectiveness and specificity of gene editing by the CRISPR-Cas9 system. The engineered strain 434 produces 3.7 g/L in 42 hours of cultivation, which means that this project starts at a level 9 times higher than the one which gave rise to the best strain built so far to produce surfactin. New genomic editions of the strains were carried out to connect the surfactin biosynthesis to a synthetic gene expression autoinduction system developed by the research group SynBio Araraquara and to replace the P_{srfA} promoter in control of the surfatin operon by a strong constitutive promoter. The two editions carried out to replace the P_{srfA} promoter impaired the surfactin production and cell growth, while the genomic edition that associated the synthetic gene expression autoinduction system to the P_{srfA} promoter for regulation of the surfactin operon accelerated this biosurfactant production by the strain 434-2a that reached the productivity of 39.72 mg/L·h in 24 hours.

Keywords: CRISPR-Cas9, Synthetic Biology, Surfactin, Biosurfactant, *Bacillus subtilis*.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Biossíntese de surfactina por sintetases peptídicas não-ribossomais.....	19
Figura 2 – Regulação do operon <i>srfA</i> em <i>B. subtilis</i>	20
Figura 3 – Plasmídeo pJOE8999 adaptado para a edição gênica com o sistema CRISPR-Cas9 em <i>B. subtilis</i>	25
Figura 4 – Esquema simplificado da edição do DNA genômico bacteriano pelo sistema CRISPR-Cas9.	27
Figura 5 – Sistema sintético de autoindução da expressão gênica.	29
Figura 6 – Esquema simplificado da modificação 1 realizada nas linhagens <i>B. subtilis</i> 168, KO7 e $\Delta 6$ para restaurar a funcionalidade do gene <i>sfp</i>	32
Figura 7 – Esquema simplificado para comparar a regulação do operon <i>srfA</i> no genoma de <i>B. subtilis</i> sem edição gênica e com as modificações 2a, 2b e 2c.	34
Figura 8 – Esquema simplificado das modificações propostas 2a, 2b e 2c, comparando as sequências de DNA doador.	35
Figura 9 – Comparação da sequência-alvo do gene <i>sfp</i> com stop codon prematuro com a região modificada do gene na sequência de DNA doador.....	51
Figura 10 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 1A e 1B do DNA doador SD1.....	52
Figura 11 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG1).....	53
Figura 12 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG1+SD1). ...	54
Figura 13 – Resultado de sequenciamento da região modificada do gene <i>sfp</i> da linhagem <i>B. subtilis</i> 168.....	55
Figura 14 – Curva de calibração para o método colorimétrico baseado em CPC-BTB com surfactina comercial.....	57
Figura 15 – Teste de produção de surfactina pelas linhagens com a modificação 1.....	58
Figura 16 – Primeiro cultivo para avaliação da cinética de produção de surfactina pelas linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449.	59
Figura 17 – Crescimento celular e produção de surfactina pelas linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449 durante o cultivo de 48 horas.	61
Figura 18 – Cromatogramas obtidos em HPLC de uma das triplicatas do ponto de 0,75 mg/mL da curva de calibração com surfactina comercial e dos pontos de 24 horas das linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449.	64

Figura 19 – Primeiro teste de comparação entre a quantificação da produção de surfactina por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB.	65
Figura 20 – Segundo teste de comparação entre a quantificação da produção de surfactina por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB.	66
Figura 21 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2).....	69
Figura 22 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 2A, 2B e 2C do DNA doador SD2.	70
Figura 23 – Resultado da eletroforese dos produtos da digestão das amostras V1, V2 e V3 com a enzima de restrição <i>Pst</i> I.	71
Figura 24 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2). ...	71
Figura 25 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2).....	74
Figura 26 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia da amostra K7.	75
Figura 27 – Resultado do sequenciamento da PCR de colônia da amostra D3.....	76
Figura 28 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 3A, 3B e 3C do DNA doador SD3.	79
Figura 29 – Resultado da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) com os oligonucleotídeos de sequenciamento.	80
Figura 30 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3). ...	81
Figura 31 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3).....	84
Figura 32 – Resultado do sequenciamento da fita reversa da PCR de colônia da amostra A24.	85
Figura 33 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia da amostra B15.	86
Figura 34 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 4A, 4C do DNA doador SD4.	87
Figura 35 – Resultado de eletroforese dos produtos de PCR das amostras C1 a C8 provenientes da tentativa de construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).....	88
Figura 36 – Resultado de sequenciamento de DNA da fita direta do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).	90
Figura 37 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).....	92

Figura 38 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia das amostras G12 e J6.....	93
Figura 39 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 434, 434-2a, 449 e 449-2a durante cultivo de 42 horas.....	96
Figura 40 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 434, 434-2b, 449 e 449-2b durante cultivo de 42 horas.	98
Figura 41 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 449, 449-2a, 449-2b e 449-2c durante cultivo de 42 horas.	99
Figura 42 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens de <i>B. subtilis</i> 434 e 449 e derivadas durante cultivo de 42 horas.	101

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.....	37
Tabela 2 – Plasmídeos, sequências-guias do gRNA e sequências de DNA doador utilizados neste estudo.....	39
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.....	40
Tabela 4 – Detalhes das reações de PCR realizadas.....	42
Tabela 5 – Detalhes das reações de digestão realizadas nas sequências de DNA doador.....	44
Tabela 6 – Proporções das reações de ligação entre plasmídeos e as sequências de DNA doador	45
Tabela 7 – Reação de digestão e ligação de mais de um inserto.	46
Tabela 8 – Ciclos de incubação no termociclador para a reação de digestão e ligação de mais de um inserto.	46
Tabela 9 – Detalhes da sequência-guia SG1 do gRNA.	50
Tabela 10 – Detalhes da sequência-guia SG2, com alvo na sequência expandida do promotor P_{srfA}	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Biossurfactantes	17
1.2. Surfactina	18
1.3. Sistema CRISPR-Cas9.....	22
1.4. Sistema de sintético de autoindução da expressão gênica	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA.....	30
3.1. Edições genômicas.....	30
3.1.1. Modificação 1	31
3.1.2. Modificação 2	33
3.2. Linhagens, plasmídeos, sequências e oligonucleotídeos utilizados.....	36
3.3. Etapas comuns	41
3.3.1. Desenho e obtenção do RNA-guia (gRNA)	41
3.3.2. Desenho e obtenção do DNA doador	41
3.3.3. Construção dos plasmídeos e clonagem em <i>E. coli</i>	43
3.3.4. Transformação em <i>B. subtilis</i> e edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9	47
3.3.5. Cultivos: análise do crescimento celular e produção de surfactina	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Modificação 1	49
4.1.1. Desenho e obtenção da sequência-guia SG1 do gRNA e da sequência de DNA doador SD1	49
4.1.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG1+SD1) e clonagem em <i>E. coli</i>	53
4.1.3. Introdução e teste do sistema de edição gênica CRISPR-Cas9 em <i>B. subtilis</i> ...	54
4.1.4. Construção de uma linhagem de <i>B. subtilis</i> produtora de surfactina.....	56

4.1.5.	Cinética de produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> após a modificação 1	59
4.2.	Modificação 2	67
4.2.1.	Desenho e obtenção da sequência-guia SG2 do gRNA.....	67
4.2.2.	Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2) e clonagem em <i>E. coli</i>	68
4.2.3.	Modificação 2a	69
4.2.4.	Modificação 2b	78
4.2.5.	Modificação 2c	86
4.2.6.	Produção de surfactina por <i>B. subtilis</i> após a modificação 2	95
5.	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
	ANEXOS	110
	APÊNDICES	116

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biossurfactantes

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas que combinam atividade biológica com propriedades físico-químicas, destacando-se pela capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de soluções aquosas e misturas de hidrocarbonetos. Os surfactantes de origem química (ou sintéticos) têm sido aplicados largamente em residências, indústria e agricultura. Entretanto, na última década, preocupações ambientais levaram a busca por surfactantes sustentáveis. Diferente dos surfactantes sintéticos, biossurfactantes são produzidos a partir de plantas, animais e microrganismos, e apresentam diversas vantagens tais como maior biodegradabilidade, menor toxicidade, interação benigna com o meio ambiente, maior formação de espuma e podem possuir valores mais baixos de concentração micelar crítica (CMC), comparados aos análogos sintéticos (JAHAN *et al.*, 2020; LIU *et al.* 2020).

Microrganismos produzem biossurfactantes como metabólitos secundários que podem ser secretados para o ambiente extracelular ou permanecerem aderidos à superfície da célula. A vantagem do uso de microrganismos para a síntese de biossurfactantes está no menor tempo de produção comparado a plantas ou animais, e tanto bactérias e fungos que habitam água, solo e ambientes extremos são naturalmente produtores destas moléculas (JAHAN *et al.*, 2020). Contudo, microrganismos geralmente produzem uma mistura de surfactantes estrutural e fisicamente semelhantes ao invés de uma única molécula e isto pode dificultar e encarecer as etapas posteriores do bioprocesso que visam a purificação da biomolécula de interesse (LIU *et al.* 2020).

Dependendo do microrganismo produtor, os biossurfactantes podem apresentar diferentes estruturas e propriedades específicas e, com isso, ser produzidos de acordo com a sua aplicação final. Tais propriedades incluem detergência, formação de espuma, umedecimento, emulsificação, biorremediação, estabilização, lubrificação, dispersão e solubilização de compostos hidrofóbicos. A classificação dos biossurfactantes microbianos é feita de acordo com seu peso molecular: há aqueles de baixo peso molecular, como glicolipídeos e lipopeptídeos; e compostos poliméricos de alto peso molecular, isto é, polissacarídeos, proteínas ou formas combinadas de lipoproteínas ou lipopolissacarídeos (JAHAN *et al.*, 2020).

A atual preocupação com o meio ambiente aumentou a busca por moléculas de origem natural e com menor impacto ambiental. Isto, combinado a diversidade de estruturas e

propriedades dos biossurfactantes, faz com que estes compostos apresentem grande aplicabilidade na indústria. O mercado global de biossurfactantes evidencia isto, já que atingiu a marca de \$4,35 bilhões em 2017 e estima-se que alcance \$7,95 bilhões em 2026. Entretanto, a baixa produtividade das linhagens microbianas selvagens e os altos custos de produção dificultam o escalonamento da produção (JAHAN *et al.*, 2020; BIOSSURFACTANTS, 2018).

1.2. Surfactina

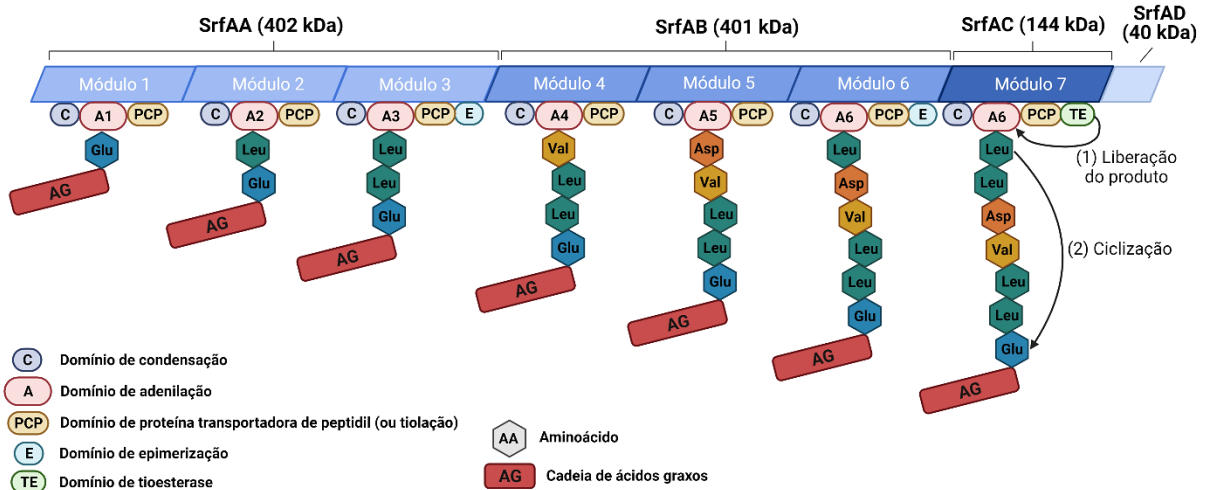
A surfactina é um biossurfactante pertencente a classe dos lipopeptídeos cíclicos. Sua estrutura anfifílica é caracterizada por um anel peptídico de sete aminoácidos e uma cadeia longa de ácidos graxos de 13 a 16 átomos de carbono. Este tensoativo é produzido principalmente por espécies de *Bacillus* como um conjunto de isoformas, que podem variar quanto ao tipo de aminoácidos e comprimento da cadeia de ácidos graxos (HU *et al.*, 2019).

As variações estruturais das isoformas de surfactina influenciam em suas propriedades físico-químicas, como tolerância a altas temperaturas e condições salinas (HU *et al.*, 2019), capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27,9 mN/m (em concentração de 0,005%) (ARIMA *et al.*, 1968) e concentração micelar crítica (CMC) de 10 mg/L (DELEU *et al.*, 1999). Tais propriedades lhe garantem uma vasta gama de aplicações, como a sua utilização como agente antitumoral, antiviral e antimicrobiano na área farmacêutica (MEENA; KANWAR, 2015) e estudos indicam que apresenta também propriedades hipocolesterolêmica, anti-adesiva, apoptótica e hemolítica (JAHAN *et al.*, 2020). Do ponto de vista ambiental, a surfactina também tem sido aplicada na recuperação melhorada de petróleo (técnicas EOR e MEOR), bem como na biorremediação de solos contaminados e na composição de alguns biopesticidas e fertilizantes de plantas (GEISSLER *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2013). Outras aplicações incluem produtos cosméticos e alimentícios, onde a surfactina pode estar presente como componente de emulsões e nanoemulsões (GEISSLER *et al.*, 2019).

Por ser um lipopeptídeo cíclico de síntese não-ribossomal, a síntese de surfactina por *Bacillus* envolve várias rotas metabólicas desde a síntese das moléculas precursoras até a biossíntese do tensoativo em si. Uma vez que as moléculas precursoras (ácidos graxos, NADPH, glutamato, aspartato, valina e leucina) foram acumuladas na célula, a biossíntese de surfactina é catalisada por sintetases peptídicas modulares SrfAA, SrfAB, SrfAC e SrfAD

(Figura 1). As três primeiras formam um conjunto de sete módulos, cada um responsável pela adição de um aminoácido à molécula. Os módulos possuem domínios catalíticos de adenilação, condensação, tiolação (ou transportadores de peptidil), epimerização e tioesterase responsáveis pela ativação dos aminoácidos, elongação da cadeia peptídica e liberação do produto. A biossíntese de surfactina depende da maturação das subunidades SrfAA, SrfAB, SrfAC, que acontece através da ativação de seus domínios de tiolação por uma 4-fosfopanteteil transferase codificada pelo gene *sfp* e, portanto, este gene é essencial para a síntese do biosurfactante. A sintetase SrfAD recicla domínios de tiolação malformados (JAHAN *et al.*, 2020; GEISSLER *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019; ZHI *et al.*, 2017).

Figura 1 – Biossíntese de surfactina por sintetases peptídicas não-ribossomais.

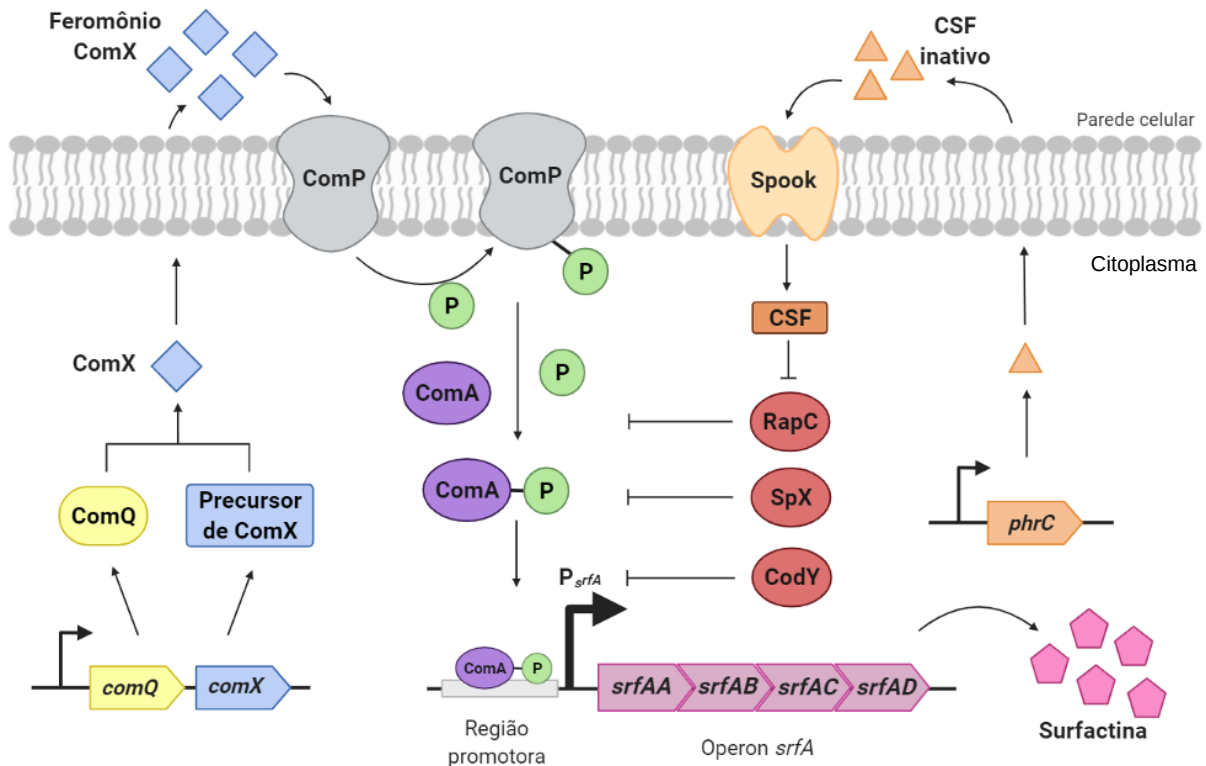


A biossíntese de surfactina é realizada pelas sintetases peptídicas não-ribossomais, SrfAA, SrfAB, SrfAC e SrfAD. As três primeiras sintetases formam um arranjo linear de sete módulos responsáveis pela ativação dos aminoácidos, elongação da cadeia peptídica e liberação do produto. Os módulos possuem cinco domínios: i. domínio de adenilação (A) responsáveis pela seleção e ativação de um aminoácido com consumo de ATP; ii. domínio transportador de peptidil ou tiolação (PCP), que faz o transporte do adenilato de aminoácido ao ligá-lo por uma ligação tioéster a um resíduo de serina no transportador; iii. domínio de condensação (C), que forma uma ligação peptídica entre os substitutos de aminoácil de dois módulos adjacentes; iv. domínio de epimerização (E), que converte o aminoácido L-Leucina em D-Leucina e é exclusivo dos módulos 3 e 6 das sintetases SrfAA e SrfAB; v. domínio tioesterase (TE), presente no último módulo e responsável pela clivagem da última ligação tioéster, levando a liberação e ciclização da molécula de surfactina. A biossíntese de surfactina é iniciada apenas após a ativação pós-traducional dos domínios PCP nas sintetases SrfAA, SrfAB e SrfAC. Esta ativação é realizada por uma 4-fosfopanteteinil transferase codificada pelo gene *sfp*. A subunidade SrfAD recicla os domínios PCP malformados. **Fonte:** Adaptado de Geissler *et al.* (2019) com [Biorender.com](https://www.biorender.com).

O operon *srfA* codifica essas sintetases peptídicas e sua expressão gênica é regulada pelo promotor P_{srfA} (Figura 2). O promotor, por sua vez, é ativado pela ligação da molécula

ComA fosforilada (ComA-P), proveniente do sistema de *quorum-sensing* ComQXPA de *Bacillus*, e sofre repressão de diversas moléculas como CodY (regulador transcricional dependente de GTP e aminoácidos de cadeia ramificada), Rap (aspartato fosfatases), PerR e SinI (reguladores transcricionais), Spx (proteína reguladora) e PhoP (regulador de resposta de dois componentes) (WU *et al.*, 2019; ZHI *et al.*, 2017).

Figura 2 – Regulação do operon *srfA* em *B. subtilis*.



O promotor P_{srfA} controla a expressão do operon *srfA*, que codifica as sintetases peptídicas não-ribossômicas (SrfAA a SrfAD) responsáveis pela biossíntese de surfactina. A regulação do promotor P_{srfA} está relacionada ao sistema de *quorum-sensing* ComQXPA de *Bacillus*. Setas e barras indicam regulação positiva e negativa, respectivamente. O feromônio ComX é sintetizado e então modificado pela isoprenil transferase ComQ para ser exportado. Durante a fim da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento bacteriano, a concentração de ComX atinge o limiar que é detectado pelo receptor de membrana ComP, o qual se autofosforila e ativa a resposta cognata da proteína reguladora ComA. A proteína ComA é fosforilada (ComA-P) e se liga a região promotora do P_{srfA} , ativando a expressão do operon *srfA*. As proteínas RapC, SpX e CodY são alguns dos repressores da atividade do promotor P_{srfA} : a proteína RapC desfosforila a molécula ComA-P, enquanto a proteína SpX bloqueia a interação da RNA polimerase com a proteína ComA e a região promotora; e a proteína CodY reprime diretamente a ativação do promotor P_{srfA} ao se ligar à região promotora. O peptídeo CSF, codificado pelo gene *phrC*, é exportado pelo meio extracelular em sua forma inativa, então é importado pela oligopeptídeo permease Spook, ativado e liga-se a proteínas da família Rap, bloqueando sua atividade de desfosforilação. Assim, o peptídeo CSF age indiretamente como um ativador do promotor P_{srfA} .
Fonte: Adaptado de Hu *et al.* (2019) com [Biorender.com](https://www.biorender.com/); informações de Hu *et al.* (2019), Wu *et al.* (2019) e Zhi *et al.* (2017).

A maioria das linhagens de *Bacillus* selvagens, isoladas e reportadas até o momento, alcançam níveis de produção de apenas 100 a 600 mg/L de surfactina (HU *et al.*, 2019). Foram realizados muitos trabalhos que empregaram estratégias tradicionais de mutagênese e reprodução ou otimização dos parâmetros de cultivo, porém, não levaram a resultados significativos de aumento de produtividade do tensoativo, o que mantém a produção em escala industrial inviável (HU *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2013; SHALIGRAM; SHINGAL, 2010; OHNO *et al.*, 2005).

O surgimento de novas técnicas de Engenharia Genética e Metabólica possibilitou diferentes abordagens para o problema da baixa produtividade das linhagens e três estratégias têm sido comumente aplicadas na tentativa de estabelecer linhagens geneticamente modificadas produtoras de níveis significativos de surfactina. A primeira estratégia consiste na substituição do promotor P_{srfA} do operon *srfA*. A segunda, baseia-se no estímulo do efluxo de surfactina pela superexpressão de proteínas auxiliares e transportadores de surfactina, como YerP. Por fim, a terceira, é modificar genes reguladores transcricionais do operon *srfA*, incluindo aqueles relacionados ao sistema de *quorum-sensing* da bactéria (HU *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019; JIAO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2015). Em pesquisas recentes, Jiao *et al.* (2016) e Wu *et al.* (2019) demonstraram que manipulações genéticas e métodos sistemáticos de engenharia metabólica foram capazes de elevar a produção de surfactina das linhagens *B. subtilis* THY-7 e *B. subtilis* 168 para 9,74 g/L e 12,8 g/L, respectivamente. As duas linhagens foram patenteadas (WU; XU, 2018; LIANG, 2018), e representam as publicações e patentes que descrevem as maiores produções e produtividades (aproximadamente 0,3 g/L·h) já registradas de surfactina.

Embora níveis melhorados de produção tenham sido alcançados com manipulação genética, ainda não existem processos industriais para produção de surfactina, tendo em vista que empresas do ramo de biosurfactantes, como Ecover (Bélgica), Jeneil Biotech (Estados Unidos), Evonik (Alemanha) e Biotensidon (Alemanha), focam na produção de soforolipídeos ou ramnolipídeos a partir de outras fontes microbianas (GLOBAL GLYCOLIPIDS BIOSURFACTANT MARKET, 2020). Em um estudo publicado em 2013, a levedura *Candida bombicola* produtora de soforolipídeos atingiu a produtividade de 3,7 g/L·h (GAO *et al.*, 2013) em um cultivo em reator de 10 L. Por outro lado, a produção de ramnolipídeos é feita principalmente pelo patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, cujos níveis máximos de produção atingiram 38 g/L e produtividade de 0,43 g/L·h em um reator de 30 L (MÜLLER *et al.*, 2011).

Portanto, estratégias alternativas de engenharia metabólica se fazem necessárias para o desenvolvimento de novas linhagens de *B. subtilis* para a produção industrial de surfactina, uma vez que, além de ser naturalmente produtora do biossurfactante de interesse, esta é uma das bactérias gram-positivas mais estudadas, é classificada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), e já é utilizada industrialmente para produção de biomoléculas como a riboflavina (SCHWECHHEIMER *et al.*, 2016). Além disso, os trabalhos previamente citados de Jiao *et al.* (2016) e Wu *et al.* (2019) utilizaram-se de técnicas tradicionais de biologia molecular para a manipulação gênica dos microrganismos, as quais envolvem várias etapas de clonagem e geram linhagens com múltiplas marcas de seleção e cicatrizes nos cromossomos.

Uma abordagem atual para esses problemas tradicionais de engenharia metabólica consiste na edição do cromossomo microbiano com o emprego do sistema CRISPR-Cas9 para alterar processos regulatórios celulares de modo a controlar a dose gênica, e assim, controlar o fluxo de carbono por determinadas vias biossintéticas (WESTBROOK *et al.*, 2018; WOOLSTON *et al.*, 2018).

1.3. Sistema CRISPR-Cas9

Em bactérias e arqueias, o sistema CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) e as proteínas associadas Cas (do inglês *CRISPR associated*) representam sua resposta imune adaptativa contra elementos genéticos móveis, em geral, vírus (fagos) e plasmídeos (MOHANRAJU *et al.*, 2016). Foi descoberto que este sistema de defesa procariótico é organizado no genoma como o denominado loco CRISPR-Cas, o qual consiste no arranjo CRISPR de repetições idênticas intercaladas com o DNA invasor (espaçador), que codificam os RNAs CRISPR (crRNAs), e um operon com os genes *cas*, responsável pela expressão das proteínas Cas (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

De maneira bastante simplificada, a resposta imune adaptativa de bactérias e arqueias ocorre em três estágios: (i) inserção de uma sequência curta do DNA invasor como uma sequência espaçadora no loco CRISPR; (ii) transcrição do precursor crRNA (pré-crRNA) que sofre maturação para gerar crRNAs individuais, cada um composto por uma porção de repetição e uma porção espaçadora com alvo no DNA invasor; e (iii) clivagem do DNA invasor por proteínas Cas, dirigidas por crRNA, em locais complementares à sequência espaçadora de crRNA (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Existe uma variedade de sistemas CRISPR-Cas já identificados e descritos na literatura (MOHANRAJU *et al.*, 2016). O sistema CRISPR-Cas9 é classificado como tipo II, o qual se destaca pela presença de uma grande endonuclease, a Cas9, além da RNase III, uma ribonuclease responsável pelo processamento do pré-crRNA, e do *trans-activating* crRNA (tracrRNA), um pequeno RNA codificado a montante do loco CRISPR-Cas tipo II responsável pela ativação e maturação do crRNA. A Cas9 possui dois domínios responsáveis pela clivagem dupla fita do DNA invasor, HNH e RuvC: o primeiro cliva a fita de DNA complementar à porção do espaçador no crRNA, enquanto o segundo cliva a fita de DNA oposta. É importante ressaltar que a clivagem do DNA-alvo só ocorre mediante ao pareamento do mesmo com o crRNA e à presença de uma sequência curta (PAM, do inglês *protospacer adjacent motif*) adjacente à sequência-alvo no DNA invasor (MOHANRAJU *et al.*, 2016; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Uma vez que o mecanismo de ação do sistema CRISPR-Cas9 foi elucidado, foi possível a sua adaptação como uma ferramenta de edição gênica. Isto se deu a partir da fusão das moléculas crRNA e tracrRNA, criando uma única molécula de RNA guia (*single guide RNA*, sgRNA ou gRNA). Os 20 nucleotídeos na extremidade 5' desta molécula (sequência-guia ou *spacer*) são responsáveis pelo reconhecimento do DNA-alvo através do pareamento de bases; já os aproximadamente 80 nucleotídeos na extremidade 3' da molécula de gRNA (sequência-universal ou *scaffold*) formam uma estrutura secundária na forma de grampo que interage com a Cas9. Assim, a edição gênica com técnica CRISPR-Cas9 tornou-se um sistema simples que necessita de apenas dois elementos exógenos: a nuclease Cas9 e a molécula de gRNA. Dado que a porção da sequência-universal do gRNA é padronizada de acordo com a Cas9 utilizada, o DNA-alvo da nuclease pode ser facilmente determinado ou alterado com a modificação da porção da sequência-guia do gRNA, desde que haja uma sequência PAM adjacente no DNA-alvo (VIEIRA *et al.*, 2016; DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Em células eucarióticas, o reparo da quebra na dupla-fita de DNA genômico após a ação da Cas9 pode ocorrer através de dois mecanismos: junção de extremidades não homólogas ou NHEJ (do inglês *Non-Homologous End Joining*) e reparo direcionado por homologia ou HDR (do inglês *Homology directed repair*). No mecanismo de NHEJ, as extremidades do DNA são unidas por eventos independentes de homologia, o que pode levar a introdução de mutações no DNA e frequentemente nocauteamento (*knock-out*) de genes. Já no mecanismo de HDR, na presença de uma outra molécula de DNA (DNA doador) que apresenta homologia com as extremidades geradas após a quebra da dupla-fita, o DNA

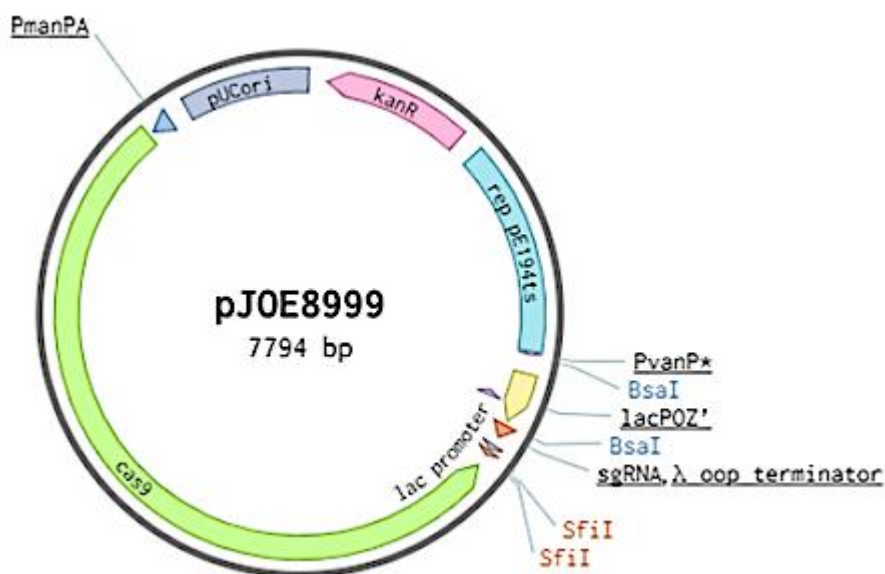
genômico será reparado por homologia. Isto, dependendo da molécula de DNA doador, pode resultar em inserção de uma sequência exógena no genoma (*knock-in*) ou substituição alélica (VIEIRA *et al.*, 2016).

No caso das células procarióticas, o reparo da quebra da dupla-fita de DNA ocorre quase exclusivamente pelo mecanismo de HDR. Desta forma, para a edição gênica pela técnica de CRISPR-Cas9, é necessário fornecer à célula, além da nuclease Cas9 e da molécula de gRNA, uma molécula de DNA doador. Do contrário, a quebra da dupla-fita do DNA genômico procariótico resultará em morte celular (TOYMENTSEVA; ALTENBUCHNER, 2019; ALTENBUCHNER, 2016).

A inativação de um ou ambos os domínios catalíticos da Cas9 origina, respectivamente, a Cas9 *nickase* (nCas9) ou a *dead* Cas9 (dCas9). A primeira cliva apenas uma das fitas do DNA-alvo, enquanto a segunda não possui atividade endonucleásica, mas mantém a capacidade de reconhecer sequências específicas no genoma alvo. A dCas9 tem sido amplamente aplicada na regulação da expressão gênica, ao ser associada a fatores de transcrição, permitindo tanto o aumento quanto a repressão da transcrição de um gene (técnica de CRISPR de interferência ou CRISPRi). Além disso, a dCas9 pode ser fusionada a outras proteínas, como GFP (do inglês *Green Fluorescent Protein*), para a marcação de regiões específicas do DNA genômico (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

A versatilidade da técnica de edição gênica CRISPR-Cas9 permite sua utilização em diversos organismos, como células de mamíferos (inclusive células humanas), células vegetais, fungos e bactérias. Recentemente, a técnica de CRISPR-Cas9 foi adaptada para uso em *B. subtilis*, sendo desenvolvidos três principais sistemas: sistema baseado em um único plasmídeo (ALTENBUCHNER, 2016), sistema baseado em dois plasmídeos (SO *et al.*, 2017) e sistema de manutenção cromossomal (WESTBROOK *et al.*, 2016). Neste projeto, será utilizado o plasmídeo desenvolvido por Altenbuchner (2016) (Figura 3).

Figura 3 – Plasmídeo pJOE8999 adaptado para a edição gênica com o sistema CRISPR-Cas9 em *B. subtilis*.



O plasmídeo pJOE8999 contém o gene *cas9* de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) sob controle do promotor induzível por manose P_{manP} ; o gene de resistência à canamicina (*kanR*); origem de replicação do pUC18 para *E. coli*; origem de replicação sensível a temperatura de pE194^{ts} para *B. subtilis*; a sequência-universal (*scaffold*) do gRNA (sgRNA) transcrito do promotor semissintético P_{vanP^*} e interrompido pelo fragmento *lacZα* (*lacPOZ'*) e o terminador *loop*. O plasmídeo possui também os sítios das enzimas de restrição *BsaI* e *SfiI* para a clonagem da sequência-guia (*spacer*) do gRNA e do DNA doador, respectivamente. **Fonte:** Adaptado de Altenbuchner (2016).

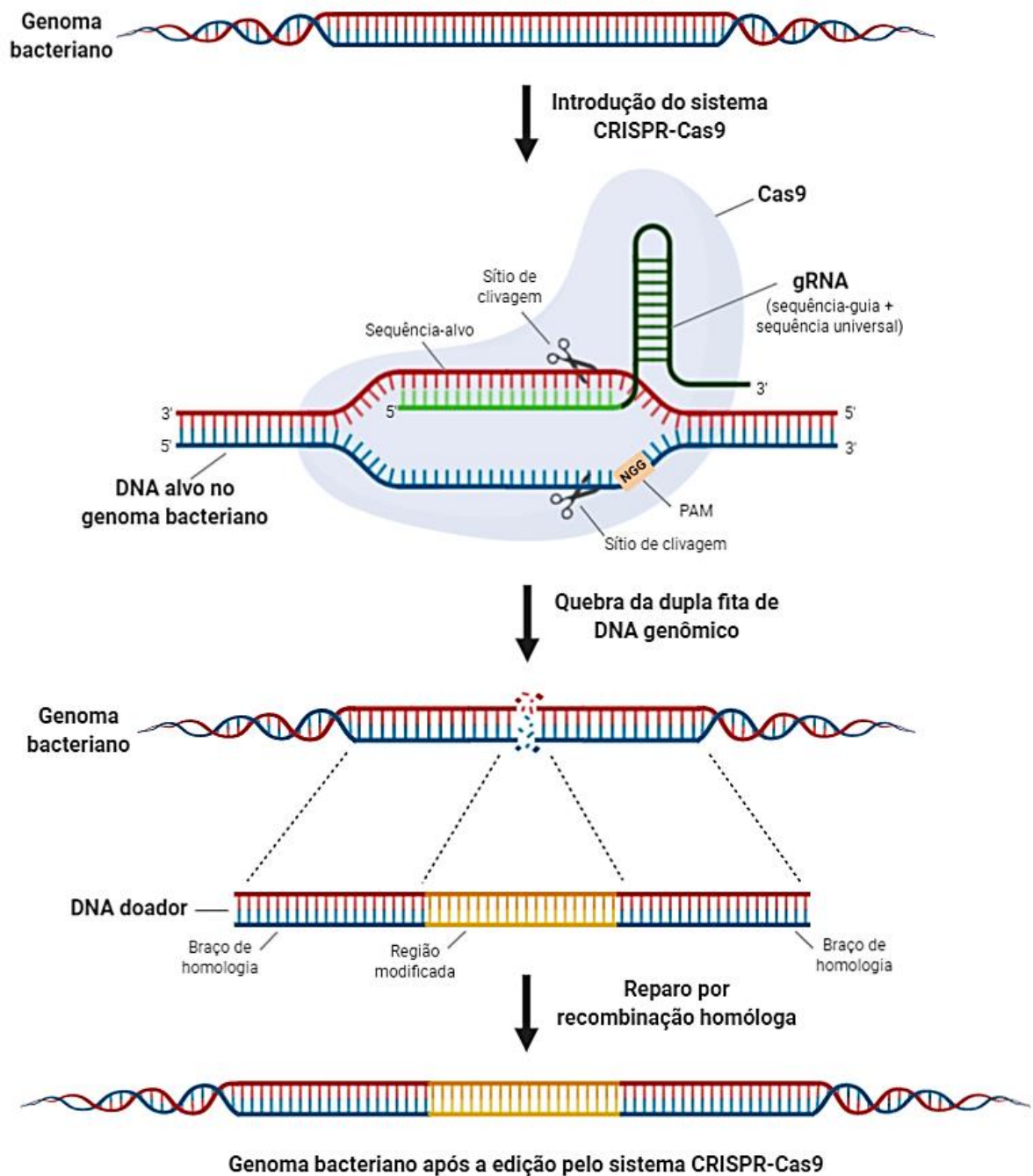
Em seu trabalho publicado, Altenbuchner (2016) comprovou a funcionalidade do plasmídeo pJOE8999 através da deleção de duas grandes sequências no genoma de *B. subtilis*: uma de 25,1 kb contendo o gene *amyE* e outra de 4,1 kb contendo os genes responsáveis pela biossíntese de um pigmento vermelho. Além disso, também utilizou o sistema CRISPR-Cas9 para o reparo da mutação no gene *trpC2* na linhagem de *B. subtilis* 168.

Desde então, o vetor desenvolvido por Altenbuchner (2016) foi utilizado em outros trabalhos: Watzlawick and Altenbuchner (2019) integraram várias cópias do gene *ganA* ao genoma da linhagem *B. subtilis* Reg19 para o aumento da produção de β -galactosidase; e Boumezbeur *et al.* (2020) aplicaram o sistema para engenharia metabólica da via de biossíntese de purinas na linhagem *B. subtilis* 168 para a produção de riboflavina. O plasmídeo pJOE8999 também serviu como base para criação de um “toolkit” para a edição gênica de fagos de *B. subtilis* (SCHILLING *et al.*, 2018), para a criação de vetores com diferentes reguladores da expressão do gene *cas9* (xilose e tetraciclina) e para comparar a efetividade das nucleases Cas9 e a Cas9n na edição gênica de *B. subtilis* Reg19, bem como

para comprovar a ausência do mecanismo de reparo de DNA por NHEJ em *B. subtilis* (TOYMENTSEVA; ALTENBUCHNER, 2019).

O uso do plasmídeo pJOE8999 neste projeto nos permitiu utilizar sistema CRISPR-Cas9 para realizar edições no genoma de três linhagens de *B. subtilis* de maneira rápida e precisa, com o intuito de criar uma linhagem base produtora de surfactina que, futuramente e após mais edições genômicas adequadas, poderá ser utilizada para produção em escala industrial do biossurfactante. A Figura 4 ilustra de maneira bastante simplificada o processo de edição genômica das linhagens após a transformação com este plasmídeo, tendo início na introdução do sistema CRISPR-Cas9 na célula e reconhecimento do DNA alvo, seguido pela clivagem da dupla fita de DNA pela Cas9 e, por fim, reparo desta quebra para incorporação da mutação de interesse no genoma bacteriano.

Figura 4 – Esquema simplificado da edição do DNA genômico bacteriano pelo sistema CRISPR-Cas9.



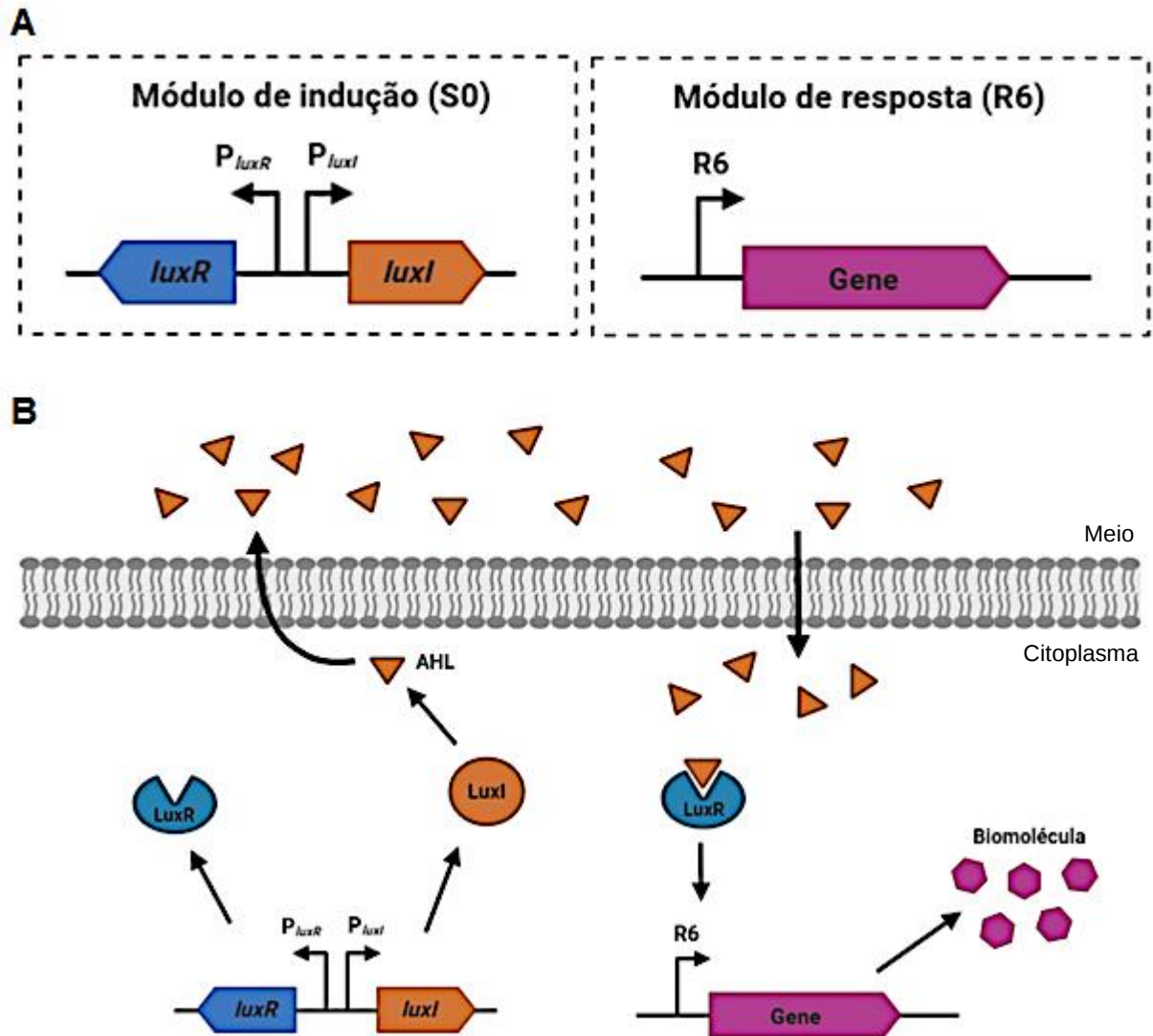
A edição gênica tem início com a transformação da bactéria com um plasmídeo contendo o gene da SpCas9 (Cas9 de *Streptococcus pyogenes*), o RNA-guia (gRNA) e o DNA doador. A Cas9 é uma endonuclease. O gRNA é composto pela sequência-guia (ou *spacer*; em verde claro) e a sequência universal (ou *scaffold*; em verde escuro). A primeira é uma sequência variável de aproximadamente 20 nucleotídeos, responsável pelo pareamento com o DNA-alvo; a segunda é uma sequência de aproximadamente 80 nucleotídeos necessária para a ativação da Cas9. A partir da expressão da Cas9 e transcrição do gRNA pela célula, ocorre o reconhecimento do DNA-alvo no genoma bacteriano e clivagem do mesmo pela Cas9. Para que a Cas9 clive o DNA-alvo é necessário que este apresente a sequência PAM (NGG, no caso da SpCas9) próxima a sequência-alvo que sofrerá pareamento com a sequência-guia do gRNA. A quebra da dupla fita de DNA é reparada através do mecanismo de recombinação homóloga, tendo como molde o DNA doador. O DNA doador possui dois braços de

homologia (400 a 1500 pares de base cada) que flanqueiam a região na qual está contida a modificação a ser inserida no genoma. Esta modificação pode ser a substituição, deleção ou adição de uma sequência de DNA. **Fonte:** A autora, criado com [Biorender.com](https://biorender.com) e baseado em informações de Doudna and Charpentier (2014), Vieira *et al.* (2016) e Altenbuchner (2016).

1.4. Sistema de sintético de autoindução da expressão gênica

O sistema sintético de autoindução da expressão gênica foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa SynBio (CORRÊA *et al.*, 2020) e consiste em dois módulos (Figura 5-A): o módulo de indução S0, proveniente do sistema *quorum-sensing* de *Aliivibrio fischeri*, que é composto do gene *luxR* sob controle do promotor P_{luxR} e do gene *luxI* sob controle do promotor P_{luxI} ; e o módulo de resposta, ou promotor sintético R6, que leva este nome, pois responde ao módulo de autoindução e pode controlar a expressão de diferentes genes ou operons. Este sistema é ortogonal e modular e, além disso, o promotor R6 mostrou-se 2,5 vezes mais forte que o promotor P_{srfA} no trabalho de Corrêa *et al.* (2020). A autoindução do sistema é ilustrada na Figura 5-B.

Figura 5 – Sistema sintético de autoindução da expressão gênica.



(A) Módulos de indução S0 e resposta R6 que equivalem ao sistema sintético de autoindução da expressão gênica de Corrêa *et al.* (2020). O primeiro corresponde aos genes *luxR* e *luxI* sob controle dos promotores P_{luxR} e P_{luxI} , respectivamente. O segundo é o promotor sintético R6 que responde ao módulo de indução e controla a expressão do gene de interesse. (B) O funcionamento do sistema tem início com a expressão das proteínas LuxR e LuxI. A proteína LuxI sintetiza uma pequena molécula sinalizadora, AHL, que permeia entre o meio intra- e extracelular com facilidade. Uma vez que a concentração extracelular de AHL atinge um limiar, dependente da concentração de células no meio, esta liga-se à proteína LuxR no citoplasma. Então o complexo LuxR-AHL ativa o módulo de resposta (o promotor R6) e a expressão do gene de interesse é iniciada. **Fonte:** Adaptado de Corrêa *et al.* (2020) com [Biorender.com](https://www.biorender.com).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Manipulação da via metabólica relacionada à produção de surfactina em *Bacillus subtilis*, com emprego do sistema de edição gênica CRISPR-Cas9. As alterações cromossômicas realizadas deverão criar uma linhagem de *B. subtilis* cuja produção de surfactina será controlada por um sistema sintético de autoindução da expressão gênica.

2.2. Objetivos específicos

- Introduzir e testar o sistema de edição gênica CRISPR-Cas9 em *B. subtilis*;
- Restaurar a funcionalidade do gene *sfp* nas linhagens de *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$;
- Construir uma linhagem de *B. subtilis* produtora de surfactina;
- Introduzir o sistema sintético de autoindução da expressão gênica (módulo de indução S0 e módulo de resposta R6) nas linhagens produtoras em duas configurações: a montante do promotor P_{srfA} e substituindo o promotor P_{srfA} na regulação do operon *srfA*;
- Substituir o promotor P_{srfA} pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2 na regulação do operon *srfA* nas linhagens produtoras;
- Comparar as modificações realizadas na regulação do operon *srfA* com base na produção de surfactina pelas novas linhagens.

3. METODOLOGIA

3.1. Edições genômicas

Este subtópico detalha as edições genômicas realizadas com auxílio do sistema CRISPR-Cas9, as quais foram divididas de acordo com os genes que estão relacionadas. Desta forma, temos a modificação 1 que trata da restauração da funcionalidade do gene *sfp* e a modificação 2 que engloba três diferentes modificações, 2a, 2b e 2c, todas relacionadas à regulação do operon *srfA*.

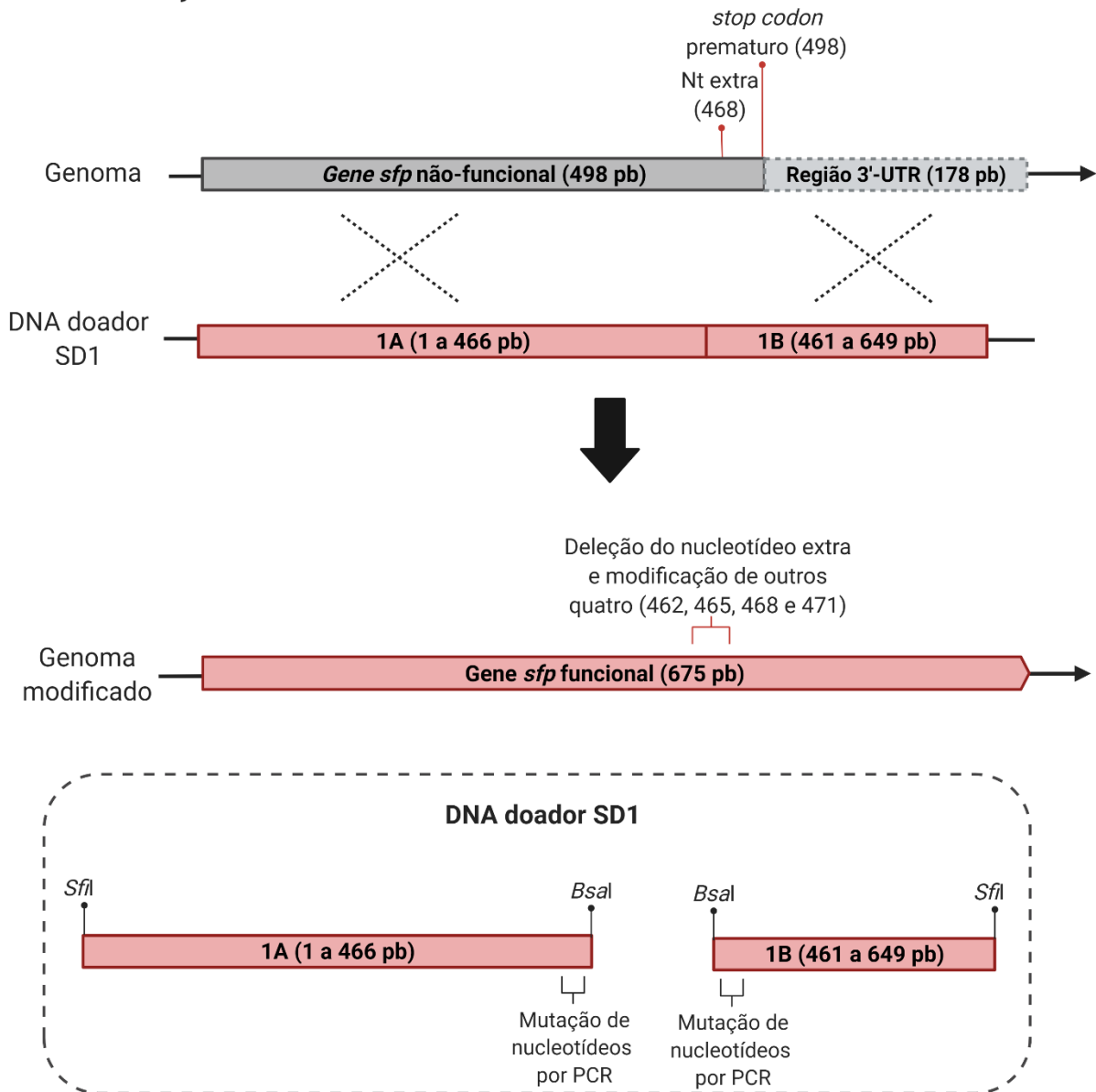
3.1.1. Modificação 1

A modificação 1 consiste na substituição do gene *sfp* com um sítio de terminação da transcrição (*stop codon*) prematuro do genoma das linhagens de *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$ pelo gene *sfp* com a deleção do nucleotídeo extra (uma adenina) na posição 468 (em pares de base, pb) e modificação de outros quatro nucleotídeos. O intuito desta modificação foi restaurar a funcionalidade do gene que expressa uma 4-fosfopanteteil transferase envolvida na biossíntese de surfactina e, com isso, possibilitar a produção deste biossurfactante pelas linhagens. A Figura 6 ilustra a modificação 1 simplificada.

Para realizar esta modificação, o gene *sfp* com *stop codon* prematuro foi escolhido como DNA-alvo da Cas9 e utilizado no desenho da sequência-guia SG1 do gRNA. A sequência de DNA doador SD1 consiste no gene *sfp* sem o nucleotídeo extra e foram modificados também outros quatro nucleotídeos na sequência-alvo do gene e na PAM. O DNA doador SD1 foi construído em duas partes: a parte 1A corresponde aos nucleotídeos 1 a 466 do gene, e a parte 1B corresponde aos nucleotídeos 461 a 649. As alterações de nucleotídeos citadas foram realizadas por mutação durante a amplificação por PCR das partes 1A e 1B com o DNA genômico de *B. subtilis* $\Delta 6$ como molde.

Figura 6 – Esquema simplificado da modificação 1 realizada nas linhagens *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$ para restaurar a funcionalidade do gene *sfp*.

Modificação 1



A porção superior da figura ilustra o DNA genômico das linhagens com o gene *sfp* com *stop codon* prematuro e não-funcional. Após a clivagem do DNA-alvo pela Cas9, o gene não-funcional sofreu recombinação homóloga (simbolizada pelas figuras pontilhadas em X) com o DNA doador SD1. Esta modificação visa restaurar a funcionalidade do gene *sfp*, ilustrado no centro da figura, a partir da deleção do nucleotídeo extra na posição 468 pb; também foram alterados outros quatro nucleotídeos na sequência-alvo e PAM do gene (posições 462, 465, 468 e 471 pb) de forma a evitar outro reconhecimento pela Cas9. Estas alterações foram realizadas por mutação durante a amplificação por PCR do DNA doador. A porção inferior da figura ilustra a molécula de DNA doador SD1 construída em duas partes: 1A e 1B. A parte 1A corresponde aos pares de base 1 a 466 do gene *sfp* funcional, enquanto a parte 1B corresponde aos pares de base 461 a 649. As duas partes possuem sítios de restrição das enzimas *SfiI* e *BsaI*, que serão utilizados durante a etapa de clonagem no plasmídeo pJOE8999. Os seis nucleotídeos em comum no final da parte 1A e início da parte 1B (nas posições 461 a 466 pb) funcionarão como extremidades coesivas complementares que serão ligadas após a

digestão das duas partes com a enzima *Bsa*I. Há um sítio de restrição da enzima *Bsa*I na posição 651 pb no gene *sfp*, então para não atrapalhar a etapa de clonagem do DNA doador SD1 no plasmídeo pJOE8999, os últimos 24 pares de base do gene não foram incluídos na parte 1B. **Fonte:** A autora, criado com [Biorender.com](https://biorender.com).

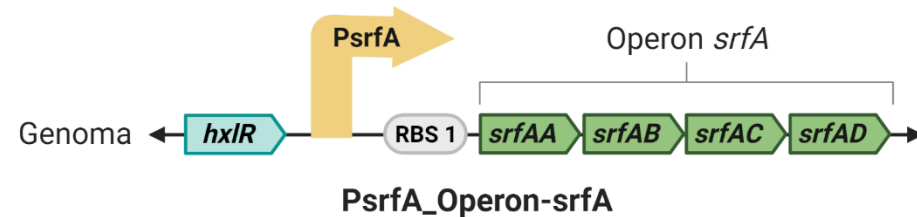
3.1.2. Modificação 2

A modificação 2 engloba três modificações diferentes, 2a, 2b e 2c, que têm como objetivo alterar a regulação da expressão gênica do operon *srfA*, responsável pela biossíntese de surfactina. Estas três modificações, ilustradas na Figura 7, estão sendo realizadas paralelamente nas linhagens 434 e 449. A produção de surfactina foi avaliada após cada modificação e aquela que levar a maiores níveis de produção será mantida para projetos futuros.

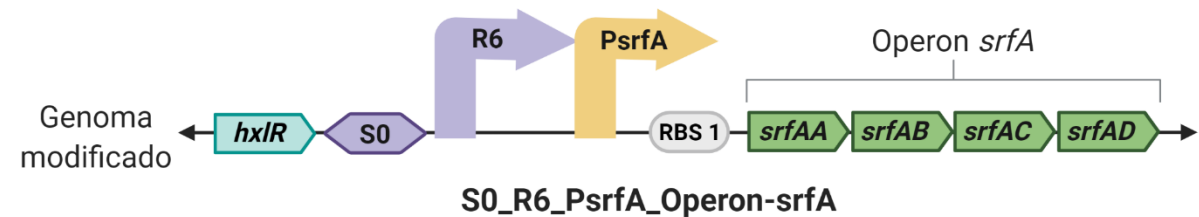
As três modificações utilizam o mesmo alvo para ação da Cas9 e, consequentemente, a mesma sequência-guia do gRNA, a SG2. Para o desenho desta, o DNA-alvo foi a sequência expandida do promotor P_{srfA} , presente no genoma das linhagens 168, KO7 e $\Delta 6$ entre os genes *hxlR* e *srfAA*. A diferença das modificações está nas sequências de DNA doador utilizadas, apresentadas na Figura 8.

Figura 7 – Esquema simplificado para comparar a regulação do operon *srfA* no genoma de *B. subtilis* sem edição gênica e com as modificações 2a, 2b e 2c.

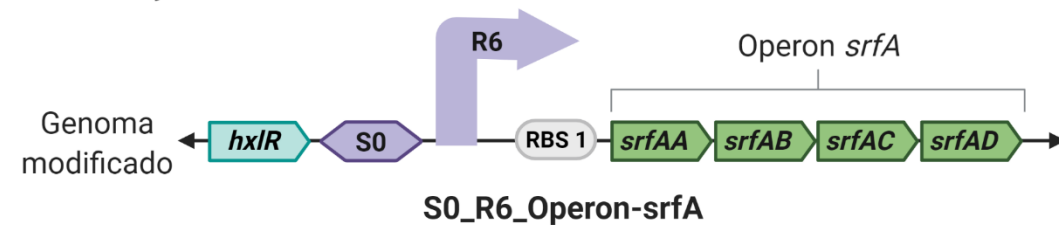
Sem modificação



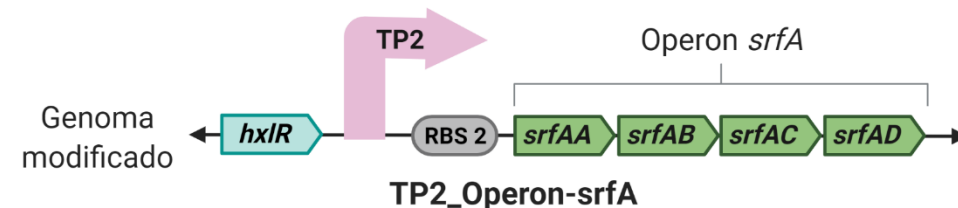
Modificação 2a



Modificação 2b



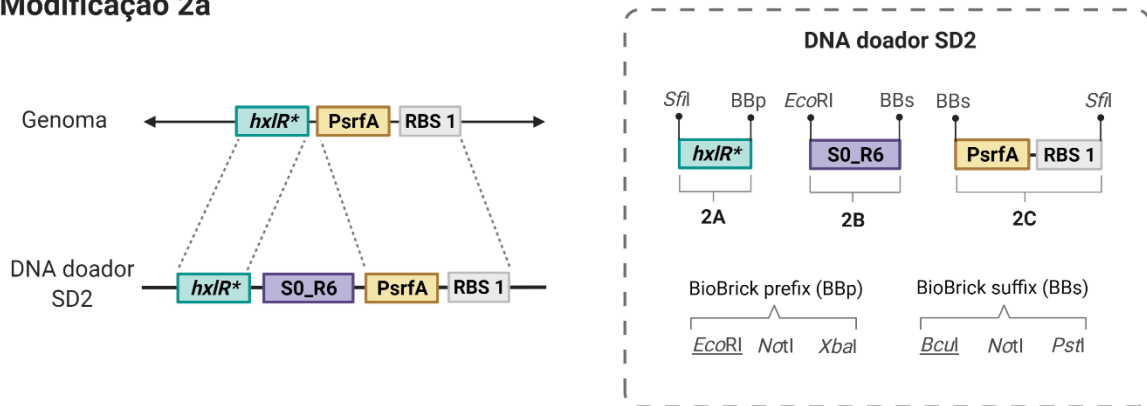
Modificação 2c



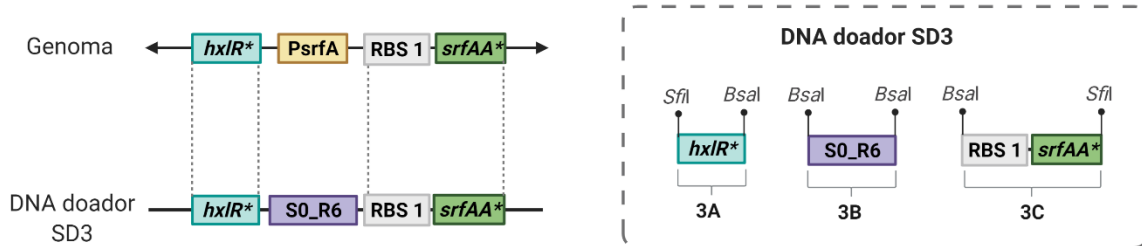
Nas linhagens de *B. subtilis* sem modificação genômica, o operon *srfA* (genes *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* e *srfAD*) da biossíntese de surfactina é regulado pelo promotor P_{srfA} . Na modificação 2a, o sistema sintético de autoindução da expressão gênica desenvolvido por Corrêa *et al.* (2020) será inserido a montante do promotor P_{srfA} . Este sistema sintético é caracterizado pelo módulo de indução (sequência S0) e pelo módulo de resposta (promotor R6). Na modificação 2b, o promotor P_{srfA} será substituído pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica de Corrêa *et al.* (2020). Na modificação 2c, o promotor P_{srfA} será substituído pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2 de Liu *et al.* (2018). O gene *hxlR* localizado anteriormente ao operon *srfA* não sofrerá alterações em nenhuma das modificações. São ilustrados também os sítios de ligação do ribossomo, RBS1 e RBS 2, presentes nas construções **Fonte:** A autora, criado com [Biorender.com](https://www.biorender.com).

Figura 8 – Esquema simplificado das modificações propostas 2a, 2b e 2c, comparando as sequências de DNA doador.

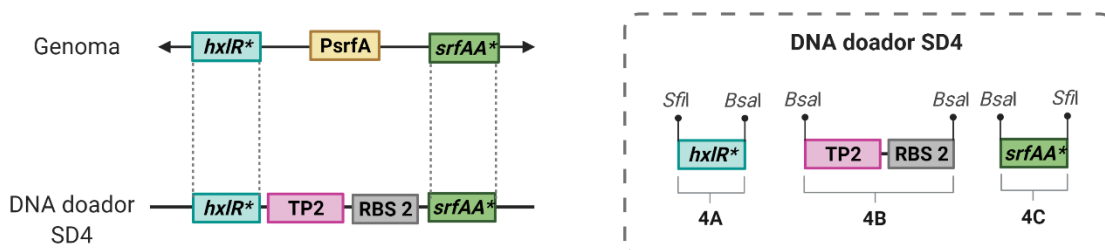
Modificação 2a



Modificação 2b



Modificação 2c



*hxlR** e *srfAA** são sequências parciais dos genes *hxlR* e *srfAA*, respectivamente; *P_{srfA}* e TP2 são promotores; S0_R6 são as sequências dos módulos de indução e resposta do sistema sintético de autoindução da expressão gênica; RBS 1 e RBS 2 são sítios de ligação do ribossomo. A sequência de DNA doador SD2 é composta das partes 2A (*hxlR**), 2B (S0_R6) e 2C (*P_{srfA}*-RBS 1); o DNA doador SD3 é composto das partes 3A (*hxlR**), 3B (S0_R6) e 3C (RBS 1-*srfAA**); e o DNA doador SD4 é composto das partes 4A (*hxlR**), 4B (TP2-RBS 2) e 4C (*srfAA**). É ilustrado também as enzimas de restrição utilizadas na construção das sequências de DNA doador, sendo elas: *SfiI*, *EcoRI*, *BclI* e *BsaI*. Os BioBricks prefix e suffix são partes biológicas pré-determinadas compostas, respectivamente, dos sítios das enzimas de restrição *EcoRI*-*NotI*-*XbaI* e *BclI*(*SpeI*)-*NotI*-*PstI*. **Fonte:** A autora, criado com Biorender.com.

A modificação 2a refere-se à adição da sequência S0 e o promotor R6, que correspondem ao sistema sintético de autoindução da expressão gênica (CORRÊA *et al.*,

2020) a montante do promotor P_{srfA} que controla a expressão do operon *srfA* no genoma das linhagens de *B. subtilis*. A sequência de DNA doador SD2 (Figura 8) foi composta de três partes: sequência parcial do gene *hxlR* (parte 2A); sequência S0_R6 (parte 2B) e promotor P_{srfA} e do sítio de ligação do ribossomo RBS 1, que é natural desta região do genoma (parte 2C).

Na modificação 2b, o promotor P_{srfA} foi substituído pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica, a sequência S0 e o promotor R6. A sequência de DNA doador SD3 (Figura 8) foi composta de três partes: sequência parcial do gene *hxlR* (parte 3A); sequência S0_R6 (parte 3B) e o RBS 1 e sequência parcial do gene *srfAA* (parte 3C).

Já na modificação 2c, o promotor P_{srfA} foi substituído pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2 desenvolvido por Liu *et al.* (2018), assim como o sítio de ligação do ribossomo RBS 2. A sequência de DNA doador SD4 (Figura 8) foi composta de três partes: sequência parcial do gene *hxlR* (parte 4A); o promotor TP2 e o RBS 2 (parte 4B) e sequência parcial do gene *srfAA* (parte 4C).

3.2. Linhagens, plasmídeos, sequências e oligonucleotídeos utilizados

As linhagens de *Escherichia coli* foram utilizadas durante a construção e clonagem dos plasmídeos, enquanto as linhagens de *B. subtilis* foram utilizadas para a edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9 e produção de surfactina. A Tabela 1 detalha as linhagens utilizadas.

Tabela 1 – Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

Linhagem	Características	Fonte ou referências
<i>E. coli</i> JM109	Células quimicamente competentes. recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺), mcrA, supE44, gyrA96, relA1, λ ⁻ , Δ(lac-proAB), F'(traD36, proAB + , lacI ^q , (ΔlacZ)M15)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
<i>E. coli</i> TOP10	Células quimicamente competentes. mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Phi80lacZ(del)M15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(SmR), endA1, nupG	Invitrogen
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Tipo selvagem. Produz surfactina.	BGSCID 3A22
<i>B. subtilis</i> 168	Derivada de <i>B. subtilis</i> Marburg. Auxotrófica para triptofano. Não produz surfactina. trpC2	BGSCID 1A1
<i>B. subtilis</i> KO7	Derivada de <i>B. subtilis</i> PY79. Livre de proteases extracelulares. Não produz surfactina. ΔnprE, ΔaprE, Δepr, Δmpr, ΔnprB, Δvpr, Δbpr	BGSCID 1A1133
<i>B. subtilis</i> Δ6	Derivada de <i>B. subtilis</i> 168, com redução de 7,7% no genoma. Não produz surfactina. Cm, trpC2, Δskin, ICEBs1(0), Δprophage1, Δprophage3, ΔSPbeta, ΔPBSX, pks::Cm	BGSID 1A1299
<i>B. subtilis</i> 413	Derivada de <i>B. subtilis</i> 168. Substituição do gene <i>sfp</i> utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 434	Derivada de <i>B. subtilis</i> KO7. Substituição do gene <i>sfp</i> utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 449	Derivada de <i>B. subtilis</i> Δ6. Substituição do gene <i>sfp</i> utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 434-2a	Derivada de <i>B. subtilis</i> 434. Inserção do sistema sintético de autoindução da expressão gênica (S0_R6) a montante do promotor P _{srfA} na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 449-2a	Derivada de <i>B. subtilis</i> 449. Inserção do sistema sintético de autoindução da expressão gênica (S0_R6) a montante do promotor P _{srfA} na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 434-2b	Derivada de <i>B. subtilis</i> 434. Substituição do promotor P _{srfA} pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica (S0_R6) na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 449-2b	Derivada de <i>B. subtilis</i> 449. Substituição do promotor P _{srfA} pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica (S0_R6) na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 434-2c	Derivada de <i>B. subtilis</i> 434. Substituição do promotor P _{srfA} pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2 na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo
<i>B. subtilis</i> 449-2c	Derivada de <i>B. subtilis</i> 449. Substituição do promotor P _{srfA} pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2 na regulação do operon <i>srfA</i> , utilizando o sistema CRISPR-Cas9. Produz de surfactina.	Este estudo

Fonte: A autora.

Durante as etapas de clonagem e transformação, tanto as linhagens de *E. coli* quanto as linhagens de *B. subtilis* foram cultivadas em meio Lysogeny Broth (LB), com adição de ágar

(16,0 g/L) e canamicina (concentração final de 50,0 µg/mL para *E. coli* e 5,0 µg/mL para *B. subtilis*), quando necessário. Para as etapas de produção de surfactina, as linhagens de *B. subtilis* foram cultivadas em meio complexo rico em açúcar (meio PW) composto por: 60,0 g/L glicose, 1,0 g/L extrato de levedura, 25,0 g/L NaNO₃, 0,333 g/L KH₂PO₄, 1,0 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0,15 g/L MgSO₄·7H₂O, 7,5 mg/L CaCl₂, 6,0 mg/L MnSO₄·H₂O e 6,0 mg/L FeSO₄·7H₂O, pH 7,0 (YANG *et al.*, 2015).

O plasmídeo pJOE8999 foi adaptado para utilização do sistema CRISPR-Cas9 em *B. subtilis* por Altenbuchner (2016) e doado cordialmente pelo autor. A Tabela 2 descreve os plasmídeos construídos para este estudo a partir do plasmídeo pJOE8999, as sequências-guias do gRNA e as sequências de DNA doador. Os oligonucleotídeos utilizados no estudo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 2 – Plasmídeos, sequências-guias do gRNA e sequências de DNA doador utilizados neste estudo.

Plasmídeo, sequência-guia ou DNA doador	Características	Fonte ou referências
pJOE8999	Plasmídeo base.	Altenbuchner (2016)
pJOE8999(SG1)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG1 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> .	Este estudo
pJOE8999(SG2)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG2 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> .	Este estudo
pJOE8999(SG1+SD1)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG1 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> e sequência de DNA doador SD1 clonada entre os sítios da enzima de restrição <i>SfiI</i> .	Este estudo
pJOE8999(SG2+SD2)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG2 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> e sequência de DNA doador SD2 clonada entre os sítios da enzima de restrição <i>SfiI</i> .	Este estudo
pJOE8999(SG2+SD3)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG2 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> e sequência de DNA doador SD3 clonada entre os sítios da enzima de restrição <i>SfiI</i> .	Este estudo
pJOE8999(SG2+SD4)	Derivado do plasmídeo pJOE8999. Sequência-guia SG2 clonada entre os sítios de restrição da enzima <i>BsaI</i> e sequência de DNA doador SD4 clonada entre os sítios da enzima de restrição <i>SfiI</i> .	Este estudo
SG1	Sequência-guia do gRNA com alvo no gene <i>sfp</i> com <i>stop codon</i> prematuro no genoma de <i>B. subtilis</i> 168, KO7 e $\Delta 6$.	Este estudo
SG2	Sequência-guia do gRNA com alvo na região do promotor P_{srfA} que regula o operon <i>srfA</i> em <i>B. subtilis</i> .	Este estudo
SD1	Sequência de DNA doador composta pelos primeiros 649 pb do gene <i>sfp</i> de <i>B. subtilis</i> 168, com a remoção do nucleotídeo extra (uma adenina na posição 468 pb) e alteração dos nucleotídeos nas posições 462 (C por T), 465 (A por G), 469 (G por A) e 471 pb (A por G).	Este estudo
SD2	Sequência de DNA doador composta pelos últimos 298 pb do gene <i>hxlR</i> , os 102 pb seguintes no genoma da região regulatória; a sequência S0; o promotor R6; e a sequência expandida do promotor P_{srfA} com alteração do nucleotídeo na posição 119 pb (G por C).	Este estudo
SD3	Sequência de DNA doador composta pelos últimos 298 pb do gene <i>hxlR</i> , os 102 pb seguintes no genoma da região regulatória; a sequência S0; o promotor R6; e os primeiros 400 pb do gene <i>srfAA</i> do operon <i>srfA</i> .	Este estudo; Corrêa <i>et al.</i> (2020)
SD4	Sequência de DNA doador composta pelos últimos 298 pb do gene <i>hxlR</i> , os 102 pb seguintes no genoma da região regulatória; a sequência do promotor TP2; e os primeiros 400 pb do gene <i>srfAA</i> do operon <i>srfA</i> .	Este estudo; Liu <i>et al.</i> (2018)

Fonte: A autora.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Nome	ID	Sequência	Função
SG1_fw	#299	TACGAAAGCTTTATCAAACAAGGA	Anelamento de oligonucleotídeos
SG1_rv	#300	AAACTCCTTGTTTGATAAAGCTTT	
SG2_fw	#462	TACGAAAGATTGAACGCAGCAGTT	
SG2_rv	#463	AAACAAC TGCTGCGTTCAATCTTT	
TP2(4B)_fw	#563	TAAATCTCAAAAAGGTGTTGACATTCAAAACAAAATATGG TATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACCTA ACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAAGAAGGAGATA	
TP2(4B)_rv	#564	TGTATATCTCCTTCTTTTCTATTATACCAGATCTGAGTTAA GTTGTCAACACTTTTTTGCGATTTTGGGGGCATTATACCATA TTTTGTTTTGAATGTCAACACCTTTTTGAGA	
1A_fw	#301	AAGGCCAACGAGGCCATGAAGATTTACGGAATTTATATGG	Oligonucleotídeos para amplificação de sequências por PCR.
1A_rv	#302	TCTGGGTCTCGCTTAATAAAGCTTCTTTTCATTGACCATAG	
1B_fw	#303	TCTGGGTCTCTTAAGCAAGAGGGCAAAGGCTTATCGCTTC	
1B_rv	#356	AAGGCCTTATTGGCCTTGTGATATCCTCGGGGAAATC	
2A-3A-4A_fw	#464	AAGGCCAACGAGGCCTAAATGGAAAATGCTCATTTTATGG CATTTAG	
2A_rv	#492	TCGACTCTAGAAGCGGCCGGAATTCTCTTTTTTTATGCTG AATGCAATTTACAATC	
2B_fw	#17	GCTAGAATTCTTAACTTTTAAAGTATGGGCAATC	
2B_rv	#124	CGGACTGCAGCGCCGCTACTAG	
2C_fw	#493	GCTATACTAGTAGCGGCCGCTGCAGTTGAACGCAGCAGTTT CGTTTAAAAATTTTATTTTCTGTAAATAATGTTTAGTGG	
2C_rv	#469	AAGGCCTTATTGGCCATTGTCATACCTCCCCTAATCTTTATA AGCAG	
3A_rv	#535	TCTGGGTCTCTCTTTTTTTTATTGCTGAATGCAATTTACAATC	
3B_fw	#536	TCTGGGTCTCAAAAGAAACTTTTAAAGTATGGGCAATCAAT TGCTC	
3B_rv	#537	TCTGGGTCTCCCTAATACTACATTTATTATACAACAAACCA TTTTCTTGCG	
3C_fw	#538	TCTGGGTCTCATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAAATAA C	
4A_rv	#533	TCTGGGTCTCATTTAATCTTTTTTTATTGCTGAATGCAATTT ACAATC	
4C_fw	#534	TCTGGGTCTCATACATATGGAAATAACTTTTTACCCTTTAAC GGATG	
3C-4C_rv	#539	AAGGCCTTATTGGCCACCACACTTCATTTTCCTTTATGGTGA AC	
pJOE8999.seq- fw	#357	AACCATCACTGTACCTCCCAAC	Oligonucleotídeos de sequenciamento do plasmídeo pJOE8999
pJOE8999.seq- rv	#358	GAGACAAACCAATACGTGAACAAG	

O número de identificação dos oligonucleotídeos (ID) refere-se a sua identificação na coleção de oligonucleotídeos do grupo de pesquisa SynBio. **Fonte:** A autora.

3.3. Etapas comuns

3.3.1. Desenho e obtenção do RNA-guia (gRNA)

O desenho das sequências-guias dos gRNAs foi feito utilizando ferramentas de análise das plataformas online IDT (https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM) e CRISPR RGEN Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>), onde foram inseridas as sequências de DNA-alvo e obtidas possíveis sequências-guias para os gRNAs. A escolha das sequências-guias a serem utilizadas foi baseada na pontuação fornecida, porcentagem de guanina e citosina, ausência de sequência de terminação da transcrição e presença da PAM característica da SpCas9 (“NGG”).

A partir da escolha de uma sequência-guia de 20 nucleotídeos, esta foi utilizada para o desenho de oligonucleotídeos complementares, com acréscimo dos nucleotídeos “TACG” e “AAAC” na extremidade 5’ das fitas direta e reversa, respectivamente. Os quatro nucleotídeos acrescentados em cada fita são complementares às extremidades coesivas resultantes no plasmídeo pJOE8999 após sua digestão com a enzima de restrição *BsaI*, onde a sequência-guia foi inserida a montante da sequência-universal do gRNA já presente no plasmídeo. Os oligonucleotídeos foram adquiridos da empresa Exxtend.

Os oligonucleotídeos referentes às sequências-guias dos gRNAs foram anelados para formar uma sequência dupla-fita conforme o protocolo: em um microtubo, foram acrescentados 10 µL oligonucleotídeo fita direta (100µM), 10 µL oligonucleotídeo fita reversa (100µM) e 80 µL Tampão TE; a mistura foi incubada em um termobloco a 100°C por 10 minutos; aguardou-se até a temperatura baixar a 40°C. Por fim, o microtubo foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e o DNA presente na amostra foi quantificado no leitor de placas Tecan Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland).

3.3.2. Desenho e obtenção do DNA doador

As sequências de DNA doador são responsáveis pelo reparo da dupla fita de DNA do genoma bacteriano pelo mecanismo de recombinação homóloga. Neste estudo, as sequências foram construídas em partes: o centro da sequência possuía a nova porção que seria inserida no genoma bacteriano, e duas sequências flanqueadoras de 200 a 500 pares de base que atuam como “braços de homologia” durante a recombinação homóloga. Como a maioria das partes

das sequências de DNA doador foi obtida através de amplificação por PCR do DNA genômico de *B. subtilis* ou do plasmídeo pBS3Clux_luxRI_Plux3.2, foi necessário apenas o desenho dos oligonucleotídeos (já apresentados na Tabela 3) utilizados nestas reações de PCR, os quais continham também sítios de enzimas de restrição *BsaI* e/ou *SfiI*. A exceção foi a parte 4B que consiste no promotor duplo sintético constitutivo TP2 de Liu *et al.* (2018), já que esta sequência precisou ser comprada como um par de oligonucleotídeos.

A Tabela 4 detalha o DNA molde, oligonucleotídeos e enzima DNA polimerase utilizados nas reações de PCR, as quais foram montadas de acordo com o protocolo do fornecedor das enzimas DNA polimerases Time Hifi (ECRA biotec) ou Phusion High-fidelity (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 4 – Detalhes das reações de PCR realizadas.

DNA doador	Parte	DNA molde	Oligonucleotídeos	Enzima	TM (°C)
SD1	1A (491 pb)	gDNA linhagem Δ6	1A_fw e 1A_rv	Time	52
	1B (214 pb)	gDNA linhagem Δ6	1B_fw e 1B_rv	Time	52
SD2	2A (441 pb)	gDNA linhagem Δ6	2A-3A-4A_fw e 2A_rv	Time	58
	2B (1796 pb)	pBS3Clux_luxRI_Plux3.2	2B_fw e 2B_rv	Time	55
	2C* (511 pb)	gDNA linhagem Δ6	2C_fw e 2C_rv	Time	58
SD3	3A (425 pb)	gDNA linhagem 168	2A-3A-4A_fw e 3A_rv	Time	58
	3B (1793 pb)	pBS3Clux_luxRI_Plux3.2	3B_fw e 3B_rv	Phusion	72
	3C (445 pb)	gDNA linhagem 168	3C_fw e 3C-4C_rv	Time	58
SD4	4A (431 pb)	gDNA linhagem 168	2A-3A-4A_fw e 4A_rv	Time	58
	4C (431 pb)	gDNA linhagem 168	4C_fw e 3C-4C_rv	Time	58

O tamanho das sequências em pb leva em conta os sítios de enzimas de restrição adicionados após a PCR. *A parte 2C passou por mutação de nucleotídeos durante a reação de amplificação por PCR, o oligonucleotídeo 2C_fw foi desenhado especificamente para isto. Enzimas DNA polimerases Time Hifi (ECRA biotec) e Phusion High-fidelity (Thermo Fisher Scientific). TM é a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. **Fonte:** A autora.

Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o kit GENECLAN® Turbo Kit (MP Biomedicals), seguindo as especificações do fornecedor. No caso das partes 2B e 3B, que apresentaram bandas inespecíficas, o mesmo kit também foi utilizado para purificar a banda correspondente ao produto de PCR de interesse do gel de agarose 1% (m/v) após a eletroforese. O DNA foi quantificado após a purificação.

A parte 4B (141 pb), referente ao promotor TP2, foi obtida através do anelamento dos oligonucleotídeos TP2(4B)_fw e TP2(4B)_rv, seguindo o mesmo protocolo de anelamento das sequências-guias do gRNA. Estes oligonucleotídeos foram desenhados para

que, após o anelamento, ficassem com extremidades coesivas complementares às partes 4A e 4C digeridas com a enzima *BsaI*.

3.3.3. Construção dos plasmídeos e clonagem em *E. coli*

A primeira etapa da construção dos plasmídeos consistiu na inserção da sequência-guia do gRNA. Para isto, cerca de 1500 ng do plasmídeo pJOE8999 foram digeridos com a enzima de restrição *BsaI*-HFv2 (New England Biolabs Inc.), seguindo as especificações da reação descritas pelo fornecedor. A reação foi incubada em banho termostatzado a 37°C por 2 a 4 horas. Então a reação foi incubada em termobloco a 80°C por 20 minutos para inativação térmica da enzima de restrição.

Como a sequência-guia apresenta extremidades coesivas complementares ao plasmídeo digerido, seguiu-se para a reação de ligação, na qual foram adicionados 20 ng de plasmídeo pJOE8999 digerido e a sequência-guia na proporção 1:150 (plasmídeo:inserto). Utilizou-se a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) e o volume final da reação foi 10 µL, seguindo as demais especificações do fornecedor. A reação foi incubada a 22°C por 2 horas. A reação controle foi preparada com todos os reagentes da reação de ligação, com exceção da sequência-guia (inserto).

Ambas as reações, ligação e controle, foram transformadas por choque-térmico em *E. coli* TOP10 quimicamente competente seguindo o protocolo usual (Anexo B-b). As transformações foram plaqueadas em meio LB-ágar acrescido de canamicina 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 12 a 18 horas. As colônias transformadas pela reação de ligação foram inoculadas em meio LB líquido acrescido de canamicina 50 µg/mL e incubadas a 37°C e 220 rpm por 12 a 18 horas. O plasmídeo foi extraído dos inóculos utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). A ligação do inserto ao plasmídeo foi confirmada por sequenciamento de DNA no equipamento sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando os reagentes do kit BigDye® Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) e seguindo o protocolo no Anexo B-f.

3.3.3.1. Construção dos plasmídeos pJOE8999(SG1+SD1), pJOE8999(SG2+SD2) e pJOE8999(SG2+SD3)

Assim que foi confirmado por sequenciamento a presença da sequência-guia no plasmídeo, 1500 ng do plasmídeo foram digeridas com a enzima *SfiI* (New England Biolabs Inc.), seguindo as especificações de reação do fornecedor, com incubação em banho termostático a 50°C por 2 a 4 horas. Posteriormente, foi realizada a eletroforese da reação de digestão em gel de agarose 1% (m/v). A banda referente ao plasmídeo digerido foi purificada do gel utilizando o kit GENECLAN® Turbo Kit (MP Biomedicals), para garantir que apenas plasmídeo digerido estivesse presente nas etapas seguintes.

As partes referentes ao DNA doador foram digeridas de acordo com os sítios das enzimas de restrição presentes em suas extremidades, seguindo os protocolos de digestão especificados pelos fornecedores. Os detalhes são apresentados na Tabela 5. No caso das digestões que utilizaram outra enzima juntamente com a enzima *SfiI*, esta última só foi adicionada após finalizado o período de incubação a 37°C para atividade da primeira enzima.

Tabela 5 – Detalhes das reações de digestão realizadas nas sequências de DNA doador.

DNA doador	Partes e quantidade de DNA	Enzimas utilizadas	Incubação	Procedimento final
SD1	1A (1500 ng)	<i>BsaI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 2 horas; 50°C por 2 horas	Purificação do DNA
	1B (1500 ng)	<i>BsaI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 2 horas; 50°C por 2 horas	
SD2	2A (1500 ng)	<i>EcoRI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 2 horas; 50°C por 2 horas	Purificação do DNA
	2B (1500 ng)	<i>BcuI</i> e <i>EcoRI</i>	37°C por 2 horas	
	2C (1500 ng)	<i>BcuI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 2 horas; 50°C por 2 horas	
SD3	3A (1500 ng)	<i>BsaI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 3 horas; 50°C por 2 horas	Purificação do DNA
	3B (1500 ng)	<i>BsaI</i>	37°C por 3 horas	Inativação térmica
	3C (1500 ng)	<i>BsaI</i> e <i>SfiI</i>	37°C por 3 horas; 50°C por 2 horas	Purificação do DNA

Enzimas *BsaI* (HFv2) e *SfiI* da empresa New England Biolabs Inc. e enzimas *BcuI* (FastDigest) e *EcoRI* (FastDigest) da empresa Thermo Fisher Scientific. Incubação em banho termostático. Inativação térmica da enzima *BsaI* (HFv2) em termobloco a 80°C por 20 minutos. **Fonte:** A autora.

Após a etapa de digestão das sequências de DNA doador e dos plasmídeos, foram realizadas as reações de ligação. Foram utilizados 20 ng de plasmídeo digerido com a enzima *SfiI* e a quantidade dos insertos variou dependendo da sequência de DNA doador utilizada, conforme mostra a Tabela 6, bem como o tempo de incubação da reação no termoshaker. O

volume final das reações foi 10 µL e a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific) foi utilizada para todas as reações. As reações de controle possuíam todos os reagentes, exceto os insertos.

Tabela 6 – Proporções das reações de ligação entre plasmídeos e as sequências de DNA doador

Reação de ligação	Proporção (plasmídeo:insertos)	Enzima utilizada	Incubação
pJOE8999(SG1) + SD1	1:10:10 (P:1A:1B)	T4 DNA Ligase	22°C por 1 hora
pJOE8999(SG2) + SD2	1:10:3:10 (P:2A:2B:2C)	T4 DNA Ligase	22°C por 2 horas
pJOE8999(SG2) + SD3	1:10:3:10 (P:3A:3B:3C)	T4 DNA Ligase	22°C por 2 horas

pJOE8999(SG1) representa o plasmídeo pJOE8999 com a sequência-guia do gRNA SG1, enquanto pJOE8999(SG2) representa o plasmídeo pJOE8999 com a sequência-guia do gRNA SG2. Enzima T4 DNA Ligase da Thermo Fisher Scientific. **Fonte:** A autora.

As reações de ligação e controle foram transformadas por choque-térmico em *E. coli* JM109 quimicamente competente seguindo o protocolo usual (Anexo B-b). As transformações foram plaqueadas em meio LB-ágar acrescido de canamicina 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 12 a 18 horas. As colônias transformadas pela reação de ligação foram inoculadas em meio LB líquido acrescido de canamicina 50 µg/mL e incubadas a 37°C e 220 rpm por 12 a 18 horas. O plasmídeo foi extraído das culturas. A ligação do DNA doador ao plasmídeo foi confirmada por sequenciamento de DNA.

3.3.3.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4)

Foi descoberto pelo nosso grupo de pesquisa em um projeto paralelo, que também usava o promotor sintético TP2, que a clonagem de três insertos em um vetor ao mesmo tempo era mais fácil seguindo o protocolo adaptado de An *et al.* (2010), então o mesmo protocolo foi utilizado neste projeto conforme é descrito abaixo.

Primeiramente foi realizada uma etapa de digestão e ligação dos insertos na mesma reação, visando ligar as três partes para obter apenas um inserto. Para isto, as partes 4A, 4B e 4C foram adicionados à uma reação com a enzima de restrição *BsaI* e a enzima T4 DNA Ligase, conforme a Tabela 7. Esta reação foi incubada em termociclador e os ciclos de variação de temperatura são apresentados na Tabela 8.

Tabela 7 – Reação de digestão e ligação de mais de um inserto.

Reagentes	Quantidade
Água ultrapura	14,36 µL
Tampão da enzima T4 Ligase (10x)	2,0 µL
Parte 4A	0,94 µL (100 ng)
Parte 4B	0,90 µL (150 ng)
Parte 4C	0,80 µL (100 ng)
Enzima T4 DNA ligase	0,50 µL
Enzima <i>BsaI</i>	0,50 µL
Volume final	20,0 µL

Enzimas *BsaI* (HFv2) da empresa New England Biolabs Inc. e enzima T4 DNA Ligase da Thermo Fisher Scientific. **Fonte:** A autora.

Tabela 8 – Ciclos de incubação no termociclador para a reação de digestão e ligação de mais de um inserto.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima de restrição	37°C	5 min	50
Ativação da ligase	16°C	5 min	
Inativação	80°C	20 min	1
Manutenção	10°C	∞	

Fonte: A autora.

A etapa seguinte foi a reação de PCR do produto da reação de digestão e ligação para amplificar o inserto de interesse, isto é, a sequência de DNA doador SD4 (4A+4B+4C). A reação de PCR utilizou como molde 0,5 µL do produto da reação de digestão e ligação, os oligonucleotídeos 2A-3A-4A_fw e 3C-4C_rv e a enzima DNA polimerase Time Hifi (ECRA biotec), seguindo o protocolo do fornecedor. A temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos utilizada foi 58°C. Após a reação de PCR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) com todo o volume da reação. A banda de interesse (951 pb) foi purificada utilizando o kit GENECLAN® Turbo Kit (MP Biomedicals) e o DNA resultante foi quantificado.

Uma vez que a sequência de DNA doador SD4 foi recuperada, aproximadamente 900 ng desta sequência foram digeridos com a enzima de restrição *SfiI* (New England Biolabs Inc.), de acordo com as especificações de reação do fornecedor. A reação de digestão foi incubada em banho termostático a 50°C por 3 horas e, após este período, o DNA digerido foi purificado e quantificado.

Finalmente, a sequência de DNA doador SD4 foi ligada ao plasmídeo pJOE8999(SG2) que também havia sido digerido com a enzima *Sfi*I. A reação de ligação foi preparada com 50 ng de plasmídeo e a sequência SD4 na proporção 1:5 (plasmídeo:inserto), com o volume final de 10 µL de reação. Foram testadas também as proporções 1:4 e 1:10. Utilizou-se a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), seguindo as demais especificações do fornecedor. A reação de controle foi preparada com todos os reagentes exceto o inserto. As reações foram incubadas a 22°C por 2 horas. As etapas de transformação em *E. coli*, seleção e confirmação de colônias positivas e construção do plasmídeo foram realizadas conforme descrito no tópico 3.3.3.1.

3.3.4. Transformação em *B. subtilis* e edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9

A primeira etapa consistiu na transformação das células de *B. subtilis*, expressão da Cas9 e edição gênica. As células quimicamente competentes de *B. subtilis* foram transformadas com 1000 a 1500 ng do plasmídeo pJOE8999 completo, com o gRNA e o DNA doador, seguindo o protocolo usual de transformação (Anexo B-d). Volumes de 20, 50 e 100 µL da transformação foram inoculados em placas e meio LB-ágar, acrescido de canamicina 5 µg/mL e manose 0,2% (m/v). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por dois dias e o crescimento de colônias foi acompanhado durante este período.

A etapa seguinte foi a perda do plasmídeo, na qual colônias isoladas foram coletadas das placas da transformação e estriadas com palito de dente placas novas de meio LB-ágar (sem antibiótico). As placas e meio LB-ágar foram divididas em até dez partes para evitar o desperdício de material; uma colônia foi devidamente identificada e estriada em cada parte. As placas foram incubadas em estufa a 42°C (para a transformação das células competentes das linhagens 168 e KO7) e 44°C ou 45°C (para a transformação das células competentes das linhagens Δ6, 434 e 449) por um dia.

A confirmação da perda do plasmídeo foi feita através da seleção e coleta de colônias isoladas que cresceram nas placas de LB da etapa anterior. As colônias foram divididas ao meio, sendo metade estriada em placas de placas de meio LB-ágar e outra metade estriada em placas e meio LB-ágar acrescido de canamicina 5 µg/mL. As placas de meio LB-ágar foram divididas em até oito partes para evitar o desperdício de material; metade de uma colônia foi

devidamente identificada e estriada em cada parte. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por um dia.

No dia seguinte, as colônias que cresceram apenas na placa de LB foram aquelas que perderam o plasmídeo. Estas colônias foram selecionadas e novamente divididas ao meio: metade da colônia foi inoculada em meio LB líquido (sem antibiótico) para que seja feito estoque; enquanto a outra metade da colônia foi utilizada na PCR de colônia (protocolo no Anexo B-e) e sequenciamento do produto de PCR para confirmar a edição do genoma das bactérias.

3.3.5. Cultivos: análise do crescimento celular e produção de surfactina

Para produção de surfactina, as linhagens foram cultivadas em meio de cultivo PW em tubos de ensaio ou tubos graduados de centrifuga de 50 mL, incubados a 37°C e agitação de 220 rpm por até 48 horas. Foram retiradas amostras ao longo do cultivo para avaliar a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) e a produção de surfactina. Todos os experimentos foram realizados com três replicatas biológicas. Os volumes e tempo de incubação do cultivo variaram dependendo do teste realizado e serão detalhados no tópico de resultados.

A DO_{600} das amostras de cultivo foi avaliada em placa de 96 poços branca com fundo transparente no leitor de placas Tecan Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland), utilizando 200 μ L de amostra de cultivo, com agitação orbital por 20 segundos e amplitude de 6 mm, seguida pela leitura de absorbância a 600 nm. As amostras foram diluídas em meio de cultivo PW quando necessário.

Paralelamente, as amostras foram centrifugadas a 17.000 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para quantificar surfactina através do método colorimétrico baseado em cloreto de cetilpiridínio (CPC) e azul de bromotimol (BTB), formando o complexo CPC-BTB descrito por Yang *et al.* (2015). A reação foi preparada em placa transparente de 48 poços contendo 100 μ L de sobrenadante do cultivo (se necessário, diluído em meio de cultivo PW) e 800 μ L de CPC-BTB 0,1 mM (tamponado em PBS 0,1 M pH 8,0) e incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. Após o período de incubação, a absorbância das amostras foi quantificada no mesmo leitor de placas no comprimento de onda de 600 nm. A curva de calibração foi construída com surfactina comercial (Sigma-Aldrich, grau HPLC). Este protocolo é baseado em YANG *et al.* (2015).

Para análise da produção de surfactina em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), foram retiradas amostras de cultivo de 1 a 5 mL e estas amostras foram centrifugadas a 17.000 xg por 30 minutos. O sobrenadante livre de células foi armazenado em microtubos de 1,5 mL ou em tubos graduados de centrifuga de 15 mL estéreis, onde o pH foi ajustado para 2,0 usando uma solução de HCl 5 M. As amostras foram centrifugadas novamente a 10000 xg por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em metanol 100% (grau HPLC). As amostras foram filtradas em membrana PTFE hidrofílica 0,22 µm. Este protocolo foi adaptado de Zhi *et al.* (2017).

A análise destas amostras em HPLC foi feita no equipamento da classe Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments) com bomba modelo LC-20AD, controlador de sistema CBM-20A, detector fotodiodo SPD-M20A, com a coluna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm, 2.7 µm; Agilent, Santa Clara, CA, USA) e pré-coluna InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (3.0 x 5 mm, 2.7 µm; Agilent). A fase móvel consistiu em acetonitrila (grau HPLC) e ácido trifluoacético (TFA; 99,8%; Neon Comercial Ltda.) 3,8 mM, na proporção 80:20 (v/v), em fluxo isocrático de 0,4 mL/min a 30°C, com volume de injeção de amostra de 20 µL. As isoformas de surfactina foram detectadas a 205 nm. A curva de calibração foi construída com surfactina comercial (Sigma-Aldrich, grau HPLC). Este protocolo foi baseado em Koim-Puchowska *et al.* (2019) e Isa *et al.* (2020).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modificação 1

4.1.1. Desenho e obtenção da sequência-guia SG1 do gRNA e da sequência de DNA doador SD1

O gRNA consiste em uma molécula de RNA fita simples, a qual forma uma estrutura secundária em forma de grampo, e é responsável por direcionar a nuclease Cas9 até o DNA-alvo. Este RNA é formado por duas regiões principais: a sequência-guia e a sequência universal (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). O plasmídeo pJOE8999 utilizado para a introdução do sistema CRISPR-Cas9 em *B. subtilis* possui a sequência-universal do gRNA, sendo necessária apenas a clonagem da sequência-guia.

Para o desenho da sequência-guia, foi determinado como DNA-alvo o gene *sfp* com *stop codon* prematuro das linhagens de *B. subtilis* 168, Δ6 e KO7; a sequência é apresentada a seguir. Uma adenina extra na posição 468 (em pares de base) do gene *sfp* leva a formação do

stop codon prematuro e inibe a expressão de uma 4-fosfopanteteil transferase envolvida na biossíntese de surfactina.

DNA-alvo: Gene *sfp* com *stop codon* prematuro (498 pb) de *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$, conforme anotado nos genomas

ATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCGCCCGCTTTCACAGGAAGAAAATGAACGGTTCATGTCT
TTCATATCACCTGAAAAACGGGAGAAATGCCGGAGATTTTATCATAAAGAAGATGCTCACCGCACC
CTGCTGGGAGATGTGCTCGTTTCGCTCAGTCATAAGCAGGCAGTATCAGTTGGACAAATCCGATATC
CGCTTTAGCACGCAGGAATACGGGAAGCCGTGCATCCCTGATCTTCCCGACGCTCATTTCAACATTT
CTCACTCCGGACGCTGGGTTCATTTGCGCGTTTGATTACAGCCGATCGGCATAGATATCGAAAAAA
CGAAACCGATCAGCCTTGAGATCGCCAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAG
CAAAAGACAAGGACGAGCAGACAGACTATTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTATCA
AACAAGGAAGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGA

Legenda: nucleotídeo extra (nt alvo = 468 pb); *stop codon* prematuro; sequência-alvo do gRNA; PAM.

Utilizando os programas computacionais descritos no tópico 3.3.1, obtiveram-se várias opções de sequências-guias para o alvo. A sequência escolhida é detalhada na Tabela 9.

Tabela 9 – Detalhes da sequência-guia SG1 do gRNA.

Posição	Fita	Sequência	PAM	On-target score	Conteúdo GC (%)
451	+	AAAGCTTTATCAAACAAGGA	AGG	69	30

Fonte: A autora, com auxílio das ferramentas computacionais disponíveis em <https://www.idtdna.com> e <http://www.rgenome.net>; 2019.

Na Tabela 9 observa-se a localização da sequência-guia em relação ao início do gene *sfp*; o sentido da fita de DNA alvo correspondente a sequência-alvo; a sequência escolhida, onde a adenina em vermelho (posição 468) é responsável pelo *stop codon* prematuro no gene *sfp*; a PAM reconhecida pela Cas9 no DNA alvo; o “on-target score” indica a predição do desempenho de edição do gRNA no alvo pretendido (pontuação de 0 a 100), sendo o valor de 69 bastante satisfatório; e o conteúdo de guanina e citosina (GC) da sequência. Segundo Silva *et al.* (2016), o conteúdo de GC da sequência deve ser próximo a 50%, se possível, isto aumenta a estabilidade do pareamento entre o gRNA e o DNA-alvo. No caso da sequência SG1, o conteúdo de GC é apenas 30%, mas veremos nos resultados seguintes que isto não impediu a ação específica da Cas9. Também foi verificado que a sequência-guia é única no genoma das linhagens 168 e $\Delta 6$ e KO7, o que garante a especificidade da Cas9 e reduz da possibilidade de clivagens *off-target*.

A sequência-guia foi adquirida na forma de oligonucleotídeos de DNA fita simples que são apresentados a seguir, estes oligonucleotídeos foram então anelados. A sequência de DNA fita dupla obtida possui extremidades coesivas complementares as extremidades formadas no plasmídeo pJOE8999 após sua digestão com a enzima de restrição *BsaI*

(nucleotídeos em azul). É importante reforçar que a PAM não faz parte desta sequência, ela está presente apenas no DNA-alvo no genoma da bactéria.

SG1_fw: TACGAAAGCTTTATCAAACAAGGA

SG1_rv: AAATCCTTGTGTTGATAAAGCTTT

O objetivo da edição gênica das linhagens *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e KO7 nesta etapa do estudo era remover o nucleotídeo extra na posição 468 do gene *sfp* para que a 4-fosfopanteteil transferase fosse sintetizada corretamente e apresentasse funcionalidade. Assim, a sequência de DNA doador SD1 consiste no gene *sfp* sem o nucleotídeo extra. Além desta deleção, foram modificados outros quatro nucleotídeos na sequência-alvo do gene localizados na região equivalente a porção *seed* do gRNA e na PAM (Figura 9), de forma a evitar novo pareamento do DNA-alvo com o gRNA e reconhecimento pela Cas9 após a edição gênica. Vale ressaltar que as alterações destes nucleotídeos não acarretam em alterações na sequência de aminoácidos da enzima 4-fosfopanteteil transferase que, assim, manterá sua funcionalidade.

Figura 9 – Comparação da sequência-alvo do gene *sfp* com *stop codon* prematuro com a região modificada do gene na sequência de DNA doador.



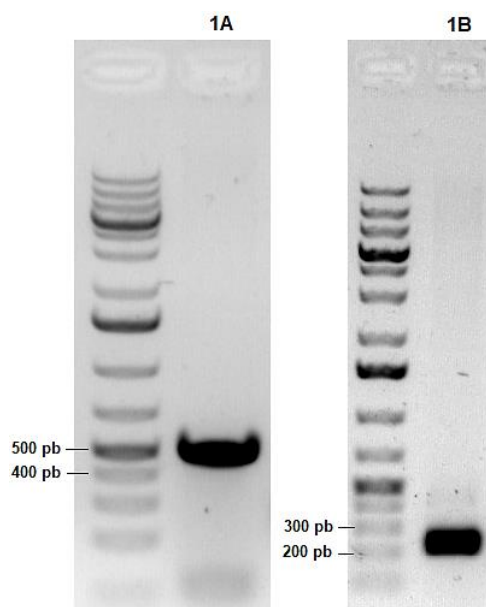
(A) Região do gene *sfp* com *stop codon* prematuro presente nas linhagens *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e KO7 anteriormente a modificação pelo sistema CRISPR-Cas9. Destacam-se a sequência-alvo (azul) a qual sofrerá pareamento com a sequência-universal do gRNA; o nucleotídeo extra, uma adenina (roxo) na posição 468, o qual leva à alteração da sequência do gene e a um *stop codon* prematuro (vermelho); e a PAM (laranja). **(B)** Região do gene *sfp* presente na sequência doadora para edição genômica das linhagens de *B. subtilis*. Destacam-se a deleção do nucleotídeo extra e consequente ausência do *stop codon* prematuro; nucleotídeos alterados (rosa), inclusive na PAM (laranja), para impedir novo reconhecimento pela Cas9 após a edição gênica. **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

A sequência de DNA doador SD1 foi construída em duas partes: 1A e 1B, as quais foram amplificadas por PCR a partir do gene *sfp* do genoma de *B. subtilis* $\Delta 6$. Durante as

reações de amplificação por PCR foi possível realizar as mutações no gene, de forma a obter as alterações ilustradas na Figura 9. Para isso, o oligonucleotídeo 1A_rv foi desenhado com a alteração dos nucleotídeos nas posições 462 (C por T) e 465 pb (A por G) do gene *sfp*, enquanto o oligonucleotídeo 1B_fw foi desenhado com estas duas alterações, a deleção do nucleotídeo extra na posição 468 e a alteração dos nucleotídeos nas posições 468 (G por A; posição 469 no gene *sfp* não-funcional) e 471 pb (A por G; posição 472 no gene *sfp* não-funcional).

Durante as reações de PCR também foram adicionados sítios de restrição das enzimas *SfiI* (extremidade 5' da parte 1A e 3' da parte 1B) e *BsaI* (extremidade 3' da parte 1A e 5' da parte 1B) às duas partes da sequência SD1. Há seis nucleotídeos em comum no final da parte 1A e início da parte 1B (nas posições 461 a 466 pb) que funcionarão como extremidades coesivas complementares que serão ligadas após a digestão das duas partes com a enzima *BsaI*. As amplificações por PCR das partes 1A e 1B é comprovada pelo resultado do gel de eletroforese apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 1A e 1B do DNA doador SD1.



À esquerda, está o resultado da eletroforese do produto de PCR da amplificação da parte 1A, de 491 pb, e à direita, está o resultado da eletroforese do produto de PCR da amplificação da parte 1B, de 240 pb. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

4.1.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG1+SD1) e clonagem em *E. coli*

Uma vez desenhada sequência-guia SG1 foi obtida, ela inserida no plasmídeo pJOE8999 após a digestão deste com a enzima *BsaI*. A ligação do inserto no plasmídeo e sua clonagem em *E. coli* TOP 10 foi confirmada por sequenciamento de DNA (Figura 11). A sequência-guia SG1 foi inserida a montante da sequência-universal do gRNA, criando uma molécula de gRNA funcional.

Figura 11 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG1).

```

Seq_1  2810  TTCCTTTTGGCGTGTGATGCGAATTCTTGACCGTGATTAGAGAATTGAGTAAATGTACC  2869
          |||
Seq_2  525    TTCCTTTTGGCGTGTGATGCGAATTCTTGACCGTGATTAGAGAATTGAGTAAATGTACC  466

Seq_1  2870  TACGAAAGCTTTATCAAACAAGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT  2929
          |||
Seq_2  465    TACGAAAGCTTTATCAAACAAGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT  406

Seq_1  2930  AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTACTCCATCTGGATT  2989
          |||
Seq_2  405    AGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTACTCCATCTGGATT  346

Seq_1  2990  GTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTATCTAAAGCTTAGGCCAGTCGAAAG  3049
          |||
Seq_2  345    GTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTATCTAAAGCTTAGGCCAGTCGAAAG  286

```

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) refere-se à sequência do pJOE8999(SG1) desenhada *in silico*. É ilustrado o promotor semissintético P_{vanP*} (em roxo), a sequência-guia SG1 (em azul escuro) e a sequência-universal do gRNA (em azul claro). A sequência 2 (Seq_2) foi obtida como resultado do sequenciamento de DNA após a clonagem da sequência-guia SG1 no plasmídeo. **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

Para a clonagem da sequência doadora SD1 no plasmídeo pJOE8999(SG1), as partes 1A e 1B foram digeridas com as enzimas *SfiI* e *BsaI* e foram ligadas ao plasmídeo digerido com a enzima *SfiI*. A confirmação da transformação e clonagem do plasmídeo resultante, pJOE8999(SG1+SD1), em *E. coli* JM109 foi obtida por sequenciamento de DNA (Figura 12). O sequenciamento não mostrou o início da sequência SD1, mas é possível confirmar a presença de aproximadamente dois terços da sequência. Assim, podemos concluir que ela foi clonada com sucesso no plasmídeo. Verifica-se também que digestão dos insertos com *BsaI* não deixou cicatrizes na sequência após a reação de ligação.

50°C. Foram necessárias várias tentativas de transformações, em que a incubação das células durante a etapa de perda do plasmídeo foi avaliada em diferentes temperaturas (48, 46, 45, 44, 42, 40 e 39°C), até que determinamos que a etapa de incubação a 50°C não era necessária; que a maioria das células da linhagem 168 é capaz de perder o plasmídeo com a incubação a 42°C por um dia; enquanto a maioria das células da linhagem KO7 pode perder o plasmídeo sendo incubada a 42 ou 44°C por um dia; e que grande parte das células da linhagem Δ6 perde o plasmídeo com a incubação a 44°C por um dia. Com isso, conseguimos alcançar uma boa taxa de sucesso na transformação e edição gênica por CRISPR-Cas9 para as linhagens 168, Δ6 e KO7 e reduzimos em um dia o protocolo previamente estabelecido por Altenbuchner (2016).

Após esta adaptação do protocolo de Altenbuchner (2016), o plasmídeo pJOE8999(SG1+SD1) foi transformado com sucesso nas linhagens *B. subtilis* 168, Δ6 e KO7. A edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9 foi confirmada por sequenciamento de DNA, sendo o resultado apresentado na Figura 13.

Figura 13 – Resultado de sequenciamento da região modificada do gene *sfp* da linhagem *B. subtilis* 168.

```

Seq_1  360  GCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAGCAAAAGACAAGGACGAGCAGAC  419
          |||
Seq_2  345  GCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAGCAAAAGACAAGGACGAGCAGAC  404

Seq_1  420  AGACTATTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTATTAAAGCAAGAGGCAAAAGG  479
          |||
Seq_2  405  AGACTATTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTATTAAAGCAAGAGGCAAAAGG  464

Seq_1  480  CTTATCGCTTCCGCTTGATTCTTTTCAGTGCGCCTGCACCAGGACGGACAAGTATCCAT  539
          |||
Seq_2  465  CTTATCGCTTCCGCTTGATTCTTTTCAGTGCGCCTGCACCAGGACGGACAAGTATCCAT  524

```

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) refere-se à sequência do gene *sfp* desenhada *in silico* com a deleção do nucleotídeo extra na posição 468 e as alterações em quatro nucleotídeos da sequência-alvo (em rosa). A sequência 2 (Seq_2) foi obtida como resultado do sequenciamento de DNA desta região do genoma da linhagem *B. subtilis* 168 após edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9. **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

A Figura 13 mostra o alinhamento de parte da sequência obtida através do sequenciamento do gene *sfp* da linhagem modificada de *B. subtilis* 168 (agora denominada linhagem 413) com o gene *sfp* desenhado *in silico* (que apresenta a deleção do nucleotídeo extra na posição 468 e alteração de quatro nucleotídeos na sequência-alvo). Observa-se que o alinhamento na região de interesse é perfeito, confirmando o sucesso da modificação 1 no genoma da bactéria utilizando o sistema CRISPR-Cas9. O mesmo resultado foi obtido para as

linhagens KO7 (agora linhagem 434) e $\Delta 6$ (agora linhagem 449). Não foram observadas edições inespecíficas no gene *sfp* nas novas linhagens.

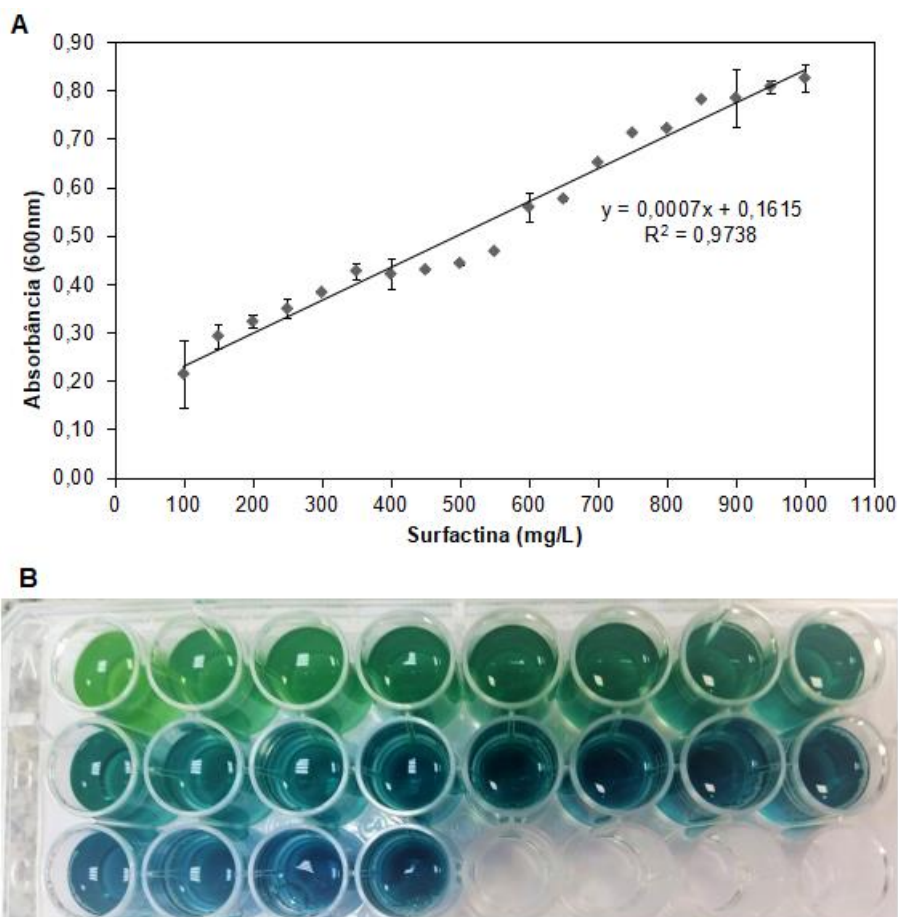
Conforme descrito na Introdução, a funcionalidade do sistema desenvolvido por Altenbuchner (2016), baseado no plasmídeo pJOE8999, já foi comprovada na edição genômica da linhagem *B. subtilis* 168. Aqui, comprovamos também a precisão e eficiência deste sistema para edição gênica por CRISPR-Cas9 das linhagens *B. subtilis* KO7 e $\Delta 6$.

4.1.4. Construção de uma linhagem de *B. subtilis* produtora de surfactina

Previamente à análise da produção de surfactina pelas linhagens modificadas de *B. subtilis*, foi construída uma curva de calibração para o método colorimétrico baseado em CPC-BTB com surfactina comercial (Figura 14). A regressão linear obtida é dada por:

$$Abs_{600nm} = 0,0007 \times Surfactina (mg/L) + 0,1615 \text{ (Eq. 1), } R^2 = 0,9738, 100 mg/L \leq Surfactina \leq 1000 mg/L.$$

Figura 14 – Curva de calibração para o método colorimétrico baseado em CPC-BTB com surfactina comercial

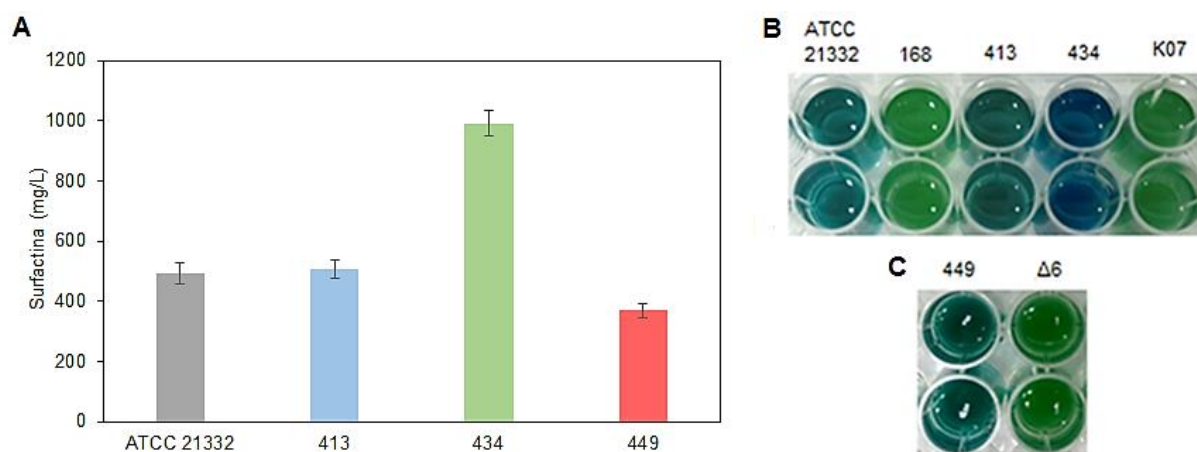


(A) Curva de calibração construída com surfactina comercial (Sigma-Aldrich, grau HPLC) para o método colorimétrico baseado em CPT-BTB. **(B)** Foto retirada de uma das duplicatas das amostras preparadas para a curva de calibração para demonstrar a variação da coloração, de verde a azul escuro, dependendo da concentração de surfactina. O primeiro poço é o branco, o qual contém apenas os reagentes do método colorimétrico e o meio de cultivo PW. Os poços seguintes contêm surfactina comercial diluída em diferentes concentrações (100 a 1000 mg/L) em meio de cultivo PW e os reagentes do método colorimétrico. **Fonte:** A autora.

O princípio do método colorimétrico é a interação do BTB e da surfactina com o mediador CPC. Inicialmente, o indicador colorimétrico BTB liga-se ao mediador catiônico CPC, levando a uma alteração de cor do azul escuro para verde amarelado na reação. Uma vez que a surfactina, um biossurfactante lipopeptídico com carga negativa, é adicionada à reação, ela liga-se competitivamente ao CPC. Isto desfaz o complexo CPC-BTB e leva à segunda mudança de coloração da reação: de verde amarelado para verde escuro ou azul brilhante, dependendo da concentração de surfactina presente. Assim, a adição de surfactina ao reagente CPC-BTB gera uma mudança de cor visível na reação, o que permite a análise qualitativa e quantitativa (por espectrofotometria) do biossurfactante (YANG *et al.*, 2015).

As linhagens 413, 434 e 449 (ver Tabela 1) foram cultivadas em meio PW e, após 24 horas, amostras dos cultivos foram coletas. A linhagem ATCC 21332 foi utilizada como controle positivo e as linhagens 168, $\Delta 6$ e KO7, como controle negativo. O sobrenadante livre de células foi utilizado para detecção da surfactina produzida utilizando o método colorimétrico descrito. Os resultados são apresentados na Figura 15-A e a mudança na coloração da reação, nas Figuras 15-B e 15-C.

Figura 15 – Teste de produção de surfactina pelas linhagens com a modificação 1.



Resultados do cultivo teste das linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449 para produção de surfactina. Cultivo realizado em 5,0 mL de meio definido PW em tubo de ensaio, a 37°C e agitação de 220 rpm, por 24 horas. **(A)** Surfactina produzida quantificada através do método colorimétrico baseado em CPC-BTB (Eq.1). **(B)** e **(C)** Alteração de coloração das amostras durante a análise de produção pelo do método colorimétrico. **Fonte:** A autora.

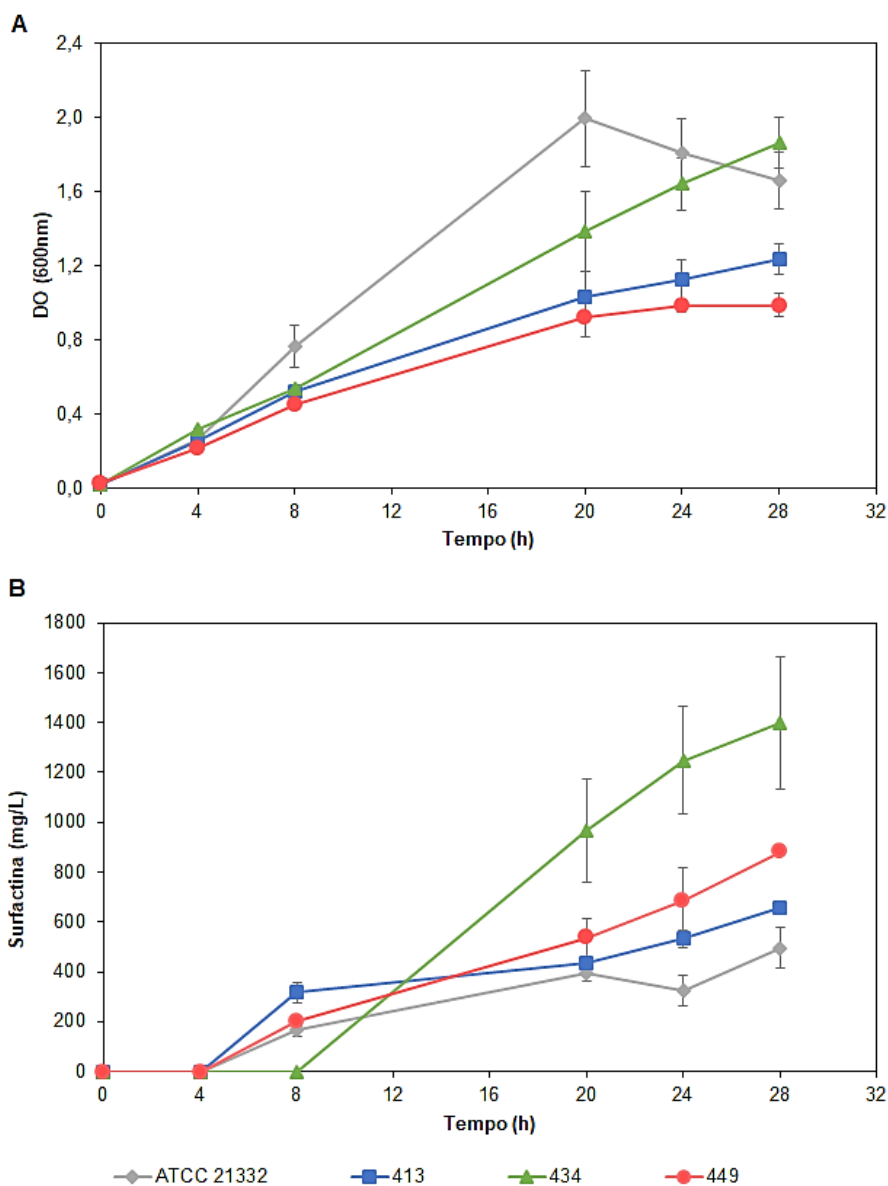
Observa-se que a modificação do gene *sfp* no genoma das linhagens 413, 434 e 449 restaurou a via de biossíntese de surfactina. Os resultados apresentados na Figura 15 correspondem a um cultivo teste realizado apenas para confirmar a capacidade de produção da molécula de interesse pelas linhagens modificadas. Não foram realizadas diluições no momento da quantificação pelo método colorimétrico, desta forma, como será visto nos resultados seguintes, a quantificação da surfactina produzida pela linhagem 434 foi subestimada. A quantificação de surfactina produzida pelos controles negativos 168, $\Delta 6$ e KO7 foi nula, por esta razão, eles não estão apresentados no gráfico da Figura 15-A.

4.1.5. Cinética de produção de surfactina por *B. subtilis* após a modificação 1

4.1.5.1. Cultivo de 28 horas

Uma vez comprovado que as linhagens 413, 434 e 449 produzem surfactina, alguns testes foram feitos para avaliar a cinética de produção. A Figura 16 apresenta as curvas de crescimento das linhagens e produção de surfactina durante um cultivo, em triplicata, de 28 horas, em tubos graduados de centrifuga de 50 mL com 10 mL de cultura.

Figura 16 – Primeiro cultivo para avaliação da cinética de produção de surfactina pelas linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449.



Resultados do cultivo das linhagens ATCC 21332 (♦, em cinza), 413 (■, em azul), 434 (▲, em verde) e 449 (×, em vermelho) em triplicata em tubos graduados de centrifuga de 50 mL com 10 mL de meio PW, a 37°C e sob agitação de 220 rpm, por 28 horas. **(A)** Curva de crescimento das linhagens obtida através da quantificação da densidade óptica das amostras a 600nm. **(B)** Surfactina produzida pelas

linhagens e quantificada através do método colorimétrico baseado em CPC-BTB (Eq.1). **Fonte:** A autora.

Nota-se que as linhagens 413 e 449 apresentaram crescimento menor comparado a linhagem selvagem ATCC 21332, entretanto sua produção de surfactina foi maior. Além disso, por ser um metabólito secundário, a maior parte da produção do biossurfactante teve início a partir do fim da fase exponencial e durante a fase estacionária de crescimento microbiano. A linhagem 434 apresenta destaque pois, mesmo após 28 horas, aparentava ainda não ter entrado na fase estacionária de crescimento e produziu uma quantidade de surfactina muito além das outras linhagens, por volta de 1400 mg/L. As amostras utilizadas para quantificação de surfactina pelo método colorimétrico foram diluídas 2 vezes nos pontos de 24 e 28 horas, assim obtivemos uma quantificação mais precisa.

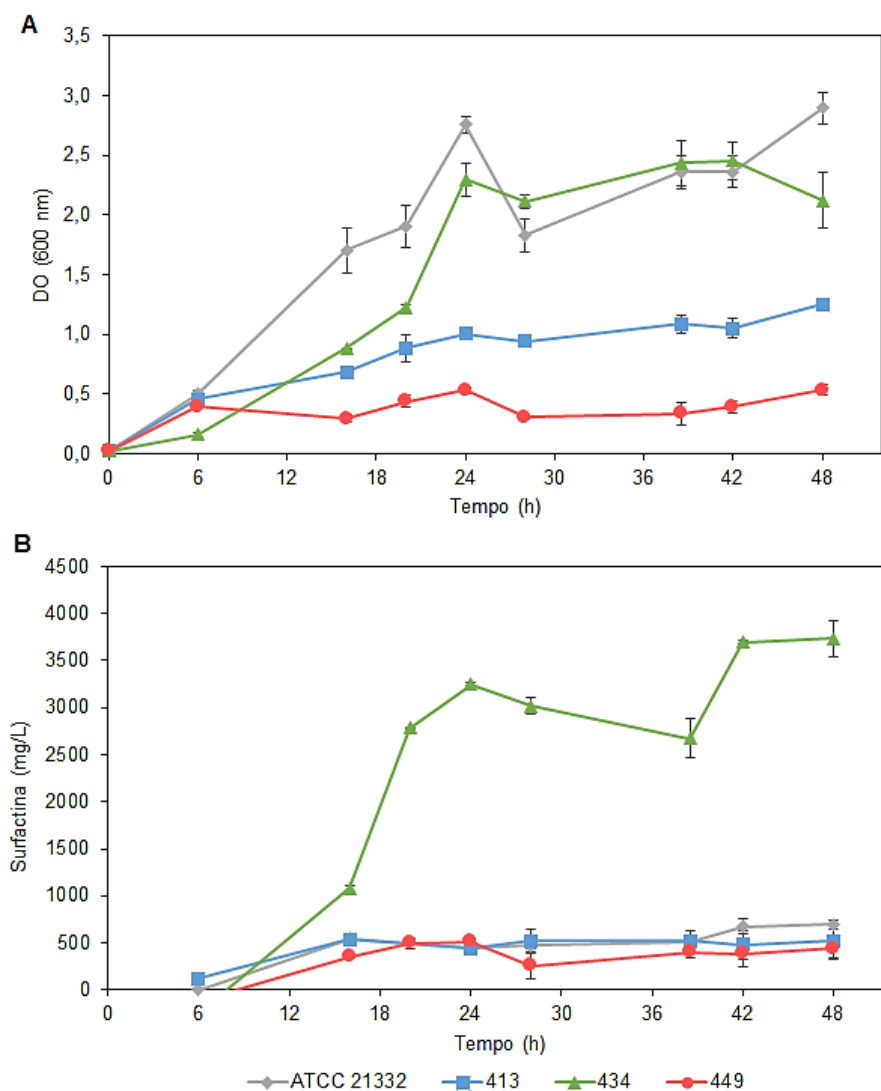
Os resultados apresentados confirmam que as linhagens modificadas pelo sistema CRISPR-Cas9 são capazes de produzir surfactina e a linhagem 434 produz quantidades além do esperado do biossurfactante, considerando que apenas uma modificação foi realizada em seu genoma até o momento.

Yang *et al.* (2015) garante a confiabilidade do método colorimétrico baseado em CPC-BTB comparado a quantificação de surfactina por RP-HPLC, além do primeiro ser um método mais prático e rápido para ser realizado rotineiramente em laboratório.

4.1.5.2. Cultivo de 48 horas

Com o intuito de avaliar a produção de surfactina das linhagens com a primeira modificação por mais tempo, foi realizado um cultivo de 48 horas com as linhagens ATCC 21332 (controle positivo), 413, 434 e 449 em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata, que foram incubados a 37°C com agitação de 220 rpm. Foram retiradas amostras ao longo do tempo para quantificar o crescimento celular e produção de surfactina. A concentração de surfactina foi calculada de acordo com a equação 1. Os resultados podem ser observados na Figura 17.

Figura 17 – Crescimento celular e produção de surfactina pelas linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449 durante o cultivo de 48 horas.



Cultivo realizado com as linhagens ATCC 21332 (♦, em cinza), 413 (■, em azul), 434 (▲, em verde) e 449 (●, em vermelho) em tubos de ensaio com 12 mL de meio PW, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm por 48h. **(A)** crescimento celular quantificado a partir da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) e **(B)** produção de surfactina quantificada pelo método colorimétrico CPC-BTB. **Fonte:** A autora.

De acordo com estes resultados, as linhagens continuaram crescendo ao longo do cultivo: as linhagens 413 e 449 apresentaram um crescimento com um perfil similar e mais lento comparado as linhagens ATCC 21332 e 434; estas últimas também apresentaram um perfil de crescimento parecido. Contudo, nota-se que as linhagens ATCC 21332, 413 e 449 atingiram o máximo da produção de surfactina em aproximadamente 24 horas, chegando a produzir respectivamente $441,72 \pm 43,42$ mg/L, $438,05 \pm 35,15$ mg/L e $514,00 \pm 39,57$ mg/L

do biossurfactante. Já a linhagem 434 continuou produzindo surfactina conforme crescia e atingiu a produção de $3731,43 \pm 193,95$ mg/L em 48 horas.

A linhagem 434 apresentou uma produção cerca de 7,7 vezes maior que a média das linhagens 413 e 449, que passaram pela mesma edição genômica. Além disso, os trabalhos de engenharia metabólica que levaram à melhores linhagens produtoras de surfactina já construídas foram iniciados a partir de linhagens com produção de 0,5 g/L em 32h e 0,4 g/L em 48h (JIAO *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2019). A linhagem 434 produz 3,7 g/L em 48h de cultivo, uma concentração 9 vezes maior do que aquela que deu origem a melhor linhagem até então construída.

Sabemos que a linhagem *B. subtilis* KO7 (BGSCID 1A1133), da qual a linhagem 434 é derivada, tem a deleção de sete proteases extracelulares ($\Delta nprE$, $\Delta aprE$, Δepr , Δmpr , $\Delta nprB$, Δvpr , $\Delta bprA$). Assim, nossa hipótese é que uma ou mais destas proteases reconhece a sequências de aminoácidos da surfactina e degrada a molécula, como a linhagem 434 não expressa essas proteases extracelulares, ela é capaz de acumular mais surfactina no meio extracelular do que as outras linhagens.

4.1.5.3. Análises em HPLC

O primeiro teste para estabelecer um protocolo de análise em HPLC foi realizado com amostras de 1 mL obtidas de um cultivo de 24 horas das linhagens 168, KO7, $\Delta 6$, ATCC 21332, 413, 434 e 449. O cultivo foi realizado em tubos de ensaio com 6 mL de meio PW. As amostras foram retiradas no ponto de 24 horas e a surfactina produzida foi analisada tanto pelo método colorimétrico CPC-BTB quanto por HPLC, de forma a comparar os métodos analíticos.

O cálculo da concentração de surfactina nas amostras foi feito com curva de calibração do método colorimétrico CPC-BTB é dada pela Equação 1 e a curva de calibração em HPLC dada pela Equação 2, ambas obtidas com surfactina comercial (grau HPLC, Sigma Aldrich).

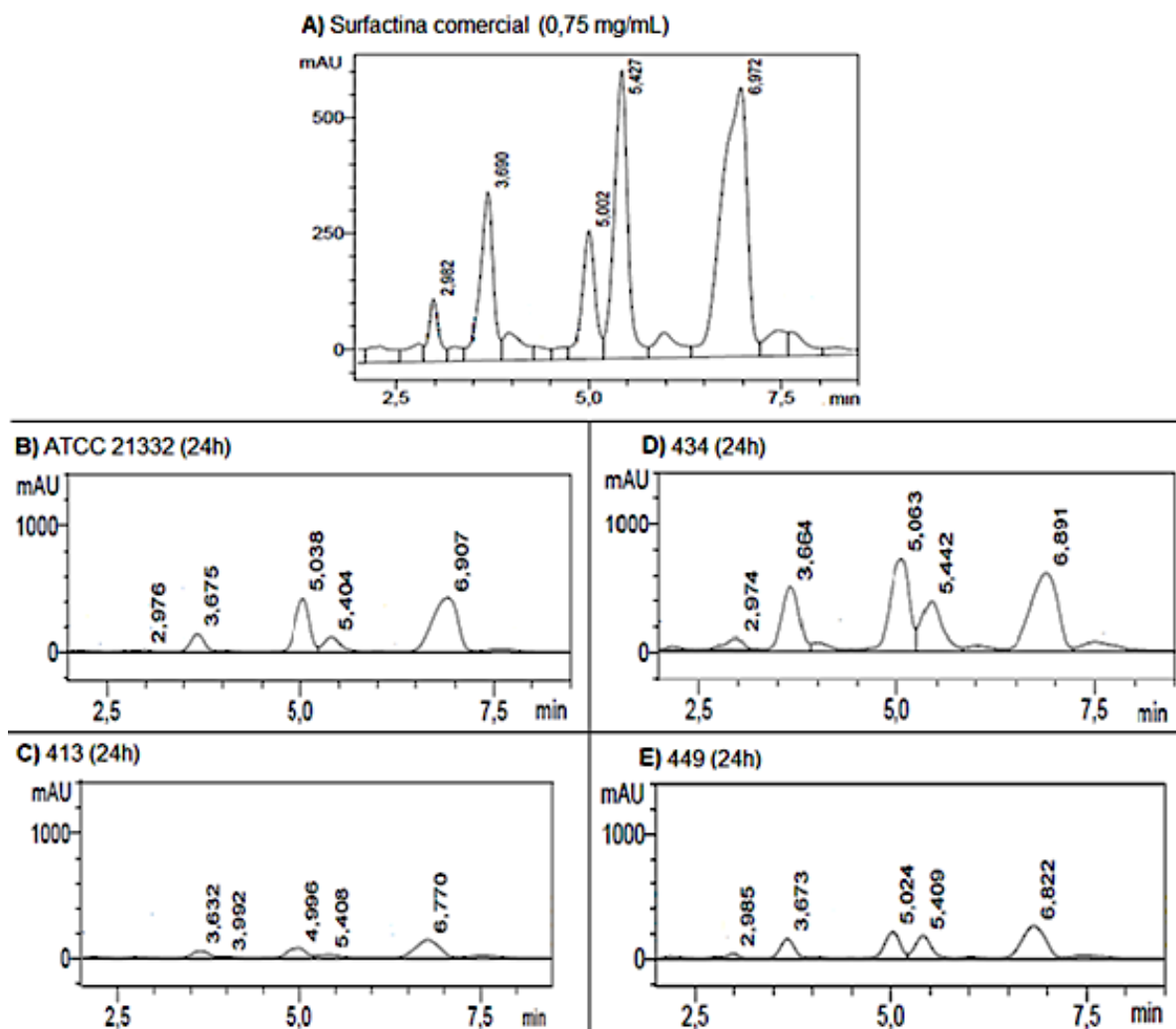
$$Abs_{600nm} = 0,0007 \times Surfactina (mg/L) + 0,1615 \text{ (Eq. 1), } R^2 = 0,9738, 100 mg/L \leq Surfactina \leq 1000 mg/L.$$

$$\text{Soma das áreas} = 34.548,8812 \times \text{Surfactina (mg/L)} + 3.691.328,7561 \quad (\text{Eq. 2}),$$

$$R^2 = 0,9769, 100 \text{ mg/L} \leq \text{Surfactina} \leq 1000 \text{ mg/L}.$$

A Figura 18 mostra os cromatogramas obtidos em HPLC de uma triplicata do ponto de 0,75 mg/mL da curva de calibração com surfactina comercial (Fig. 12-A), e uma amostra do ponto de 24 horas dos cultivos ATCC 21332 (Fig. 12-B), 413 (Fig. 12-C), 434 (Fig. 12-D) e 449 (Fig. 12-E). Os cinco picos que aparecem nos cromatogramas são característicos das isoformas de surfactina de *B. subtilis* e também são observados na literatura (KOIM-PUCHOWSKA *et al.*, 2019; ISA *et al.*, 2020). A concentração total de surfactina nas amostras é calculada a partir da soma da área dos cinco picos. O que observamos nos cromatogramas é que as quatro linhagens de *B. subtilis* que utilizamos neste projeto produzem surfactina, além disso, produzem mais da isoforma característica do terceiro pico (com cadeia de ácidos graxo de 14 carbonos) em comparação à combinação de isoformas presentes na surfactina comercial.

Figura 18 – Cromatogramas obtidos em HPLC de uma das triplicatas do ponto de 0,75 mg/mL da curva de calibração com surfactina comercial e dos pontos de 24 horas das linhagens ATCC 21332, 413, 434 e 449.

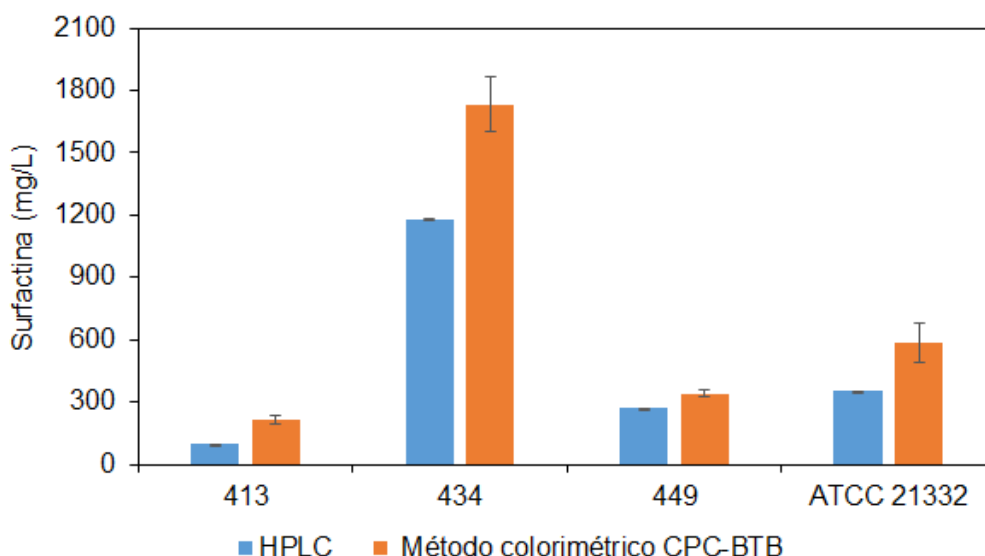


(A) Cromatograma de uma triplicata do ponto de 0,75 mg/mL da curva de calibração com surfactina comercial e cromatogramas de uma triplicata do ponto de 24 horas de cultivo das linhagens ATCC 21332 **(B)**, 413 **(C)**, 434 **(D)** e 449 **(E)**. Da esquerda para a direita os picos representam surfactinas com cadeias carbônicas de comprimento 13, 14, outra isoforma de 14, e 15 carbonos. **Fonte:** A autora.

As amostras quantificadas em HPLC também foram quantificadas pelo método colorimétrico CPC-BTB e o resultado da comparação de ambos é apresentado na Figura 19. Conforme pode ser observado, a quantificação de surfactina por HPLC é um pouco inferior à quantificação pelo método colorimétrico CPC-BTB. Acreditamos que isto seja justificado pela perda de surfactina durante o preparo das amostras para a quantificação por HPLC. O preparo das amostras de 1 mL de sobrenadante de cultivo foi realizado em microtubos de 1,5 mL e observamos grande formação de espuma no momento da redução do pH das amostras com HCl 5M para precipitação de surfactina. Apesar disto, tanto o método colorimétrico

CPC-BTB quanto as análises por HPLC confirmam que a produção de surfactina pela linhagem 434 é superior às demais, o que é um resultado bastante promissor.

Figura 19 – Primeiro teste de comparação entre a quantificação da produção de surfactina por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB.



Produção de surfactina no ponto de 24 horas de cultivo pelas linhagens 413, 434, 449 e ATCC 21332 quantificadas por HPLC (em azul) e pelo método colorimétrico CPC-BTB (em laranja). O cultivo realizado em tubos de ensaio com 6 mL de meio PW, em triplicata. **Fonte:** A autora.

Para quantificar a perda de surfactina durante o processo de preparo de amostras, diuímos duas amostras de surfactina comercial em meio PW estéril na concentração final de 1 g/L, realizamos o processo de precipitação com HCl 5M e quantificamos as amostras em HPLC, em duplicata para cada amostra. A concentração final quantificada foi $0,735 \pm 0,009$ g/L, ou seja, obtivemos 26,5% de perda no teste com surfactina comercial. Contudo, não observamos o mesmo padrão de perda entre as amostras de cultivo comparando a quantificação por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB. No caso da linhagem 413, por exemplo, a perda chegou a 54% (Figura 19). Assim, não podemos utilizar um fator de correção.

Em uma tentativa de reduzir a perda de surfactina durante a etapa de precipitação com HCl 5 M, um novo cultivo com as mesmas linhagens foi feito em tubos de ensaio com 12 mL de meio PW por 42 horas. Para o preparo de amostras para HPLC, foram coletadas amostras de 5 mL de sobrenadante no ponto de 42 horas cultivo, as quais foram armazenadas em tubos graduados de centrifuga de 15 mL. Nestes tubos, o pH das amostras foi reduzido a 2,0 com HCl 5 M. Continuamos observando muita formação de espuma, mas o tamanho do

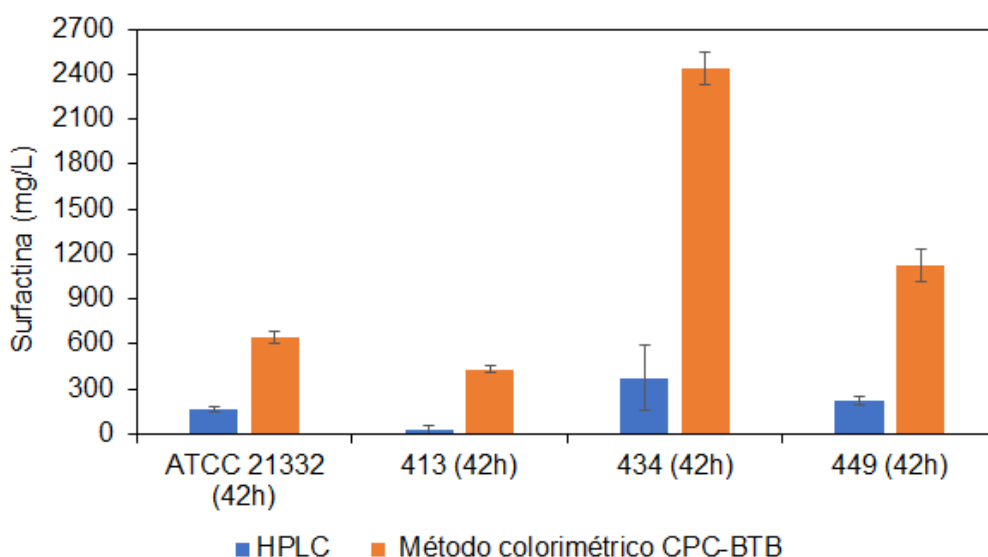
tubo evitou o vazamento. Os demais procedimentos do preparo de amostras e parâmetros da análise em HPLC foram mantidos.

Repetimos a curva de calibração com surfactina comercial (grau HPLC, Sigma Aldrich) no equipamento de HPLC, sendo a regressão linear obtida dada pela Equação 3. Esta equação foi utilizada para o cálculo das amostras quantificadas neste segundo teste em HPLC. Novamente, os resultados da quantificação de surfactina por HPLC foram comparados à quantificação pelo método colorimétrico CPC-BTB das mesmas amostras e são apresentados na Figura 20.

$$\text{Soma das áreas} = 33.050,8166 \times \text{Surfactina (mg/L)} + 7.012.611,8659 \quad (\text{Eq. 3}),$$

$$R^2 = 0,9955, 100 \text{ mg/L} \leq \text{Surfactina} \leq 1000 \text{ mg/L}.$$

Figura 20 – Segundo teste de comparação entre a quantificação da produção de surfactina por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB.



Produção de surfactina no ponto de 42 horas de cultivo pelas linhagens ATCC 21332, 413, 434, 449 e quantificadas por HPLC (em azul) e pelo método colorimétrico CPC-BTB (em laranja). O cultivo realizado em tubos de ensaio com 12 mL de meio PW, em triplicata. **Fonte:** A autora.

Observamos na Figura 20 uma discrepância ainda maior entre os resultados de produção de surfactina quantificada por HPLC e pelo método colorimétrico CPC-BTB. Neste caso, as perdas variaram de 72% (linhagem ATCC 21332) a 93% (linhagem 413), o que indica que a modificação que fizemos no preparo de amostras para a análise em HPLC não surtiu o efeito desejado e houve uma perda ainda maior de surfactina no processo.

Continuamos buscando formas de otimizar o preparo de amostras para a quantificação por HPLC com base em trabalhos publicados, porém a grande maioria deles utiliza o método de precipitação de surfactina com HCl 5M. Não conseguimos quantificar a surfactina por HPLC seguindo outras metodologias de preparo de amostra como, por exemplo, diluição do sobrenadante de cultivo em uma solução aquosa de NaHCO_3 1 g/L, conforme descrito por Yang *et al.* (2015).

A dificuldade com a metodologia estabelecida até então para o preparo de amostras para HPLC associada ao tempo necessário para análises neste equipamento e aos atrasos no cronograma do projeto devido à pandemia de COVID-19, fizeram com que, para os cultivos seguintes, priorizássemos a quantificação de surfactina pelo método colorimétrico CPC-BTB, que é mais simples, rápido e, ainda assim, confiável. Pretendemos retomar a quantificação por HPLC em projetos futuros.

4.2. Modificação 2

4.2.1. Desenho e obtenção da sequência-guia SG2 do gRNA

Para o desenho da sequência-guia SG2, foi utilizada como DNA alvo a sequência expandida do promotor P_{srfA} no genoma de *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$, a qual é apresentada a seguir, enquanto a Tabela 8 mostra a sequência-guia escolhida a partir das opções fornecidas ferramentas de análise das plataformas online IDT e CRISPR RGEN Tools.

DNA-alvo: Sequência expandida do P_{srfA} presente no genoma de *B. subtilis* 168, KO7 e $\Delta 6$

GACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTGCCTTTTTTTCGGTTTTTGC GCGGTACACATAGTCATGTA
AAGATTGTAAATTGCATT CAGCAATAAAA AAAGA TTGAACGCAGCAGTT TGC TTTAAAAATTTTAA
TTTTCTGTAAATAATGTTTAGTGGAATGATTGCGGCATCCCGCAAAAAATATTGCTGTAAATAA
ACTGGAATCTTTCGGCATCCCGCATGAAACTTTTCACCCATTTTTCGGTGATAAAAAACATTTTTTTC
ATTAAACTGAACGGTAGAAAGATAAAAAATATTGAAAACAATGAATAAATAGCCAAAATTGGTT
TCTATTAGGGTGGGGTCTTGC GGTCCTTATCCGCTTATGTTAAACGCCGCAATGCTGACTGACGGC
AGCCTGCTTTAATAGCGGCCATCTGTTTTTTGATTGGAAGCACTGCTTTTTTAAGTG TAGTACTTTGG
GCTATTTTCGGCTGTTAGTTCATAAGAATTAAAAGCTGATATGGATAAGAAAGAGAAAATGCGTTGC
ACATGTTCACTGCTTATAAAGATTAGGGGAGGTATGACAAT

Legenda: P_{srfA} expandido; sequência-alvo do gRNA; PAM; regiões -35 e -10 do promotor; RBS 1.

Tabela 10 – Detalhes da sequência-guia SG2, com alvo na sequência expandida do promotor P_{srfA}.

Posição	Fita	Sequência	PAM	On-target score	Conteúdo GC (%)
98	+	AAAGATTGAACGCAGCAGTT	TGG	48	40

“Posição” é onde inicia-se a sequência-guia com base no DNA-alvo fornecido; “Fita” é a direção da fita de DNA; “Sequência” é a sequência-guia obtida; “PAM” é a sequência de reconhecimento da Cas9, presente apenas no DNA-alvo; “On-target score” indica o desempenho previsto de edição do gRNA no local de destino pretendido; “Conteúdo GC” indica a porcentagem de guanina e citosina na sequência-guia. **Fonte:** A autora, com auxílio das ferramentas computacionais disponíveis em <https://www.idtdna.com> e <http://www.rgenome.net>.

A sequência determinada como SG2 não apresenta um “on-target score” ideal, uma vez que valores mais próximos a 100 são melhores, entretanto buscávamos uma sequência-guia no início da sequência expandida do P_{srfA} para que fosse relativamente fácil remover a PAM da sequência de DNA doador SD2 por mutação de nucleotídeos no momento da PCR da parte 2C e esta sequência foi a melhor opção. Além disso, a sequência-guia SG2 não apresenta sequência de terminação da transcrição (mais que quatro timinas repetidas) e apresenta um bom conteúdo de guanina e citosina que auxiliam em seu pareamento com o DNA-alvo. Os oligonucleotídeos de DNA complementares desenhados para a sequência-guia SG2 são apresentados a seguir, em azul estão as extremidades coesivas que são complementares ao plasmídeo pJOE8999 após a digestão deste com a enzima de restrição *BsaI*.

SG2_fw: TACGAAAGATTGAACGCAGCAGTT

SG2_rv: AAACAACCTGCTGCGTTCAATCTTT

4.2.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2) e clonagem em *E. coli*

Os oligonucleotídeos SG2_fw e SG2_rv foram anelados e ligados ao plasmídeo pJOE8999 digerido com a enzima de restrição *BsaI*. A proporção da ligação foi 1:150 (plasmídeo:SG2). A reação de ligação e a reação controle foram transformadas em *E. coli* TOP10 quimicamente competentes. Os plasmídeos foram clonados, extraídos das células e a construção do plasmídeo pJOE8999(SG2) foi confirmada por sequenciamento de DNA (Figura 21).

Figura 21 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2).

```

Seq_1  577  ACCTCAAAAAGGTCTTTAATTAACATCTCAAATTCGCATTATTCCAATTTCCTTTTGG  518
          |||
Seq_2  2760  ACCTCAAAAAGGTCTTTAATTAACATCTCAAATTCGCATTATTCCAATTTCCTTTTGG  2819

Seq_1  517  CGTGTGATGCGAATTCTTGACCGTGATTAGAGAATTGAGTAAAATGTACCTACGAAAGAT  458
          |||
Seq_2  2820  CGTGTGATGCGAATTCTTGACCGTGATTAGAGAATTGAGTAAAATGTACCTACGAAAGAT  2879

Seq_1  457  TGAACGCAGCAGTTGTTTITAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT  398
          |||
Seq_2  2880  TGAACGCAGCAGTTGTTTITAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTAT  2939

Seq_1  397  CAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTACTCCAATCTGGATTGTTCAGAACG  338
          |||
Seq_2  2940  CAACTTGAAAAAGTGGCACCAGAGTCGGTGCTTTTACTCCAATCTGGATTGTTCAGAACG  2999

```

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2) clonado em *E. coli* TOP10 e sequência 2 (Seq_2) é plasmídeo pJOE8999(SG2) desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados parte da origem de replicação sensível a temperatura pE194^{ts} para *B. subtilis* (verde água); promotor semissintético P_{vanP*} (roxo); sequência-guia SG2 do gRNA (azul escuro); e sequência-universal do gRNA (laranja).

Fonte: A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

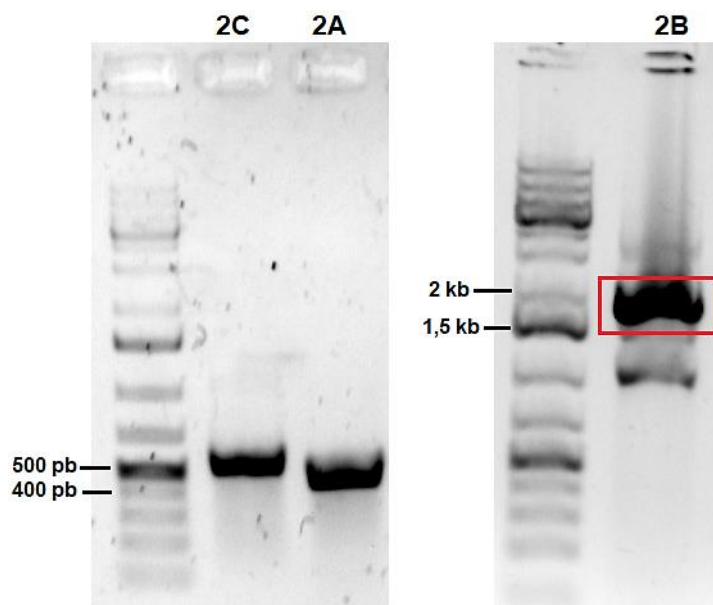
4.2.3. Modificação 2a

4.2.3.1. Desenho e obtenção do DNA doador SD2

A sequência de DNA doador SD2 é composta de três partes: a sequência parcial do gene *hxlR* (parte 2A) e o promotor P_{srfA} (parte 2C), que funcionam como braços de homologia, e entre elas está a sequência S0 e o promotor R6 (parte 2B), que foram inseridos no genoma bacteriano por recombinação homóloga durante o reparo da quebra da dupla fita do DNA genômico, após a ação da Cas9. A sequência S0_R6 corresponde ao sistema sintético de autoindução da expressão gênica desenvolvido pelo grupo de pesquisa SynBio (CORRÊA *et al.*, 2020).

Para a construção da sequência SD2, suas três partes foram inicialmente amplificadas por PCR: as partes 2A e 2C foram obtidas a partir do genoma de *B. subtilis* Δ6, enquanto a parte 2B foi amplificada do plasmídeo pBS3Clux_luxRI_Plux3.2 proveniente da coleção do nosso grupo de pesquisa. A Figura 22 mostra os produtos de PCR obtidos. Devido às regiões repetidas na sequência de DNA da parte 2B, foram amplificados produtos inespecíficos. Com isso, o produto de interesse de aproximadamente 1800 pb precisou ser purificado do gel de agarose 1%.

Figura 22 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 2A, 2B e 2C do DNA doador SD2.

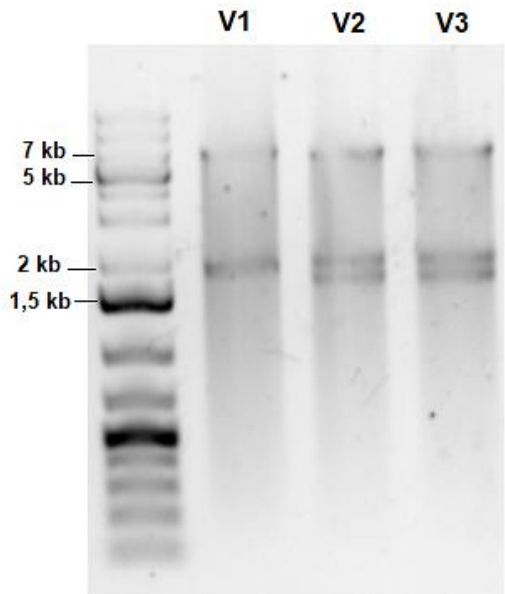


À esquerda, está o resultado da eletroforese dos produtos de PCR da amplificação das partes 2A e 2C, de aproximadamente 400 e 500 pb, respectivamente. À direita, está o resultado da eletroforese do produto de PCR da amplificação da parte 2B, onde são observadas bandas inespecíficas e a banda de interesse de aproximadamente 1800 pb (circulada em vermelho). Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

4.2.3.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) e clonagem em *E. coli*

Após a purificação dos produtos de PCR, estes foram digeridos com enzimas de restrição e ligados ao plasmídeo pJOE8999(SG2). A proporção da ligação foi 1:10:3:10. As reações de ligação e controle foram transformadas em células de *E. coli* JM109 quimicamente competentes. Foram obtidas três colônias nas placas da transformação com a reação de ligação e nenhuma colônia nas placas do controle. As colônias foram nomeadas V1, V2 e V3 e inoculadas em meio LB líquido. No dia seguinte, foi feita a extração dos plasmídeos e estes foram digeridos com a enzima de restrição *Pst*I. Foi feita a eletroforese dos produtos da digestão e o resultado é apresentado na Figura 23. As amostras que consistiam no plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) construído e clonado conforme esperado deveriam apresentar três bandas: 6533, 1919 e 1653 pb. Amostras negativas apresentariam apenas a banda de 7447 pb, referente ao plasmídeo pJOE8999(SG2) linearizado.

Figura 23 – Resultado da eletroforese dos produtos da digestão das amostras V1, V2 e V3 com a enzima de restrição *Pst*I.



Resultado da eletroforese da digestão das amostras V1, V2 e V3 com a enzima de restrição *Pst*I. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

De acordo com os resultados da Figura 23, as amostras V2 e V3 são positivas, ou seja, o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2), enquanto o resultado da amostra V1 não ficou claro. Estas amostras foram sequenciadas, no entanto, foram obtidos apenas resultados para o sequenciamento da amostra V3, que são apresentados na Figura 24, e indicam que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) foi construído com sucesso.

Figura 24 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2).

A

Seq_1	442	TTAATACGACTCACTATAGGGTCGACGGCCAAACGAGGCCTAAATGGAAAATGCTCATTTT	501
Seq_2	3061	TTAATACGACTCACTATAGGGTCGACGGCCAAACGAGGCCTAAATGGAAAATGCTCATTTT	3120
Seq_1	502	ATGGCATTTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGTTCAATGAATTAAAAACATTGATTCCTGA	561
Seq_2	3121	ATGGCATTTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGTTCAATGAATTAAAAACATTGATTCCTGA	3180
Seq_1	562	TATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTTGAGCAGGATATGATTGTTCA	621
Seq_2	3181	TATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTTGAGCAGGATATGATTGTTCA	3240
Seq_1	622	CAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAAGGTTGAATATTCTCTGACCCCGCACGGAG	681
Seq_2	3241	CAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAA-GGTTGAATATTCTCTGACCCCGCACGGAG	3299
Seq_1	682	AAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGGAATT	741
Seq_2	3300	AAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGG-AAAGGCTATATGG-AATT	3357

B

Seq_1	804	-----TATATCGCTTGAAATACA-TTGTTTAACATAAGTACC	769
Seq_2	5154	AAATTGGATTTTGTGCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAAACATAAGTACC	5213
Seq_1	768	CTGTAGGGATCGTACAGGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATAATAAATGTAGTAC	709
Seq_2	5214	--TGTAGGATCGTACA-GGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATAATAAATGTAGTAC	5270
Seq_1	708	TAGTAGCGGCCGCTGCAGTTGAACGCAGCAGTTTCGTTTAAAAATTTTATTTTCTGTGA	649
Seq_2	5271	TAGTAGCGGCCGCTGCAGTTGAACGCAGCAGTTTCGTTTAAAAATTTTATTTTCTGTGA	5330
Seq_1	648	AATAATGTTTAGTGGAAATGATTGCGGCATCCCGCAAAAAAATATTGCTGTAAATAAACT	589
Seq_2	5331	AATAATGTTTAGTGGAAATGATTGCGGCATCCCGCAAAAAA-TATTGCTGTAAATAAACT	5389
Seq_1	588	GGAATCTTTCGGCATCCCGCATGAAACTTTTCACCCATTTTCGGTGATAAAAACATTTT	529
Seq_2	5390	GGAATCTTTCGGCATCCCGCATGAAACTTTTCACCCATTTTCGGTGATAAAAACATTTT	5449
Seq_1	528	TTTCATTAAACTGAACGGTAGAAAGATAAAAAATATTGAAAACAATGAATAAATAGCCA	469
Seq_2	5450	TTTCATTAAACTGAACGGTAGAAAGATAAAAAATATTGAAAACAATGAATAAATAGCCA	5509
Seq_1	468	AAATTGGTTTCTTATTAGGGTGGGGTCTTTCGGTCTTTATCCGCTTATGTTAAACGCCGC	409
Seq_2	5510	AAATTGGTTTCTTATTAGGGTGGGGTCTTTCGGTCTTTATCCGCTTATGTTAAACGCCGC	5569
Seq_1	408	AATGCTGACTGACGGCAGCCTGCTTTAATAGCGGCCATCTGTTTTTGGATTGGAAGCACT	349
Seq_2	5570	AATGCTGACTGACGGCAGCCTGCTTTAATAGCGGCCATCTGTTTTTGGATTGGAAGCACT	5629
Seq_1	348	GCTTTTAAAGTGTAGTACTTTGGGCTATTTTCGGCTGTTAGTTCATAAGAATTAAGCTG	289
Seq_2	5630	GCTTTTAAAGTGTAGTACTTTGGGCTATTTTCGGCTGTTAGTTCATAAGAATTAAGCTG	5689
Seq_1	288	ATATGGATAAGAAAGAGAAAATGCGTTGCACATGTTCACTGCTTATAAAGATTAGGGGAG	229
Seq_2	5690	ATATGGATAAGAAAGAGAAAATGCGTTGCACATGTTCACTGCTTATAAAGATTAGGGGAG	5749
Seq_1	228	GTATGACAATGGCCAATAAGGCCTTTCTAGATTAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATAC	169
Seq_2	5750	GTATGACAATGGCCAATAAGGCCTTTCTAGATTAAGAAATAATCTTCATCTAAAATATAC	5809

Parte do alinhamento de duas seqüências. A seqüência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento das fitas (A) direta e (B) reversa de DNA da amostra V3, um plasmídeo clonado e extraído de *E. coli* JM109. Em ambas as figuras, a seqüência 2 (Seq_2) é plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados o promotor T7 (azul); o sítio da enzima de restrição *Sfi*I (roxo); o início da parte 2A do DNA doador SD2, isto é, a seqüência parcial do gene *hxlR* (vinho); parte do promotor R6 (vermelho); o sítio de clonagem BioBrick suffix (verde claro); o promotor P_{srfA} (rosa) com a mutação de um nucleotídeo para inativação da PAM (citosina “C” grifada em vermelho); o RBS (azul escuro); e o sítio da enzima de restrição *Sfi*I (roxo). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

O equipamento de sequenciamento utilizado não dá resultados maiores que 900 pares de bases por sequenciamento, desta forma não é possível sequenciar o DNA doador SD2 completamente, o qual tem 2660 pb. Além disso, as regiões repetitivas na seqüência S0_R6

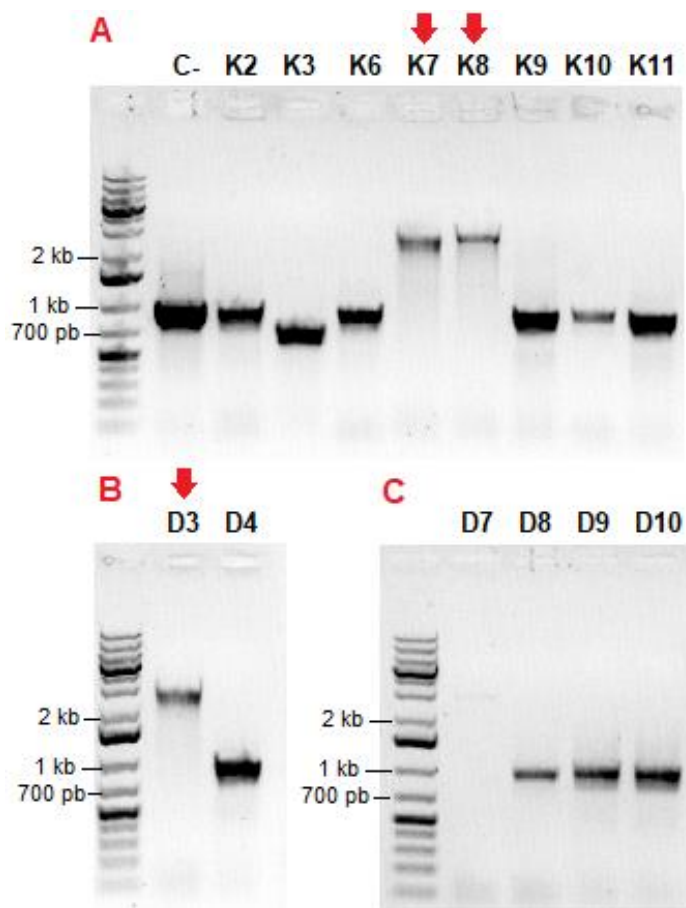
também dificultam o alinhamento das sequências. Apesar disso, a Figura 23 mostra que as amostras V2 e V3 digeridas com a enzima de restrição *Pst*I apresentaram os três tamanhos de banda que indicam ser o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2). Combinado a isso, temos o sequenciamento parcial da fita direta (Figura 24-A) e da fita reversa (Figura 24-B) de DNA da amostra V3, que mostram a sequência parcial do gene *hxlR*, o final do promotor R6 e o promotor *P_{srfA}*, que sofreu a mutação de um nucleotídeo durante sua amplificação por PCR e teve a sequência PAM inativada (TGG trocado por TCG). Todos estes resultados são ótimos indicativos de que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) foi construído conforme planejado e clonado em *E. coli*.

4.2.3.3. Transformação do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) em *B. subtilis*

Uma vez que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2) foi construído, este foi transformado nas linhagens de *B. subtilis* 434 e 449 quimicamente competentes, seguindo o protocolo adaptado de Altenbuchner (2016) para edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9. As transformações foram plaqueadas e, após a incubação, 20 colônias de cada transformação foram selecionadas. As colônias foram nomeadas K1 a K20 para aquelas provenientes da transformação da linhagem 434 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2), e D1 a D20 para aquelas provenientes da transformação da linhagem 449 com o mesmo plasmídeo.

As colônias seguiram para a etapa de perda do plasmídeo e teste da edição genômica pelo sistema CRISPR-Cas9 através de PCR de colônia. As colônias K1, K4, K5, D2, D5 e D6 foram as primeiras selecionadas para o teste de confirmação da edição gênica, entretanto seus resultados foram negativos. Então foram testadas as colônias K2, K3, K6, K7, K8, K9, K10, K11, D3, D4, D7, D8, D9 e D10. O resultado da eletroforese dos produtos das PCRs de colônia é apresentado na Figura 25.

Figura 25 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2).



(A) Resultado da eletroforese da PCR do controle negativo C- (DNA genômico de *B. subtilis* 168) e das PCRs de colônia das colônias K2, K3, K6, K7, K8, K9, K10, K11 provenientes da transformação da linhagem 434 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2). **(B)** e **(C)** Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias D3, D4, D7, D8, D9 e D10 provenientes da transformação da linhagem 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD2). A seta vermelha indica as colônias potencialmente positivas, que podem ter passado pela edição genômica esperada (modificação 2a) com o sistema CRISPR-Cas9. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

Foram utilizados os oligonucleotídeos externos da sequência de DNA doador SD2 nas PCRs de colônia, desta forma, se as colônias fossem positivas para a edição genômica, apresentariam a sequência SD2 inserida em seu genoma e uma banda no gel equivalente a aproximadamente 2660 pb. No caso de as colônias serem negativas e não terem sofrido a edição genômica, estas apresentariam uma banda de aproximadamente 900 pb, como o controle negativo que é o produto de PCR do DNA genômico de *B. subtilis* 168. É possível observar na Figura 25 que as amostras K7, K8 e D3 apresentam bandas que indicam que estas colônias são positivas, então o produto da PCR de colônia destas amostras foi sequenciado e os resultados são mostrados nas Figuras 26 e 27.

O baixo rendimento da edição gênica após a modificação 2a pode estar relacionado ao baixo “*on-target score*” da sequência-guia SG2 do gRNA (Tabela 10). Ainda assim, obtivemos pelo menos uma colônia potencialmente positiva para cada transformação.

Figura 26 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia da amostra K7.

```

Seq_1  289  TTTTTTGCCTTTTTTCGGTTTTTGGCGGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATT  348
      |||
Seq_2  3419  TTTTTTGCCTTTTTTCGGTTTTTGGCGGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATT  3478

Seq_1  349  GCATTGAGCAATAAAAAAGAGAATTCTTAACTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCC  408
      |||
Seq_2  3479  GCATTGAGCAATAAAAAAGAGAATTCTTAACTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCC  3538

Seq_1  409  TGTAAAAATTGCTTTAGTAATACTTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGAGTTTCATTGCGC  468
      |||
Seq_2  3539  TGTAAAAATTGCTTTAGTAATACTTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGAGTTTCATTGCGC  3598

Seq_1  469  ATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTTTGAATATCCCA  528
      |||
Seq_2  3599  ATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTTTGAATATCCCA  3658

Seq_1  529  AGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTT  588
      |||
Seq_2  3659  AGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTT  3718

Seq_1  589  GTTTGATTTATTATTGCTATATTATTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAAT  648
      |||
Seq_2  3719  GTTTGATTTATTATTGCTATATTATTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAAT  3778

Seq_1  649  TAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGGTTGCTTTCTCTG  708
      |||
Seq_2  3779  TAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAG-TTGCTTTCTCTG  3837

Seq_1  709  AATGTGCAAACTAAGCATTCCCGAAGGCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAACTAAA  768
      |||
Seq_2  3838  AATGTGCAAACTAAGCATTCC-GAA-GCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAACTAAA  3895

```

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento da fita direta de DNA da PCR de colônia da amostra K7 e sequência 2 (Seq_2) é parte do genoma de *B. subtilis* com a modificação 2a desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados o final sequência do gene *hxlR* com o terminador (vinho), o sítio da enzima de restrição *EcoRI* utilizado durante a construção da sequência (azul escuro) e o início da sequência S0 (laranja). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

Figura 27 – Resultado do sequenciamento da PCR de colônia da amostra D3.

A

Seq_1	291	TTTTTTTGCCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATT	350
Seq_2	3419	TTTTTTTGCCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATT	3478
Seq_1	351	GCATTTCAGCAATAAAAAAGAGAATTCTTAACCTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCC	410
Seq_2	3479	GCATTTCAGCAATAAAAAAGAGAATTCTTAACCTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCC	3538
Seq_1	411	TGTTAAATTTGCTTTAGAAATACCTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGAGTTTCATTTCGCGC	470
Seq_2	3539	TGTTAAATTTGCTTTAGAAATACCTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGAGTTTCATTTCGCGC	3598
Seq_1	471	ATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTTTGAATATCCCA	530
Seq_2	3599	ATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTTTGAATATCCCA	3658
Seq_1	531	AGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTT	590
Seq_2	3659	AGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTT	3718
Seq_1	591	GTTTGATTTATTATTGCTATATTTATTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAAT	650
Seq_2	3719	GTTTGATTTATTATTGCTATATTTATTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAAT	3778
Seq_1	651	TAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGA	710
Seq_2	3779	TAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGA	3838
Seq_1	711	ATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTATTAGCAGTATGA-TAGGGAACTAAACCC	769
Seq_2	3839	ATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCC	3898

mais forte que o promotor P_{srfA} , este sistema sintético faz com que a expressão gênica do produto de interesse tenha início quando a concentração de células no meio atinge um limiar, geralmente no início da fase exponencial do crescimento bacteriano (CORRÊA *et al.*, 2020). Já o promotor nativo P_{srfA} , é ativado apenas no final da fase exponencial e início da fase estacionária (CORRÊA *et al.*, 2020; GEISSLER *et al.*, 2019). Fazer com que o pico de produção seja atingido mais rapidamente é interessante para produção de surfactina, uma vez que esta molécula é um tensoativo e pode causar rompimento da membrana celular bacteriana.

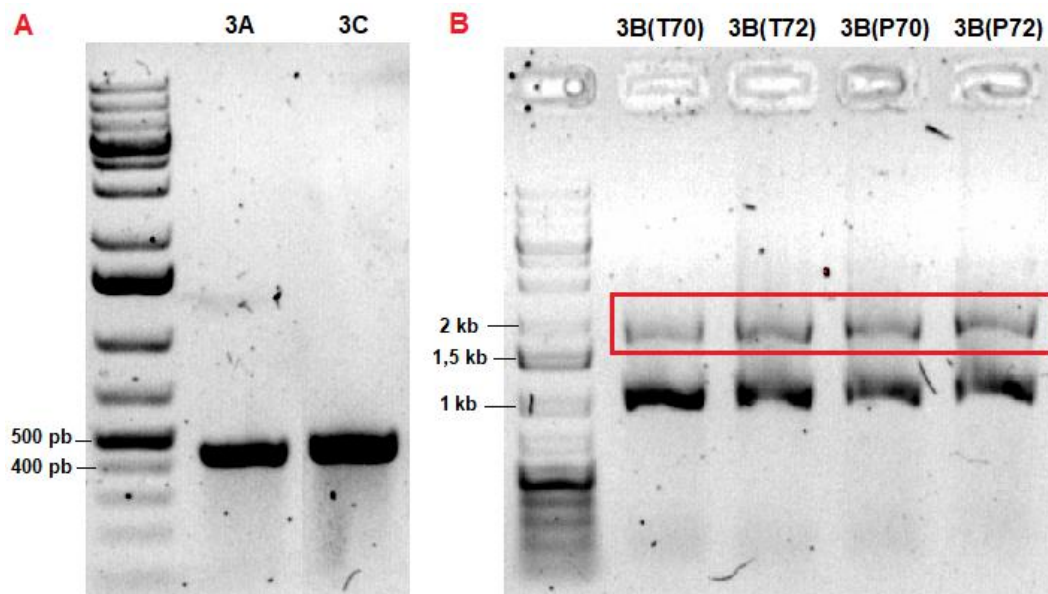
4.2.4. Modificação 2b

4.2.4.1. Desenho e obtenção do DNA doador SD3

Na modificação 2b, o promotor P_{srfA} foi substituído pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica no controle do operon *srfA*. Esta modificação foi desenhada pois o promotor P_{srfA} responde ao sistema de *quorum sensing* de *B. subtilis* e sua regulação é dependente de várias moléculas, assim como muitas outras moléculas podem levar a repressão deste promotor e consequente interrupção na biossíntese de surfactina. O sistema sintético de autoindução da expressão gênica, por outro lado, não sofre repressão de moléculas do metabolismo de *B. subtilis* e sua ativação depende apenas da proteína LuxR ligada ao metabólito AHL (CORRÊA *et al.*, 2020).

A sequência de DNA doador SD3 é composta de três partes: a sequência parcial do gene *hxlR* (parte 3A) e a sequência parcial do gene *srfAA* (parte 3C), que funcionam como braços de homologia, e entre elas está a sequência S0 e o promotor R6 (parte 3B), que foram inseridas no genoma bacteriano. As três partes foram obtidas através de amplificação por PCR do DNA genômico de *B. subtilis* 168 (partes 3A e 3C) e do plasmídeo pBS3Clux_luxRI_Plux3.2 (parte 3B). A Figura 28 mostra o resultado da eletroforese dos produtos de PCR.

Figura 28 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 3A, 3B e 3C do DNA doador SD3.



(A) Resultado da eletroforese dos produtos de PCR da amplificação das partes 3A e 3C, de aproximadamente 400 pb. **(B)** Resultado da eletroforese do produto de PCR das tentativas de amplificação da parte 3B, onde são observadas bandas inespecíficas e as bandas de interesse de aproximadamente 1800 pb (circuladas em vermelho). 3B(T70) e 3B(T72) foram reações de PCR realizadas com a enzima Time Hifi com as temperaturas de anelamento de 70 e 72°C, respectivamente; 3B(P70) e 3B(P72) foram reações de PCR realizadas com a enzima Phusion High-fidelity com as temperaturas de anelamento de 70 e 72°C, respectivamente. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

Novamente, houve dificuldades na amplificação da sequência S0_R6 (parte 3B), então foram feitas várias reações de PCR com diferentes temperaturas de anelamento. Por fim, foi possível purificar a banda de interesse do gel de eletroforese das amostras de PCR realizadas com a enzima Phusion High-fidelity e a temperatura de anelamento de 72°C.

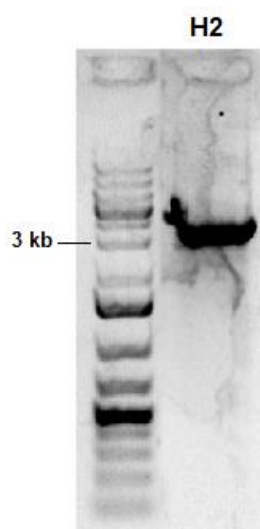
4.2.4.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) e clonagem em *E. coli*

Assim que os produtos de PCR referente as três partes da sequência SD3 foram purificados, estes foram digeridos com enzimas de restrição e ligados ao plasmídeo pJOE8999(SG2). A proporção da ligação foi 1:10:3:10. As reações de ligação e controle foram transformadas em células de *E. coli* JM109 quimicamente competentes. Foi obtida apenas uma colônia na placa da transformação com a reação de ligação. Esta colônia foi

denominada H2 e foi cultivada em meio LB líquido. No dia seguinte, foi feita a extração do plasmídeo.

O plasmídeo foi utilizado como molde para a PCR com os oligonucleotídeos de sequenciamento pJOE8999.seq_fw e pJOE8999.seq_rv. Caso a sequência de DNA doador (2611 pb) estivesse no plasmídeo, o produto da PCR teria aproximadamente 3000 pb, considerando a região onde os oligonucleotídeos anelam. A Figura 29 apresenta o resultado da eletroforese do produto da PCR.

Figura 29 – Resultado da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) com os oligonucleotídeos de sequenciamento.



Resultado da eletroforese do produto de PCR do plasmídeo extraído da colônia H2. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

O resultado da PCR indica que o plasmídeo possui a sequência SD3, portanto, ele foi sequenciado e os resultados são apresentados na Figura 30. Como explicado anteriormente, a sequência S0 não pode ser sequenciada completamente devido ao seu tamanho, mas a combinação dos resultados nas Figuras 29 e 30 confirmam que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) foi construído corretamente e clonado em *E. coli*.

Figura 30 – Resultado de sequenciamento de DNA do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3).

A

Seq_1	475	CGGCCAACGAGGCCTAAATGGAAAATGCTCATTTCATTTATGGCATTTCAGGAAAAGAAGGCACA	534
Seq_2	7439	CGGCCAACGAGGCCTAAATGGAAAATGCTCATTTCATTTATGGCATTTCAGGAAAAGAAGGCACA	7498
Seq_1	535	AAACGGTTCAATGAATTAAAAACATTGATTCCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAAT	594
Seq_2	7499	AAACGGTTCAATGAATTAAAAACATTGATTCCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAAT	7558
Seq_1	595	CAGCTGAGAGAGCTTGAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGATCCAGTTGTCCCG	654
Seq_2	7559	CAGCTGAGAGAGCTTGAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGATCCAGTTGTCCCG	7618
Seq_1	655	CCGAAGGTTGAATATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCC	714
Seq_2	7619	CCGAAGGTTGAATATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCC	7678
Seq_1	715	ATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGGGAATTGATTGATATCGACAAAA-TGTCATGAA	773
Seq_2	7679	ATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGG-AATTGATTGATATCGACAAAAATGTGTCATGAA	7737
Seq_1	774	AGAAATCGTTGTGA-GACGCTCTTCGCAAGGGTTTTCTTTTTTTTGTCTTTTTTCGGTTTT	832
Seq_2	7738	AGAAATCGTTGTGAAGACGCTCTTCGCAAGGGTG-TCTTTTTTTTGC-CTTTTTTTTCGGTTTT	7795
Seq_1	833	TGCGCGGTAACACATAGTCATGTAAAGATT-----TGTAATTGCATTTC-AG	878
Seq_2	7796	TGCGCGGTA-CACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTGAGCAATAAAAAAGAAA	7854
Seq_1	879	CATAAAAAGAACTTTTAAAGTATGGCAATCAATGGCTCTGGTAATGCATTAAATACTTGGC	938
Seq_2	7855	CTTTT--AAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGC	7912

B	Seq_1	833	-----GTCGCAAGTTTTGCGTGTAT-TATTCATTAAAAACGGTAATAG	792
	Seq_2	9421	ATCCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTTGCGTGTATATA-TCATTAAAAACGGTAATAG	9479
	Seq_1	791	ATTGACATTGATTCTAATAAATTGGGATTTTGTCACTATTATATCGCTTGAAATAC	732
	Seq_2	9480	ATTGACATTGATTCTAATAAATTGG-ATTTTGTCACTATTATATCGCTTGAAATAC	9538
	Seq_1	731	AATTGTTTAAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTG	672
	Seq_2	9539	AATTGTTTAAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTG	9598
	Seq_1	671	TATAATAAATGTAGTATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAATAACTTTTTACCCCTTAA	612
	Seq_2	9599	TATAATAAATGTAGTATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAATAACTTTTTACCCCTTAA	9658
	Seq_1	611	CGGATGCACAAAAACGAATTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGCATTTCAA	552
	Seq_2	9659	CGGATGCACAAAAACGAATTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGCATTTCAA	9718
	Seq_1	551	ATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAGC	492
	Seq_2	9719	ATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAGC	9778
	Seq_1	491	AGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGATG	432
	Seq_2	9779	AGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGATG	9838
	Seq_1	431	AAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAACATACTG	372
	Seq_2	9839	AAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAACATACTG	9898
	Seq_1	371	ACACTACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTACAATGGAGCCGGGAGGAAACGA	312
	Seq_2	9899	ACACTACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTACAATGGAGCCGGGAGGAAACGA	9958
	Seq_1	311	AGAAACCTTTGCCGCTATACGATTGTGATTGTTCGGTTTTTCCTTGTTCACCATAAAGG	252
	Seq_2	9959	AGAAACCTTTGCCGCTATACGATTGTGATTGTTCGGTTTTTCCTTGTTCACCATAAAGG	10018
	Seq_1	251	AAAATGAAGTGTGGTGGCCAATAAGGCCTTCTAGATTAGAAATAATCTTCATCTAAAA	192
	Seq_2	10019	AAAATGAAGTGTGGTGGCCAATAAGGCCTT-----	10048

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento das fitas **(A)** direta e **(B)** reversa de DNA da amostra F2, um plasmídeo clonado e extraído de *E. coli* JM10. Em ambas as figuras, a sequência 2 (Seq_2) é plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados o final da sequência do gene *hxlR* com o terminador (vinho), o início da sequência S0 (laranja), parte do promotor R6 (vermelho), o RBS 1 (rosa claro), e a sequência parcial do gene *srfAA* (verde escuro) e o sítio da enzima de restrição *SfiI* (roxo). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

4.2.4.3. Transformação do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) em *B. subtilis*

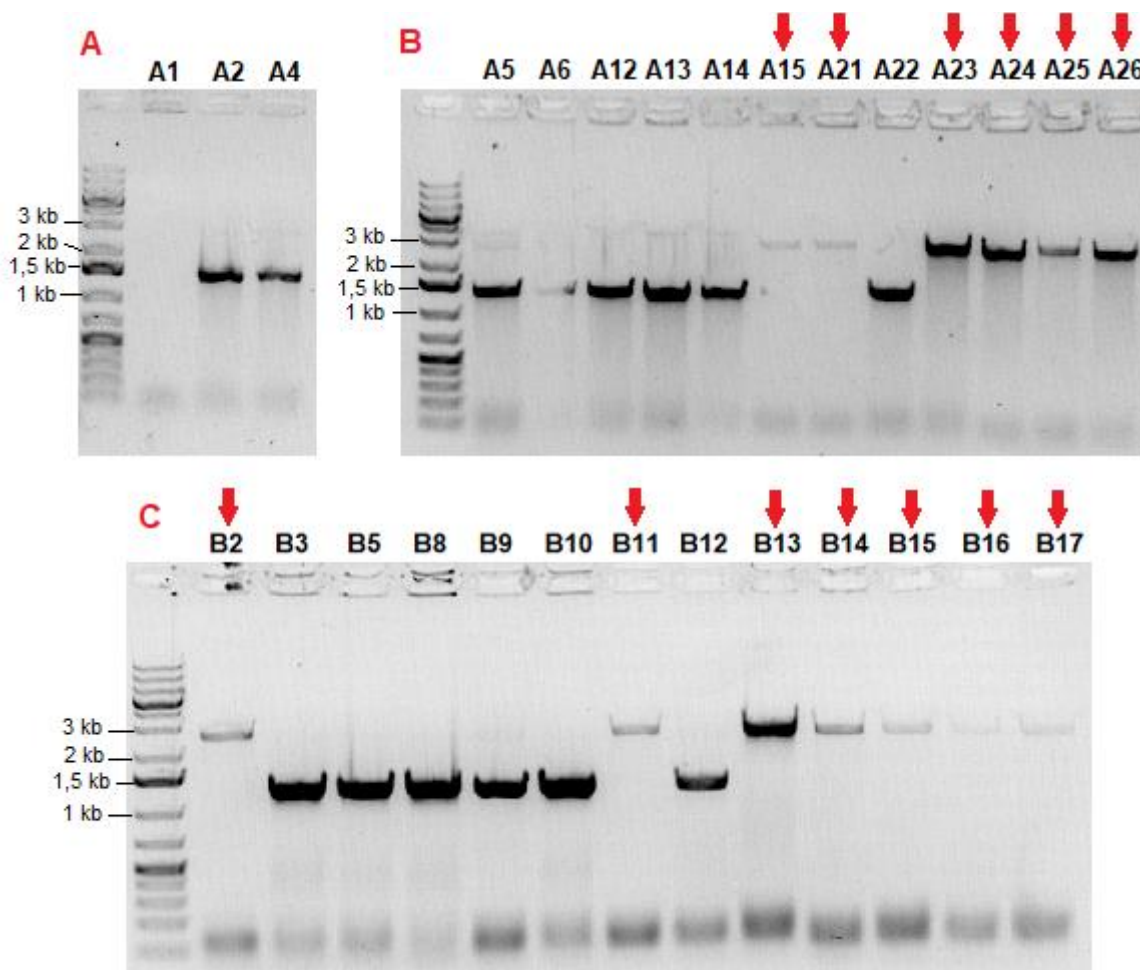
Assim que obtivemos a confirmação da construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3), ele foi transformado nas células quimicamente competentes de *B.*

subtilis 434 e 449 para edição gênica pelo sistema CRISPR-Cas9 seguindo o protocolo adaptado de Altenbuchner (2016). As transformações foram plaqueadas e, após a incubação, 30 colônias de cada transformação foram selecionadas. As colônias provenientes da transformação da linhagem 434 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3) foram nomeadas A1 a A30 e aquelas provenientes da transformação da linhagem 449 com o mesmo plasmídeo foram nomeadas B1 a B30.

As colônias seguiram para a etapa de perda do plasmídeo por incubação a 44°C, seguida para o teste de perda do plasmídeo e, por fim, PCR de colônia daquelas que perderam o plasmídeo para confirmar a edição genômica pela técnica de CRISPR-Cas9. Para esta última etapa, foram selecionadas as colônias A1, A2, A4 a A6, A12 a A15, A21 a A26; B2, B3, B5, B8 a B17. O resultado da eletroforese dos produtos da PCR é apresentado na Figura 31.

As reações de PCR de colônia foram feitas com os oligonucleotídeos externos da sequência de DNA doador SD3, 2A-3A-4A_fw e 3C-4C_rv. Colônias potencialmente positivas, nas quais a modificação 2b ocorreu, deveriam apresentar uma banda no gel de aproximadamente 2600 pb; já colônias negativas deveriam apresentar uma banda de aproximadamente 1300 pb. Pelo resultado do gel de eletroforese (Figura 31), as colônias A15, A21, A23 a A26, B2, B11, B13 a B17 eram potencialmente positivas para a modificação 2b.

Figura 31 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3).



(A) e (B) Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias A1, A2, A4 a A6, A12 a A15, A21 a A26 provenientes da transformação da linhagem 434 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3). (C) Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias B2, B3, B5, B8 a B17 provenientes da transformação da linhagem 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD3). A seta vermelha indica as colônias potencialmente positivas, que podem ter passado pela edição genômica esperada (modificação 2b) com o sistema CRISPR-Cas9. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific).
Fonte: A autora.

O produto de PCR das colônias A15, A24 a A26, B2, B11, B13 a B15 foi sequenciado para confirmar a modificação 2b e os resultados são apresentados nas Figura 32 e 33. A Figura 32 mostra o resultado do sequenciamento da fita reversa da PCR de colônia da amostra A24 e um resultado semelhante foi obtido para as colônias A26, B2, B13 e B14. A Figura 33 mostra o resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia da amostra B15. Com isso e os resultados das PCRs de colônia, podemos concluir que a modificação 2b

foi realizada com sucesso nas linhagens 434 e 449. Assim, obtivemos as linhagens *B. subtilis* 434-2b e 449-2b.

Figura 32 – Resultado do sequenciamento da fita reversa da PCR de colônia da amostra A24.

Seq_1	763	TAAACAGTAACATCAACAGCAATAGAGCGATTTTAAAGCGTATTAAAGTTTCCTTGTCAT	704
Seq_2	9234	TAA-CAGTAACATCAACAGCAATAGAGCGATTTTAAAGCGTATTAAAGTTTCCTTGTCAT	9292
Seq_1	703	CGTATTGGAGACAAAGAAATTCATGTATTAGGTGATACTAAATCGGTTGTATTGCTATG	644
Seq_2	9293	CGTATTGGAGACAAAGAAATTCATGTATTAGGTGATACTAAATCGGTTGTATTGCTATG	9352
Seq_1	643	CCTATTAAATGAACAGTTTAAAAAGCAGTCTTAAATTAAGTAGAACCCATCTCTTTATCC	584
Seq_2	9353	CCTATTAAATGAACAGTTTAAAAAGCAGTCTTAAATTAAGTAGAACCCATCTCTTTATCC	9412
Seq_1	583	TTACCTATTGTTTGGTCGCAAGTTTTCGGTGTATAT-TCATTAAAAACGGTAATAGATTG	525
Seq_2	9413	TTACCTATTGTTTGGTCGCAAGTTTTCGGTGTATATATCATTAAAAACGGTAATAGATTG	9471
Seq_1	524	ACATTTGATCTCAATAAATTGGATTTTGTGCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTG	465
Seq_2	9472	ACATTTGATCTCAATAAATTGGATTTTGTGCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTG	9531
Seq_1	464	TTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAAATGGTTTGTGTATAA	405
Seq_2	9532	TTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAAATGGTTTGTGTATAA	9591
Seq_1	404	TAAATGTAGTATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAATAACTTTTACCCCTTTAACGGAT	345
Seq_2	9592	TAAATGTAGTATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAATAACTTTTACCCCTTTAACGGAT	9651
Seq_1	344	GCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGCATTTCAAATCTT	285
Seq_2	9652	GCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGCATTTCAAATCTT	9711
Seq_1	284	GCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAGCAGGCG	225
Seq_2	9712	GCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAGCAGGCG	9771
Seq_1	224	ATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGATGAAAAC	165
Seq_2	9772	ATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGATGAAAAC	9831
Seq_1	164	GGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCCTGTTGATATAAAACATACTGACACT	105
Seq_2	9832	GGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCCTGTTGATATAAAACATACTGACACT	9891
Seq_1	104	ACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTTCACAATGGAGCCGGGAGGAAACGAAGAAA	45
Seq_2	9892	ACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTTCACAATGGAGCCGGGAGGAAACGAAGAAA	9951

Parte do alinhamento de duas seqüências. A seqüência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento da fita reversa de DNA da PCR de colônia da amostra A24 e seqüência 2 (Seq_2) é parte do genoma de *B. subtilis* com a modificação 2b desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados o final da seqüência S0 (laranja), o promotor R6 (vermelho), o RBS 1 (rosa claro), e o início da seqüência parcial do gene *srfAA* (verde escuro). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

Figura 33 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia da amostra B15.

```

Seq_1 148 TATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGG 207
          |||
Seq_2 7619 TATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGG 7678

Seq_1 208 GGGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAA 267
          |||
Seq_2 7679 GGGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAA 7738

Seq_1 268 GACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATA 327
          |||
Seq_2 7739 GACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATA 7798

Seq_1 328 GTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTGAGCAATAAAAAAGAACTTTTAAAGTATGGGC 387
          |||
Seq_2 7799 GTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTGAGCAATAAAAAAGAACTTTTAAAGTATGGGC 7858

Seq_1 388 AATCAATTGCTCCTGTAAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGA 447
          |||
Seq_2 7859 AATCAATTGCTCCTGTAAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGCGGTTTGTGTATTGA 7918

Seq_1 448 GTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTT 507
          |||
Seq_2 7919 GTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAATATTT 7978

Seq_1 508 TTGAAATATCCCAAGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAAACATTCTTTTTCTCTT 567
          |||
Seq_2 7979 TTGAAATATCCCAAGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAA-CATTCTTTTTCTCTT 8037

```

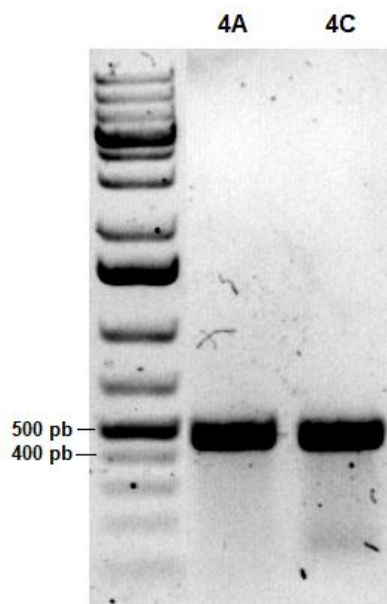
Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento da fita direta de DNA da PCR de colônia da amostra B15 e sequência 2 (Seq_2) é parte do genoma de *B. subtilis* com a modificação 2b desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados o final da sequência do gene *hxlR* com o terminador (vinho) e o início da sequência S0 (laranja). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

4.2.5. Modificação 2c

4.2.5.1. Desenho e obtenção do DNA doador SD4

Conforme descrito na metodologia, a sequência do promotor TP2 (sequência 4B) foi obtida como oligonucleotídeos, os quais foram anelados para formar uma fita dupla de DNA. As sequências flanqueadoras 4A e 4B foram amplificadas por PCR do genoma de *B. subtilis* 168. A Figura 34 mostra a eletroforese dos produtos de PCR, demonstrando que a amplificação ocorreu conforme o esperado.

Figura 34 – Resultado da eletroforese dos produtos de PCR das partes 4A, 4C do DNA doador SD4.



Resultado da eletroforese do produto de PCR da amplificação das partes 4A e 4C, de 400 e 420 pb, respectivamente. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

4.2.5.2. Construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) e clonagem em *E. coli*

Uma vez que as três partes da sequência do DNA doador SD4 foram obtidas, seguiu-se o protocolo adaptado de An *et al.* (2010) para clonagem delas no plasmídeo pJOE8999(SD2). Conforme descrito no tópico 3.3.3.2 da metodologia, o primeiro passo foi realizar na mesma reação a digestão das partes 4A, 4B e 4C com a enzima de digestão *Bsa*I e a ligação com a enzima T4 DNA Ligase. Esta etapa visa transformar os três insertos em um, ou seja, a sequência SD4, porém a reação também resulta na ligação inespecífica de algumas partes. Tendo isto em vista, o produto da reação de digestão e ligação foi analisado em eletroforese e apenas a banda de interesse de 951 pb foi purificada do gel.

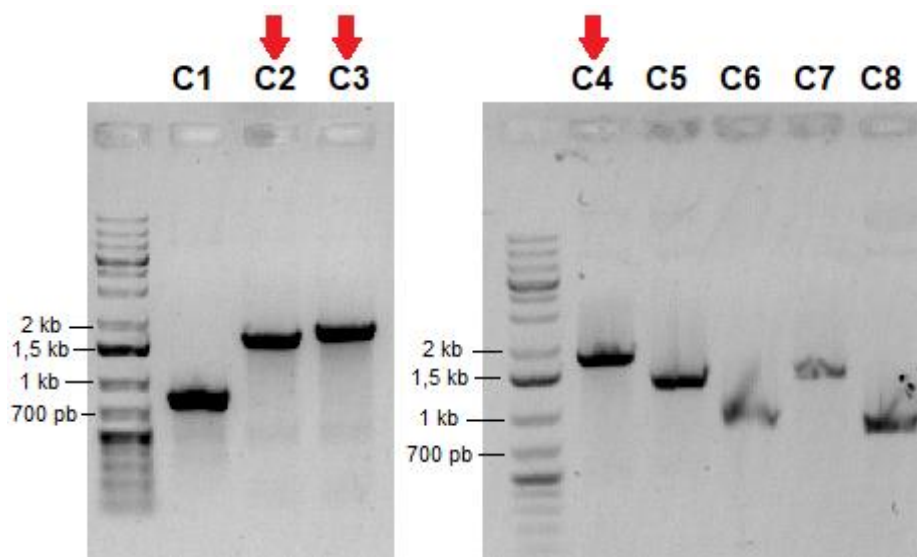
A sequência de DNA doador SD4 foi então digerida com a enzima de restrição *Sfi*I e ligada ao plasmídeo pJOE8999(SG2) digerido com a mesma enzima. Foram testadas três proporções (plasmídeo:inserto) na reação de ligação: 1:4, 1:5 e 1:10. Tanto as reações de ligação quanto do controle foram transformadas em *E. coli* JM109.

Para a proporção 1:4, foi obtida uma colônia na transformação da reação de ligação e uma colônia na transformação do controle. Para as proporções 1:5 e 1:10, foram obtidas, respectivamente, 20 e 9 colônias nas transformações das reações de ligação e 10 colônias na

transformação do controle. Considerando a diferença do número de colônias entre a transformação de ligação e do controle, a reação na proporção 1:5 apresentava mais chances de colônias positivas. Então, 8 colônias da transformação da reação de ligação na proporção 1:5 foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas a 37°C por 12 horas.

No dia seguinte, os plasmídeos foram extraídos das culturas e utilizados em reações de PCR com os oligonucleotídeos de sequenciamento pJOE8999.seq-fw e pJOE8999.seq-rv. Os produtos das reações de PCR foram avaliados em eletroforese e a Figura 35 mostra os resultados. No caso do inserto SD4 ter sido ligado com sucesso ao plasmídeo pJOE8999(SG2), seria observada uma banda de aproximadamente 1700 pb. Caso contrário, seria observada uma banda de aproximadamente 790 pb. Sendo assim, temos que as amostras C2, C3 e C4 eram potencialmente positivas.

Figura 35 – Resultado de eletroforese dos produtos de PCR das amostras C1 a C8 provenientes da tentativa de construção do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).



Produto de PCR amostras C1 a C8, as quais são plasmídeos clonados e extraídos de colônias de *E. coli* JM109 após a transformação com a reação de ligação do inserto SD4 ao plasmídeo pJOE8999(SG2). A seta indica resultado potencialmente positivo, ou seja, amostras em que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) foi construído. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). **Fonte:** A autora.

Os produtos de PCR das amostras C2, C3 e C4 foram sequenciados e o resultado do sequenciamento da amostra C3 é apresentado na Figura 36, o resultado do sequenciamento da amostra C4 foi similar, confirmando que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) foi construído com sucesso e clonado em *E. coli* JM109.

É interessante ressaltar que a amostra C2 também foi sequenciada, contudo, o resultado mostrou que as partes 4A e 4C ligaram-se sem a parte 4B da sequência SD4 durante a reação de digestão e ligação e que a purificação do produto desta reação do gel de eletroforese não eliminou os produtos inespecíficos de tamanho próximo a 950 pb, assim, alguns destes produtos ligaram-se ao plasmídeo. Observando a Figura 35 novamente, podemos supor que o mesmo aconteceu com as amostras C5 e C7.

Figura 36 – Resultado de sequenciamento de DNA da fita direta do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).

```

Seq_1  41  ATTAACAAACATTGATTCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCT  100
      |||
Seq_2  7501 ATTAACAAACATTGATTCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCT  7560

Seq_1  101  TGAGCAGGATATGATTGTTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATA  160
      |||
Seq_2  7561  TGAGCAGGATATGATTGTTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATA  7620

Seq_1  161  TTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGG  220
      |||
Seq_2  7621  TTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGG  7680

Seq_1  221  GAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAAATCGTTGTAAGA  280
      |||
Seq_2  7681  GAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAAATCGTTGTAAGA  7740

Seq_1  281  CGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTGCCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGT  340
      |||
Seq_2  7741  CGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTGCCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGT  7800

Seq_1  341  CATGTAAAGATTGTAAATTGCATTAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGTT  400
      |||
Seq_2  7801  CATGTAAAGATTGTAAATTGCATTAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGTT  7860

Seq_1  401  GACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACTT  460
      |||
Seq_2  7861  GACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACTT  7920

Seq_1  461  AACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAAGAGGAGATATACATATGGAATAAATTTTTTACC  520
      |||
Seq_2  7921  AACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAGAGAGGAGATATACATATGGAATAAATTTTTTACC  7980

Seq_1  521  CTTTAACGGATGCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTTATCCTCACACGAGCA  580
      |||
Seq_2  7981  CTTTAACGGATGCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTTATCCTCACACGAGCA  8040

Seq_1  581  TTTCAAATCTTGCAGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTG  640
      |||
Seq_2  8041  TTTCAAATCTTGCAGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTG  8100

Seq_1  641  TTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGC  700
      |||
Seq_2  8101  TTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGC  8160

Seq_1  701  TAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAAC  760
      |||
Seq_2  8161  TAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAAC  8220

Seq_1  761  ATACTGACACTACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTCACAATGGAGCCCGGCA  820
      |||
Seq_2  8221  ATACTGACACTACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTCACAATGGAGCC---GGG  8277

```

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) foi obtida como resultado do sequenciamento da fita reversa de DNA da amostra C3, um plasmídeo clonado e extraído de *E. coli* JM109 e sequência 2 (Seq_2) é plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados a sequência parcial do gene *hxlR* (roxo), o promotor TP2 (azul escuro), o RBS 2 (amarelo) e a sequência parcial do gene *srfAA* (verde escuro). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

4.2.5.3. Transformação do plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) em *B. subtilis*

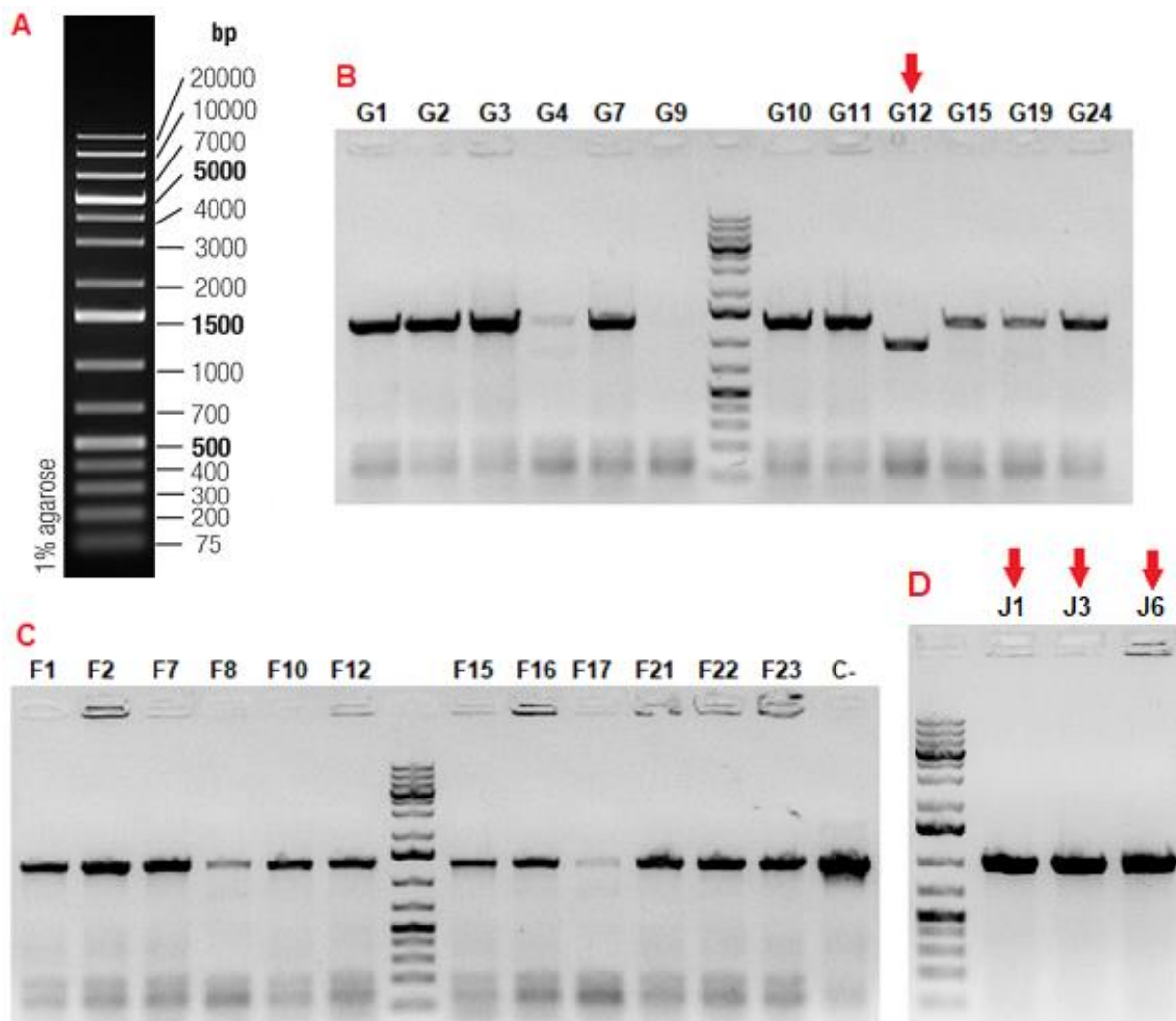
Assim que o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) foi construído, ele foi transformado nas linhagens *B. subtilis* 434 e 449, seguindo o protocolo de edição gênica pelo Sistema CRISPR-Cas9 adaptado de Altenbuchner (2016). Após o período de incubação de dois dias a 30°C, foram coletadas 24 colônias de cada transformação, as quais foram nomeadas G1 a G24 para aquelas provenientes da transformação da linhagem 434 e F1 a F24 para aquelas provenientes da transformação da linhagem 449.

As colônias seguiram para as etapas de perda do plasmídeo por incubação a 44°C e confirmação. Como foi feito para as outras modificações, realizamos a PCR de colônia daquelas que sobreviveram a incubação a 44°C e perderam o plasmídeo; foram utilizados os oligonucleotídeos das extremidades da sequência de DNA doador SD4, 2A-3A-4A_fw e 3C-4C_rv. As Figuras 37-B e 37-C mostram o resultado da eletroforese dos produtos da PCR de colônia das amostras G1 a G4, G7, G9 a G12, G15, G19, G24, F1, F2, F7, F8, F10, F12, F15 a F17, F21 a F23.

As colônias que sofreram a modificação 2c deveriam apresentar uma banda de aproximadamente 950 pb, referente à substituição do promotor P_{srfA} pelo promotor TP2 no controle do operon *srfA*. Se a substituição do promotor não ocorreu, seria observada uma banda de aproximadamente 1300 pb. Com isso, apenas a colônia G12 foi potencialmente positiva (Figura 37-B). Como não foi obtida nenhuma colônia positiva dentre as testadas para a transformação da linhagem 449 (Figura 37-C), foram testadas também outras oito colônias da mesma transformação. Mesmo assim não obtivemos resultados positivos.

A transformação da linhagem 449 foi então repetida com plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4) extraído no mesmo dia para aumentar a chance de sucesso. Seguindo o protocolo, as placas contendo a transformação foram incubadas a 30°C por dois dias e, após este período, nove colônias (J1 a J9) foram selecionadas para seguir para a etapa de perda do plasmídeo. As colônias J1, J3 e J6 perderam o plasmídeo após incubação a 45°C por um dia e foram testadas por PCR de colônia para confirmar a modificação 2c na linhagem 449. É possível observar na Figura 37-D, que mostra o resultado da eletroforese dos produtos da PCR de colônia, que as três colônias apresentaram a banda esperada de aproximadamente 950 pb e, com isso, eram potencialmente positivas para a modificação 2c.

Figura 37 – Resultado da eletroforese da PCR de colônia das colônias provenientes da transformação das linhagens 434 e 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4).



(A) Padrão de bandas marcador de DNA: Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). (B) Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias G1 a G4, G7, G9 a G12, G15, G19 e G24 provenientes da transformação da linhagem 434 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4). (C) Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias F1, F2, F7, F8, F10, F12, F15 a F17, F21 a F23 provenientes da primeira transformação da linhagem 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4). A amostra C- é referente à PCR do controle negativo (DNA genômico de *B. subtilis* 168). (D) Resultado da eletroforese das PCRs de colônia das colônias J1, J3 e J6 provenientes da segunda transformação da linhagem 449 com o plasmídeo pJOE8999(SG2+SD4). A seta vermelha indica as colônias potencialmente positivas, que podem ter passado pela edição genômica esperada (modificação 2c) com o sistema CRISPR-Cas9. Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL). **Fonte:** A autora.

Através do sequenciamento de DNA dos produtos de PCR de colônia das colônias G12, J1, J3 e J6, foi confirmada a modificação 2c nas linhagens 434 e 449, dando origem às linhagens 434-2c e 449-2c. A Figura 38 evidencia a substituição do promotor P_{srfA} pelo

promotor TP2 na regulação do operon *srfA* no genoma das colônias G12 e J6; o mesmo resultado foi observado no sequenciamento de DNA das colônias J1 e J3.

Figura 38 – Resultado do sequenciamento da fita direta da PCR de colônia das amostras G12 e J6.

A	Seq_1	43	AATTAAAAACATTGATTCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGC	102
	Seq_2	7500	AATTAAAAACATTGATTCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGC	7559
	Seq_1	103	TTGAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAAT	162
	Seq_2	7560	TTGAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAAT	7619
	Seq_1	163	ATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGG	222
	Seq_2	7620	ATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGG	7679
	Seq_1	223	GGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAG	282
	Seq_2	7680	GGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAG	7739
	Seq_1	283	ACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGGTACACATAG	342
	Seq_2	7740	ACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGGTACACATAG	7799
	Seq_1	343	TCATGTAAGATTGTAAATTGCATTGAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGT	402
	Seq_2	7800	TCATGTAAGATTGTAAATTGCATTGAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGT	7859
	Seq_1	403	TGACATTCAAAACAAATATGGTATAATGCCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACT	462
	Seq_2	7860	TGACATTCAAAACAAATATGGTATAATGCCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACT	7919
	Seq_1	463	TAACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAAGAGGAGATATACATATGGAAATAACTTTTTAC	522
	Seq_2	7920	TAACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAAGAGGAGATATACATATGGAAATAACTTTTTAC	7979
	Seq_1	523	CCTTTAACGGATGCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGC	582
	Seq_2	7980	CCTTTAACGGATGCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGC	8039
	Seq_1	583	ATTTCAAATCTTGCAGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTT	642
	Seq_2	8040	ATTTCAAATCTTGCAGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTT	8099
	Seq_1	643	GTTGAGCAG-CGATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGG	701
	Seq_2	8100	GTTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGG	8159
	Seq_1	702	CTAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAA	761
	Seq_2	8160	CTAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAA	8219

B

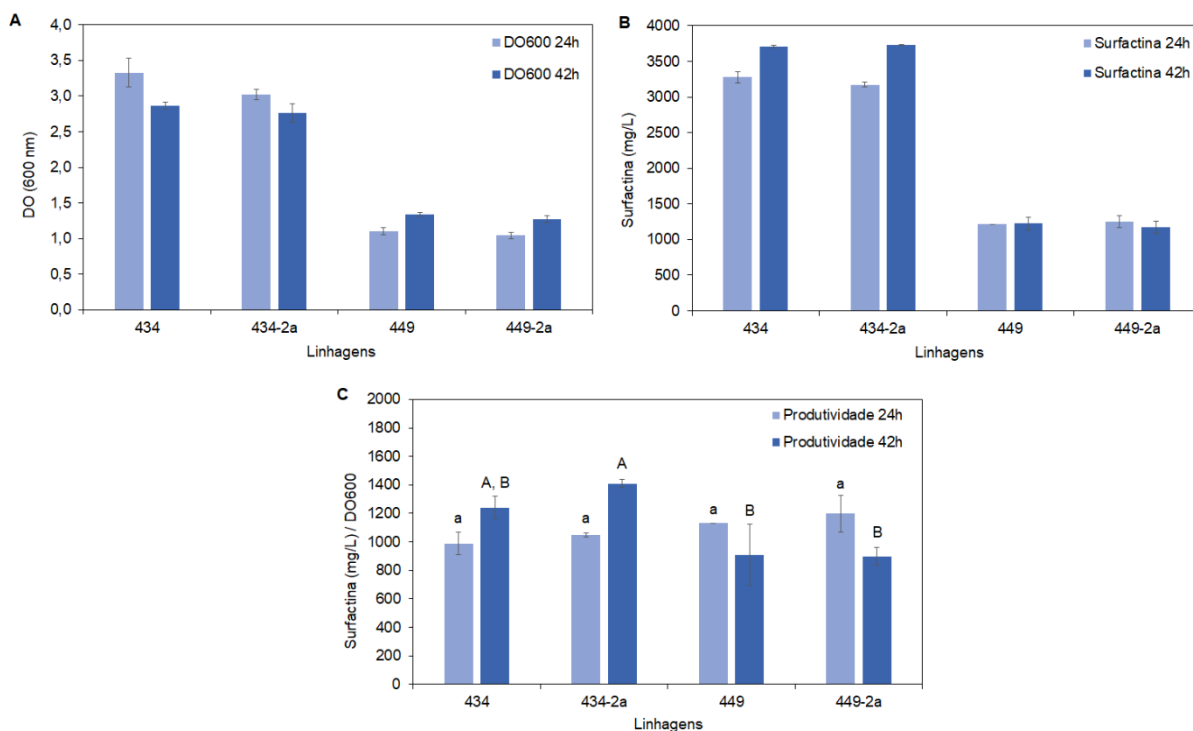
Seq_1	36	AATTAAAAACATTGATTCTGTATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGC	95
Seq_2	7500	AATTAAAAACATTGATTCTGTATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGC	7559
Seq_1	96	TTGAGCAGGATATGATTGTTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAAT	155
Seq_2	7560	TTGAGCAGGATATGATTGTTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAAT	7619
Seq_1	156	ATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGG	215
Seq_2	7620	ATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGG	7679
Seq_1	216	GGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAG	275
Seq_2	7680	GGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAG	7739
Seq_1	276	ACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAG	335
Seq_2	7740	ACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTCGCTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAG	7799
Seq_1	336	TCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTTCAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGT	395
Seq_2	7800	TCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTTCAGCAATAAAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGT	7859
Seq_1	396	TGACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACT	455
Seq_2	7860	TGACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAGTGTGACAACT	7919
Seq_1	456	TAACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAAGAGGAGATATACATATGGAAATAACTTTTTAC	515
Seq_2	7920	TAACTCAGATCTGGTATAATAGAAAAGAGGAGATATACATATGGAAATAACTTTTTAC	7979
Seq_1	516	CCTTTAACGGATGCACAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGC	575
Seq_2	7980	CCTTTAACGGATGCACAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTATCCTCACACGAGC	8039
Seq_1	576	ATTTCAAATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTT	635
Seq_2	8040	ATTTCAAATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTT	8099
Seq_1	636	GTTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGG	695
Seq_2	8100	GTTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGG	8159
Seq_1	696	CTAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCCTGTTGATATAAA	755
Seq_2	8160	CTAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCC-TGTTGATATAAA	8218

Parte do alinhamento de duas sequências. A sequência 1 (Seq_1) é resultado do sequenciamento da fita direta de DNA da PCR de colônia da (A) amostra G12 e (B) amostra J6. Em ambas as figuras, a sequência 2 (Seq_2) é parte do genoma de *B. subtilis* com a modificação 2c desenhado *in silico*. Na Seq_2 são destacados a sequência parcial do gene *hxlR* (roxo), o promotor TP2 (azul escuro), o RBS 2 (amarelo) e a sequência parcial do gene *srfAA* (verde escuro). **Fonte:** A autora, com auxílio do software Serial Cloner.

4.2.6. Produção de surfactina por *B. subtilis* após a modificação 2

O primeiro teste de produção de surfactina após a modificação 2 foi realizado com as linhagens *B. subtilis* 434, 434-2a, 449 e 449-2a, onde comparamos o crescimento e a produção de surfactina entre as linhagens com as modificações 1 e 2a. O cultivo foi realizado em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata, os quais foram incubados a 37°C com agitação de 220 rpm por 42 horas. Foram retiradas amostras de 1 mL nos pontos de 24 e 42 horas, com as quais foram avaliadas a densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) e a produção de surfactina. Esta última foi quantificada pelo método colorimétrico baseado em CPC-BTB. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 39.

Figura 39 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 434, 434-2a, 449 e 449-2a durante cultivo de 42 horas.



Cultivo realizado com as linhagens 434, 434-2a, 449 e 449-2a em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm por 42 horas. **(A)** crescimento celular quantificado a partir da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). **(B)** Produção de surfactina quantificada pelo método colorimétrico CPC-BTB nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). **(C)** Produtividade das linhagens calculada pela razão entre a produção de surfactina (mg/L) e o crescimento celular (DO₆₀₀), nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). A análise estatística dos dados de produtividade foi realizada com teste ANOVA com um fator e método de Tukey, ambos com 95% de confiabilidade. As letras acima das colunas no gráfico indicam o agrupamento das amostras estatisticamente semelhantes de acordo com o método de Tukey. Letras minúsculas significam agrupamentos entre os pontos de 24 horas e letras maiúsculas, pontos de 42 horas. Se as amostras não compartilham uma letra, são significativamente diferentes. **Fonte:** A autora.

Pode-se observar na Figura 39 que a modificação 2a não aumentou significativamente a produção de surfactina comparada às linhagens base e o mesmo pode ser dito para o crescimento celular. Algumas justificativas para estes resultados são que o promotor P_{srfA} ainda está presente na regulação do operon *srfA*, portanto, pode estar sofrendo repressão de moléculas, como a proteína AbrB e seu análogo Abh ou a proteína CodY, que se ligam a ele e impedem a ligação da RNA polimerase (GEISSLER *et al.*, 2019), o que também afeta a atividade do promotor R6 localizado a montante do P_{srfA} . Há também a possibilidade de as linhagens terem atingido sua capacidade máxima de produção de surfactina até que sejam realizadas edições gênicas para aumentar a resistência das células e sua capacidade de

exportar o biossurfactante para o meio extracelular (planejado para projetos futuros). Observa-se também que, apesar de as linhagens 434 e 434-2a alcançarem aproximadamente 3700 mg/L de surfactina em 42 horas de cultivo, enquanto as linhagens 449 e 449-2a alcançaram aproximadamente 1200 mg/L, neste cultivo a produtividade (surfactina/DO₆₀₀) das quatro linhagens não apresentou diferença significativa (Figura 39-C). Tal fato indica que a capacidade de produção individual das células é a mesma, sendo a produção total apenas afetada pela quantidade de células no cultivo de cada linhagem.

O trabalho de Jiao *et al.* (2017) se destaca pelo aumento da produção de surfactina após a substituição do promotor P_{srfA} na regulação do operon *srfA* de biossíntese de surfactina. O promotor P_{srfA} foi substituído pelo promotor sintético Pg3, induzível por IPTG, na linhagem *B. subtilis* THY-7. Com isso, Jiao *et al.* (2017) alcançou o título de surfactina de 8,61 g/L em frascos de 500 mL com 100 mL de cultura e no cultivo em reator de 5 L alcançou 9,74 g/L com produtividade de 0,30 g/L·h. É importante mencionar que Jiao *et al.* (2017) utilizou o meio de cultura PW, porém utilizou sacarose (70 g/L) ao invés de glicose (60 g/L) como fonte de carbono.

Baseado no resultado de Jiao *et al.* (2017), acreditávamos que o promotor P_{srfA} poderia ser substituído na regulação do operon *srfA* sem prejuízo à produção de surfactina, dependendo da força do promotor escolhido. Assim, realizamos as modificações 2b e 2c nas linhagens 434 e 449.

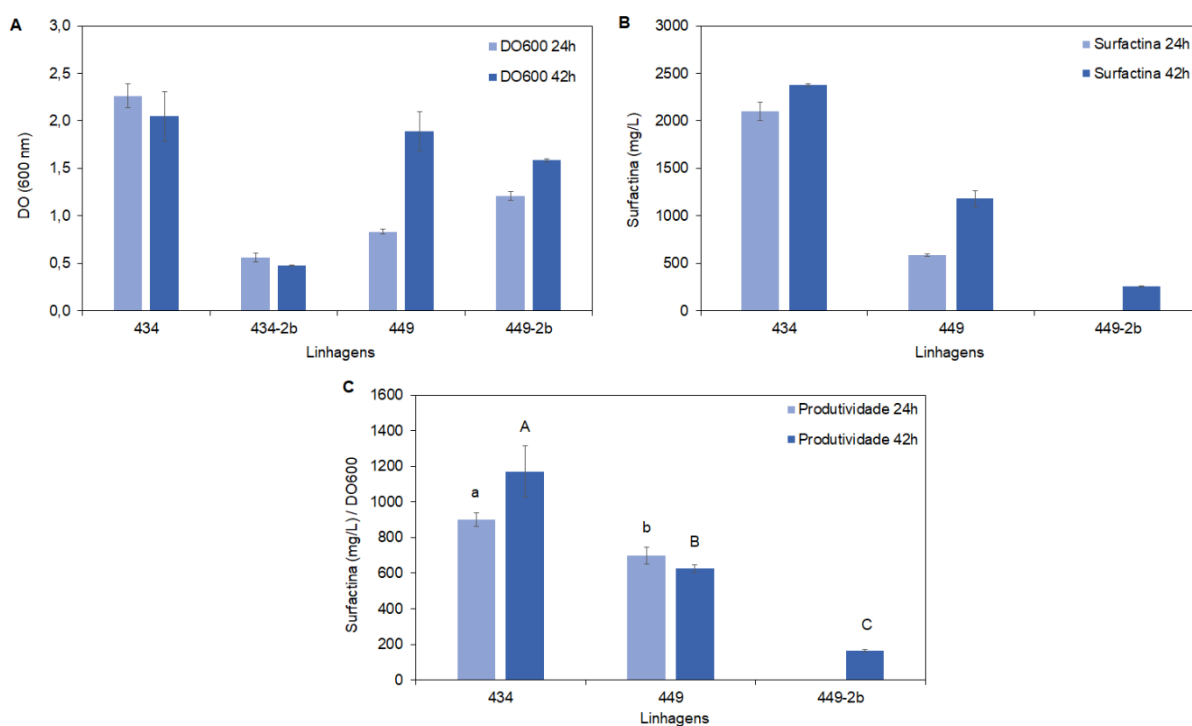
Vale ressaltar que, apesar da modificação 2c consistir na substituição do promotor P_{srfA} pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2, o operon *srfA* continua a ser regulado por promotores induzíveis após modificações 2a e 2b. Contudo, diferente de Jiao *et al.* (2017) que utilizou promotores induzíveis por IPTG, os promotores utilizados neste estudo, P_{srfA} e R6, são induzíveis por moléculas provenientes do metabolismo celular. Isto é uma vantagem se pensarmos no aumento de escala da produção, pois não será necessário adicionar moléculas indutoras externas ao cultivo.

Os resultados do primeiro cultivo realizado para comparar a produção das linhagens com a modificação 2b e as linhagens base são apresentados na Figura 40. As condições de cultivo e análises das amostras foram as mesmas descritas para o cultivo anterior. Observa-se na Figura 40 que a linhagens 434 apresentou um crescimento menor do que no cultivo anterior (Figura 39-A), porém manteve a sua produtividade. Já a linhagem 434-2b apresentou crescimento muito reduzido e não produziu surfactina em níveis detectáveis. A linhagem 449

apresentou um bom crescimento, porém isto não foi refletido na sua produção de surfactina e, consequentemente, sua produtividade que foi menor comparada ao cultivo anterior (Figura 39-C). Por sua vez, a linhagem 449-2b apresentou um nível crescimento próximo à sua linhagem base, mas a sua produtividade foi muito reduzida, cerca de 3,8 vezes menor que a linhagem 449 e não produziu níveis detectáveis de surfactina no ponto de 24 horas de cultivo.

Com base nestes resultados, temos indicações de que a modificação 2b reduziu os níveis de produção de surfactina da linhagem 449. Porém, isto não ficou claro para a linhagem 434, já que a linhagem 434-2b não alcançou o crescimento suficiente para que a sua produção de surfactina fosse detectada pelo método colorimétrico CPC-BTB. Desta forma, realizamos mais testes de cultivo.

Figura 40 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 434, 434-2b, 449 e 449-2b durante cultivo de 42 horas.

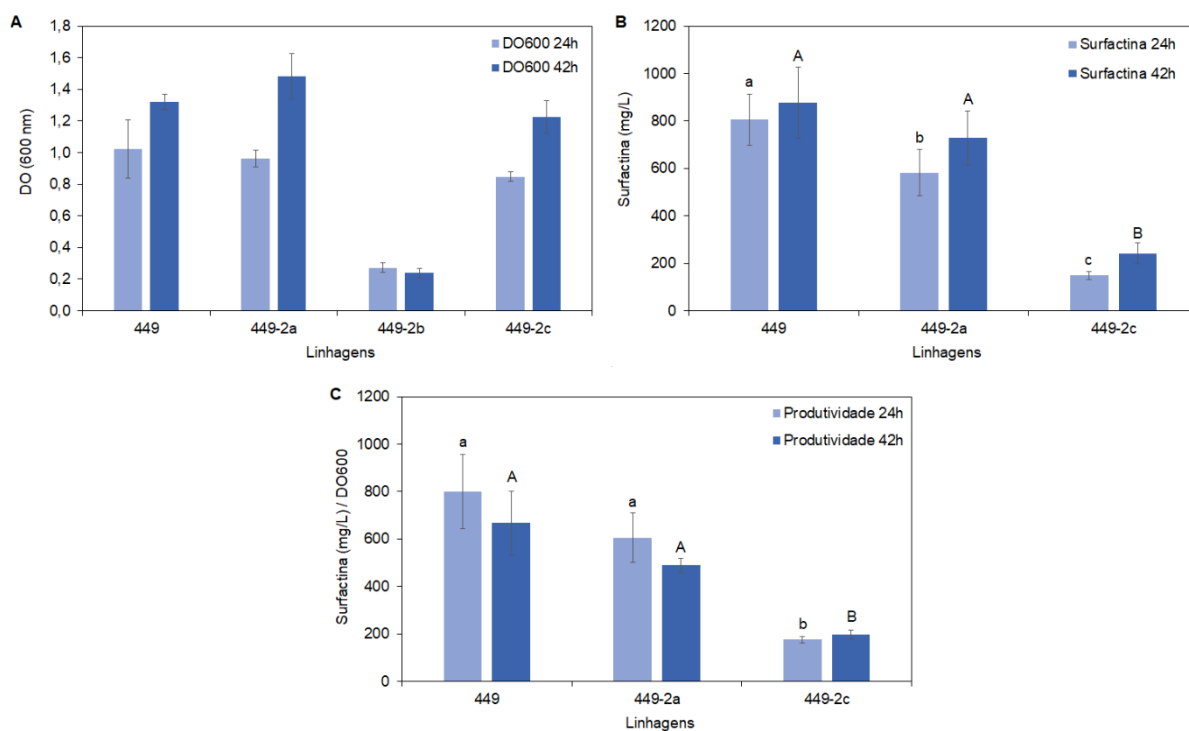


Cultivo realizado com as linhagens 434, 434-2b, 449 e 449-2b em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm por 42 horas. **(A)** crescimento celular quantificado a partir da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). **(B)** Produção de surfactina quantificada pelo método colorimétrico CPC-BTB nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). A linhagem 434-2b e a linhagem 449-2b (ponto de 24 h) não produziram surfactina em níveis detectáveis pelo método colorimétrico CPC-BTB, portanto seus resultados não são representados neste gráfico. **(C)** Produtividade das linhagens calculada pela razão entre a produção de surfactina (mg/L) e o crescimento celular (DO₆₀₀), nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). Como as linhagens 434-2b e 449-2b (ponto de 24 h) não produziram surfactina em níveis detectáveis, seus resultados de produtividade são nulos e não foram representados no gráfico. A análise estatística dos dados de produtividade foi realizada com teste ANOVA com um fator e método de Tukey, ambos com

95% de confiabilidade. As letras acima das colunas no gráfico indicam o agrupamento das amostras estatisticamente semelhantes de acordo com o método de Tukey. Letras minúsculas significam agrupamentos entre os pontos de 24 horas e letras maiúsculas, pontos de 42 horas. Se as amostras não compartilham uma letra, são significativamente diferentes. **Fonte:** A autora.

O cultivo seguinte foi realizado apenas entre a linhagem 449 e suas derivadas, ou seja, linhagens 449-2a, 449-2b e 449-2c, em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata. Os tubos foram incubados a 37°C com agitação de 220 rpm por 42 horas. Novamente, foram retiradas amostras nos pontos de 24 e 42 horas para avaliar o crescimento celular por DO₆₀₀ e a produção de surfactina pelo método CPC-BTB. Os resultados são apresentados na Figura 41, onde observamos que as linhagens 449, 449-2a e 449-2c apresentaram crescimento similar, porém produtividades diferentes, sendo a linhagem 449 a melhor delas. A linhagem 449-2b repetiu o padrão de cultivo da linhagem 434-2b no cultivo anterior (Figura 40), não sendo possível detectar sua produção de surfactina em nenhum dos pontos do cultivo.

Figura 41 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens 449, 449-2a, 449-2b e 449-2c durante cultivo de 42 horas.

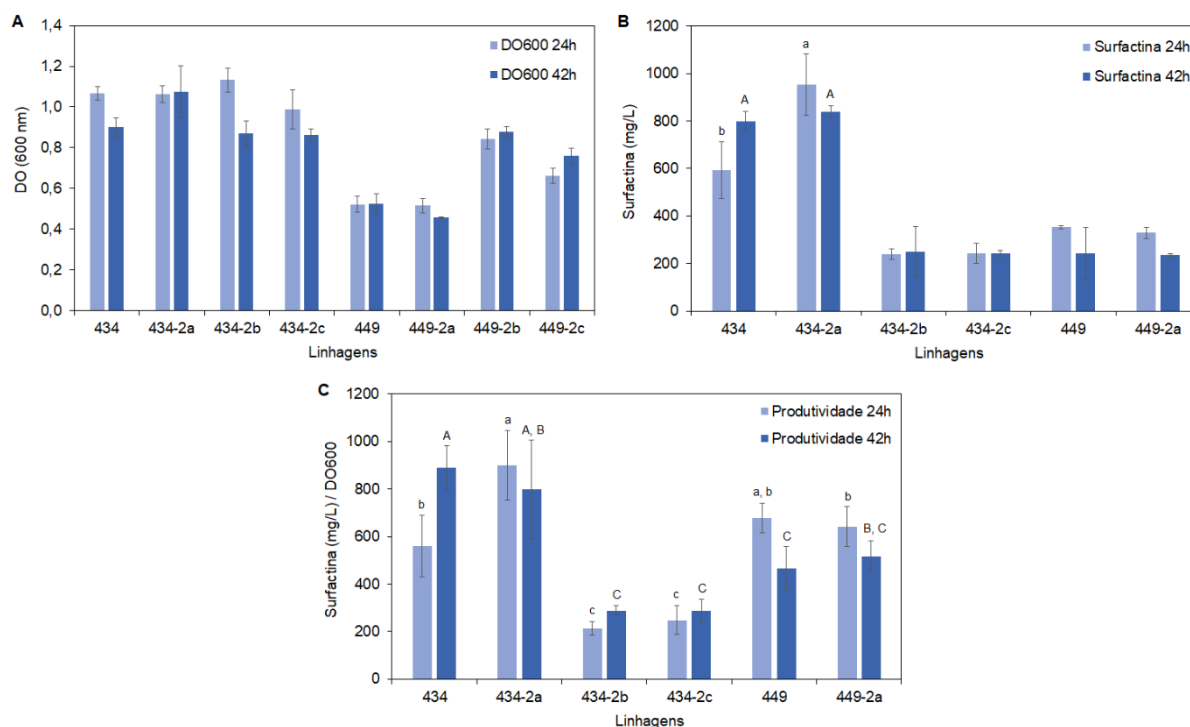


Cultivo realizado com as linhagens 449, 449-2a, 449-2b e 449-2c em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 12 mL de meio PW, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm por 42 horas. **(A)** crescimento celular quantificado a partir da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). **(B)** Produção de surfactina quantificada pelo método colorimétrico CPC-BTB nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). A linhagem 449-2b não produziu surfactina em níveis detectáveis pelo método colorimétrico CPC-BTB,

portanto seus resultados não são representados neste gráfico. **(C)** Produtividade das linhagens calculada pela razão entre a produção de surfactina (mg/L) e o crescimento celular (DO_{600}), nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). Como a linhagens 449-2b não produziu surfactina em níveis detectáveis, seus resultados de produtividade são nulos e não foram representados no gráfico. A análise estatística dos dados de produtividade foi realizada com teste ANOVA com um fator e método de Tukey, ambos com 95% de confiabilidade. As letras acima das colunas no gráfico indicam o agrupamento das amostras estatisticamente semelhantes de acordo com o método de Tukey. Letras minúsculas significam agrupamentos entre os pontos de 24 horas e letras maiúsculas, pontos de 42 horas. Se as amostras não compartilham uma letra, são significativamente diferentes. **Fonte:** A autora.

A instabilidade do crescimento das linhagens com a modificação 2b nos cultivos de 12 mL em tubos de ensaio (Figuras 40 e 41), nos fez suspeitar dos parâmetros de cultivo, uma vez que ambas as linhagens 434-2b e 449-2b cresciam bem nos pré-inóculos com 5 mL de meio PW em tubos de ensaio, mas não cresciam nos cultivos com 12 mL. Acreditamos então que a menor aeração nos cultivos de maior volume fosse parte do problema. Assim, realizamos o último cultivo, cujos resultados são apresentados na Figura 42, em que mantivemos as condições dos cultivos anteriores: incubação em shaker a 37°C e 220 rpm por 42 horas, porém reduzimos o volume de meio PW para 6 mL. Neste cultivo, comparamos as quatro modificações (1, 2a, 2b e 2c) realizadas nas linhagens 434 e 449.

Figura 42 – Crescimento celular, produção de surfactina e produtividade das linhagens de *B. subtilis* 434 e 449 e derivadas durante cultivo de 42 horas.



Cultivo realizado com as linhagens 434, 434-2a, 434-2b, 434-2c, 449, 449-2a, 449-2b e 449-2c em tubos de ensaio (20 x 150 mm; D x A) com 6 mL de meio PW, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C sob agitação de 220 rpm por 42 horas. **(A)** crescimento celular quantificado a partir da densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). **(B)** Produção de surfactina quantificada pelo método colorimétrico CPC-BTB nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). A linhagem 449-2b não produziu surfactina em níveis detectáveis pelo método colorimétrico CPC-BTB, portanto seus resultados não são representados neste gráfico. **(C)** Produtividade das linhagens calculada pela razão entre a produção de surfactina (mg/L) e o crescimento celular (DO₆₀₀), nos pontos de 24 horas (azul claro) e 42 horas (azul escuro). Como a linhagens 449-2b não produziu surfactina em níveis detectáveis, seus resultados de produtividade são nulos e não foram representados no gráfico. A análise estatística dos dados de foi realizada com teste ANOVA com um fator e método de Tukey, ambos com 95% de confiabilidade. As letras acima das colunas nos gráficos indicam o agrupamento das amostras estatisticamente semelhantes de acordo com o método de Tukey. Letras minúsculas significam agrupamentos entre os pontos de 24 horas e letras maiúsculas, pontos de 42 horas. Se as amostras não compartilham uma letra, são significativamente diferentes. **Fonte:** A autora.

Os resultados da Figura 42 nos mostram que o aumento da aeração durante o cultivo, prejudicou o crescimento e produção de surfactina das linhagens que possuem o promotor *P_{srfA}* na regulação do operon *srfA* (linhagens 434, 434-2a, 449 e 449-2a), inclusive a sua produtividade foi reduzida em comparação aos cultivos apresentados anteriormente. Podemos observar também que não há diferença significativa entre a produção de surfactina pelas linhagens 434 e 434-2a e 449 e 449-2a no ponto de 42 horas, corroborando os resultados do primeiro cultivo (Figura 39). Por outro lado, o aumento da aeração beneficiou o crescimento

das linhagens em que o promotor P_{srfA} foi substituído pelos promotores R6 ou TP2 na regulação do operon *srfA* (linhagens 434-2b, 449-2b, 434-2c e 449-2c), ainda assim, isto não aumentou a produção de surfactina por estas linhagens. No caso das linhagens 434-2b e 434-2c, suas produtividades foram cerca de 3 vezes menores que a produtividade da linhagem base. Já as linhagens 449-2b e 449-2c não produziram surfactina em níveis detectáveis pelo método colorimétrico CPC-BTB durante o cultivo.

Os resultados obtidos durante estes três últimos cultivos, indicam que a substituição do promotor P_{srfA} nas linhagens 434 e 449, tanto através da modificação 2b quanto da modificação 2c, afetaram o crescimento celular e prejudicaram a produção de surfactina. Desta forma, as linhagens com estas modificações não serão mantidas para projetos futuros.

Trabalhos que substituíram o promotor P_{srfA} por promotores constitutivos, como P_{groE} ou P_{veg} , também relataram diminuição na produção de surfactina em suas linhagens (JIAO *et al.* 2017; WILLENBACHER *et al.*, 2016), assim como ocorreu neste trabalho com o uso do promotor duplo sintético constitutivo TP2, desenvolvido e classificado como forte por Liu *et al.* (2018). Uma possível justificativa para isto é a toxicidade da surfactina para as células bacterianas. Entretanto, não esperávamos que a substituição do promotor P_{srfA} pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica fosse prejudicar a produção de surfactina como aconteceu com as linhagens 434-2b e 449-2b, pois Corrêa *et al.* (2020) demonstrou que promotor sintético R6 foi mais forte que o promotor P_{srfA} na transcrição do operon *luxABCDE* da luminescência.

Apesar de sofrer repressão de diversas proteínas, como AbrB, CodY, SpX, SinI, Rap e PerR, algumas cujos mecanismos de ação ainda não são claros, o promotor P_{srfA} pode ser regulado positivamente por outras proteínas como ComA e DegU fosforiladas ou o peptídeo CSF (HAYASHI *et al.*, 2005; CHUMSAKUL *et al.*, 2011; ZHI *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2019). Isto evidencia a complexidade da regulação do promotor P_{srfA} que é influenciada por diversas rotas metabólicas de *B. subtilis* e isto pode ser parte do motivo pelo qual substituir o promotor P_{srfA} no controle do operon *srfA* nas linhagens deste projeto prejudicou sua produção de surfactina. Desta forma, a deleção de alguns genes que codificam as proteínas repressoras e superexpressão das proteínas ativadoras deste promotor pode levar a melhores resultados de produção de surfactina pelas linhagens derivadas de *B. subtilis* 434 e 449 e pretendemos trabalhar nisto em projetos futuros.

Outra hipótese para justificar os resultados observados com as modificações 2b e 2c é o contexto genético. Isto é, resultados de análises de força de um promotor para a expressão de um gene em determinada região do genoma podem não ser reprodutíveis quando este promotor é inserido em outra região ou em uma linhagem diferente daquela testada. A variação genética da linhagem pode interferir nas condições e taxas de crescimento, bem como na quantidade de RNA polimerases ou ribossomos disponíveis para expressão do gene de interesse. Enquanto a inserção do promotor em uma região diferente do genoma pode levar a formação de estruturas não previstas, como terminadores e sítios de ligação de proteínas reguladoras (BROPHY; VOIGT, 2014).

Finalmente, a análise estatística apresentada dos cultivos realizados em tubos de ensaio não mostrou diferença significativa entre a produtividade das linhagens 434 e 434-2a e 449 e 449-2a no ponto de 42 horas. Porém, a análise da produção e da produtividade com 24 horas de cultivo mostra resultados melhores para a linhagem 434-2a, indicando uma antecipação da produção promovida pelo sistema sintético de autoindução (Figura 42-C). Neste período, a linhagem 434-2a atingiu a produtividade de 39,72 mg/L·h de surfactina em comparação a 24,70 mg/L·h alcançados pela linhagem 434. Se a antecipação da produção pela linhagem 434-2a se mantiver durante os testes de aumento de escala, isto seria uma vantagem para seu uso industrial, uma vez que o menor tempo de cultivo reduz os custos de produção.

Os resultados obtidos até o momento para as linhagens 434, 434-2a, 449 e 449-2a indicam que mais testes precisam ser realizados para definir a melhor produtora. Desta forma, as quatro linhagens serão mantidas até que projetos futuros sejam capazes de esclarecer, com o aumento de escala e talvez alteração das condições de cultivo, os resultados que observamos neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

Após reproduzir e adaptar protocolos descritos na literatura para edição gênica de *B. subtilis* pelo sistema CRISPR-Cas9, comprovamos a facilidade e eficiência deste sistema para a realização de modificações genômicas nas linhagens utilizadas neste trabalho. Como esperado, a técnica de CRISPR-Cas9 mostrou-se uma ferramenta muito útil para a Biologia Sintética e que pode facilmente sobrepor técnicas de edição genômica usuais, sem a necessidade de introduzir marcas de seleção ou sequências extras de DNA no genoma bacteriano.

Utilizando este sistema de edição genômica foi possível construir não somente uma, mas três linhagens produtoras de surfactina e outras seis linhagens derivadas. A modificação do gene *sfp* nas linhagens 168 e $\Delta 6$, originando as linhagens 413 e 449, respectivamente, levou a níveis de produção de surfactina similares àqueles da linhagem selvagem ATCC 21332. Contudo, a mesma modificação quando realizada na linhagem KO7, que deu origem a linhagem 434, alcançou um nível de produção de surfactina aproximadamente cinco vezes maior que a linhagem selvagem e o título de 3,7 g/L e produtividade de 87,8 mg/L·h em 42 horas.

Apesar dos atrasos no cronograma do projeto devido à pandemia da COVID-19 no último ano, as etapas envolvendo a construção dos plasmídeos e a realização das modificações 2a, 2b e 2c nas linhagens 434 e 449 foram concluídas. Estas modificações permitiram a introdução do sistema sintético de autoindução da expressão gênica (módulo S0-R6) a montante do promotor P_{srfA} na regulação do operon *srfA* e, paralelamente, a substituição do promotor P_{srfA} pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica e pelo promotor sintético forte TP2. O promotor R6 é um promotor sintético induzível forte, enquanto o promotor TP2 é um promotor duplo sintético constitutivo. Observamos como estes dois promotores regularam a expressão do operon *srfA*, em comparação ao promotor nativo P_{srfA} , ao avaliarmos sua influência na produção de surfactina e no crescimento celular.

Ao construir as linhagens 434-2b e 449-2b, alcançamos o objetivo principal do projeto, que era a construção de uma linhagem de *B. subtilis* na qual a biossíntese de surfactina fosse controlada pelo sistema sintético de autoindução da expressão gênica. Entretanto, ao contrário do que era esperado, a produção de surfactina destas linhagens não superou a produção das linhagens base, sendo o contexto genético nossa principal hipótese para isto. Um resultado semelhante foi observado nas linhagens 434-2c e 449-2c, nas quais a biossíntese é controlada pelo promotor duplo sintético constitutivo TP2. A combinação destes resultados nos leva a crer que substituir o promotor P_{srfA} na regulação do operon *srfA* da biossíntese de surfactina não é a melhor alternativa para as linhagens com as quais trabalhamos.

Por outro lado, associar o promotor P_{srfA} a outros promotores pode ser a solução, como é o caso das linhagens com a modificação 2a, já que no último cultivo realizado observamos a antecipação da produção de surfactina pela linhagem 434-2a que alcançou a produtividade de 39,72 mg/L·h em 24 horas, comparada a linhagem 434 que alcançou 24,70

mg/L·h no mesmo período. Pensando na aplicação industrial, é vantajoso atingir o pico de produção mais cedo e, assim, reduzir o tempo de cultivo, por dois principais motivos: a redução dos custos de produção e a toxicidade da surfactina para as células de *B. subtilis*.

Nossas perspectivas para os próximos projetos incluem testes para esclarecer se o sistema sintético de autoindução da expressão gênica das linhagens com a modificação 2a é estável e funcional em maior escala, otimizar as condições de cultivo e ainda planejamos otimizar a metodologia de preparo de amostras para análise em HPLC para confirmar os resultados de produção de surfactina quantificados pelo método colorimétrico baseado em CPC-BTB neste trabalho.

Como sabíamos desde o início desde projeto, as edições genômicas realizadas e descritas aqui são apenas as primeiras de uma série de edições utilizando o sistema CRISPR-Cas9 que pretendemos realizar nas linhagens derivadas de *B. subtilis* $\Delta 6$ e KO7 para criar, no futuro, uma linhagem produtora de surfactina com potencial para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-16>.

AN, Y. *et al.* A PCR-after-ligation method for cloning of multiple DNA inserts. **Analytical Biochemistry**, v. 402, p. 203 – 205, 2010.

ARIMA, K. *et al.* Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 31, p. 488 – 494, 1968.

BIOSURFACTANTS - Global Market Outlook (2017-2026). 2018. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/Statistics-Market-Research-Consulting-v4058/Biosurfactants-Global-Outlook-11666469/>> Acesso em: 03 mai. 2020.

BOUMEZBEUR, A. -H. *et al.* Rational engineering of transcriptional riboswitches leads to enhanced metabolite levels in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 58 – 68, 2020.

BROPHY, J. A. N.; VOIGT, C. A. Principles of genetic circuit design. **Nat. Methods**, v. 11, p. 508 – 520, 2014.

CHUMSAKUL, O. *et al.* Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 414 – 428, 2011.

CORRÊA, G. G. *et al.* A modular autoinduction device for control of gene expression in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 326 – 334, 2020.

DELEU, M. *et al.* Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.**, v. 152, p. 3 – 10, 1999.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, 2014.

GAO, R. *et al.* Production of sophorolipids with enhanced volumetric productivity by means of high cell density fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 97, p. 1103 –1111, 2013.

GEISSLER, M. *et al.* Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. In: HAYES, D. G.; SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D. **Biobased Surfactants Synthesis, Properties, and Applications**. 2nd. ed. Academic Press and AOCS Press, 2019. p. 205 - 240.

GLOBAL GLYCOLIPIDS BIOSURFACTANT MARKET 2020 by Manufacturers, Regions, Type and Application, Forecast to 2025. 2020. Disponível em: <<https://www.marketresearch.com/GlobalInfoResearch-v4117/Global-Glycolipids-Biosurfactant-Manufacturers-Regions-14487762/>> Acesso em: 03 mai. 2020.

HAYASHI, K. *et al.* The H₂O₂ Stress-Responsive Regulator PerR Positively Regulates *srfA* Expression in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6659 – 6667, 2005.

HU, F. *et al.* Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. **Microbial Cell Factories**, v.18, Article number: 42, 2019.

ISA, M. H. M. *et al.* Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. **Food Biotechnology**, v. 34, p. 1 - 24, 2020.

JAHAN, R. *et al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 275, 102061, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>.

JIAO, S. *et al.* In situ enhancement of surfactin biosynthesis in *Bacillus subtilis* using novel artificial inducible promoters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, p. 832 – 42, 2016.

KOIM-PUCHOWSKA, B. *et al.* Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surfaceactive compounds. **PLoS ONE**, v. 14, e022510, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225108>.

LIANG, C. One plant of Surfactin superior strain and its application., CN109182170. 2018.

LIU, D. *et al.* Construction, Model-Based Analysis, and Characterization of a Promoter Library for Fine-Tuned Gene Expression in *Bacillus subtilis*. **ACS Synth. Biol.**, v. 7, p. 1785 – 1797, 2018.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. **BioMed Res. Int.**, Article ID 473050, p. 1 – 9, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1155/2015/473050>.

MOHANRAJU, P. *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. **Science**, v. 353, n. 6299, aad5147, 2016. Doi: <https://science.sciencemag.org/content/353/6299/aad5147>.

MÜLLER, M. M. *et al.* Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 585 – 592, 2011.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p. 209 - 214, 1995.

PEREIRA, J. F.B. *et al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, p. 258 - 268, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>.

VIEIRA, G. V. *et al.* Visão geral do mecanismo básico de ação. In: PEREIRA, T. C. **Introdução à Técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. p. 39 – 49.

SCHILLING, T. *et al.* A CRISPR-Cas9-Based Toolkit for Fast and Precise In Vivo Genetic Engineering of *Bacillus subtilis* Phages. **Viruses**, v. 10, n. 5, 241, 2018. Doi: <https://doi.org/10.3390/v10050241>.

SCHWECHHEIMER, S. K. *et al.* Biotechnology of riboflavin. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, p. 2107 – 2119. 2016.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 119 - 134, 2010.

SILVA, R. S. *et al.* Obtenção de Cas9 e gRNAs. In: PEREIRA, T. C. **Introdução à Técnica de CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016. p. 109 – 133.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Applied Biosystems BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Pub. No. MAN0015666. 2016, 2 p. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4337455>>. Acesso em: 01 jan. 2021.

TOYMENTSEVA, A. A.; ALTENBUCHNER, J. New CRISPR-Cas9 vectors for genetic modifications of *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 1, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny284>.

WATZLAWICK, H.; ALTENBUCHNER, J. Multiple integration of the gene *ganA* into the *Bacillus subtilis* chromosome for enhanced β -galactosidase production using the CRISPR/Cas9 system. **AMB Expr**, v. 9, 158, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0884-4>.

WESTBROOK, A.W.; MOO-YOUNG, M; CHOU, C.P. Development of a CRISPR–Cas9 tool kit for comprehensive engineering of *Bacillus subtilis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, p. 4876 – 4895, 2016.

WESTBROOK, A. W., *et al.* Metabolic engineering to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 47, p. 401 - 413, 2018.

WILLENBACHER, J. *et al.* Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive P_{veg} in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production. **Journal of Biotechnology**, v. 224, p. 14 – 17, 2016.

WOOLSTON, B. M., *et al.* Rediverting carbon flux in *Clostridium ljungdahlii* using CRISPR interference (CRISPRi). **Metabolic Engineering**, v. 48, p. 243 - 253, 2018.

WU, Q.; XU, Y. Method for Promoting *Bacillus subtilis* to Synthesize Surfactin based on Multi-gene Synergy., US20200131229A1. 2018.

WU, Q., *et al.* Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. **Metabolic Engineering**, v. 52, p. 87 – 97, 2019.

YANG, H.; YU, H.; SHEN, Z. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 1139 - 47, 2015.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, p. 103 – 119, 1985.

ZHI, Y., *et al.* Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. **Science Reports**, v. 7, 40976, 2017. <https://www.nature.com/articles/srep40976>.

ANEXOS

Anexo A: Protocolos

a) Produção de células quimicamente competentes de *E. coli*

Inicialmente foram preparadas soluções de CaCl_2 0,1M e CaCl_2 0,1 M acrescido de glicerina 10%, ambas foram esterilizadas e resfriadas em gelo para que fossem utilizadas. Foram preparadas, além disso, pré-culturas de *E. coli* em 5 mL de meio LB¹, inoculadas com uma colônia das bactérias proveniente de uma placa fresca ou uma pequena quantidade dos estoques em glicerol a -80°C. As pré-culturas foram incubadas a 37°C e 220 rpm por 12 a 18 horas.

Após a incubação, foi medida a densidade óptica das pré-culturas em espectrofotômetro a 600 nm (DO_{600}). As pré-culturas foram então inoculadas em 50 mL de meio LB a uma DO_{600} de 0,03 e incubadas a 37°C e 220 rpm até alcançar a DO_{600} de 0,3. Ao atingir a DO_{600} determinada, o volume de cada pré-cultura foi transferido para dois tubos graduados de centrífuga de 50 mL estéreis previamente resfriados em gelo. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram imediatamente colocados no gelo, sendo que, a partir deste ponto, todas as etapas foram realizadas em gelo. O precipitado de células foi ressuspensionado gentilmente em 10mL de CaCl_2 0,1M e, após a ressuspensão completa, foram incubados em gelo por 20 minutos.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi ressuspensionado cuidadosamente em 1 mL de CaCl_2 0,1M acrescido de glicerina 10%. Foram feitas alíquotas da solução resultante em microtubos estéreis de 1,5 mL (100µL por tubo). As alíquotas foram estocadas a -80°C.

¹Lysogeny Broth (LB): 10,0 g/L Triptona, 10,0 g/L NaCl, 5,0 g/L extrato de levedura. pH entre 7,0 e 7,2.

b) Transformação de células de *E. coli* quimicamente competentes por choque-térmico

Alíquotas contendo células de *E. coli* quimicamente competentes foram retirados do estoque a -80°C e descongeladas em gelo. Após o descongelamento, foram adicionados 50 µL

de células e 10 µL (2-5 ng) do DNA plasmidial em um microtubo estéril de 1,5 mL. A mistura foi incubada em gelo por 30 minutos.

Para a etapa de choque-térmico, o tubo contendo as células e o DNA plasmidial foi colocado em banho termostatzado a 42°C por 30 segundos e imediatamente transferido para o gelo, onde foi incubado por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de meio SOC² ao tubo e este foi incubado por 1 hora a 37°C e 220 rpm.

Após a incubação, as células transformadas foram plaqueadas em diferentes concentrações em meio LB-ágar³, acrescido de antibiótico e incubadas a 37°C por 12 a 18 horas. As colônias que cresceram isoladas nas placas são inoculadas em meio LB líquido acrescido de antibiótico e incubadas a 37°C e 220 rpm por 12 a 18 horas. Posteriormente, parte da cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial clonado e outra parte foi estocada a -80°C.

²Super Optimal Broth with Catabolite repression (SOC): 5 g/L extrato de levedura, 20 g/L triptona, 0,548 g/L NaCl, 0,186 g/L KCl, 2,4 g/L MgSO₄, 200 g/L glicose. pH 7,5.

³Lysogeny Broth acrescido de ágar (LB-ágar): 10,0 g/L Triptona, 10,0 g/L NaCl, 5,0 g/L extrato de levedura, 16,0 g/L ágar. pH entre 7,0 e 7,2.

c) Produção de células quimicamente competentes de *Bacillus* sp.

O pré-inóculo foi preparado com a linhagem de *Bacillus* de interesse, a qual foi retirada do estoque a -80°C ou de uma placa fresca e inoculada em 5 mL de meio LB, então foi incubada a 37°C e 220 rpm por 12 a 18 horas. No dia seguinte, DO₆₀₀ do pré-inóculo foi quantificada e um volume do pré-inóculo foi inoculado em 20 mL de meio SpC⁴ na DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. A cultura foi incubada a 37°C sob aeração vigorosa (220 rpm) e a DO₆₀₀ foi monitorada em intervalos.

Quando foi observado que o crescimento atingiu a fase estacionária (ou seja, sem mudanças significativas na DO₆₀₀ em um intervalo de 20 a 30 minutos), foram inoculados 2 mL desta cultura em fase estacionária em 200 mL de meio SpII⁵ pré-aquecido. A incubação foi mantida a 37°C, porém a uma aeração menor (180 rpm).

Após incubação de 90 minutos, a cultura foi transferida para tubos graduados de centrífuga de 50 mL estéreis e centrifugada a 8000 xg por 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi então transferido para um tubo estéril e armazenado. As células precipitadas foram ressuspensas em 12 mL deste sobrenadante acrescido de 8 mL de glicerol 50% (solução estéril), misturou-se gentilmente. Por fim, foram preparadas alíquotas de 500 µL desta mistura de células em microtubos estéreis, os quais foram estocados a -80°C.

⁴SpC (preparar com as soluções estéreis no dia do uso): 20 mL T Base⁶, 0,2 mL glicose 50% (m/v), 0,3 mL MgSO₄·3H₂O 1,2% (m/v), 0,4 mL extrato de levedura 10% (m/v), 0,5 mL casaminoácidos 1% (m/v). Para linhagens auxotróficas (*B. subtilis* 168 e Δ6), acrescentar 0,2 mL de L-Triptofano 2 mg/mL.

⁵SpII (preparar com as soluções estéreis no dia do uso): 200 mL T Base⁶, 2 mL glicose 50% (m/v), 14 mL MgSO₄·3H₂O 1,2% (m/v), 2 mL extrato de levedura 10% (m/v), 2 mL casaminoácidos 1% (m/v), 1 mL CaCl₂ 0,1M. Para linhagens auxotróficas (*B. subtilis* 168 e Δ6), acrescentar 2 mL de L-Triptofano 2 mg/mL.

⁶T Base (esterilizar): 2,0 g/L (NH₄)₂SO₄, 18,3 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 6,0 g/L KH₂PO₄, 1,0 g/L Trisódio citrato·2H₂O.

d) Transformação em células quimicamente competentes de *Bacillus* sp.

As células quimicamente competentes foram descongeladas em banho termostático a 37°C. Em um microtubo estéril, foram adicionados 250 µL de células, 250 µL de meio SpII + EGTA⁷ e 500 a 1500 ng de DNA a ser transformado. O tubo contendo a mistura foi colocado sob incubação a 37°C e 220 rpm por 1 hora. Após este período, entre 20 e 100 µL da transformação foram plaqueados em meio LB-ágar, acrescido de antibióticos. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 18 horas, para o crescimento de colônias transformadas.

⁷SpII + EGTA: 200 mL de SpII⁵ com 4 mL de EGTA (0,1M, pH 8,0), sem CaCl₂. Pode ser armazenado a -20°C em alíquotas, embora congelamento e descongelamento repetitivos devam ser evitados.

e) PCR de colônia de *B. subtilis*

Primeiramente, foi realizado o processo de rompimento celular, onde metade da colônia é coletada e transferida para um microtubo contendo 10 µL de tampão Tris-HCl 0,1M, em seguida, o microtubo foi incubado no gelo por cinco minutos. O microtubo foi colocado no micro-ondas e aquecido por um minuto, então foi colocado novamente no gelo por 30 segundos. Estas duas etapas foram repetidas por três ou quatro vezes. Finalmente, o microtubo foi incubado no gelo por cinco minutos.

Para a reação de PCR, utilizou-se 1 µL da solução com as células rompidas para substituir o DNA molde na reação com a enzima DNA polimerase de preferência, seguindo o protocolo do fornecedor.

f) Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento de DNA, primeiramente é realizado o preparo das amostras, as quais passam por uma reação de amplificação de DNA (PCR), seguida por sua purificação antes de serem colocadas no sequenciador. A Tabela A1 apresenta a quantidade de DNA molde que deve ser adicionado a reação de PCR de acordo com o tipo de DNA que se deseja sequenciar.

Tabela A1 – Quantidade de DNA molde necessária para as diferentes amostras a serem sequenciadas.

Molde	Tamanho	Quantidade
Produto de PCR	100-200 pb	1-3 ng
	200-500 pb	3-10 ng
	500-1000 pb	5-20 ng
	1000-2000 pb	10-40 ng
	>2000pb	40-100 ng
DNA fita simples		50-100 ng
DNA fita dupla		200-500 ng

Fonte: Adaptado de THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2016.

A reação de PCR do DNA a ser sequenciado utilizou o reagente BigDye® Mix Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.) que contém dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl. Os componentes da reação são apresentados na Tabela A2. Após preparada, a reação foi colocada no equipamento C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad), seguindo o programa de ciclos da Tabela A3.

Tabela A2 – Reagentes para a PCR do DNA a ser sequenciado.

Reagentes	Reação de 20 µL
BigDye® Mix (Applied Biosystems)	1,0 µL
5X Sequencing Buffer (BigDye® - Applied Biosystems)	3,5 µL
Oligonucleotídeo (3,2µM)	2,0 µL
DNA molde	x
Água ultrapura	(20,0 – x) µL

Fonte: Adaptado de THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2016.

Tabela A3 – Programa da PCR de sequenciamento no termociclador.

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96°C	1 minuto	1
Desnaturação	96°C	10 segundos	
Anelamento	TM dos oligonucleotídeos*	5 segundos	25
Extensão	60°C	4 minutos	
Extensão final	60°C	5 minutos	1
Manutenção	4°C	∞	

*TM dos oligonucleotídeos corresponde à temperatura de anelamento dos mesmos a sequência de DNA molde. Nesta reação, a TM dos oligonucleotídeos não deve ser maior que 56°C. **Fonte:** Adaptado de THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., 2016.

Após a PCR, o DNA foi purificado utilizando o kit “BigDye® Xterminator™ Purification kit” (Applied Biosystems). Foram adicionados 45 µL do reagente SAM™ Solution, seguido pela adição de 10µL da solução Xterminator™ ao microtubo contendo o produto da reação de PCR. Em seguida, o microtubo foi colocado em um agitador por 30 minutos a 2000 rpm, onde é protegido da luz.

Após este período, a amostra é centrifugada em velocidade máxima por 10 segundos e 20 µL do sobrenadante resultante foi pipetado em uma placa de 96 poços específica para o sequenciamento. A placa contendo todas as amostras a serem sequenciadas foi colocada em uma centrifuga de placas por 10 segundos em velocidade máxima e, por fim, colocada no sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

APÊNDICES

Apêndice A: Sequências de DNA

a) Genes:

sfp com *stop codon* prematuro (498 pb) - *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e PY79

ATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCGCCCGCTTTCACAGGAAGAAAATGAACGGTTCATGTCTTT
CATATCACCTGAAAAACGGGAGAAATGCCGGAGATTTTATCATAAAGAAGATGCTCACCGCACCCCTGC
TGGGAGATGTGCTCGTTCGCTCAGTCATAAGCAGGCAGTATCAGTTGGACAAATCCGATATCCGCTTT
AGCACGCAGGAATACGGGAAGCCGTGCATCCCTGATCTTCCCGACGCTCATTTCAACATTTCTCACTC
CGGACGCTGGGTCATTTGCGCGTTTGATTACAGCCGATCGGCATAGATATCGAAAAACGAAACCGA
TCAGCCTTGAGATCGCCAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAGCAAAAGACAAG
GACGAGCAGACAGACTATTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTATCAAACAAGGAAGGCA
AAGGCTTATCGCTTCCGCTTGA

Legenda: nucleotídeo extra na posição 468 pb; *stop codon* prematuro.

sfp completo (675 pb) - *B. licheniformis* strain NIOT-ARMKVK06 e *B. subtilis* strain NCIB 3610 YcxD

ATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCGCCCGCTTTCACAGGAAGAAAATGAACGGTTCATGTCTTT
CATATCACCTGAAAAACGGGAGAAATGCCGGAGATTTTATCATAAAGAAGATGCTCACCGCACCCCTGC
TGGGAGATGTGCTCGTTCGCTCAGTCATAAGCAGGCAGTATCAGTTGGACAAATCCGATATCCGCTTT
AGCACACAGGAATACGGGAAGCCGTGCATCCCTGATCTTCCCGACGCTCATTTCAACATTTCTCACTC
CGGACGCTGGGTCATTTGCGCGTTTGATTACAGCCGATCGGCATAGATATCGAAAAACGAAACCGA
TCAGCCTTGAGATCGCCAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTTTTAGCAAAAGACAAG
GACGAGCAGACAGACTATTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTATCAAACAGGAAGGCAA
AGGCTTATCGCTTCCGCTTGATTCTTTTTCAGTGCAGCTGCACCAGGACGGACAAGTATCCATTGAGC
TTCCGGACAGCCATTCCCCATGCTATATCAAAACGTATGAGGTGATCCCGGCTACAAAATGGCTGTA
TGCGCCGCACACCCTGATTTCCCCGAGGATATCACAATGGTCTCGTACGAAGAGCTTTTATAA

Legenda: sequência correta.

Sequência expandida do *hxlR* (465 pb) - *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e PY79

TTGAGCCGGATGGACGACAAAAGGTTTAATTGTGAGAAGGAATTAACGCTTGCAGTGATTGGCGGTAA
ATGGAAGATGCTCATTTTATGGCATTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGTTCAATGAATTAAAAACAT
TGATTCTTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTTGAGCAGGATATGATTGTT
CACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATATTCTCTGACCCCGCACGGAGAAAGCCT
CATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGGAATTGATTGATATCGACAAAA
ATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAAGACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTGCCTTTTTTTTCGGTTTT
TGCGCGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTTCAGCAATAAAAAAAGA

Legenda: Gene *hxlR* (363 pb); terminador rho-independente do gene *hxlR* (WILLENBACHER *et al.*, 2016); sequência utilizada como braço de homologia (400 pb).

***srfAA* (10.746 pb) - *B. subtilis* 168, Δ6 e PY79**

ATGGAATAACTTTTTACCCTTTAACGGATGCACAAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTTATCC
 TCACACGAGCATTTCAAATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGC
 TTGTTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGAT
 GAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAACATACTGACACTAC
 TGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTTACAATGGAGCCGGGAGGAAACGAAGAAACCTTTGCCGC
 TATACGATTGTGATTTGTTCCGTTTTTCCCTTGTTTACCATAAAGGAAAAATGAAGTGTGGTTTTACGCA
 AATGTTTCATCACGTGATTTCTGATGGTATCTCCATGAATATTCTCGGGAATGCGATCATGCACATTTA
 TTTAGAATTAGCCAGCGGCTCAGAGACAAAAGAAGGAATCTCGCATTCATTTATCGATCATGTTTTAT
 CTGAACAGGAATATGCTCAATCGAAGCGGTTTGAAAAGGACAAGGCGTTTTGGAACAAACAATTTGAA
 TCGGTGCCTGAACTTGTTTCCCTTGAAACGGAATGCATCCGCAGGGGGAAGTTTAGATGCTGAGAGGTT
 CTCTAAAGATGTGCCTGAAGCGCTTCATCAGCAGATTCTGTCTGTTTTGTGAGGCGAATAAAGTCAGTG
 TTCTTTTCGGTATTTCAATCGCTGCTCGCCGCCTATTTGTACAGGGTCAGCGGCCAGAATGATGTTGTG
 ACGGGAACATTTATGGGCAACCGGACAAATGCGAAAGAGAAGCAGATGCTTGGCATGTTTGTCTTCTAC
 GGTTCCGCTTCGACAAACATTGACGGCGGGCAGGCGTTTTTCAGAATTTGTCAAAGACCGGATGAAGG
 ATCTGATGAAGACACTTCGCCACCAAAAGTATCCGTATAATCTCCTAATCAACGATTTGCGTGAAACA
 AAGAGCTCTCTGACCAAGCTGTTTACGGTTTTCTCTTGAATATCAAGTGATGCAGTGGCAGAAAGAAGA
 GGATCTTGCCTTTTTTGACTGAGCCGATTTTCAGCGGCAGCGGATTAAATGATGTCTCAATTCATGTAA
 AGGATCGATGGGATACTGGGAAACTCACCATAGATTTTGATTACCGCACTGATTTATTTTACGTGAA
 GAAATCAACATGATTTGTGAGCGCATGATTACCATGCTGGAGAACGCGTTAACGCATCCAGAACATAC
 AATTGATGAATTAACACTGATTTCTGATGCGGAGAAAGAGAAGCTGCTTGCGAGGGCCGGCGGTAAAT
 CTGTGAGCTACCGTAAGGACATGACGATACCAGAGCTGTTCCAAGAAAAGGCTGAACTGCTTTCTGAT
 CATCCAGCGGTTGTATTTGAAGATCGCACATTGTCTATCGAACGTTACATGAGCAATCTGCACGCAT
 CGCCAATGTGCTGAAACAGAAAGGGTTGGCCCGACAGTCTGTGCGGTTTTTGATTGAACGCTCTG
 AACGGATGATTACAGCTATCATGGGAATTTTAAAAGCCGGCGGAGCCTATGTGCCGATTGATCCGGGT
 TTTCTGCTGAGCGCATTCAATATATTTTGAGGAGTGCAGGGGCGGATTTTCATCCTGACTGAATCGAA
 GGTGCGGCGCCTGAAGCCGATGCTGAGCTGATTGACTTAGATCAGGCGATTGAGGAAGGTGCAGAAG
 AAAGCCTGAATGCAGATGTGAACGCTCGGAACCTTGCCCTACATTATTTACACATCGGGAACAACCGGA
 CGCCGAAAGGCGTTATGATCGAGCATCGCCAGGTTTCATCATTTGGTTGAATCTCTGCAGCAGACGAT
 TTATCAAAGCGGCAGCCAAACCCTGCGGATGGCATTGCTTGCGCCGTTCCACTTTGATGCGTCAGTGA
 AGCAGATCTTCGCGTCGCTTCTTTTGGGCCAAACCCTTTATATCGTACCGAAGAAAACAGTGACGAAC
 GGGGCCGCCCTTACTGCATATTATCGGAAGAACAGCATTGAGGCGACGGACGGAACACCGGCTCATTT
 GCAAATGCTGGCAGCAGCAGGCGATTTTGAAGGCCTAAACTGAAGCACATGCTGATCGGAGGAGAAG
 GCCTGTCATCTGTTGTTGCGGACAAGCTGCTGAAGCTGTTTAAAGAAGCCGGCACAGCGCCGCGTTTG
 ACTAATGTGTACGGGCCGACTGAAACGTGCGTTGACGCGTCTGTTTCATCCGGTTATCCCTGAGAATGC
 AGTTCAATCAGCGTATGTGCCGATCGGGAAAGCGCTGGGGAATAACCGCTTATATATTTTGGATCAAA
 AAGGCCGGCTGCAGCCTGAAGGCGTGGCGGGTGAGCTTTATATCGCGGGAGACGGTGTGGGCCGAGGC
 TATTTACATTTGCCTGAATTAACGGAAGAGAAGTTTTTACAAGATCCATTCGTGCCGGGCGATCGCAT
 GTACCGGACCGGGGACGTGGTGCGCTGGCTTCCAGATGGAACAATCGAATATTTAGGCAGAGAGGATG
 ACCAGGTCAAAGTCCGCGGATACCGGATTGAGCTTGGGGAAATTGAAGCCGTGATTACAGCAGGCGCCA
 GACGTTGCAAAAGCCGTTGTTTTGGCACGCCCTGACGAACAGGGAAATCTTGAGGTTTGCGCATATGT
 TGTGAGAAGCCTGGAAGCGAATTTGCGCCAGCCGTTTGAGGGAGCATGCGGCCAGACAGCTTCCTG
 ACTATATGGTGCCGGCTTACTTTACAGAAGTGACAGAAATTCGCTTACACCAAGCGGCAAAGTCGAC
 CGCCGCAAGCTGTTTGCACTAGAGGTGAAGGCTGTCAGCGGCACTGCCTATACAGCGCCGCGAAATGA
 GACTGAAAAAGCAATCGCAGCCATTTGGCAGGACGTGCTGAACGTTGAGAAGGCGGGGATCTTTGACA
 ATTTCTTTGAAACTGGCGGACATTCATTAAGCCATGACCCTTTTAAACAAAGATTTCATAAGGAAACA
 GGCATTGAGATTCCGCTTCAATTTTTGTTTGAAGCATCCGACGATTACGGCTCTTGACAGAGGAAGCTGA
 TCACAGAGAAAGCAAAGCTTTTGCGGTGATTGAACCTGCTGAAAAACAGGAGCATTACCCGCTTTTCAT
 TGGCACAGCAGCGAACATATATCGTCAGCCAGTTCGAGGATGCGGGAGTCGGCTATAACATGCCAGCA
 GCAGCAATTCTGGAAGGGCCTTTAGATATTCAAAGCTGGAGCGCGCATTTTACGGGATTAATCCGACG
 CCACGAGTCATTGAGAACATCATTTGTTCTTGAAAACAGCACGCCGAGACAGAAAATTCACGATAGCG
 TTGATTTCAACATCGAAATGATTGAAAGAGGCGGCCGCTCAGATGAGGCAATTATGGCTTCATTTCGTT
 CGGACATTTGATTTGGCGAAAGCTCCGCTGTTTCAAGATCGGTTTGCTGGGGCTTGAAGAGAACCGTCA
 TATGCTGCTGTTTGACATGCACCATTTGATTTCTGACGGTGTATCCATTGGCATTATGCTGGAGGAGT

TAGCACGCATTTATAAAGGCGAACAGCTTCCTGATCTTCGTCTCCAGTATAAGGACTACGCTGTATGG
 CAAAGCAGACAGGCTGCTGAAGGGTACAAGAAGGACCAGGCTTATTGGAAGGAAGTCTTTGCAGGCGA
 GCTCCCGGTGCTTCAGCTTCTGTCCGATTACCCAAGACCACCTGTTCAAAGCTTTGAAGGGGATCGGG
 TGTCAATCAAGCTGGATGCGGGGGTAAAGGATCGCCTCAATCGTTTGGCTGAACAAAACGGCGCCACT
 TTATATATGGTGTATGCTTTCCGCTTACTATACGCTTTTGTCAAAGTATACGGGGCAGGATGACATCAT
 TGTGCGGGACACCGTCAGCGGGCAGAAATCACTCCGATACAGAGGGCATTATCGGGATGTTTCGTCAATA
 CGCTTGCGATTTCGAGTGAGGTGAAGCAGAATGAGACGTTTACCCAATTGATCTCGCGTGTCCGCAAA
 CGGGTGCTGGATGCCTTTTCTCATCAGGACTATCCGTTTGAGTGGCTTGTGAAGATTGGAACATCCC
 GCGTGATGTTAGCAGGCATCCGCTGTTTGACACGATGTTTCAAGAGACCAATTTCAAGATTGCCAAATTTGATTTGACG
 GTGCAGGCGAGAGAAACCGATGAAGGCATTGAGATTGATGTGGATTACAGCACAAAGCTGTTTAAACA
 AAGCACGGCAGACAGGCTGCTTACGCATTTTGC GCGTTTGCTTGAAGATGCTGCGGCTGATCCAGAGA
 AGCCGATTTCTGAGTATAAGCTTCTTTCTGAAGAGGAGGCTGCTTCGCAAATTCAGCAGTTTAAACCCG
 GGCAGAACACCTTATCCGAAAGATAAAACAATTGTTTCAAGTGTGTTGAGGAGCAAGCGGCGAATACGCC
 AGACCACACTGCGCTTCAATATGAAGGCGAATCACTCACTTATCGTGAACGGAATGAACGGGCAATC
 GTTTAGCCCGCGGCATTCTTTCTCTTGGAGCTGGCGAAGGCAGAACTGCGGCTGTCTTATGCGAGCGG
 TCAATGGATATGATTGTGTGATCTTGGCAGTATTAATAACAGGTTTCGGCTTATGTTCCGATCGATCC
 GGAACATCCGATTCAGCGGATGCAGCATTTCTTCCGTGACAGCGGAGCAAAGGTGCTTCTCACTCAGA
 GGAAATTAAAGGCTTTGGCGGAAGAAGCGGAATTTAAGGGCGTTATCGTGCTAGCCGATGAGGAAGAA
 AGCTATCATGCCGATGCGCGAAATCTCGCACTGCCTCTTGATTCTGCAGCAATGGCCAACCTGACGTA
 TACTTCCGGAACGACTGGAACACCTAAGGGGAATATCGTGACACATGCCAATATTCTCCGCACGGTGA
 AGGAAACGAATTATCTCAGCATTACAGAACAGGATACGATTCTCGGTCTTTCCAATTACGTGTTTGAC
 GCGTTTATGTTGATATGTTTCGGCTCTTTGTTAAACGGAGCCAAGCTGGTGCTGATACCGAAGGAAAC
 CGTTTTGGACATGGCTCGCCTGTCCCGCGTCATTGAACGGGAGAACATCAGCATTCTCATGATTACAA
 CCGCTTTGTTCCACTTGCTTGTGGACTTGAATCCGGCATGCTTGTCAACGCTTCGCAAGATTATGTTT
 GGCGGGGAACGGGCTTCGGTTGAGCATGTGAGAAAGCTTTGCAAACGGTTGGAAAGGGCAAGCTCCT
 TCATATGTATGGACCGTCTGAAAGCACGGTTTTTCGCGACGTATCATCCGGTTGATGAATTGGAGGAGC
 ACACGCTGTCTGTTCCGATTGGAAAACCGGTCAGCAATACGGAAGTATACATTCTTGACCGTACGGGA
 CACGTGCAGCCTGCCGGGATTGCCGGAGAGCTTTGCGTCAGCGGCGAAGGACTCGTGAAAGGCTATTA
 CAACCGTCCAGAACTGACTGAGGAGAAATTTGTTCCCATCCGTTTACATCCGGCGAACGCATGTATA
 AAACGGGAGACCTTGCGAGATGGCTGCCGAATGGCGACATCGAATTTATCGGGCGAATCGACCATCAG
 GTGAAGATTTCGCGGACAGCGCATCGAGCTTGGAGAAATCGAACATCAGCTGCAAACCCATGATCGTGT
 TCAGGAAAGTGTTGTGCTTGCCGTTGATCAAGGAGCGGGAGATAAACTGTTGTGTGCTTACTATGTGCG
 GAGAAGGAGACATCTCATCACAAAGAGATGAGAGAGCATGCTGCGAAGGACTTGCCGGCATATATGGTT
 CCTGCGGTGTTTATCCAAATGACGAGCTGCCGCTGACAGGGAACGGAAAAATTGACCGGAGAGCGCT
 GCCGATTCTGTATGCCAACGTTTCAAGAGGTGTTTCATATGTTGCGCCACGCAATGGAACGGAACAAA
 AAGTCGCGGACATTTGGGCACAGGTACTTCAGGCAGAACAAAGTCGGCGCTTATGACCACTTCTTTGAC
 ATTGGCGGACATTCATTAGCAGGCATGAAGATGCTTGCCTTGGTTTCATCAGGAACCTGGGCGTTGAGCT
 GTCATCAAGGATCTCTTCCAGTCACCGACGGTTGAGGGCTTGGCACAGGTGATTGCCTCTGCTGAAA
 AAGGGACAGCCGCAAGTATCAGCCCGGCAGAGAAACAAGATACGTATCCTGTTTCTTACCGCAAAAA
 CGGATGTACGTGCTTACGAGCTTGAGGATGCGCAAACGAGCTATAACATGCCGGCGGTTCTGCGCCT
 GACAGGTGAGCTTGATGTTGAAAGGCTTAACAGCGTCATGCAGCAGTTAATGCAGCGTCATGAAGCCT
 TGAGAACCACGTTTGAATAAAAGATGGAGAAACGGTGACGCGATCTGGGAAGAGGCTGAGTGCGAG
 ATAGCCTATTTGCAAGCCCCGGAAGAAGAGACAGAGCGGATCGTTTCTGAGTTTATTAAGCCTTTCAA
 AATCGACCAACTTCCACTGTTTCAAGATAGGGCTTATCAAGCATTTCAGACACTGAGCATGTGCTGCTGT
 TCGATATGCATCATATTATTTCTGATGGTGCATCTGTGCGTGTGCTGATTGAGGAGCTTTCAAAGCTG
 TACGACGGAGAAACCTTTGAGCCGCTCCGTATTCAATATAAGGATTATGCCGTGTGGCAGCAGCAGTT
 CATTCACTCTGAGCTTTACAAGAAGCAAGAAGAGCATTGGCTGAAGGAGCTGGACGGAGAGCTGCCGG
 TGCTGACGCTTCCGACTGATTACAGTCGGCCTGCCGTTCAAACATTTGAGGGAGACCGCATTGCATTT
 TCATTAGAAGCAGGCAAGCTGATGCTCTGCGCAGGCTTGCAAAGAAACGGATTCCACGCTTTACAT
 GGTGCTTCTGGCTTCATACAGTGCCTTTTTATCAAAAATTAGCGGGCAAGACGATATCATCGTCGGTT
 CACCTGTGGCCGACGATCTCAAGCGGACGTCAGCCGCGTCATCGGAATGTTTCGTCAATACATTGGCG
 CTGCGCACGTATCCGAAGGGTGAAAAGACGTTTGCTGACTATCTTAACGAAGTGAAAGAAACGGCACT
 CAGCGCTTTTGATGCGCAGGATTACCCACTTGAGGATTTGATCGGAAATGTTTCAAGTTTACGCTGACA
 CAAGCAGAAATCCGTTATTTCGATGCAGTTTTTTTCAATGCAAATGCGAATATAAAGGATTTAACAATG

AAAGGGATTTCAGCTTGAGCCGCATCCGTTTGAACGGAAAAACAGCCAAGTTTGACCTCACGCTGACGGC
 TGACGAAACCGACGGAGGGCTTACATTCGTACTCGAATACAATACAGCTCTGTTTAAAGCAGGAAACGA
 TTGAACGATGGAAGCAATATTGGATGGAGCTTTTAGATGCAGTTACTGGGAACCCGAACCAGCCGCTT
 TCCAGCCTGTCACTGGTCACCGAGACAGAAAAGCAAGCGCTTCTTGAGGCATGGAAGGGCAAAGCGCT
 GCCTGTGCCGACAGACAAAACGGTTCATCAGCTATTTCGAAGAGACTGCCAGCGCCACAAAGACCGCC
 CGGCTGTACATACAACCGGCCAGTCTTGAGCGTACGGCGAGCTGAATGCGAAGGCCAAACCGTCTCGCG
 CGGATTCTGATGGACTGCGGCATCAGCCCGGATGACCGCGTCGGCGTTCTCACGAAGCCGTCGCTTGA
 AATGTCCGCCGCGGTGCTCGGCGTCTTGAAAGCCGGAGCGGCGTTTGTGCCGATTGATCCTGACTATC
 CGGATCAGCGGATTGAGTATATTTTACAGGACAGCGGCGCAAGCTTCTCTTGAAACAGGAAGGCATT
 TCAGTGCCGGACAGCTATACGGGAGATGTCATTCTTCTCGACGGAAGCCGCACGATTCTAAGCCTGCC
 GCTTGATGAAAACGACGAGGAAAATCCAGAAACCGCTGTAACCGCGGAGAAGCTTGGCGTACATGATTT
 ACACGTCTGGAACGACCGGACAGCCGAAGGGTGTCTGTCGAGCACCATTGCGCTTGTGAACCTGTGC
 TTCTGGCACCACGACGCGTTCAGCATGACAGCGGAGGACCGCAGTGCGAAGTACGCGGGCTTTGGGT
 CGACGCTTCCATTTGGGAGATGTTCCCGACCTGGACGATCGGTGCCGAACCTTCACGTCATTGAGGAAG
 CGATCCGCCTCGATATCGTCCGCCTGAACGATTATTTTGAACGAACGGCGTAACGATCACGTTCCCTG
 CCGACACAGCTTGCGGAACAGTTTCATGGAGCTTGAGAACACATCACTTCGCGTATTGCTTACTGGAGG
 AGACAAGCTGAAGCGCGCAGTGAAAAAGCCGTACACACTCGTCAATAACTACGGGCCGACAGAGAATA
 CGGTGCTTGCCACAAGCGCAGAAATCCATCCGGAGGAAGGCTCGCTTTCCATCGGAAGGGCCATTGCC
 AATACGAGAGTATACATTCTCGGCGAGGGCAATCAGGTGCAGCCGGAAGGCGTAGCCGGAGAGCTTTG
 CGTGGCGGGGCGCGGACTGGCACGCGGCTATCTGAATCGAGAAGACGAAACCGCGAAGCGGTTTGTGCG
 CTGATCCGTTTGTGCCGGGTGAGCGCATGTACCGCACCGGCGATTTGGTGAATGGACGGGCGGCGGC
 ATCGAATACATCGGCCGGATCGACCAGCAGGTCAAGGTCCGCGGCTACCGGATCGAGCTCTCAGAAAT
 TGAAGTCCAGCTCGCCAGCTTTCTGAGGTGCAGGATGCGGCGGTGACAGCTGTCAAAGATAAAGGCG
 GCAACACAGCGATCGCGGCGTATGTCACACCGGAATCAGCTGACATAGAAGCACTGAAATCAGCACTG
 AAGGAAACCTTCCGGATTACATGATCCCGGCGTTCTGGGTGACGCTGAACGAGCTTCCGGTTACGGC
 AAACGGCAAAGTGGACCGCAAAGCCTTGCTTGAGCCGGACATCGAAGCGGGAAGCGGAGAATACAAAG
 CGCCGACGACCGACATGGAAGAGCTGCTTGCCGGCATCTGGCAGGACGTGCTTGGAATGTCTGAAGTC
 GGTGTACCCGACAATTTCTTCTCGCTTGCGGAGATTCCATCAAAGGAATTCAAATGGCGAGCCGCTT
 GAACCAGCACGGCTGGAAGCTGGAATGAAAGATCTCTTCCAGCACCCGACGATCGAAGAGCTCACCC
 AGTACGTAGAGCGTGCCGAAGGCAAACAGGCAGACCAAGGCCCGGTGGAGGGCGAAGTCATCCTGACG
 CCGATCCAGCGCTGGTTCTTTGAAAAGAACTTCACGAACAAGCACCCTGGAACCAATCTGTGATGCT
 TCACGCCAAGAAGGGCTTTGATCCTGAACGGGTGGAGAAAACATTGCAGGCGCTGATCGAGCATCATG
 ACGCGCTCCGCATGGTCTATCGTGAGGGACAGGAAGACGTCATTCAATACAACAGAGGTCTTGAAGCT
 GCTTCAGCTCAATTGGAGGTCATCCAGATTGAGGGCCAAGCTGCAGATTACGAAGACCGAATAGAGAG
 AGAAGCGGAGCGTTTGCAGAGCAGCATCGACTTGAGGAAGGCGGCTTGTTAAAAGCAGGCTTGTTC
 AAGCGGAAGACGAGATCACTTGCTTCTTGCCATTACCACTTAGTGTTGACGGCGTGTGCTGGCGG
 ATTTTACTGGAGGATTTCCGCCGGTATATACACAGCTTGAGCAAGGCAATGAACCGGTTCTCCCGCA
 GAAAACACATTCATTTGCAGAGTATGCAGAGAGATTGCAAGACTTCGCGAACTCCAAAGCCTTTTTGA
 AAGAAAAAGAGTATTGGAGACAGCTTGAAGAACAAGCTGTTGCGGCAAAGCTTCCGAAAGACCGCGAA
 TCTGGTGATCAGCGAATGAAACATACAAAGACAATTGAATTCTCGCTGACTGCTGAAGAGACAGAAAC
 GCTCACCACAAAGGTGCATGAGGCATATCACACAGAAATGAATGATATTTTGCTGACGGCATTTCGGAT
 TGGCAATGAAGGAGTGGACGGGTCAAGATCGAGTAAGTGTTTCAATTTAGAGGGGCATGGACGTGAAGAA
 ATCATAGAAGACCTGACCATTTCTCGCACAGTCGGCTGGTTTACAAGTATGTACCCAATGGTGCTCGA
 TATGAAGCATGCGGATGATCTGGGCTACCAGCTGAAGCAAATGAAAGAAGATATCAGACATGTGCCGA
 ATAAGGGAGTCGGATACGGCATTCTGCGCTATCTGACGGCACCGGAACATAAAGAAGATGTGGCGTTC
 TCGATTACGCCGGATGTCAGCTTCAACTATTTAGGTGAGTTTGACGAAATGTCGGATGCAGGTTTGT
 TACGAGATCAGAGCTGCCATCAGGACAGTCATTAAGCCCTGAAACAGAAAAACCGAATGCGCTGGATG
 TTGTGCGATATATCGAAAACGGAAAACCTGACGATGTCACTGGCCTATCATTCTCTTGAATTTTCATGAA
 AAAACAGTACAAACATTTCAGTGACAGCTTTAAAGCGCATCTTCTCAGAATCATTGAACATTGCCTATC
 TCAAGATGGTACGGAAGTACCCCGAGTGATCTTGGTGACGACGATTTGACGCTGGATGAGCTGGATA
 AATTAATGGAAATTTTCTAA

Legenda: Sequência parcial do gene *srfAA* utilizada como braço de homologia (400 pb).

***luxRI* (S0) (1.553 pb) – CORRÊA *et al.*, 2020**

TTAACTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGCGGT
 TTGTTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGCCTAAT
 ATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTTCTCTTTTGGT
 TAAATCGTTGTTTGATTTATTATTGCTATATTTATTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAA
 TTAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCA
 AAACCTAAGCATTCGGAAGCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGA
 TGATTTTCGCTTCTTTAATTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAAT
 TAATTGGTGAATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCA
 TAATATTGCCTCCATTTTTTTAGGGTAATTATCTAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATGGAATGAGG
 ATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAGATAAGCATTGATTAA
 TATCATTATTGCTTCTACAAGCTTTAATTTTTATTAATTATCTGTAAAGTGTGCTCGGCATTTATGTCT
 TTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAC
 GGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTACACTATTATAATCGCTTGAAATACA
 ATTGTTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGTCGATT
 AAACGCAAGGGAGGTTGGTATGACTATAATGATAAAAAAATCGGATTTTTTGGCAATTCCATCGGAGG
 AGTATAAAGGTATTCTAAGTCTTCGTTATCAAGTGTTTAAAGCAAAGACTTGAGTGGGACTTAGTTGTA
 GAAAATAACCTGAATCAGATGAGTATGATAACTCAAATGCAGAATATATTTATGCTTGTGATGATAC
 TGAAAATGTAAGTGGATGCTGGCGTTTATTACCTACAACAGGTGATTATATGCTGAAAAGTGTTCCTC
 CTGAATTGCTTGGTCAACAGAGTGCTCCCAAAGATCCTAATATAGTCGAATTAAGTCGTTTTGCTGTA
 GGTA AAAATAGCTCCAAGATAAAATACTCTGCTAGTGAAATTACAATGAACTATTTGAAGCTATATA
 TAAACACGCTGTTAGTCAAGGTATTACAGAATATGTAACAGTAACATCAACAGCAATAGAGCGATTTT
 TAAAGCGTATTAAAGTTCTTGTTCATCGTATTGGAGACAAAGAAATTCATGTATTAGGTGATACTAA
 TCGGTTGTATTGTCTATGCCTATTAATGAACAGTTTAAAAAAGCAGTCTTAAATTAA

Legenda: *luxR* (fita reversa); *luxI*; *P_{luxI}* -35; *P_{luxI}* -10; *sítio de ligação de LuxR*; *P_{luxR}* -10 (fita reversa); *P_{luxR}* -35 (fita reversa).

b) Promotores:

Sequência expandida do *P_{srfA}* (573 pb) - *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e PY79

GACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTTTGCCTTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGTCATGTA
 AAGATTGTAAATTGCATTTCAGCAATAAAAAGAGATTGAACGCAGCAGTTGGTTTAAAAATTTTTATT
 TTTCTGTAAATAATGTTTAGTGGAATGATTGCGGCATCCCGCAAAAAATATTGCTGTAAATAAACTG
 GAATCTTTTCGGCATCCCGCATGAAACCTTTTCACCCATTTTTTCGTTGATAAAAACATTTTTTTTCATTTA
 AACTGAACGGTAGAAAGATAAAAAATATTGAAAACAATGAATAAATAGCCAAAATTGGTTTCTTATTA
 GGGTGGGGTCTTGCGGTCTTTATCCGCTTATGTTAAACGCCGCAATGCTGACTGACGGCAGCCTGCTT
 TAATAGCGGCCATCTGTTTTTTGATTGGAAGCACTGCTTTTTTAAGTGTAGTACTTTGGGCTATTTTCGG
 CTGTTAGTTCATAAGAATTAAAAGCTGATATGGATAAGAAAGAGAAAATGCGTTGCACATGTTCACTG
 CTTATAAAG

Legenda: sequência-alvo do gRNA; PAM; *P_{srfA}*; *P_{srfA}* -35 e *P_{srfA}* -10 (WILLENBACHER *et al.*, 2016).

R6 (*P_{lux3.2}*) (205 pb) - CORRÊA *et al.*, 2020

ACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAA
 TAGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGT
 TTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATAATAAATGTAG
 T

Legenda: **sítio de ligação de LuxR**; $P_{lux3.2} -35$; $P_{lux3.2} -10$

TP2 (104 pb) - LIU *et al.*, 2018

TTAAATCTCAAAAAGGTGTTGACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGCAAAAAAG
TGTGACAACCTTAACCTCAGATCTGGTATAATAGAAA

Legenda: **promotor duplo sintético TP2 de LIU *et al.* (2018).**

c) Sítios de ligação do ribossomo:

RBS 1 - *B. subtilis* 168, $\Delta 6$ e PY79

ATTAGGGGAGGTATGACAATATG

Legenda: **RBS 1**; códon de início da tradução.

RBS 2 - LIU *et al.*, 2018

AAGAAGGAGATATACATATG

Legenda: **RBS 2 de LIU *et al.* (2018)**; códon de início da tradução.

d) Sequências de DNA doador:

SD1 (679 pb)

AAAGCCAACGAGGCCATGAAGATTTACGGAATTTATATGGACCGCCCGCTTTCACAGGAAGAAAATGA
ACGGTTCATGTCTTTCATATCACCTGAAAAACGGGAGAAATGCCGGAGATTTTATCATAAAGAAGATG
CTCACCGCACCTTGCTGGGAGATGTGCTCGTTCGCTCAGTCATAAGCAGGCAGTATCAGTTGGACAAA
TCCGATATCCGCTTTAGCACGCAGGAATACGGGAAGCCGTGCATCCCTGATCTTCCCGACGCTCATTT
CAACATTTCTCACTCCGGACGCTGGGTCAATTTGCGCGTTTGATTACAGCCGATCGGCATAGATATCG
AAAAAACGAAACCGATCAGCCTTGAGATCGCCAAGCGCTTCTTTTCAAAAACAGAGTACAGCGACCTT
TTAGCAAAAGACAAGGACGAGCAGACAGACTATTTTTATCATCTATGGTCAATGAAAGAAAGCTTTAT
TAAGCAAGAGGGCAAAGGCTTATCGCTTCCGCTTGATTCCCTTTTTCAGTGCGCCTGCACCAGGACGGAC
AAGTATCCATTGAGCTTCCGGACAGCCATTCCCCATGCTATATCAAAACGTATGAGGTGATCCCCGC
TACAAAATGGCTGTATGCGCCGTACACCTGATTTCCCCGAGGATATCACAAGGCCAATAAGGCCTT

Legenda: **sítio de restrição da SfiI**, **sequência-alvo**, **nucleotídeos modificados**, **PAM modificada**.

SD2 (2690 pb)

AAAGCCAACGAGGCTTAAATGGAAAATGCTCATTTTATGGCATTTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGT
TCAATGAATTAAAAACATTGATTCCCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTT
GAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATATTCTCTGAC
CCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGGAAGGCTATATGGAAT

TGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAGACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTT
 TGCCTTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTCAGCAATAA
 AAAAAGAGAATTCCTTAACTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAATTTGCTTTAGAAATA
 CTTTGGCAGCGGTTTTGTTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTT
 ACTGCAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTT
 TTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTTGATTATTATTTGCTATATTTATTTTTTCGATAATTATCAACT
 AGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGTTGTCTTT
 CTCTGAATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAG
 TGATAAGACCTGATGATTTTCGCTTCTTTAATTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCA
 AATATATTCCAATTAATTGGTGAATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAA
 ATTAGCGTCATCATAATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCTAGAATTGAAATATCAGATTTAA
 CCATGGAATGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAGAT
 AAGCATTGATTAATATCATTATTGCTTCTACAAGCTTTAATTTTATTAATTATTCTGTAAGTGTGCTC
 GGCATTTATGTCTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTTGCGTGTTAT
 ATATCATTAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTGCACACTATTATAT
 CGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTT
 GTTATAGTCGATTAAACGCAAGGGAGGTTGGTATGACTATAATGATAAAAAAATCGGATTTTTTGGCA
 ATTCATCGGAGGAGTATAAAGGTATTCTAAGTCTTCGTTATCAAGTGTTTAAGCAAAGACTTGAGTG
 GGACTTAGTTGTAGAAAATAACCTTGAATCAGATGAGTATGATAACTCAAATGCAGAATATATTTATG
 CTTGTGATGATACTGAAAATGTAAGTGGATGCTGGCGTTTATTACCTACAACAGGTGATTATATGCTG
 AAAAGTGTTTTTTCCTGAATTGCTTGGTCAACAGAGTGCTCCCAAAGATCCTAATATAGTCGAATTAAG
 TCGTTTTGCTGTAGGTAAAAATAGCTCCAAGATAAATAACTCTGCTAGTGAAATTACAATGAACTAT
 TTGAAGCTATATATAAACACGCTGTTAGTCAAGGTATTACAGAATATGTAACAGTAACATCAACAGCA
 ATAGAGCGATTTTTTAAAGCGTATTAAAGTTCCTTGTATCGTATTGGAGACAAAGAAATTCATGTATT
 AGGTGATACTAAATCGGTTGTATTGTCTATGCCTATTAATGAACAGTTTAAAAAAGCAGTCTTAAATT
 AACTAGAACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTGCGCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTA
 ACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTGCACACTATTATATCGCTTGAAATA
 CAATTGTTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATAATA
 AATGTAGTACTAGTAGCGGCCGTCAGTTGAACGCAGCAGTTTGTTTAAAAATTTTTATTTTTCTG
 TAAATAATGTTTAGTGGAATGATTGCGGCATCCCGCAAAAAATATTGCTGTAAATAAACTGGAATCT
 TTCGGCATCCCGCATGAACTTTTACCCATTTTTTCGGTGATAAAAAACATTTTTTTTCATTAAACTGA
 ACGGTAGAAAGATAAAAAATATTGAAAACAATGAATAAATAGCCAAAATTTGGTTTCTTATTAGGGTGG
 GGTCTTGCGGTCTTTATCCGCTTATGTTAAACGCCGCAATGCTGACTGACGGCAGCCTGCTTTAATAG
 CGGCCATCTGTTTTTTGATTGGAAGCACTGCTTTTTAAGTGTAGTACTTTGGGCTATTTCGGCTGTTA
 GTTCATAAGAATTAAAAGCTGATATGGATAAGAAAGAGAAAATGCGTTGCACATGTTCACTGCTTATA
 AAGATTAGGGGAGGTATGACAATGGCCAATAAGGCCCTT

Legenda: final da sequência expandida do gene *hxlR* com terminador rho-independente; sítio de restrição da *EcoRI*; sequência S0; cicatriz *XbaI/SpeI*; promotor R6; BioBrick suffix; promotor P_{srfA} expandido; nucleotídeo modificado para remoção da PAM (G trocado por C); sítio de restrição da *SfiI*.

SD3 (2611 pb)

AAGGCCAACGAGGCC TAAATGGAAAATGCTCATTTTTATGGCATTTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGT
 TCAATGAATTAAAAACATTGATTCCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTT
 GAGCAGGATATGATTGTTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATATTCTCTGAC
 CCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCTATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGGAAT
 TGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAGACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTT
 TGCCTTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTCAGCAATAA
 AAAAAGAAACTTTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAATTTGCTTTAGAAATACTTTGGCA
 GCGGTTTTGTTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTACGCTTACTGCAGC
 CTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTCTTTCCTTCGCATGCCACGCTAAACATTCTTTTTCTCTT
 TTGGTTAAATCGTTGTTTGATTATTATTATTTGCTATATTTATTTTTTCGATAATTATCAACTAGAGAAGG

AACAATTAATGGTATGTTTCATACATGCATGTAAAAATAAACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAAT
 GTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTATTAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAGTGATAAGA
 CCTGATGATTTTCGCTTCTTTAATTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATT
 CCAATTAATTGGTGAATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGT
 CATCATAATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCTAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATGGAA
 TGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAGATAAGCATTG
 ATTAATATCATTATTGCTTCTACAAGCTTTAATTTTATTAATTATTCTGTAAGTGTCTCGGCATTTA
 TGTCTTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTCTGCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATT
 AAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTCACTATTATATCGCTTGAA
 ATACAATTGTTTAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGT
 CGATTAAACGCAAGGGAGGTTGGTATGACTATAATGATAAAAAATCGGATTTTTTGGCAATTCCATC
 GGAGGAGTATAAAGGTATTCTAAGTCTTCGTTATCAAGTGTTAAGCAAAGACTTGAGTGGGACTTAG
 TTGTAGAAAATAACCTTGAATCAGATGAGTATGATAACTCAAATGCAGAATATATTTATGCTTGTGAT
 GATACTGAAAATGTAAGTGGATGCTGGCGTTTATTACCTACAACAGGTGATTATATGCTGAAAAGTGT
 TTTTCCTGAATTGCTTGGTCAACAGAGTGCTCCCAAAGATCCTAATATAGTCGAATTAAGTCGTTTTG
 CTGTAGGTAAAAATAGCTCCAAGATAAAATAACTCTGCTAGTGAAATTACAATGAAACTATTTGAAGCT
 ATATATAAACACGCTGTTAGTCAAGGTATTACAGAATATGTAACAGTAACATCAACAGCAATAGAGCG
 ATTTTTAAAGCGTATTAAAGTTCCTTGTCATCGTATTGGAGACAAAGAAATTCATGTATTAGGTGATA
 CTAAATCGGTTGTATTGTCTATGCCTATTAATGAACAGTTTAAAAAGCAGTCTTAAATTAACCTAGAA
 CCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTCTGCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAACGGTAAT
 AGATTGACATTTGATTCTAATAAATTGGATTTTTGTCACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTT
 TAACATAAGTACCTGTAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTGTATAATAAATGTAGT
 ATTAGGGGAGGTATGACAATATGGAAATAACTTTTTACCCTTTAACGGATGCACAAAACGAATTTGG
 TACACAGAAAAATTTTATCCTCACACGAGCATTTCAAATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGC
 TGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAGCAGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGC
 GCCTTCGGTTGCGGCTAGATGAAAACGGGGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGAT
 ATAAAACATACTGACACTACTGAAGATCCGAATGCGATAGAGTTTATTTACAATGGAGCCGGGAGGA
 AACGAAGAAACCTTTGCCGCTATACGATTGTGATTTGTTCGTTTTTCCTTGTTACCATAAAGGAAA
 ATGAAGTGTGGTGGCCATAAGGCCTT

Legenda: final da sequência expandida do gene *hxlR* com terminador rho-independente; **sequência S0**; cicatriz *XbaI/SpeI*; **promotor R6**; **RBS 1**; início do gene *srfAA*; **sítio de restrição da SfiI**.

SD4 (951 pb)

AAGGCCAACGAGGGCTAAATGGAAAATGCTCATTTTTATGGCATTTAGGAAAAGAAGGCACAAAACGGT
 TCAATGAATTAAAAACATTGATTCCCTGATATTACGCAGAAGATCCTCGTGAATCAGCTGAGAGAGCTT
 GAGCAGGATATGATTGTTACAGGGAAGTGTATCCAGTTGTCCCGCCGAAGGTTGAATATTCTCTGAC
 CCCGCACGGAGAAAGCCTCATGCCATTCTTGAAGCCATGTATGAGTGGGGGAAAGGCTATATGGAAT
 TGATTGATATCGACAAAAATGTCATGAAAGAATCGTTGTAAGACGCTCTTCGCAAGGGTGTCTTTTTT
 TGCCTTTTTTTTCGGTTTTTTCGCGGTACACATAGTCATGTAAAGATTGTAAATTGCATTCAGCAATAA
 AAAAAGATTAAATCTCAAAAAGGTGTTGACATTCAAAACAAAATATGGTATAATGCCCCAAAATCGC
 AAAAAAGTGTGACAACTTAACCTCAGATCTGGTATAATAGAAAAGAAGGAGATATACATATGGAAAT
 AACTTTTTACCCTTTAACGGATGCACAAAACGAATTTGGTACACAGAAAAATTTTATCCTCACACGA
 GCATTTCAAATCTTGCGGGGATTGGTAAGCTGGTTTCAGCTGATGCGATTGATTATGTGCTTGTGAG
 CAGGCGATTCAAGAGTTTATTCGCAGAAATGACGCCATGCGCCTTCGGTTGCGGCTAGATGAAAACGG
 GGAGCCTGTTCAATATATTAGCGAGTATCGGCCTGTTGATATAAAAACATACTGACACTACTGAAGATC
 CGAATGCGATAGAGTTTATTTACAATGGAGCCGGGAGGAAACGAAGAAACCTTTGCCGCTATACGAT
 TGTGATTTGTTCCGTTTTTCCTTGTTACCATAAAGGAAAATGAAGTGTGGTGGCCATAAGGCCTT

Legenda: final da sequência expandida do gene *hxlR* com terminador rho-independente; **promotor TP2**, **RBS 2**; início do gene *srfAA*; **sítio de restrição da SfiI**.