

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

DANILO RAMOS CAVALCANTI

*Alteração Proteômica em *Zymomonas mobilis* durante a Produção de Levana*

RECIFE
2013

DANILO RAMOS CAVALCANTI

Alteração Proteômica em Zymomonas mobilis durante a Produção de Levana

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Glícia Maria Torres Calazans

**RECIFE
2013**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cavalcanti, Danilo Ramos

Alteração proteômica em *Zymomonas mobilis* ZAG-12 durante a produção de levana/ Danilo Ramos Cavalcanti– Recife: O Autor, 2013.

51 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Glícia Maria Torres Calazans

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Fermentação 2. Bactérias 3. Proteínas I. Silva, Márcia Vanusa da (orientadora) II. Calazans, Glícia Maria Torres (coorientadora) III. Título**

547.29

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 073

DANILO RAMOS CAVALCANTI

Alteração Proteômica em *Zymomonas mobilis* durante a Produção de Levana

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva
UFPE

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
UFRGS

Prof^a. Dra. Ana Maria Souto-Maior
UFPE

Recife, 25 de Fevereiro de 2013.

Aos meus pais, Manoel e Célia,
pelo amor incondicional e apoio.

À minha irmã, Diana,
pelo incentivo e torcida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem Ele, nada do que fiz teria sentido para mim. Pelas vezes em que fui fortalecido e guiado no caminho correto. Toda honra e glória pertence a Ele.

Aos meus pais, Manoel e Célia, pelo amor, carinho, paciência, incentivo e determinação em me conduzirem até o presente momento. Amo vocês!

À minha irmã, Diana, pelo apoio nas horas em que preciso.

À Julyana Viegas, por ter aparecido na minha vida no momento certo, me incentivando e apoiando minhas decisões.

Aos meus avós, tios e tias, primos e primas, que sempre torcem por meu avanço profissional.

À Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva, por sua orientação, empenho, sabedoria, compreensão e paciência que muito me auxiliaram. Mas muito mais que isto, uma amiga que ganhei, que mesmo em meio a tanto trabalho, ainda resta tempo para uma boa conversa e muitas gargalhadas.

À Prof. Dra. Glícia Maria Torres Calazans, por ter aceitado me coorientar quase na metade no mestrado. Embora estivesse distante pessoalmente, esteve presente virtualmente, ajudando e instruindo com sua paciência e delicadeza. Muito obrigado pelo apoio e amizade.

À Túlio Diego e Carolina Malafaia, meu muitíssimo obrigado. Vocês foram pessoas essenciais para a realização e concretização deste trabalho. Carol, me auxiliando desde os primeiros passos e, Túlio, se dispondo a ir até Brasília para que meu projeto fosse finalizado.

À Maria da Glória, amiga do mestrado, que mesmo atribulada com suas atividades, me ajudou nos momentos em que precisei.

À Fátima Regina, Cynthia Coimbra, Clarissa Sá e Ludhimilla Suelen, que se dispuseram a me ajudar quando eu não sabia de praticamente nada e foram me ensinando o “bê-á-bá” dos processos fermentativos.

Aos amigos do Mestrado em Biotecnologia Industrial, Gustavo, Carla, Darne, Guilherme, Sandrine, Bruno, em especial Rebeka, Mariana, Edkarlla e Glêzia, pelos momentos divertidos que passamos juntos.

Aos amigos dos laboratórios de Biologia Molecular e de Processos Fermentativos, Érika, Louise, Luís Cláudio, Cibele, Thayane, Ana, Mirzânia, Patrícia, Alexandre, Clóvis, Teresa, Thays e Sarah pelo apoio.

Às minhas amigas Suely Cavalcanti e Betânia Alves, pelas conversas e conselhos que ambas me davam quando eu mais precisava.

A todos os professores do mestrado, em destaque as Professoras Doutoras Ana Maria Souto-Maior, Ester Ribeiro Gouveia e Maria de Fátima Queiroz, por me deixarem usar alguns equipamentos de seus respectivos laboratórios para que eu pudesse dar andamento ao meu trabalho.

Aos Departamentos de Antibióticos e de Bioquímica, especialmente ao Laboratório de Processos Fermentativos e de Biologia Molecular, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial e a todos que fizeram e/ou fazem parte da coordenação deste programa.

À CAPES pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas nestes dois anos foram envolvidas, direta ou indiretamente, na realização deste projeto. Obrigado!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é "muito" para ser insignificante”.

Augusto Branco

RESUMO

Levana é um polímero de frutose produzido por *Zymomonas mobilis* que apresenta propriedades físico-químicas e biológicas que possibilitam seu uso pelas indústrias alimentícia e farmacêutica. Visando-se detectar proteínas diferencialmente expressas durante a produção deste polímero, procedeu-se a análise proteômica por meio de eletroforese bidimensional seguida por espectrometria de massas. Uma vez que as proteínas são os elementos efetores da expressão gênica e que a análise de proteomas pode auxiliar na identificação de pontos de controle do metabolismo determinantes para a biossíntese. Inicialmente, foi realizada a padronização da etapa de extração de proteínas totais solúveis de modo a obter-se uma análise proteômica global reprodutível e de qualidade. Foram testados três métodos de extração de proteínas totais (trizol, Mehta e Rosato e tampão de lise) em cinco linhagens (Ag11, ZAG-12, ZM4, ZAP e Z1-87) de *Z. mobilis* que apresentam características metabólicas diferenciadas. Dentre esses métodos, o do reagente Trizol possibilitou a obtenção de proteínas totais em quantidade e qualidade para as análises propostas. A linhagem ZAG-12, por se destacar entre as demais em termos quantitativos na produção de levana, foi escolhida para a realização dos estudos proteômicos. Esta bactéria foi crescida em meio de glicose por 24 horas, inoculada em meio de sacarose na concentração de 100 g L⁻¹ por 24 horas e submetida à fermentação em meio de sacarose na concentração de 200 g L⁻¹ por 72 horas. Alíquotas foram colhidas a cada 24 horas para dosagem de carboidratos e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência, e dosagem de levana. Para análise das proteínas diferencialmente expressas foram coletadas amostras nos tempos inicial e final da fermentação. Pode-se reconhecer aproximadamente 450 proteínas diferentes em cada gel e 44 proteínas com expressão diferenciada na comparação das duas condições estudadas. Estas proteínas foram analisadas pelo espectrômetro do tipo MALDI TOF/TOF. As proteínas diferencialmente expressas identificadas foram agrupadas de acordo com suas funções no metabolismo, em que 57% estão associadas com o metabolismo de carboidratos, 13% com mecanismos de tradução e os outros 30% com outros metabolismos, biossíntese e transcrição. Este trabalho contribuiu no estabelecimento de metodologias eficientes para obtenção de proteínas totais solúveis, assim como definiu as melhores condições

para separação de proteínas por eletroforese bidimensional em *Z. mobilis*. Além disso, os resultados obtidos servirão como base para o entendimento acerca do metabolismo da *Z. mobilis* durante a produção de levana e abrirão oportunidades para novos estudos.

Palavras-chave: expressão diferencial; fermentação; proteômica; *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT

Levan is a fructose's polymer produced by *Zymomonas mobilis* that presents physicochemical and biological properties that allow its use by the food and pharmaceutical industries. Aiming to detect differentially expressed proteins during the production of this polymer, was proceeded the proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis followed by mass spectrometry. Given that proteins are the effectors elements of gene expression and proteome analysis can help identify control points determinants of metabolism for biosynthesis. Initially, was performed the standardization of step of extracting total soluble proteins so as to obtain a global proteomic analysis and reproducible quality. Three different extraction methods of total protein (trizol, Mehta and Rosato and lysis buffer) in five strains (AG11, ZAG-12, ZM4, Z1 and ZAP-87) of *Z. mobilis* presenting different metabolic characteristics. Among these methods, the reagent Trizol allowed obtaining total protein quantity and quality for the proposed analyzes. A strain ZAG-12, by stand out among the others in in quantitative terms on levan production, was chosen to carry out the proteomic studies. Among these methods, the reagent Trizol allowed obtaining total protein quantity and quality for the proposed analyzes. A strain ZAG-12, by stand out among the others in in quantitative terms production of levan, was chosen to carry out the proteomic studies. This bacterium was grown in glucose medium for 24 hours, inoculated in sucrose medium at a concentration of 100 g L⁻¹ for 24 hours and subjected to fermentation in sucrose medium at a concentration of 200 g L⁻¹ for 72 hours. Aliquots were taken every 24 hours for dose of carbohydrates and ethanol by high performance liquid chromatography, and dosage levan. For analysis of differentially expressed proteins were collected samples at start and end of fermentation. Can be recognized about 450 different proteins in each gel and 44 proteins with differential expression on the comparison of two conditions studied. hese proteins were analyzed by MALDI TOF/ TOF spectrometer. The differentially expressed proteins identified were grouped according to their functions in metabolism, in which 57% are associated with the metabolism of carbohydrates, 13% with translation mechanisms and the other 30% with other metabolisms, biosynthesis and transcription. This work contributed to the establishment of efficient methodologies for obtaining total soluble protein, as well as has defined the best

conditions for protein separation by two-dimensional electrophoresis in *Z. mobilis*. Furthermore, the results will serve as basis for understanding the metabolism of *Z. mobilis* during levan production and will open opportunities for new studies.

Keywords: differential expression; fermentation; proteome; *Zymomonas mobilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Metabolismo de carboidratos em <i>Z. mobilis</i> .	6
Figura 3.2. Estrutura da levana.	8
Figura 5.1. Produção de levana por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 em 72h de fermentação.	21
Figura 5.2. Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12, a 20 °C.	22
Figura 5.3. Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12, a 30 °C.	22
Figura 5.4. Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12, a 40 °C.	23
Figura 5.5. Gel de separação de poliacrilamida 15%.	25
Figura 5.6. Gel bidimensional de extração de proteínas de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 pelo método do trizol.	26
Figura 5.7. Gel bidimensional de extração de proteínas de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 pelo método de Mehta e Rosato.	26
Figura 5.8. Gel bidimensional de extração de proteínas de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 pelo método do tampão de lise.	27
Figura 5.9. Visão geral do proteoma de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 no tempo inicial	28

de fermentação para produção de levana, separado por eletroforese bidimensional. A resolução de 2-D do proteoma com IEF/ SDS-PAGE e pI 4-7 linear 220-10 kDa de massa molecular.

Figura 5.10. Visão geral do proteoma de *Z. mobilis* ZAG-12 em 72 horas de fermentação para produção de levana, separado por eletroforese bidimensional. A resolução de 2-D do proteoma com IEF/ SDS-PAGE e pI 4-7 linear 220-10 kDa de massa molecular. 28

Figura 5.11. Zoom das áreas dos géis bidimensionais mostrando spots de proteínas diferencialmente expressas nos tempos 0 h e 72 h. 29

Figura 5.12. Representação proporcional das proteínas identificadas de acordo com suas funções no metabolismo de *Z. mobilis* ZAG-12. 32

Figura 5.13. Vias metabólicas de *Z. mobilis*. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Rendimento de levana para a linhagem de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12, em 72 horas de fermentação.	23
Tabela 5.2. Rendimento de etanol para a linhagem de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12, em 72 horas de fermentação.	24
Tabela 5.3. Lista de proteínas diferencialmente expressas durante a produção de levana por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12.	30
Tabela 5.4. Proteínas com aumento de expressão no tempo 0 h de fermentação (oriundas do inóculo) durante a produção de levana e de etanol em <i>Z. mobilis</i> ZAG-12.	32
Tabela 5.5. Proteínas com aumento de expressão no tempo 72 h de fermentação durante a produção de levana e de etanol em <i>Z. mobilis</i> ZAG-12.	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
ACN	Acetonitrila
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Bovine serum albumin/ Albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid/ Ácido etilenodiamino tetra-acético
FURFURAL	2-furaldeído
GFOR	Glicose-frutose oxirredutase
GL	Glicolactonase
GluRS	glutamil-RNAt sintetase
HMF	5-Hidroximetil- 2-furaldeído
INV B	Invertase
KdsA	2-desidro-3-desoxifosfooctonato aldolase
LEV U	Levanassacarase
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization/ Dessorção e ionização a laser assistida
MS	Mass spectrometry/ Espectrometria de massas
NAD	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo hidreto
NADP	Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato
PBS	Phosphate buffered saline/ Tampão fosfato salino
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA _t	Ácido ribonucleico transportador
ROK	Rho quinase
rpm	rotação por minuto

SDS	Sodium dodecyl sulfate/ Dodecil sulfato de sódio
TEMED	Tetrametiletilenodiamida
TFA	Trifluoroacetic acid/ Ácido trifluoracético
TOF	Time of Flight/ Tempo de voo
TPP	Tiamina pirofosfato
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco.
UFPEDA	Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto em substrato (g g^{-1})

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. <i>Zymomonas mobilis</i>	4
3.1.1. Histórico	4
3.1.2. Aspectos morfológicos, bioquímicos e genômica de <i>Z. mobilis</i>	5
3.2. Levana	8
3.3. Abordagem proteômica	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1. Micro-organismos	13
4.2. Meios de cultura	13
4.2.1. Meio de manutenção de <i>Z. mobilis</i>	13
4.2.2. Meio de preparação do inóculo	13
4.2.3. Meio de fermentação	13
4.3. Processos fermentativos	14
4.3.1. Efeito da temperatura na produção de levana	14
4.4. Determinações quantitativas para acompanhamentos dos processos fermentativos	14
4.4.1. Dosagem de levana	14
4.4.2. Determinação de carboidratos e etanol por CLAE	15
4.5. Proteômica	15
4.5.1. Extração de proteínas totais	15
4.5.1.1. Método do Trizol	15
4.5.1.2. Método do tampão de lise	16

4.5.1.3. Método de Mehta e Rosato	16
4.6. Quantificação de proteínas totais	17
4.6.1. Kit BCA	17
4.6.2. Kit 2D Quant	17
4.7. Gel unidimensional SDS-PAGE	17
4.8. Eletroforese bidimensional	18
4.8.1. Primeira dimensão	18
4.8.2. Segunda dimensão	18
4.9. Aquisição de imagens	19
4.10. Análise de proteínas por MALDI-TOF/TOF MS	19
4.11. Análise dos dados MS/MS	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Produção de levana e etanol por <i>Z. mobilis</i> ZAG-12	21
5.2. Análise da extração de proteínas de <i>Z. mobilis</i> em gel unidimensional	24
5.3. Análise da extração de proteínas de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 em gel bidimensional	25
5.4. Análise de proteínas	27
5.5. Regulação proteica no processo de produção de levana e de etanol	29
5.5.1. Proteínas diferencialmente expressas	33
5.5.1.1. Proteínas diferencialmente expressas oriundas do inóculo	35
5.5.1.2. Proteínas diferencialmente expressas em 72 horas de fermentação	37
6. CONCLUSÃO	40
7. PERSPECTIVA	41
8. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

A utilização de processos biotecnológicos visando à produção de uma ampla variedade de compostos vem despertando um crescente interesse, sobretudo nas últimas décadas, quando muitos avanços têm sido alcançados e novas ferramentas têm sido empregadas nesta área. Tal interesse pode ser justificado por manuseios mais brandos empregados na biossíntese, que reduzem o consumo de energia e aumentam a segurança do processo, pela alta especificidade das enzimas, que podem minimizar a formação de subprodutos, com baixo impacto ambiental (YANG et al., 2009).

Em meio a esse contexto, *Zymomonas mobilis* tem despertado um interesse considerável como resultado de seu metabolismo rápido e eficiência em produzir etanol e subprodutos, como levana, sorbitol, ácido glucônico, entre outros, a partir de açúcares simples. Além disso, apresenta outras vantagens como menor produção de biomassa, não necessidade de adição controlada de oxigênio e boa adequação às manipulações genéticas (NAJAFPOUR, 2007; RANZAN, 2010).

O interesse industrial em polissacarídeos microbianos reside no fato destes apresentarem propriedades simples e garantirem um suprimento de material de qualidade constante, preço estável e não sujeito a variações de tempo. Estas propriedades podem ser usadas na área de polímeros farmacologicamente ativos para desenvolvimento de liberação de drogas (CALAZANS, 1997).

Na indústria alimentícia, esses polissacarídeos possuem diversas propriedades funcionais, atuando como crioprotetores, estabilizantes, gelificantes e espessantes, sendo muitas vezes os principais responsáveis pela textura (corpo, viscosidade e consistência) dos alimentos processados. A levana é considerada uma boa fonte de frutose, o emprego desse polímero tem ocorrido na fixação de cores e sabores, atuando como espessante e estabilizante em géis para sobremesas, sorvetes e derivados do leite em temperos prontos para salada, em bebidas, coberturas para produtos de confeitaria e ainda como invólucro de embutidos (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

Com isso, o uso de ferramentas genômicas, transcriptômicas, metabolômicas e proteômicas tem sido aplicado em *Z. mobilis* com o intuito de elucidar e aperfeiçoar condições de processos aos quais está sendo submetido. A utilização da

ferramenta proteômica tem sido de fundamental importância em organismos vivos, visto que o proteoma tem uma natureza dinâmica (alterando-se frente a diferentes condições de estímulos). Seu estudo representa uma forma de identificar possíveis funções das proteínas e uma forma de investigar processos metabólicos em sistemas vivos para esclarecer o funcionamento de uma célula ou tecido a nível molecular (SILVA; CORRÊA; REIS, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Comparar e identificar, por meio de eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas, proteínas diferencialmente expressas durante a produção de levana em *Z. mobilis*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a produção simultânea de levana e etanol por *Z. mobilis* ZAG-12;
- Definir a melhor metodologia para extração das proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 ;
- Realizar análise comparativa do padrão de expressão diferencial de proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Zymomonas mobilis*

3.1.1. Histórico

Zymomonas mobilis é uma bactéria destacada como promissora para a indústria pelo seu potencial associado à produção de etanol e outros compostos, como levana, sorbitol, ácido lactobiônico e frutooligossacarídeos. Foi isolada por Lindner, em 1924, no México, a partir da seiva de *Agaves atrovirens*, para produção de uma bebida chamada pulque. No entanto, recebeu o binômio latino de *Zymomonas mobilis* só em 1936, de Kluwyer e van Niel, sendo por esta razão, sua descoberta atribuída aos mesmos (CALAZANS, 1987).

Em 1951, Oswaldo Gonçalves de Lima, no Congresso Científico Mexicano, apresentou resultados de *Z. mobilis*, com uma linhagem denominada Ag11, isolada da seiva açucarada do agave, no México. No ano seguinte, em Recife, isolou novas cepas de *Z. mobilis* denominadas CP1, CP2, CP3 e CP4, a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970). Estas cepas foram consideradas diferentes uma das outras até ser feita uma análise do perfil plasmidial, a qual mostrou que estas cepas eram semelhantes entre elas, aglutinando-as sob a denominação única de CP4 (DALLY et al., 1982).

A manipulação genética da bactéria *Z. mobilis*, em Recife, teve início em 1983, com a chegada do pesquisador do National Hygiene Institute of Warsaw, W. Kurylowicz, ao Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco, com a introdução da técnica de fusão de esferoplastos. Vários estudos começaram a ser realizados empregando tal técnica. Dentre tais estudos, destaca-se o descrito por Calazans (1989), no qual as cepas de *Z. mobilis* ZAP (produtora de levana) e Ag11 (não produtora de levana) foram selecionadas para utilização da técnica de fusão de esferoplastos. Os esferoplastos da ZAP foram inativados usando a técnica descrita por Fodor e Asföldi (1976) enquanto que os esferoplastos de Ag11 foram mantidos ativos. A fusão dos esferoplastos seguiu o procedimento descrito por Hopwood e Wright (1978). O resultado desta fusão resultou na formação da linhagem de *Z. mobilis* ZAG. O propósito inicial deste experimento era obter clones

que fossem tolerantes a altas temperaturas ($T > 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) e bons produtores de etanol como a ZAP, e não produtores de levana como a Ag11. Entretanto, todos os clones adquiriram a qualidade de produção de levana da ZAP, destacando-se a ZAG-12, como uma boa produtora de levana (CALAZANS et al., 1989; FALCÃO DE MORAIS et al., 1993).

3.1.2. Aspectos morfológicos, bioquímicos e genômica de *Z. mobilis*

Z. mobilis são bactérias Gram-negativas, anaeróbias aerotolerantes, que se apresentam como bastonetes curtos e grossos medindo aproximadamente 2,0 a 6,0 μm de comprimento e 1,0 a 1,4 μm de largura. Podem aparecer isoladas ou em pares, são geralmente móveis, possuindo de 1 a 4 flagelos polares. Quanto à nutrição, são organismos quimiorganotróficos pouco exigentes. Com relação às condições de cultivo, toleram baixos valores de pH, em torno de 4,0 para a maioria (SWINGS; DE LEY, 1977; YANG et al., 2009). Em meio líquido, apresentam crescimento satisfatório com temperaturas entre 25 $^{\circ}\text{C}$ e 40 $^{\circ}\text{C}$, de cepas isoladas do caldo-de-cana picado (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970).

Gibbs e DeMoss, em meados de 1950, demonstraram que o catabolismo anaeróbio da glicose pela via de Entner-Doudoroff (Figura 3.1), utilizado principalmente por bactérias estritamente aeróbias, era utilizado por *Z. mobilis*, uma bactéria anaeróbica, para produção de etanol (SWINGS e DELEY, 1977).

Em decorrência do uso dessa via, o rendimento energético obtido por *Z. mobilis* representa a metade do obtido por *Saccharomyces cerevisiae* pela via de Embden-Meyerhof (FALCÃO DE MORAIS, 1993; MCGILL; DAWES, 1971; SWINGS e DELEY, 1977). Estas rotas metabólicas são comparativamente simples em relação a outros micro-organismos. *Z. mobilis* cataboliza substratos com altas taxas específicas de carbono, uma vez que a parcela maior deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final (TOMA et al., 2003).

A utilização de sacarose por *Z. mobilis* para a produção de etanol apresenta dois problemas distintos: o primeiro, na fase de clivagem da molécula de sacarose pela enzima levanassacarase, onde acontece um desvio da rota metabólica para a produção de levana; e o segundo, para a oxidação direta de glicose ligada à redução da frutose para formar sorbitol, ou a polimerização de frutose para formação de

frutooligossacarídeos. Entretanto, isso ocorre quando existe alta concentração de sacarose no meio, uma vez que a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior que o consumo dos seus monossacarídeos. Estes problemas levam a uma redução do rendimento em etanol a partir de sacarose, em comparação com os obtidos com os processos de conversão de amido ou glicose (KANNAN et al., 1993). A frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é transportada para o interior das células primariamente, mas pela ação da enzima levanassacarase é usada na formação de levana e frutooligômeros (LOOS et al., 1994).

A sacarose é metabolizada em glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanassacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutoseoxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) que existe apenas na bactéria *Z. mobilis*. A enzima GFOR madura está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um cosubstrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (SPRENGER, 1996).

Devido a estas características que *Z. mobilis* apresenta, estudos genéticos passaram a ser inseridos na pesquisa desta bactéria. Estudos envolvendo melhoria de linhagens mutantes (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001) bem como a aplicação da análise do fluxo metabólico, mutagênese dirigida, inserção e/ou deleção de genes específicos e engenharia metabólica para desenvolvimento de cepas (HATZIMANIKATS et al., 1998; CORNISH-BOWDEN; CARDENAS, 2000). A realização de um mapa físico do genoma de *Z. mobilis* ZM4 e sua unidade transcricional ribossomal (KANG; KANG, 1998; LEE; JIN; KANG, 2001) contribuíram para a descoberta do primeiro genoma completo deste micro-organismo. O simples cromossomo circular consiste de 2.056.416 pares de base com uma média de 46,33% de conteúdo de ligações de guanina e citosina (SEO et al., 2005). Sendo

assim, estudos a níveis, transcriptômicos, metabolômicos (YANG et al., 2009) e proteômicos continuam sendo desenvolvido com as linhagens desta espécie.

3.2. Levana

Ao longo das últimas décadas, vários tipos de biopolímeros têm sido intensamente investigados por causa de suas funcionalidades físicas e fisiológicas. Levana é um polímero de frutose de origem microbiana composta de moléculas ligadas de β -2,6-frutossil-frutose e cadeias laterais (Figura 3.2).

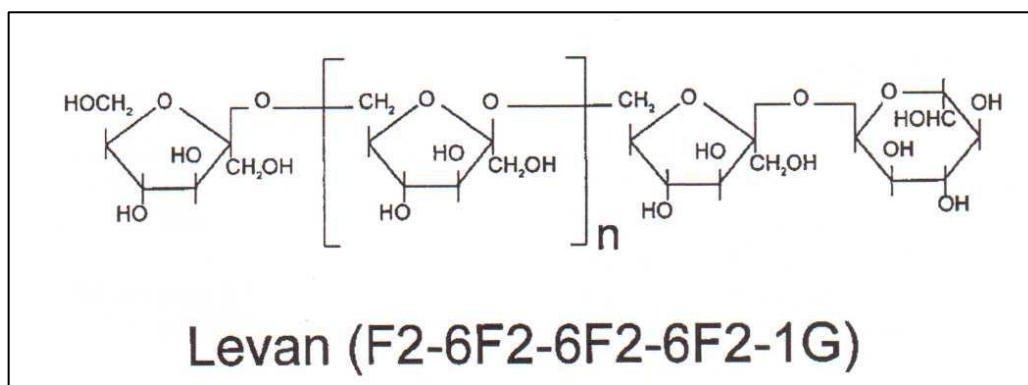


Figura 3.2. Estrutura química da levana (Fonte: HETTWER et al., 1998).

Possui peso molecular estimado em $2,5 \times 10^6$ Daltons obtido por sínteses enzimática e microbiológica. Apresenta viscosidade, solubilidade em água e óleo, compatibilidade com sais e surfactantes, estabilidade para calor, acidez e basicidade, propriedades reológicas e de suspensão, formação de película e capacidade de retenção de água e produtos químicos. Também apresenta propriedades biológicas para serem usadas como emulsificante, estabilizante e espessante, bem como agente encapsulante, crioprotetor e osmorregulador (HAN; CLARKE, 1990; YOSHIDA; SUZUKI; YAGI, 1990).

Tais propriedades apresentam excelente expectativa na área da saúde, por possuírem potencialidade terapêutica aproveitável na área farmacológica, por exemplo, como substituto de plasma sanguíneo (LIEPA et al., 1993), anti-inflamatório (VIGANTS; RICKS; MARX, 2001), imunomodulador (YOO et al., 2004), anticarcinogênico (CALAZANS et al., 1997; CALAZANS et al., 2000) e hipocolesterolêmico (YAMAMOTO et al., 1999) em *Z. mobilis*. Na indústria de alimentos, a levana tem vários usos potenciais, tais como: agente espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos (TANO; BUZATO, 2003).

A levana é produzida a partir da reação de transfrutolizilação catalisada pela enzima levanassacarase (β -2,6 frutana-D-glucose-frutossiltransferase, EC 2.4.1.10), que utiliza sacarose como substrato. Levana pode ser produzida como subproduto vantajoso economicamente em destilarias de álcool utilizando sacarose como substrato (BEKERS et al., 2002).

A produção deste polímero foi feita sob a influência da agitação; concentrações de sacarose inicial e de extrato de levedura; pH, temperatura e tipos de inóculo. Diferentes autores estudaram vários destes parâmetros pelo método tradicional de otimização univariada, a qual permite a variação de apenas um fator de cada vez, enquanto todas as outras variáveis são mantidas constantes. A principal desvantagem desta estratégia é que ela deixa de considerar qualquer possível interação entre os fatores e, conseqüentemente, pode produzir resultados enganosos (MELO et al., 2007).

A concentração de sacarose e a temperatura são os fatores mais importantes que regulam a atividade de síntese de frutooligossacarídeos catalisada pela levanassacarase e a formação de levana em *Z. mobilis* (BEKERS et al., 2002). Em baixas concentrações de sacarose, em torno de 10 a 15% a 25 °C, etanol é produzido, enquanto que com 50 a 70% da concentração de sacarose, entre 40 e 45 °C é assegurada a síntese de frutooligossacarídeos (CRITTENDEN; DOELLE, 1994).

3.3. Abordagem proteômica

A identificação de genes tem contribuído para a compreensão do mecanismo de modulação dos micro-organismos a condições abióticas distintas (AMARAL et al., 2008). Entretanto, mudanças transcricionais não refletem a expressão de proteínas (GYGI et al., 1999), uma vez que processos pós-transcricionais, alterando a quantidade de proteína ativa, como a síntese, modificação e a degradação de proteínas, não são levadas em consideração, podendo haver um aumento drástico no proteoma sem um aumento comitente da expressão gênica. Assim, abordagens complementares como o estudo de proteomas podem ajudar a identificar as proteínas relacionadas na resposta de micro-organismos às condições ambientais (CHEN; HARMON, 2006).

A proteômica surgiu no final de 1970, quando pesquisadores começaram a criar as bases de dados de proteínas usando naquela época a moderna técnica de eletroforese bidimensional (O'FARREL, 1975). O termo proteoma foi proposto por Wilkins e Willians, em 1994, como sendo todo o conteúdo de proteínas expressas por um genoma ou, no caso de organismos multicelulares, ao complemento proteico expresso por um tecido ou células diferenciadas (WILKINS et al., 1996). Depois da repercussão provocada pelo sequenciamento do genoma de vários organismos, pesquisadores perceberam que, para se compreender a função gênica em toda sua plenitude, era necessário o estudo em larga escala das proteínas expressas. Verificou-se que, apesar de importante, a análise das sequências de nucleotídeos nem sempre reflete uma relação direta com os níveis de proteínas expressas e, conseqüentemente, de atividade biológica (GYGI et al., 1999).

Enquanto o genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, o proteoma é extremamente dinâmico e variável. A análise proteômica permite saber se um gene está sendo expresso, isto é, a concentração relativa desse produto e, por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após a sua tradução. A análise proteômica pode mostrar também como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados, mediante, por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (GALDOS, 2009).

Inicialmente, o objetivo dos estudos proteômicos foi identificar em larga escala todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Estudos versavam na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intento de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão proteica (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

As razões que justificam tal magnitude do proteoma são as variações na clivagem do RNA e as modificações pós-traducionais, que o torna várias vezes maior e complexo que o genoma correspondente. Modificações na abundância (quantidade) das proteínas com o tempo, com o desenvolvimento do organismo e as alterações do meio ambiente, tornam este desenvolvimento dinâmico (WILKINS et al., 1996).

Uma vez que as análises realizadas através do DNA e da sequência do RNAm por si só não determinam as propriedades dos sistemas biológicos, a análise

do proteoma é uma ferramenta de apoio conceitualmente atrativa, pois atrelada a estudos genômicos e transcriptômicos, podem fornecer dados que complementem a determinação de tais propriedades. Estas incluem a quantidade de expressão da proteína, a localização subcelular, o estado de modificação, e a associação com ligantes, bem como a taxa de variação com o tempo (GYGI et al., 1999).

Uma das técnicas de proteoma mais utilizada é a 2D-PAGE, seguida com análise de espectrometria de massas. No contexto da proteômica comparativa, onde o objetivo é identificar diferenças quantitativas e qualitativas entre amostras de proteínas, a técnica de 2D-PAGE é um método de escolha, e gera dados em um formato que possibilita uma boa avaliação visual (para amostras pouco complexas) e fornece comparações quantitativas (RABILLOUD, 2010). Esta técnica permite a separação, a visualização e a quantificação de proteínas reproduzidas sobre um gel único (KLOSE; KOBALZ, 1995; O'FARELL, 1975).

Com os recentes avanços, como o aumento da reprodutibilidade pelo uso de gradientes imobilizados de pH, a visualização de imagens e aumento de sensibilidade de detecção; devido ao incremento de tecnologias utilizando fluorescência e nas análises por espectrometria de massas, como o aumento de sensibilidade, resolução e velocidade de aquisição de dados de identificação de proteínas para um nível que permite a análise em larga escala de proteínas separadas por eletroforese bidimensional (2-DE), a proteômica tem se tornado uma estratégia alternativa no estabelecimento de marcadores bioquímicos e uma das mais utilizadas para análises metabólicas e de expressão gênica global (PAWLOWSKI, 2007; SHEVCHENKO et al., 1996).

A eletroforese bidimensional apresenta também limitações, como baixa sensibilidade de detecção de proteínas em baixa concentração, dificuldades na resolução de spots das proteínas com pontos isoelétricos e massas moleculares parecidos e pouca representação das proteínas hidrofóbicas. No entanto, repetições de géis, maior rigor nas análises e aplicação de protocolos mais específicos para recuperação de proteínas com baixa solubilidade tem feito com que estas dificuldades venham sendo superadas (GÖRG et al., 2000; GÖRG et al., 2004; SANTONI et al., 2000). O uso de compostos fluorescentes e de softwares de análise de imagens de géis tem proporcionado resultados que permitem melhores

interpretações de dados (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; TANNU; HEMBY, 2006; VISWANATHAN et al., 2006).

A proteômica tem sido usada no estudo de vários organismos com diversos propósitos, como análise do perfil proteico para correlação filogenética, estudo das proteínas de membrana para resolução das interações proteína-proteína, estudo de isoformas, resposta a diversas condições fisiológicas, doenças, detecção de modificações pós-traducionais, proteoma mitocondrial e nuclear (LIEBLER, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Foram utilizadas cinco linhagens de *Z. mobilis*, pertencentes à Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), designadas por Ag11 (UFPEDA 198), ZAG-12 (UFPEDA 241), ZAP (UFPEDA 205), ZM4 (UFPEDA 633) e Z1-87 (UFPEDA 355). Todas foram utilizadas para escolha do melhor protocolo de extração de proteínas em *Z. mobilis*, entretanto, apenas ZAG-12 foi submetida ao processo fermentativo.

4.2. Meios de cultura

4.2.1. Meio de manutenção de *Z. mobilis*

Os micro-organismos cedidos pela Coleção foram mantidos em meio líquido na composição em g L⁻¹: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0; em estufa microbiológica a 30° C, por 24 a 48 horas. O pH foi ajustado em 6,5. As linhagens foram conservadas em geladeira a 4° C, sendo repicadas a cada três meses para o meio de manutenção.

4.2.2. Meio de preparação do inóculo

Após o crescimento, as culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo o meio da preparação de inóculo na composição em g L⁻¹: sacarose 100,0; extrato de levedura 5,0; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂SO₄ 1,0. O pH deste meio foi ajustado em 6,0. Em seguida, os frascos foram colocados em estufa a 30 °C por 24 horas.

4.2.3. Meio de fermentação

O meio utilizado na produção de levana, designado ML, foi preparado de maneira idêntica ao meio de preparação do inóculo, diferindo apenas na concentração de sacarose que foi de 200,0 g L⁻¹ (CALAZANS et al., 1989). O pH foi ajustado em 6,0. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3. Processos fermentativos

4.3.1. Efeito da temperatura na produção de levana

Os experimentos foram conduzidos com a linhagem *Z. mobilis* ZAG-12, em frascos Pyrex de 500 mL, contendo 300 mL de meio de fermentação. Foi utilizado como inóculo 10% em volume de cultivo crescido a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas de pré-fermentação. As fermentações foram realizadas nas temperaturas de 20, 30 e $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 72 horas, sem agitação. Os frascos de fermentação submetidos à temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram colocados em incubadora refrigerada. Amostras para medidas da biomassa, da sacarose, do pH e da levana produzida, foram colhidas nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas.

Foram realizadas sementeiras do mosto fermentado, em meio ágar nutritivo, com o intuito de investigar a presença de possíveis contaminantes na fermentação nos tempos mencionados anteriormente (SILVA, 1996). Nesse meio não se verifica crescimento de *Zymomonas* devido à ausência de determinados fatores essenciais para esta bactéria. O aparecimento de colônias implica na presença de contaminantes.

4.4. Determinações quantitativas para acompanhamentos dos processos fermentativos

4.4.1. Dosagem de levana

A levana do líquido fermentado foi precipitada com etanol absoluto, ajustando-se a mistura hidroalcoólica para 70 % (v/v) em etanol. Foram adicionados 15 mL do etanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 5 mL do fermentado já filtrado em membrana porosa $0,22\text{ }\mu\text{m}$ pelo sistema de filtração a vácuo (Millipore). Após a adição de 15 mL de etanol absoluto em 5 mL de filtrado, as amostras foram centrifugadas a $4200 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado, adicionaram-se 5 mL de água destilada para remoção da levana das laterais do tubo Falcon. Esse processo foi realizado duas vezes. A levana precipitada foi dosada, em g L^{-1} , por peso seco em pesa-filtros previamente secos e tarados, que foram colocados em estufa a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (REISS; HARTMEIER, 1990).

4.4.2. Determinação de carboidratos e etanol por CLAE

A quantificação da sacarose, glicose, frutose e etanol para a linhagem de *Z. mobilis* ZAG-12 ocorreu através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção por índice de refração (Agilent, Série 1100). Para esta análise, foi utilizada uma coluna Aminex HPX87H, com ácido sulfúrico 5 µM como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de 60°C. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana microporosa de 0,22 µm.

A quantificação utilizou o método do padrão externo, com utilização de uma curva de calibração feita simultaneamente com a análise dos dados obtidos durante a fermentação, com o intuito de prevenir erros de análise. Uma vez que este método é sensível a erros de preparo das amostras e dos padrões, bem como a injeção das soluções padrão e das amostras, sendo necessário tal procedimento para cada análise (RIBANI et al., 2004). As amostras e os padrões foram diluídos em fase móvel, filtrados e injetados automaticamente em um volume de 5 µL.

4.5. Proteômica

4.5.1. Extração de proteínas totais

Para os três métodos seguintes de extração, foram realizados em triplicata os experimentos com as seguintes linhagens: Ag11, ZAG-12, ZAP, ZM4 e Z1-87.

4.5.1.1. Método do Trizol

Foi adicionado 1,0 mL do reagente Trizol (Invitroge®) no micro tubo de 1,5 mL contendo as células de *Z. mobilis* e foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio e foram agitados em vórtex por 15 segundos, posteriormente incubados à temperatura ambiente por 3 minutos. Foram centrifugados a 12000 x g por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para outro micro tubo e adicionou-se 1,0 mL de isopropanol gelado e foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado por 3 vezes com 1 mL de solução de lavagem (0,3 M de hipoclorito de guanidina em etanol 95%), incubando em agitação por 20 minutos à temperatura ambiente na incubadora com agitação

orbital a 100 rpm. Centrifugou-se a 8000 x g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, descartou-se a solução de lavagem e adicionou-se 1,0 mL de etanol 100% e foram colocados no vórtex por alguns segundos. Incubou-se por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 8000 x g por 10 minutos a 4 °C. Secou-se o pellet à temperatura ambiente por 10 minutos. O pellet foi dissolvido em 200 µL de SDS 1% (1 g de SDS em 100 mL de água destilada) e 200 µL de PBS 1X (concentração em g L⁻¹: KCl 0,2; NaCl 8,0; Na₂HPO₄ 1,44; KH₂PO₄ 0,24) e usou-se um bastão de plástico para quebrar o pellet. Em seguida, juntaram-se as repetições da mesma amostra num mesmo eppendorf e foram incubadas a 50 °C por 2 horas. Centrifugou-se a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo para novo micro tubo. Em seguida, as amostras foram estocadas a -20 °C.

4.5.1.2. Método do Tampão de lise

Nas amostras mantidas no gelo foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise na concentração em g L⁻¹: 7 M ureia 420,0; 2 M tiureia 152,0; 4% CHAPS 40,0; 1% DTT 10,0. Posteriormente, foram centrifugadas a 14000 x g a 4 °C por 30 minutos e, os sobrenadantes das amostras foram transferidos para outro micro tubo e estocados a -20 °C.

4.5.1.3. Método de Mehta e Rosato

As células foram coletadas por centrifugação e os pellets foram lavados em tampão fosfato com pH ajustado em 7,2, na concentração em g L⁻¹: K₂HPO₄ 1,24; KH₂PO₄ 0,39; NaCl 8,8. Os pellets foram suspensos em 0,75 mL de tampão de extração com pH ajustado em 7,0, na concentração em g L⁻¹: 0,7 M sacarose; 0,5 M Tris-HCl; 30 mM HCl; 50 mM EDTA; 0,1 M KCl; 40 mM DTT; incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. O mesmo volume de fenol foi adicionado nos pellets e, depois de 15 minutos de agitação, a suspensão foi centrifugada a 10000 x g a 4 °C por 3 min. O sobrenadante foi descartado. Essa etapa foi repetida duas vezes. As proteínas foram precipitadas com 5 volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol e centrifugadas a 14000 x g a 4 °C por 30 minutos. O precipitado foi lavado uma vez com 1,0 mL de acetona 80% e centrifugado a 8000 x g a 4 °C por 5 min. O sobrenadante das amostras foi descartado e o pellet foi secado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de SDS

1% e PBS 1X para ressuspender as proteínas. O pellet foi quebrado com bastão de plástico e colocado em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram estocadas a -20 °C (MEHTA; ROSATO, 2001).

4.6. Quantificação de proteínas totais

4.6.1. Kit BCA

As proteínas foram quantificadas de acordo com a metodologia de Lowry (1951). Foi utilizado o Kit Thermo Scientific Pierce® BCA Protein Assay, no qual estava contida a proteína padrão albumina bovina sérica (BSA), para fazer a curva padrão. Foram pipetados 10 µL das amostras proteicas para um micro tubo e adicionados 90 µL de água destilada filtrada e autoclavada. As amostras foram agitadas por 20 segundos à temperatura ambiente. Para formação do reagente AB, foram utilizados na proporção de 50 partes do reagente A para 1 parte do reagente B, de acordo com o protocolo do fabricante. Em uma microplaca de Elisa, foram adicionados 200 µL do reagente AB e 25 µL da amostra em cada poço. Posteriormente, a microplaca foi colocada em estufa a 37 °C durante 30 minutos e lidas no espectrofotômetro com absorvância de 562 nm.

4.6.2. Kit 2D Quant

Foi feita uma curva padrão utilizando a solução de BSA 2,0 mg mL⁻¹. Foram colocados nos micro tubos 25 µL das amostras, adicionaram-se 500 µL da solução precipitante e foram postas no vórtex, seguida de incubação de 3 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 500 µL da solução coprecipitante. As amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 100 µL do Copper Solution e 400 µL de água mili-Q e colocados no vórtex para dissolver o pellet. As amostras foram lidas em espectrofotômetro na absorvância de 480 nm, usando água destilada como branco.

4.7. Gel unidimensional SDS-PAGE

Foram liofilizados 200 µg de proteínas. Na cuba de eletroforese foi adicionado primeiramente o gel de separação, o qual é composto por água destilada

esterilizada, TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8, acrilamida/bisacrilamida, SDS 10%, APS 10% e TEMED, na concentração de 15%; seguido de 200 µL de isopropanol visando a polimerização do gel. Após isso, foi adicionado o gel concentrador, na composição de 4%, constituído dos mesmos componentes do gel de separação, variando na faixa de pH do tris-HCl, que foi de 6,8. Foi colocado o tampão de corrida SDS 1X. Em cada amostra liofilizada, foram adicionados 20 µL do tampão de amostra 5X; e fervidos por 3 minutos a 100 °C. As amostras foram adicionadas no gel ao atingir a temperatura ambiente, corridas a 15 a 20 mA por cerca de 2 horas. Terminada a corrida, o gel foi colocado em uma solução de fixação por 30 minutos numa incubadora com agitação orbital com agitação de 50 rpm. Descartou-se a solução de fixação e adicionou-se no gel uma solução corante Coomassie Brilliant Blue por 30 minutos. Descartou-se a solução corante e adicionou-se a solução descorante até as bandas de proteínas serem vistas nitidamente.

4.8. Eletroforese bidimensional

4.8.1. Primeira dimensão

O equivalente a 1,0 mg de proteínas foi precipitado com ácido tricloroacético e foram ressolubilizados em tampão de reidratação. A focalização foi feita utilizando gradiente de pH imobilizado. As fitas IPG foram reidratadas no aparato para a focalização isoeletrica IPGphor 3, GE Healthcare, por 16 a 20 horas a 20 °C. A focalização isoeletrica foi feita nas seguintes etapas: 500 Vh, 800 Vh, 11300 Vh, 2900 Vh. Depois da focalização, as fitas foram lavadas com água ultrapura e armazenadas a -80°C, equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfetos (GÖRG et al., 1987).

4.8.2. Segunda dimensão

A segunda dimensão da eletroforese foi feita em seis géis verticais homogêneos de acrilamida 15%, três para as amostras do tempo zero e três para as amostras do tempo de 72 horas, conforme descrito por LAEMMLI (1970). A primeira etapa consistiu em 50 mg de DDT para cada 5 mL de solução de equilíbrio (composição em g L⁻¹: ureia 6 M; tris-HCl (pH 8,8) 75 mM; glicerol 29,3%; SDS 2%;

azul de bromofenol 0,002% de uma solução de 1%. A separação das proteínas foi feita a 10°C, em cuba Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Bioscience).

4.9. Aquisição de imagens

As imagens dos géis foram adquiridos com uma resolução de digitalização de 300 dpi, em seguida, analisados com o software ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. A quantidade de cada local foi normalizada pela intensidade total de spots válidos. Spots de proteínas foram considerados diferencialmente expressos se a intensidade se modificou estatisticamente nos diferentes dias.

4.10. Análise de proteínas por MALDI-TOF/TOF MS

A digestão em gel das proteínas foi realizada conforme descrito por SHEVCHENKO et al. (2007), com algumas alterações. Os peptídeos foram dissolvidos em 10 µL de ácido trifluoracético (TFA) 0,1%. A solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 4 mg mL⁻¹ em acetonitrila (ACN) 50% e 0,3% TFA foi misturada com igual quantidade de amostra e colocada na placa Anchor Chip 800/384 (Briker Daltonic GmbH) e secas em fluxo de ar laminar para recristalização. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF (Ultraflex, Bruker Daltonics) no modo reflectron. Peptídeos com uma relação sinal-ruído acima de 100 tiveram seu MS/MS analisados usando a tecnologia LIFT que está incorporado no MS Ultraflex; em média cinco MS/MS espectros foram medidos para cada proteína digerida levando de 2 a 5 peptídeos identificados. O processamento de dados foi feito através dos softwares Flex analysis e Biotoools (Bruker Daltonic).

4.11. Análise de dados MS/MS

A análise dos dados foi realizada utilizando software Biotoools 3.0 e a ferramenta de busca MASCOT (Matrix Sciences, MK). As pesquisas foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: a tolerância em massa foi definida para 0,7 Da para fragmentos de íons. Tripsina foi definida como enzima proteolítica com duas clivagens perdidas. A carga do peptídeo +1 foi utilizada. A

carbamidometilação de resíduos de cisteína foi definida como modificação fixa e a oxidação de resíduos de metionina foi definida como a modificação variável.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de levana e etanol por *Z. mobilis* ZAG-12

A 20 °C foi observada a maior produção de levana, 3,90 g L⁻¹, seguida em ordem decrescente pelas produções nas temperaturas de 30 e 40 °C, com 1,79 g L⁻¹ e 0,31 g L⁻¹ de levana, respectivamente (Figura 5.1). Com relação ao etanol em 72 horas de fermentação, a 30 °C ocorreu a maior produção, aproximadamente 9,36 g L⁻¹, seguida das concentrações obtidas nas temperaturas de 20 e 40 °C, 6,86 g L⁻¹ e 3,36 g L⁻¹, respectivamente (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4). O maior consumo de substrato aconteceu na temperatura de 30 °C, aproximadamente 157,13 g L⁻¹ de sacarose consumida (Figura 5.3), seguido pelo consumo nas temperaturas de 40 °C, 143,22 g L⁻¹ (Figura 5.4) e de 20 °C, 142,88 g L⁻¹ (Figura 5.2). Às temperaturas de 20 e 40 °C registra-se uma maior concentração de substrato residual, correspondendo a 11% do substrato inicial, enquanto que a 30 °C equivaleu a 7% do inicial. As figuras 5.2, 5.3 e 5.4 evidenciam que com 72 h de fermentação, o substrato não foi totalmente consumido. A condução do processo por um período de tempo maior poderia resultar em rendimentos mais elevados de levana e consequentemente, em redução do substrato residual.

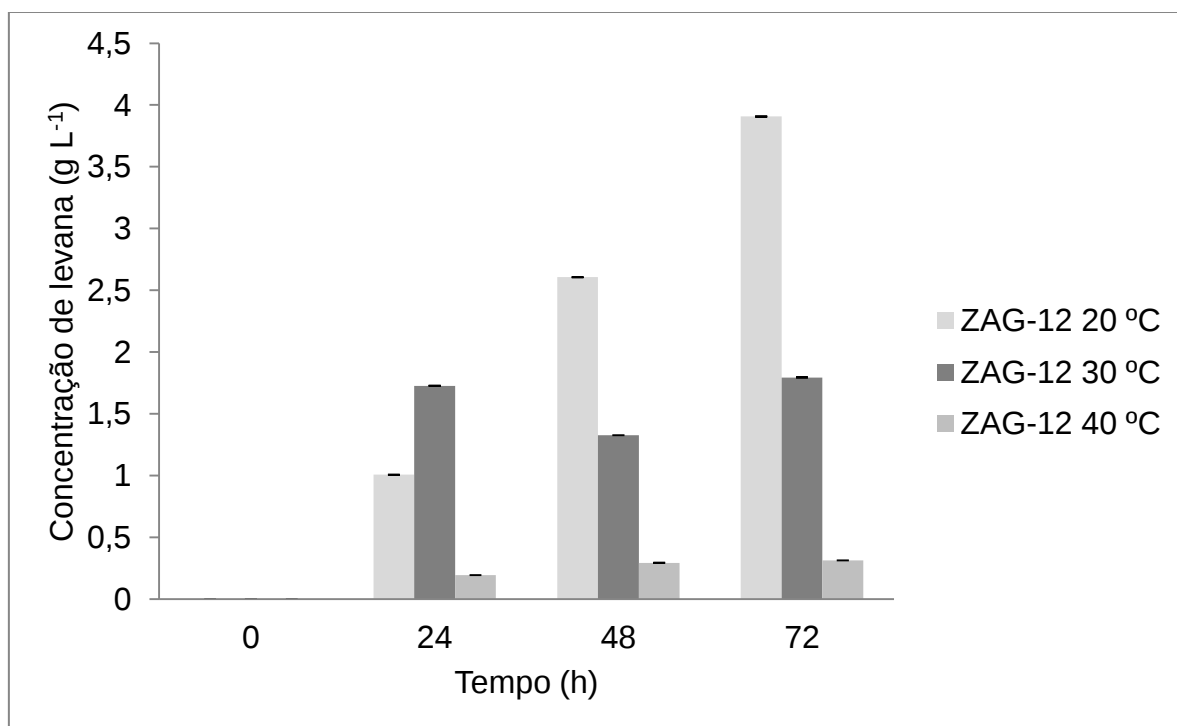


Figura 5.1 – Produção de levana por *Z. mobilis* ZAG-12 em 72h de fermentação.

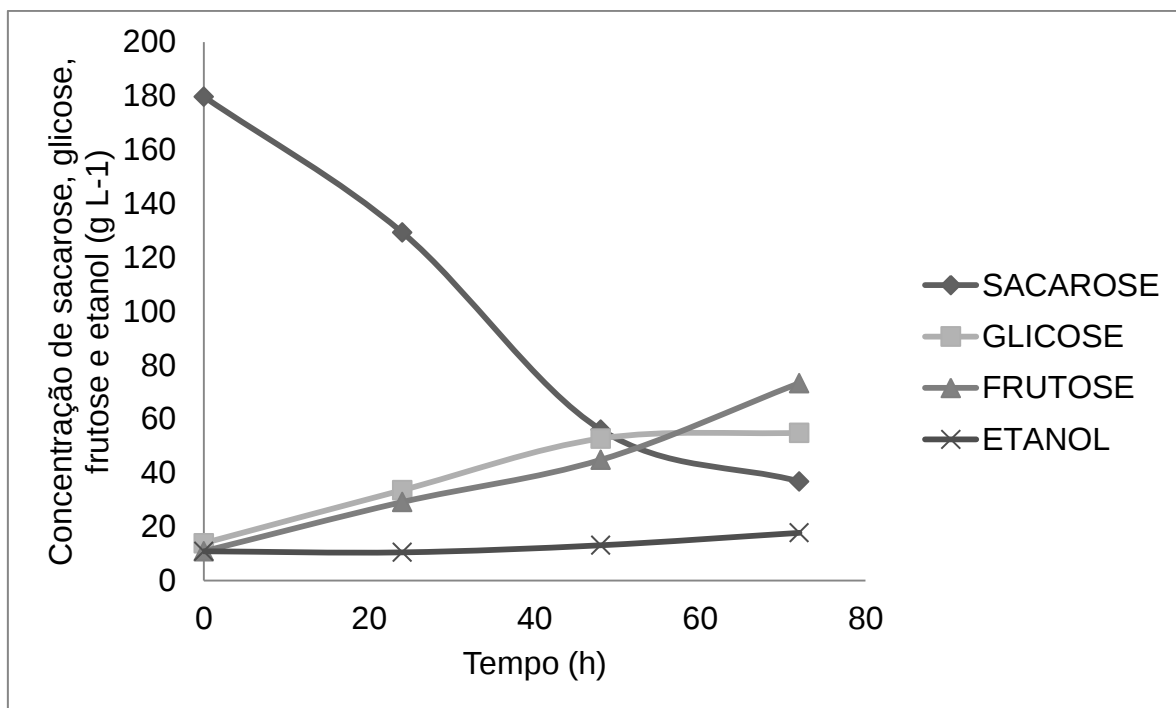


Figura 5.2 – Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por *Z. mobilis* ZAG-12, a 20 °C.

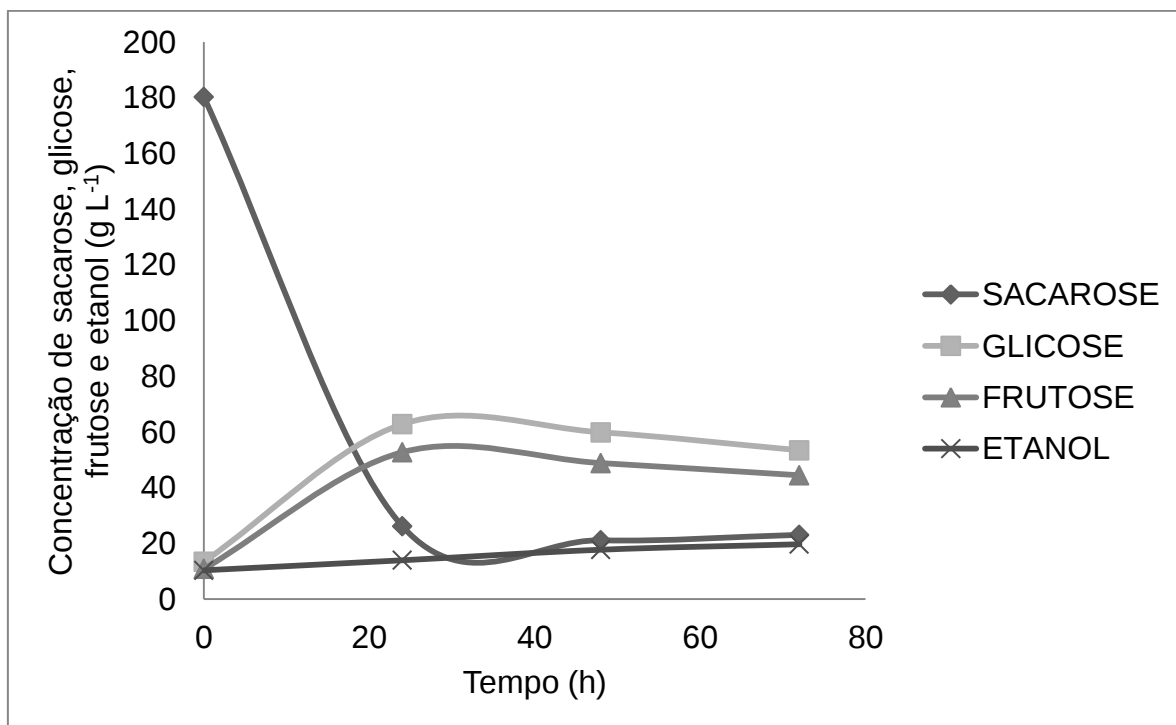


Figura 5.3 – Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por *Z. mobilis* ZAG-12, a 30 °C.

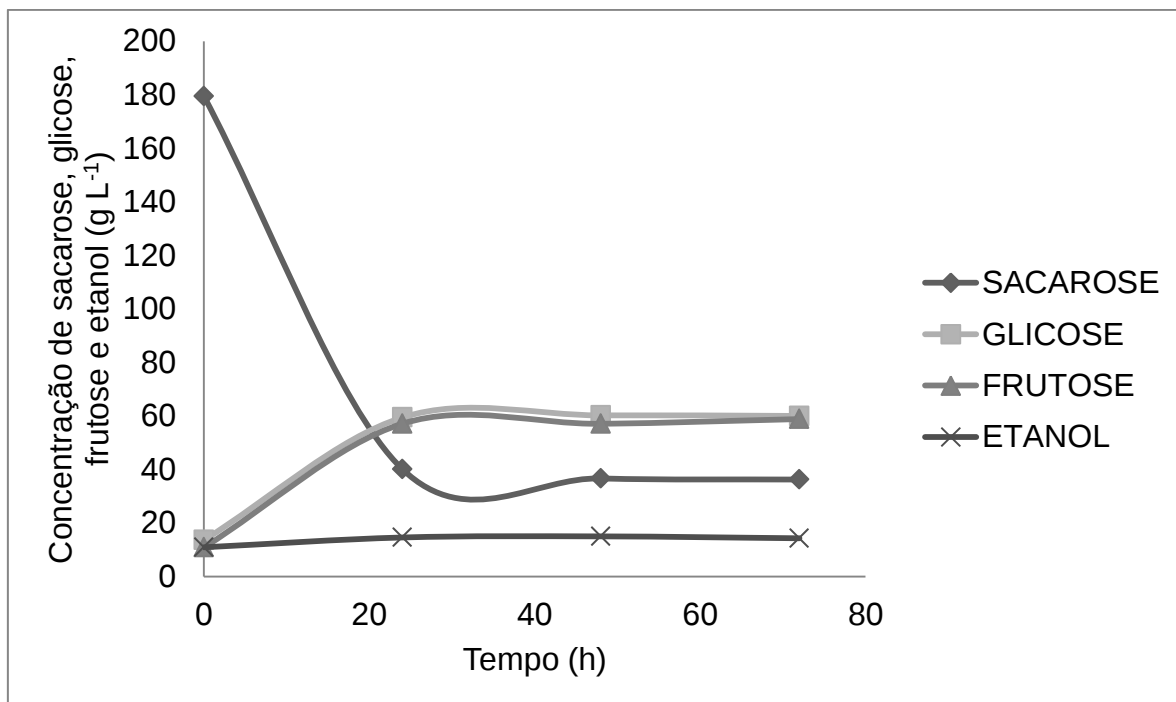


Figura 5.4 – Consumo de sacarose e concentração de glicose, frutose e etanol em 72 h de fermentação para produção de levana por *Z. mobilis* ZAG-12, a 40 °C.

Embora o maior consumo de substrato tenha ocorrido a 30 °C (Figura 5.3), à temperatura de 20 °C verificou-se a maior taxa de conversão de produto em substrato ($Y_{P/S}$). Nesta temperatura, o fator de conversão de sacarose em levana foi de 0,027 g g⁻¹, cerca de duas vezes maior do que o $Y_{P/S}$ a 30 °C e treze vezes maior do que o $Y_{P/S}$ a 40 °C (Tabela 5.1). Na mesma temperatura, também se observou que o $Y_{P/S}$ para etanol foi maior, 0,065 g g⁻¹ (Tabela 5.2). Isto pode ser explicado, considerando-se que em temperaturas mais elevadas, em torno de 30 a 35 °C acontece um favorecimento da produção de etanol, assim como o aparecimento de coprodutos como ácido glucônico e sorbitol, contribuindo para o decaimento da conversão de substrato em levana (CALAZANS, 1997; VIKARI; GISLER, 1986; DOELLE et al., 1993).

Tabela 5.1 – Rendimento de levana para a linhagem de *Z. mobilis* ZAG-12, em 72 horas de fermentação.

Temperatura (°C)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
20	0,027
30	0,011
40	0,002

Tabela 5.2 – Rendimento de etanol para a linhagem de *Z. mobilis* ZAG-12, em 72 horas de fermentação.

Temperatura (°C)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
20	0,065
30	0,043
40	0,023

Os resultados obtidos de $Y_{P/S}$ de levana foram corroborados com os descritos em estudo similar, confirmando que em temperaturas abaixo de 30 °C verifica-se uma maior polimerização de frutose em levana. Em temperaturas abaixo de 30 °C ocorre um favorecimento da polimerização de frutose em levana em detrimento da produção de etanol que, simultaneamente, desfavorece a atividade de certas enzimas que estão envolvidas na conversão do substrato em etanol, ácido glucônico e sorbitol, em temperaturas até 25 °C (CALAZANS, 1997).

Os fatores de conversão tanto para a levana quanto para etanol foram maiores na temperatura de 20 °C. Com base nos resultados obtidos, foi escolhida para a realização da análise proteômica a temperatura de 20 °C, onde se observou o favorecimento da produção de levana em comparação com as demais temperaturas testadas.

5.2. Análise da extração de proteínas de *Z. mobilis* em gel unidimensional

A análise do gel unidimensional mostrou que pelo método do trizol, ocorreu maior linearidade nas bandas de proteínas, seguidas em ordem decrescente pelos métodos de Mehta e Rosato e tampão de lise (Figura 5.5).

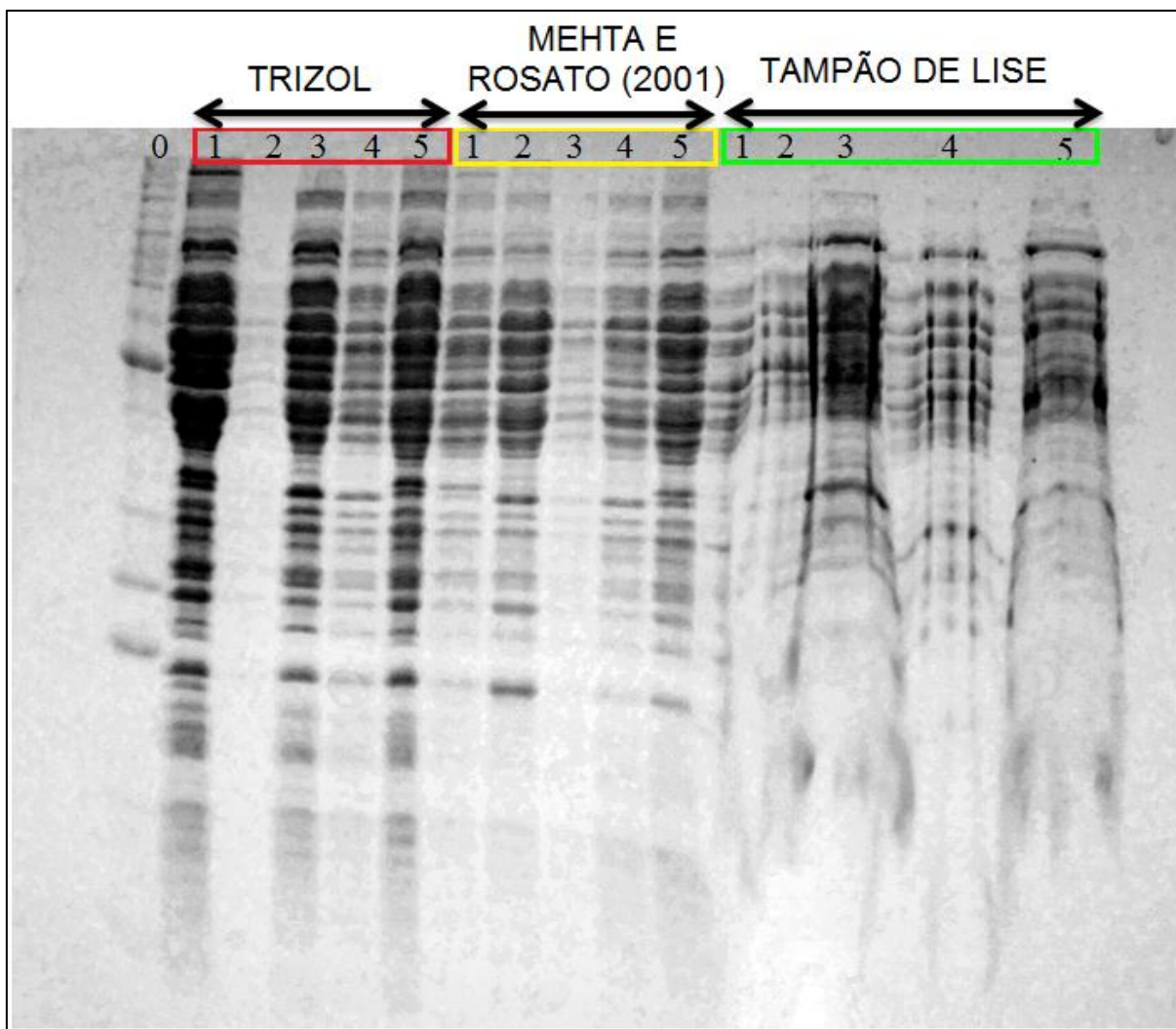


Figura 5.5 – Gel de separação de poliacrilamida 15%. Legenda: 0 - Marcador; 1 - Ag11; 2 - ZAP; 3 - ZAG-12; 4 - ZM4; 5 - Z1-87.

5.3. Análise da extração de proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 em gel bidimensional

A análise dos géis bidimensionais mostrou que o método de extração em *Z. mobilis* que revelou a maior quantidade de spots na faixa de pH de 3 a 10, foi o do método do trizol. As figuras 5.6, 5.7 e 5.8 mostram que todos os métodos são eficazes na extração de proteínas ácidas. No entanto, pode-se observar a quantidade de proteínas básicas apresentadas na figura 5.6 é maior quando se compara com as figuras 5.7 e 5.8. Sendo assim, o método de extração escolhido para a análise das proteínas durante a fermentação para a produção de levana foi o do método do trizol.

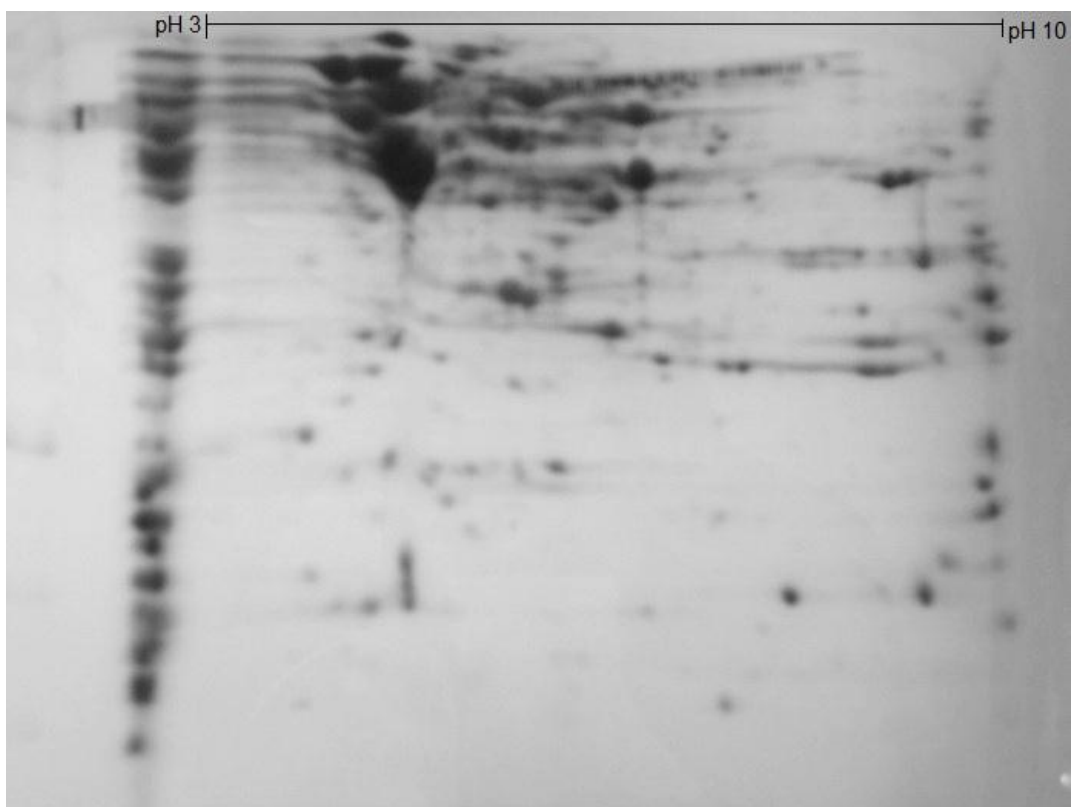


Figura 5.6 – Gel bidimensional de extração de proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 pelo método do trizol.

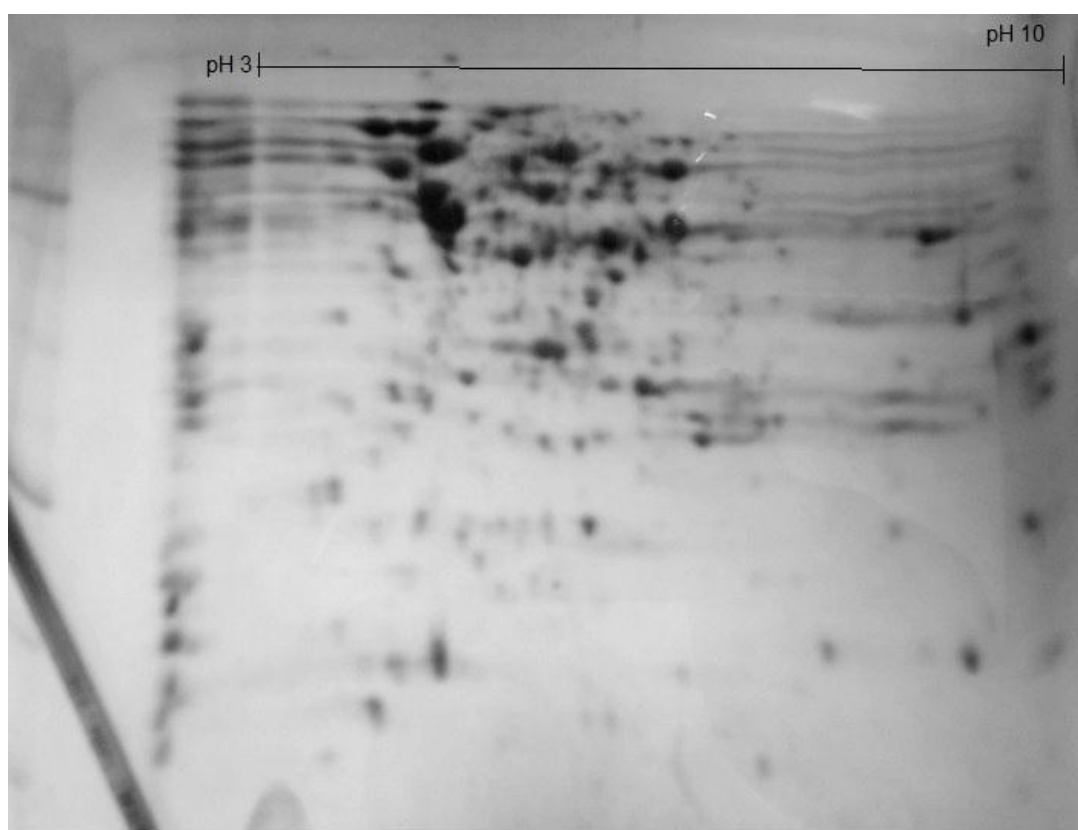


Figura 5.7 – Gel bidimensional de extração de proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 pelo método de Mehta e Rosato.

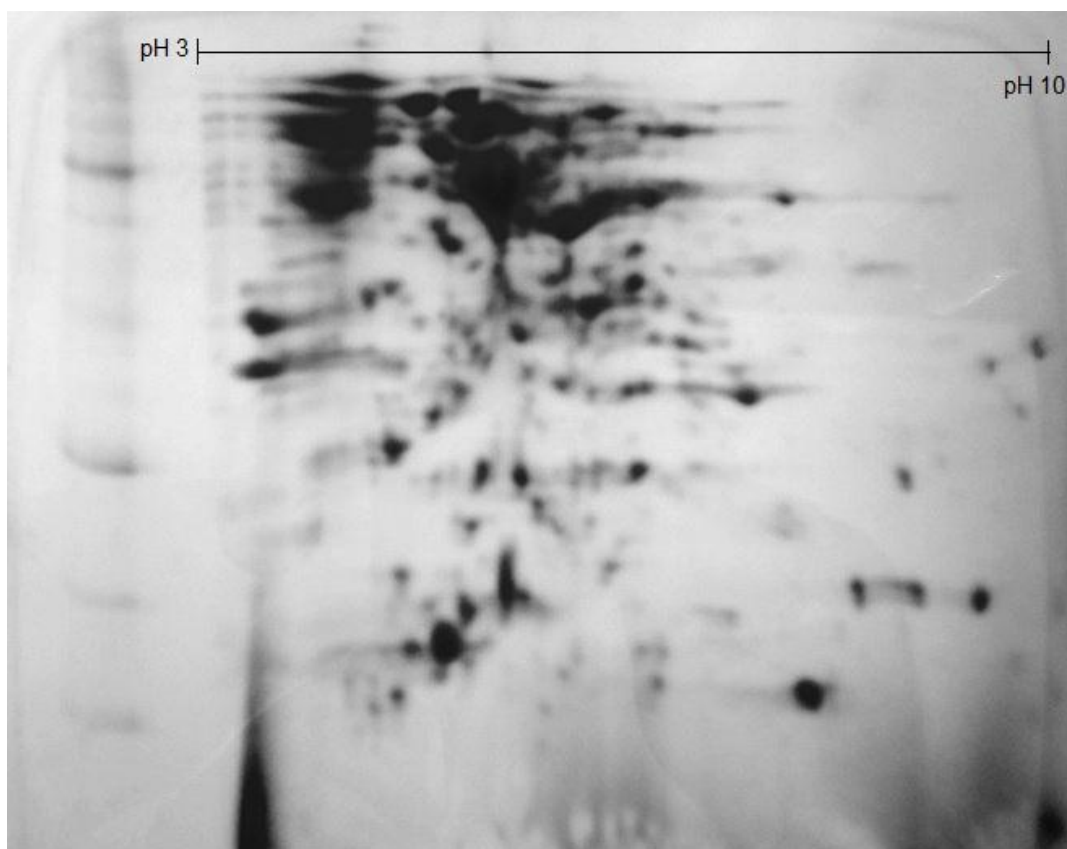


Figura 5.8 – Gel bidimensional de extração de proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 pelo método do tampão de lise.

5.4. Análise de proteínas

Aproximadamente $1,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas foram obtidas a partir de 6 mL do fermentado. A resolução de cerca de $200 \text{ }\mu\text{g}$ de proteínas carregadas em cada gel mostrou uma média de 500 spots com pI variando entre 4 e 7 e massa molecular variando entre 100 kDa e 10 kDa (Figuras 5.9 e 5.10). A imagem ampliada dos géis bidimensionais pode ser observada na Figura 5.11. A análise comparativa bidimensional foi realizada entre os tratamentos (0h e 72h), onde as proteínas encontradas no tempo 0h referem-se às proteínas provenientes do inóculo, o qual se encontrava na temperatura $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, na concentração de 100 g L^{-1} . As proteínas expressas diferencialmente, que foram identificadas através de espectrometria de massa MALDI TOF/TOF (MS/MS), atingiram identificação de 77,27% (34 de 44 spots).

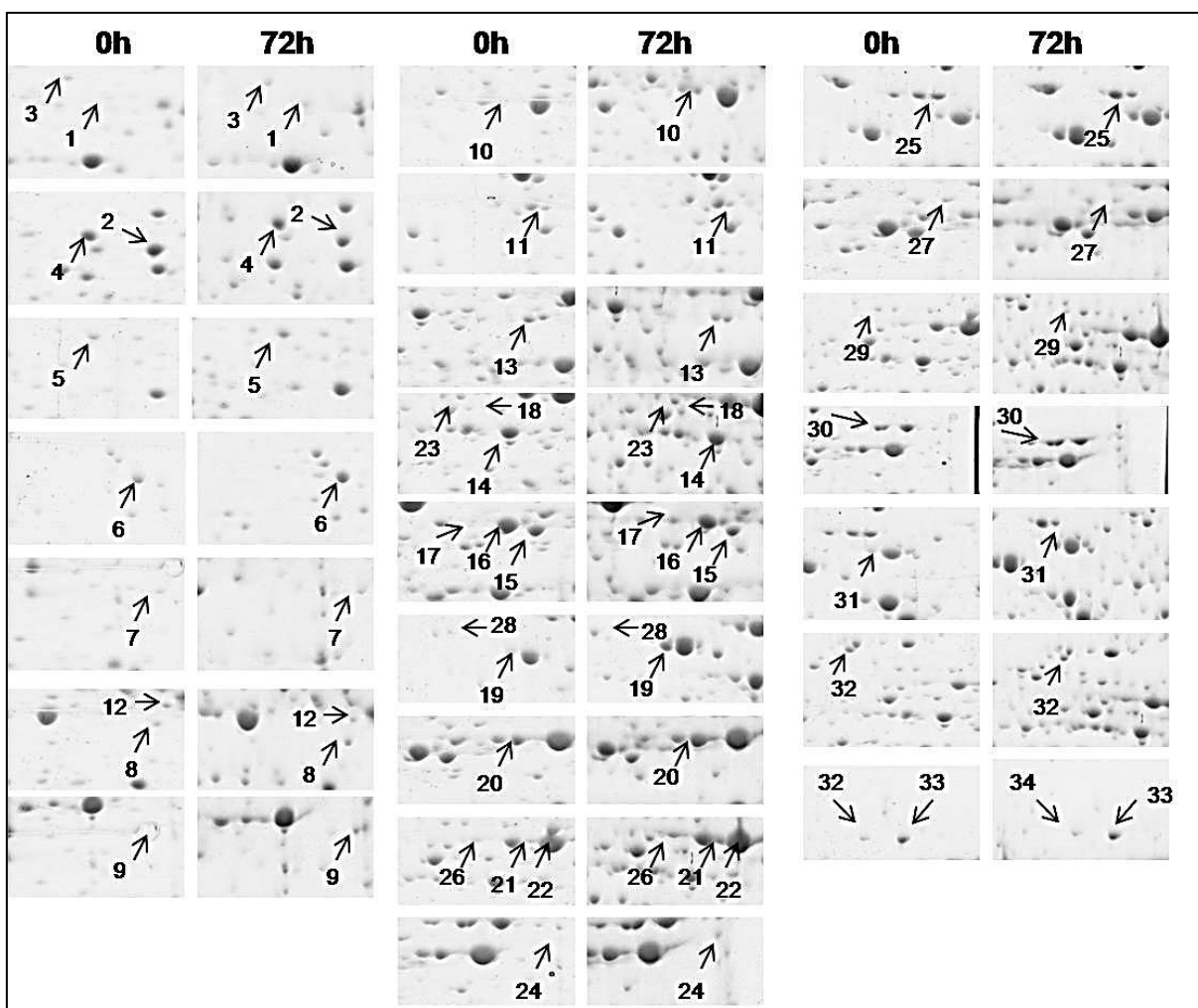


Figura 5.11 – Zoom das áreas dos géis bidimensionais mostrando spots de proteínas diferencialmente expressas nos tempos 0 h e 72 h. Os números indicados estão de acordo com os mencionados na Tabela 5.3.

5.5. Regulação proteica no processo de produção de levana e de etanol

As reações de proteína frente à produção de levana e de etanol foram avaliadas comparando os géis em triplicata, tanto no tempo inicial quanto no final. Pela abordagem 2D-PAGE, foi possível identificar 34 spots diferencialmente expressos (Tabela 5.3). Foram 19 spots que apresentaram aumento de expressão no tempo 0h de fermentação (proteínas oriundas do inóculo) (Tabela 5.4) e 15 spots apresentando aumento de expressão no tempo de 72 horas de fermentação (Tabela 5.5). A maioria destas proteínas está envolvida com o metabolismo de carboidratos (57%), outras com mecanismos de tradução e transcrição (Figuras 5.12 e 5.13).

Tabela 5.3 – Lista de proteínas diferencialmente expressas durante a produção de levana por *Z. mobilis* ZAG-12 em 72 horas.

Spot	Identidade ^a	Organismo ^b	Acesso ^c	Score ^d	pI ^e	Massa nominal ^e	Expressão proteica
1	Fator sigma 54	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384411694	125	6.10	22458	Aumento
2	ROK (rho quinase)	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552615	140	5.79	32930	Diminuição
3	2-dehidro-3-desoxifosfooctonato aldolase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552384	129	5.90	31463	Diminuição
4	UTP-glucose-1-fosfato-uridililtransferase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384412285	139	5.49	31984	Diminuição
5	Aldose 1-epimerase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	GI 397676243	84	5.12	33159	Diminuição
6	Oxidoredutase FAD/NAD(P)	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552649	82	4.91	31226	Diminuição
7	Frutose-bisfosfato aldolase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551075	100	6.46	32942	Aumento
8	Ornitina carbamoyltransferase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 283856252	162	5.70	34224	Aumento
9	Aldo/ceto redutase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551872	172	6.62	38177	Aumento
10	Ferro contendo álcool-desidrogenase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552492	92	5.49	40461	Aumento
11	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfatoreductase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551771	121	5.11	36710	Diminuição
12	Álcool-desidrogenase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	GI 397675985	97	5.70	36577	Diminuição
13	Argininosuccinato sintase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551932	217	5.76	45732	Diminuição
14	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551263	255	5.61	53940	Diminuição
15	Glicose-6-fosfato isomerase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	GI 397676012	167	5.89	55442	Diminuição
16	Aldeído-desidrogenase	<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	GI 260753699	86	5.93	49777	Diminuição

17	Semialdeído succínico desidrogenase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 4378160	87	5.79	49850	Aumento
18	Glutamil-RNAt sintetase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384412140	108	5.55	54004	Aumento
19	F0F1 ATP sintase subunidade beta	<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	GI 260753212	56	4.92	52129	Aumento
20	Piruvatoquinase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551048	217	6.26	51527	Aumento
21	Tiamina pirofosfato (TPP)	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552256	80	5.74	61286	Aumento
22	Piruvatoquinase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551048	224	6.26	51527	Aumento
23	Arginil-RNAt sintetase	<i>Z. mobilis</i> NCIMB 11163	GI 260752688	261	5.47	63401	Aumento
24	Piruvatoquinase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551048	168	6.26	51527	Aumento
25	Chaperona molecular GroEL	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552825	92	5.06	58086	Diminuição
26	Tiamina pirofosfato (TPP)	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552256	80	5.74	61286	Aumento
27	Lisil-RNAt sintetase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384411343	139	5.94	59745	Diminuição
28	Transcetolase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 29191	GI 397677356	86	4.63	50058	Diminuição
29	Tiamina	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384411594	276	5.50	67407	Aumento
30	Fosfogluconato desidratase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551264	206	6.31	65636	Aumento
31	30S Proteína ribossomal S1	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56552694	209	5.03	61671	Diminuição
32	Polirribonucleotídeo nucleotidil-transferase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384411996	330	5.35	82141	Diminuição
33	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína S-metiltransferase	<i>Z. mobilis</i> ATCC 10988	GI 384411246	189	5.92	85214	Diminuição
34	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína S-metiltransferase	<i>Z. mobilis</i> ZM4	GI 56551896	114	5.83	85218	Diminuição

- a Identificação das proteínas identificadas por espectrometria de massas
- b Espécies identificadas com as proteínas encontradas
- c Número de acesso do banco de dados (nrNCBI)
- d MASCOT score
- e Peso molecular teórico e ponto isoelétrico calculado a partir da ferramenta de cálculo Mr/PI de ExPASy
- f Tipo de expressão sofrida pela proteína

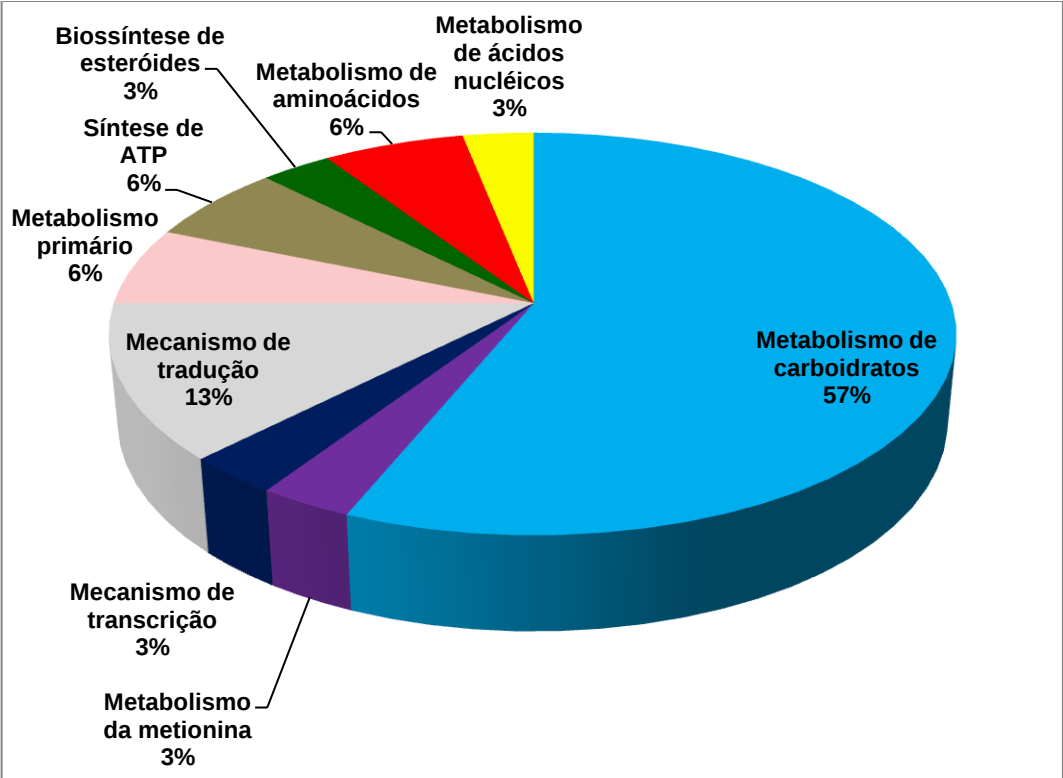


Figura 5.12 – Representação proporcional das proteínas identificadas de acordo com suas funções no metabolismo de *Z. mobilis* ZAG-12.

Tabela 5.4. Proteínas com aumento de expressão no tempo 0 h de fermentação (oriundas do inóculo) durante a produção de levana e de etanol em *Z. mobilis* ZAG-12.

PROTEÍNAS
2-dehidro-3-desoxifosfooctonato aldolase
30S Proteína ribossomal S1
4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase
5-metiltetrahydropteroltriglutamato-homocisteína-S-metiltransferase
Álcool-desidrogenase
Aldeído-desidrogenase
Aldose 1-epimerase
Argininosuccinato sintase
Chaperona molecular GroEL
Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase

Glicose-6-fosfato isomerase
Lisil-RNAt sintetase
Oxidoreductase FAD/NAD(P)
Polirribonucleotídeo nucleotidiltransferase
ROK (rho quinase)
Transcetolase
UTP-glucose-1-fosfato-uridililtransferase

Tabela 5.5. Proteínas com aumento de expressão no tempo 72 h de fermentação durante a produção de levana e de etanol em *Z. mobilis* ZAG-12.

PROTEÍNAS
Aldo/ceto redutase
Arginil-RNAt sintetase
F0F1 ATP sintase subunidade beta
Fator sigma 54
Ferro contendo álcool-desidrogenase
Fosfogluconato desidratase
Frutose-bisfosfato aldolase
Glutamil-RNAt sintetase
Ornitina carbamoiltransferase
Piruvatoquinase
Semialdeído succínico desidrogenase
Tiamina
Tiamina pirofosfato (TPP)

5.5.1. Proteínas diferencialmente expressas

As proteínas diferencialmente expressas tanto na condição onde é mais propícia para a produção de etanol quanto na condição de formação de levana estão representadas na figura 5.13.

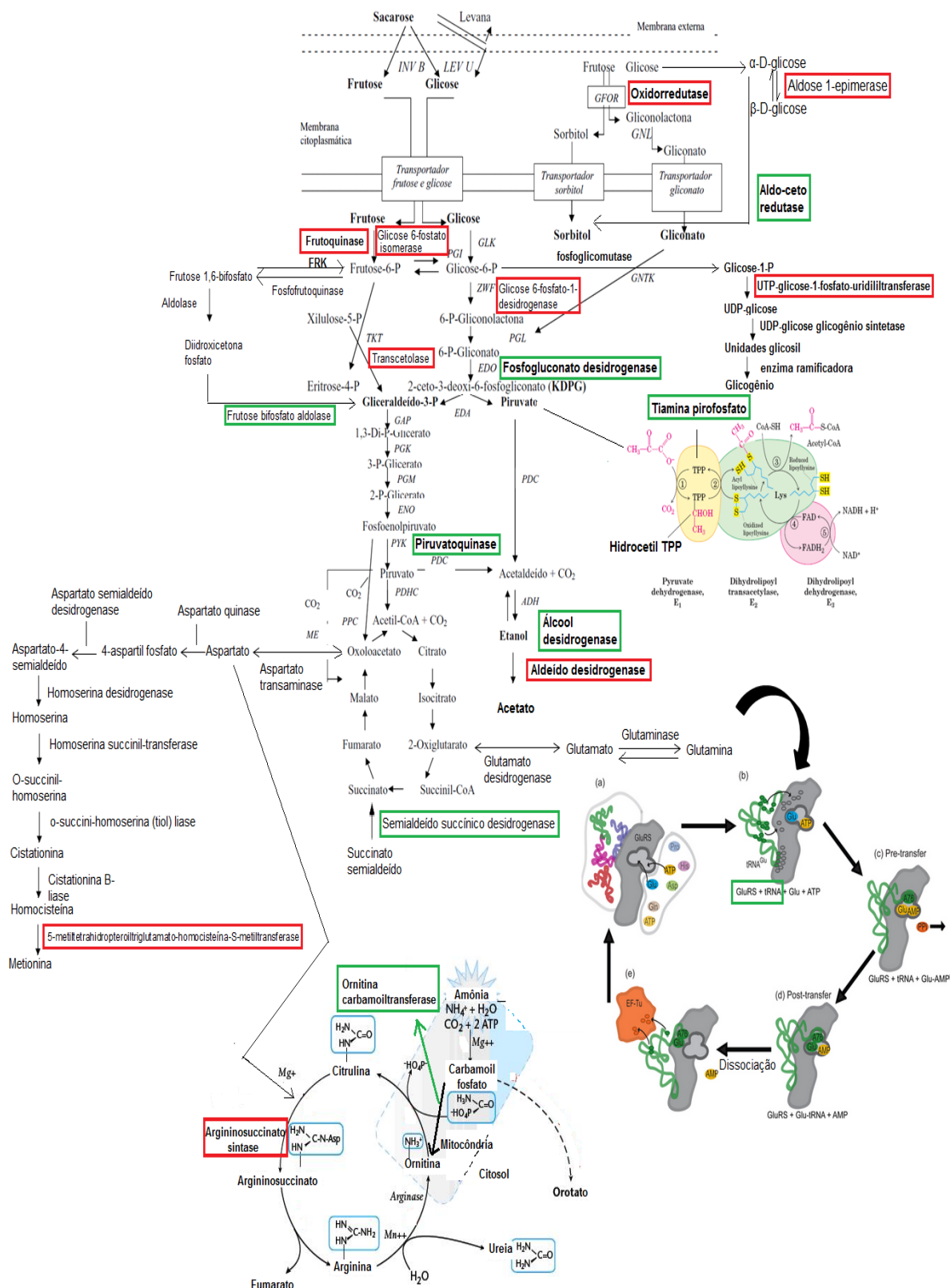


Figura 5.13 – Vias metabólicas de *Z. mobilis*. Em destaque verde, as proteínas diferencialmente expressas em 72 horas de fermentação; em destaque vermelho, as proteínas diferencialmente expressas provenientes do inóculo. (Fonte: Sprenger, 1996, adaptado; <http://healthmetrix.wordpress.com/tag/amonia-ciclo-da-ureia>).

5.5.1.1. Proteínas diferencialmente expressas oriundas do inóculo

A proteína 2-desidro-3-desoxifosfooctonato aldolase (KdsA) (spot 3) está relacionada com o metabolismo de lipídios e carboidratos em *Escherichia coli* (ZHOU; SHEN, 2011) e na biossíntese de exopolissacarídeos, como ocorre no biofilme de *Desulfovibrio vulgaris*. A kdsA catalisa a condensação de D-arabinose-5-fosfato com fosfoenolpiruvato para dar um único açúcar ácido 3-deoxi-D-manooctulosônico-8-fosfato, requerido para a maturação do lipídio A e crescimento celular (ZHANG et al., 2007). Em *Z. mobilis*, a membrana é rica em lipídios estando relacionada com sua resistência acentuada a concentração de etanol (TANO; BUZATO; CELLIGOI, 2000).

A proteína ribossomal 30S S1 (spot 31) está associada com o mecanismo de tradução. Estudos afirmaram que esta proteína apresentou aumento de expressão durante a produção de etanol a 30 °C (HAYASHI; FURUTA; FURUKAWA, 2011), corroborando com os resultados obtidos, uma vez que esta proteína foi oriunda do inóculo, apresentando aumento de expressão no tempo inicial de fermentação e, conseqüentemente uma diminuição no tempo de 72 horas.

A proteína 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase (spot 11) teve sua expressão diminuída ao longo da fermentação. Está relacionada com a formação de membrana em *Z. mobilis*, a qual é rica em lipídeos e essa riqueza está relacionada com sua resistência acentuada a concentração de etanol. Atribui-se dois mecanismos para explicar esta resistência, onde o primeiro está envolvido com os altos níveis de lipídeos cíclicos da membrana desta bactéria e, o segundo, está relacionado com a associação dos fosfolipídios de membrana a elevada quantidade de ácido cis-vacênico (TANO; BUZATO; CELLIGOI, 2000).

A 5-metiltetrahydropteroiltriglutamato-homocisteína-S-metiltransferase (spots 33 e 34) é uma enzima que está envolvida no metabolismo de metionina. Em cepas de *Z. mobilis* a 30 °C esta enzima teve menor expressão durante a fermentação para produção de etanol (HAYASHI; FURUTA; FURUKAWA, 2011).

Álcool desidrogenase (spot 12) é uma proteína que catalisa a oxidação de álcoois primários e secundários usando a coenzima NAD(P)⁺. Em bactérias Gram-negativas e em *Z. mobilis*, duas isoenzimas são, em princípio, envolvidas na produção de etanol, a partir do produto final (piruvato) na via glicolítica de Entner-

Doudoroff. Ambas são oxidoredutases metal-dependentes, o que implica num aumento de expressão quando estão associadas a metais (MOON et al., 2011). Esta proteína teve sua expressão diminuída em 72 horas do processo fermentativo, provavelmente pelo fato de ser uma oxirredutase não associada a metais.

Aldeído desidrogenase (spot 16) é uma enzima polimórfica responsável pela oxidação de aldeídos a ácidos carboxílicos (CRABB et al., 2004). A mesma apresentou diminuição de expressão ao final do processo. A partir disto pressupõe-se que, para facilitar o aumento de fornecimento de carbono para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, as células estressadas com etanol poderiam estar tentando oxidar carbono disponível a partir de acetaldeído para acetato. Sendo então diminuída a expressão desta proteína, com o intuito de minimizar a utilização de acetaldeído no citosol (CHANDLER et al., 2004).

Aldose 1-epimerase (spot 5), também chamada de mutarotase, é a enzima responsável pela interconversão anomérica de D-glicose e outras aldoses entre as formas alfa e beta. Participa na glicólise e gliconeogênese, tendo sua expressão aumentada no tempo inicial de fermentação (CHAN; SANDHU; BENNET, 2011).

Argininosuccinato sintase (spot 13) teve sua expressão diminuída ao término do processo de produção de levana. Esta enzima catalisa o passo limitante da velocidade na reciclagem de citrulina em arginina (WANG et al., 2012).

Chaperona molecular GroEL (spot 25) auxilia na dobragem adequada de polipeptídeos (WEISSMAN et al., 1995). Estudos em *Zymomonas mobilis* TISTR 548 mostraram que em células não estressadas, a expressão de GroEL é relativamente baixa, mas esta aumenta rapidamente quando as células são submetidas a estresse por temperatura (THANONKEO et al., 2007).

Glicose 6-fosfato-1-desidrogenase, glicose 6-fosfato isomerase e transcetolase (spots 14, 15 e 28, respectivamente), enzimas pertencentes às reações de catálise na via das pentoses fosfato, apresentam diminuição da expressão ao término da fermentação. O aumento da expressão da transcetolase induz um aumento na produção de etanol em níveis baixos (TAYLOR et al., 2012).

Lisil-RNA sintetase (spot 27) catalisa a síntese de lisil-RNA de transferência, que insere lisina em proteínas (FREIST; GAUSS, 1995).

Oxidoredutase (spot 6) é uma enzima que catalisa a transferência de elétrons, utilizando NADP ou NAD^+ como cofatores (BORHANI; HARTE;

PETRASH, 1992). Glicose-frutose oxidorreductase (GFOR) é uma enzima exclusiva de *Z. mobilis*. É sintetizada como um precursor (pré-GFOR) com um peptídeo sinalizador N-terminal de 52 resíduos de aminoácidos e é exportado para o periplasma, onde a enzima madura (381 resíduos de aminoácidos) existe como um homotetrâmero com uma molécula de NADP ligada a cada monômero de modo não covalente, aumentando sua expressão em *Z. mobilis* cultivadas a 30 °C (JONAS; SILVEIRA, 2004).

Polirribonucleotídeo nucleotidiltransferase (spot 32) é uma proteína proveniente do inóculo que exibiu sua expressão aumentada no tempo inicial do processo fermentativo devido a sua função na degradação de RNAm e na hidrólise de polirribonucleotídeos individualmente na direção 3' – 5' (SEO, et al., 2005).

Em *Z. mobilis*, a família de proteínas ROK (rho quinase) (spot 2) é representada pela enzima frutoquinase e, verificou-se que esta apresentou expressão diminuída em 72 horas de fermentação. Estudos demonstraram que a enzima frutoquinase é inibida pela elevação de glicose no meio em decorrência da hidrólise da sacarose e, assim, favorece a conversão da frutose em sorbitol (BEKERS et al., 2002). Sendo assim, pode-se supor que sorbitol está sendo formado ao término da fermentação.

UTP-glicose-1-fosfato-uridililtransferase (spot 4), codificada por *gal U*, tem sua expressão aumentada no início da fermentação, já que na via metabólica da glicose, está catalisando a formação de UDP-glicose a partir de glicose-1-fosfato e UTP (THODEN; HOLDEN, 2007).

5.5.1.2. Proteínas diferencialmente expressas em 72 horas de fermentação

Frutose-bifosfato aldolase (spot 7) teve sua expressão aumenta ao término do processo. Esta enzima catalisa a formação de diidroxiketona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato a partir de frutose-1,6-bifosfato na via metabólica da glicose (ANTHONY, et al., 2010).

Tiamina (spot 29) e tiamina pirofosfato (TPP) (spots 21 e 26) têm papéis importantes na formação estéreo-seletiva de ligações carbono-carbono. A piruvato descarboxilase é a única enzima em *Z. mobilis* que requer a tiamina pirofosfato para sua atividade, sendo aumentada sua expressão (DAWES; RIBONNS; LARGE,

1966). A piruvato descarboxilase também utiliza a tiamina difosfato como um cofator essencial para catalisar a formação de acetaldeído na via de síntese de etanol (PEI et al., 2010).

A proteína álcool desidrogenase contendo ferro (spot 10) aumenta sua expressão quando está associada a metais (MOON et al., 2011). Também é responsável por mediar a oxidação de etanol a acetaldeído a fim de fornecer a cadeia respiratória, com o cofator reduzido, NADH, que é oxidado a NAD^+ na cadeia respiratória (KALNENIEKS, 2003).

Semialdeído succínico desidrogenase (spot 17) é uma enzima que catalisa semialdeído succínico a succinato. Os resultados mostraram que esta enzima tem sua expressão aumentada para produzir o succinato. Em *Sccharomyces cerevisiae* ocorreu um aumento na expressão gênica, que por sua vez aumentou a expressão desta enzima em concentrações de açúcares mais elevadas (ERASMUS; VAN DER MERWE; VAN VUUREN, 2003). Isto corrobora os resultados obtidos, uma vez que a concentração de açúcar na temperatura de 20 °C é o dobro quando comparada com a temperatura a 30 °C.

Fosfogluconato desidrogenase (spot 30) catalisa a reação de gluconato-6-fosfato a 2-ceto-3-deoxi-gluconato-6-fosfato. Estudos em *Z. mobilis* ATCC 31821/ ZM4/ CP4 mostraram que esta proteína tem sua expressão aumentada (HAYASHI; FURUTA; FURUKAWA, 2011).

A enzima piruvatoquinase (spots 20, 22 e 24) catalisa a reação que forma piruvato a partir de fosfoenolpiruvato (FACINCANI, 2002). Estudos em *Z. mobilis* ZM4 mostraram que a piruvatoquinase aumenta sua expressão durante a produção de etanol (YANG et al., 2009).

Os resultados mostram que a enzima aldo/ceto redutase (spot 9) tem sua expressão aumentada em 72 horas de fermentação. Está envolvida com o metabolismo primário. Esta enzima possui a capacidade de inibir uma quantidade de inibidores, tais como: furfural, benzaldeído, acetaldeído e HMF. Podendo converter uma quantidade de furfural em 2-furano-metanol (GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION, 2012).

O cofator sigma 54 (spot 1) é de fundamental importância para o início da transcrição, o core da RNA polimerase deve se combinar com uma subunidade dissociável, a subunidade sigma (σ), para formar a RNA polimerase holoenzima.

Essas proteínas (fator σ) são essenciais para o funcionamento da RNA polimerase holoenzima (BUCK et al., 2000). A RNA polimerase holoenzima- σ^{54} pode ser regulada em uma variedade de genes em virtude das proteínas intensificadoras de ligação, que possuem sítios específicos de ligação aos promotores. Cada proteína intensificadora de ligação é controlada por uma via própria de transdução de sinais, permitindo assim que apenas um tipo de σ^{54} medie as respostas transcricionais a uma variedade de sinais fisiológicos e ambientais (COLLADO-VIDES; MAGASANIK; GRALLA, 1991).

A protease glutamyl-tRNA sintetase (GluRS) (spot 18) mostrou aumento de expressão durante a produção de levana, esta catalisa a esterificação entre RNAt e glutamina (HU et al., 2010). A GluRS está envolvida no processo de tradução. Em *Lactococcus lactis* MG1363, as células em crescimento exponencial, cultivadas em meio de cultura M17, pH em torno de 5,0, são capazes de desenvolver uma resposta de tolerância ao ácido. Após análise proteômica, verificou-se que GluRS apresenta aumento de expressão proteica (BUDIN-VERNEUIL et al., 2005).

A arginil-tRNA sintetase (spot 23) catalisa a reação: $\text{ATP} + \text{L-arginina} + \text{RNAt Arg} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{difosfato} + \text{L-arginil-RNAt Arg}$. Em *Z. mobilis* ZM4, esta enzima está envolvida com a síntese de polipeptídeos mediada por ribossomos e mostrou maior expressão em condições anaeróbicas (YANG et al., 2009).

A enzima F0F1 ATPase sintase (spot 19), em conjunto com todos os componentes necessários para a membrana de transporte de elétrons fornece a *Z. mobilis* todas as exigências metabólicas necessárias para a fosforilação oxidativa, apresentando aumento de expressão (KALNENIEKS, 2006). Estudos em *Z. mobilis* mostraram que esta enzima apresenta diminuição da expressão em condições aeróbicas (YANG et al., 2009).

Ornitina carbamoiltransferase (spot 8) mostrou aumento de expressão em 72 horas de fermentação. Em *Z. mobilis* ZM4, esta enzima apresentou expressão proteica aumentada (SEO et al., 2005).

6. CONCLUSÃO

A eletroforese bidimensional e a espectrometria de massas podem ser usados como métodos eficientes para identificação de proteínas expressas durante o metabolismo de açúcares por *Z. mobilis*, podendo auxiliar na comparação e identificação de proteínas importantes envolvidas com a maximização ou redução da produção de etanol ou de levana a partir de sacarose.

Dentre os três métodos de extração de proteínas testados para *Z. mobilis* ZAG-12 o melhor foi o do reagente trizol, tanto em qualidade de imagem quanto em quantificação proteica.

A produção simultânea de levana e de etanol varia quantitativamente em função de variações na temperatura de processo podendo-se favorecer o rendimento de cada produto, isoladamente, com base na temperatura de produção.

A produção de etanol e levana em *Z. mobilis* são diretamente influenciadas pela temperatura e 20 °C demonstrou mais uma vez ser a melhor temperatura para a produção de levana, quando se compara 20, 30 e 40 °C.

A confiabilidade da identificação das proteínas extraídas foi evidenciada pelo fato de que os scores encontrados nos bancos de dados consultados estavam relacionados com a bactéria em estudo.

Com os métodos empregados foi possível identificar proteínas relacionadas com processos metabólicos importantes, como glicólise, catabolismo energético e resposta ao estresse.

7. PERSPECTIVA

Este estudo verificou apenas as proteínas diferencialmente expressas presentes nos parâmetros de tempos inicial e final. Foram encontradas 84 proteínas que estão presentes apenas em um dos tempos de fermentação que ainda requerem identificação, podendo ser enzimas importantes no processo de produção de levana. As técnicas aplicadas neste trabalho permitiram identificar um conjunto de proteínas que pode servir como pontos de partida de futuras investigações que podem levar ao aprimoramento do processo de produção de levana. Dessa forma, os resultados apresentados constituem uma bem-sucedida experiência de aprofundar o entendimento acerca do metabolismo da *Z. mobilis* durante a produção de levana e abrem oportunidades para novos estudos.

8. REFERÊNCIAS

AMARAL, D. O. J.; MAGALHAES M, VILELA L, VANUSA M. Differential gene expression in tomato induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 43, n. 8, p.1017-1023, 2008.

ANTHONY, L. C.; DAUNER, M.; DONALDSON, G. K.; PAUL, B. J. **Carbon pathway optimized productions hosts for the production of isobutanol**. Patent number WO2010062597-A1/324, 03-JUN-2010. Butamax™ Advanced Biofuels LLC (US).

BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS, A. Frutooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 701–706, 2002.

BORHANI, D. W.; HARTER, T. M.; PETRAH, J. M. The crystal structure of the aldose reductase. NADPH binary complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24842-24847, 1992.

BUCK, M.; GALLEGOS, M.T.; STUDHOLME, D.J.; GUO, Y.; GRALLA, J.D. The bacterial enhancer-dependent σ^{54} (σ^n) transcription factor. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 4129-4136, 2000.

BUDIN-VERNEUIL, A., PICHEREAU, V., AUFRAY, Y., EHRLICH DUSKO, S. AND MAGUIN, E. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. **Proteomics**, v. 5, p. 4794-4807, 2005.

CALAZANS, G. M. T. **Fermentação etanólica por *Zymomonas mobilis* (cepa ZAP)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Pernambuco – PE, 1987.

CALAZANS, G. M. T. **Produção de levana para uso clínico**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 1997.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245 – 247, 2000.

CALAZANS, G. M.T.; LOPES, C.E.; LIMA, R. M.O. C.; FRANÇA, F.P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 1, p. 19-21, Jan. 1997.

CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SOUZA, M. F. V. Q.; MARÇAL, S. F.; LOPES, C. E. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP, em meio de sacarose. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 32, n. 4, p. 631-636, 1989.

CHAN, J.; SANDHU, G.; BENNET, A.J. A Mechanistic Study of Sialic Acid Mutarotation: Implications for Mutarotase Enzymes. **Organism and Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4818–4822, 2011.

CHANDLER, M.; STANLEY, G. A.; ROGERS, P.; CHAMBERS, P. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 427-454, 2004.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

COLLADO-VIDES, J; MAGASANIK, B; GRALLA, J. D. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. **Microbiology Review**, v. 55, n. 3, p. 371-394, 1991.

CORNISH-BOWDEN, A.; CARDENAS, M. L. From genome to cellular phenotype—a role for metabolic flux analysis? **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 267–268, 2000.

CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 1, p. 49–63, 2004.

CRITTENDEN R, DOELLE H. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* Uqm-2716 (ATCC-39676). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.302-308, 1994.

DALLY, E.L.; STOKES, H.W.;EVELEIGH, D.E. A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. **Biotechnology Letters**, v.4, p. 91-96, 1982.

DAWES, E. A.; RIBONNS, D. W.; LARGE, P. J. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Journal**, v. 98, n. 3, p. 795-803, 1966.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R. TOH, H; DOELLE, M. B. *Zymomonas mobilis* – science and industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 57-98, 1993.

ERASMUS, D. J., VAN DER MERWE, G. K.; VAN VUUREN, H. J. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 375-399, 2003.

ERNANDES, F. M. P. G; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências agrárias**, v. 26, n. 1, p. 71-82, 2005.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, v. 31, p. 75-91, 1993.

FREIST, W.; GAUSS, D. W. Lysyl-tRNA synthetase. **Biological Chemistry Hoppe Seyler**, v. 376, n. 8, p. 451-472, 1995.

GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION. CHEN, R.; AGRAWAL, M. **Industrial applications of a novel aldo/keto reductase of *Zymomonas mobilis***. n. US20120196342A1, 01 fev. 2011, 02 ago. 2012.

GONÇALVES DE LIMA, O; ARAÚJO, J. M.; SCHUMACHER, I. E.; CAVALCANTI DA SILVA, E. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, n. 1,2, p. 3-15, 1970.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; CSORDAS, A.; DIAZ, J. J.; MADJAR, J. J. Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. **Electrophoresis**, v. 18, p. 328-337, 1997.

GÖRG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p.1037-1053, 2000.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p.3665-3685, 2004.

GYGI, S. P.; RIST, B.; GERBER, S. A.; TURECEK, F.; GELB, M. H.; AEBERSOLD, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994-999, 1999.

HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 393-396, 1990.

HATZIMANIKATIS, V.; EMMERLING, M.; SAUER, U.; BAILEY, J.E. Application of mathematical tools for metabolic design of microbial ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 154–161, 1998.

HAYASHI, T.; FURUTA, Y.; FURUKAW, K. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 414–419, 2011.

HETTWER, U.; JAECKEL, F. R.; BOCH, J.; MEYER, M. RUDOLPH, K.; ULRICH, M. S. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and *P. syringae* pv. phaseolicola. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, 1998.

HU, R.; ZHAO, Z.; LI, L.; LI, Z.; TANG, X.; DUAN, L.; WU, B. Prokaryotic expression and immunization of glutamyl tRNA synthetase of *Streptococcus suis*. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 50, n. 3, p. 418-422, 2010.

JONAS, R.; SILVEIRA, M. M. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 321-336, 2004.

KALNENIEKS, U. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some unanswered questions, **Advances in Microbial Physiology**, v. 51, p. 73 – 117, 2006.

KALNENIEKS, U.; TOMA, M. M.; GALININA, N.; POOLE, R. K. The paradoxical cyanide-stimulated respiration of *Zymomonas mobilis*: cyanide sensitivity of alcohol dehydrogenase (ADH II). **Microbiology**, v. 149, 1739–1744, 2003.

KANG, H.; KANG, H. A physical map of the genome of ethanol fermentative bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 and localization of genes on the map. **Gene**, v. 206, n. 2, p. 223-228, 1998.

KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 265-270, 1993.

KLOSE, J.; KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. **Electrophoresis**, v.16, n. 1, p. 1034–1059, 1995.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, J.S.; JIN, S.J.; KANG, H.S. Molecular organization of the ribosomal RNA transcription unit and the phylogenetic study of *Zymomonas mobilis* ZM4. **Molecules and Cells**, v. 11, p. 68–74, 2001.

LEITSCH, D., D. KOLARICH, M. BINDER, J. STADLMANN, F. ALTMANN, AND M. DUCHÊNE. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. **Molecular Microbiology**, v. 72, p. 518-536, 2009.

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tool for the new biology**. 1. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press. p. 198, 2002.

LIEPA, V., ZAKENFELDS, G.; VOLPE, E.; KORONOVA, Z.; LAPSA, R.; LAIVENIEKS, M.; BEKERIS, M.; OSPISHIL, I. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiates mice, and enhances the antitumor activity of leukocytes. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences**. v. 5, p. 59-64, 1993.

LOOS, H.; KRÄMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: evidence for

a physiological function of glucosefructose oxidoreductase in osmoprotection. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7688-7693, 1994.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

McGILL, D.J.; DAWES, E. A. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 1059-10668, 1971.

MEHTA, A.; ROSATO, Y. B. Differentially expressed proteins in the interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* with leaf extract of the host plant. **Proteomics**, v. 1, n. 9, p. 1111-1118, 2001.

MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v, 38, p. 45 – 51, 2007.

MOON, J. H.; LEE, H. J.; PARK, S.Y.; SONG, J. M.; PARK, M. Y.; PARK, H. M.; SUN, J.; PARK, J. H.; KIM, B. Y.; KIM, J. S. Structures of iron dependent alcohol dehydrogenase 2 from *Zymomonas mobilis* ZM4 with and without NAD⁺ cofactor. **Journal of Molecular Biology**, v. 407, p. 413–424, 2011.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical engineering and biotechnology**. 1 ed., Elsevier B. V., Amsterdam, 2007.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-845, 2000.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33, p. 311- 323, 2003.

PAWLOWSKI, T. A. Proteomics of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seed dormancy breaking: influence of abscisic and giberellic acids. **Proteomics**, v, 7, p. 2246-2257, 2007.

PEI, X. Y.; ERIXON, K. M.; LUISI, B. F.; LEEPER, F. J. Structural insights into the prereaction state of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **Biochemistry**, v. 49, p. 1727-1736, 2010.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 11, p. 2064-2077, 2010.

RANZAN, C. Fermentação contínua de *Z. mobilis*: modelagem, ajuste de parâmetros e inferências a partir do consumo de hidróxido de sódio. **Dissertação** (Mestre em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

REISS, M., HARTMEIER, W. Levan Production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 69-75, 1990.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.

SEO, J. S.; CHONG, H.; PARK, H. S.; YOON, K. O, JUNG, C.; KIM, J. J.; HONG, J. H.; KIM, H.; KIM J. H.; KIL, J. I.; PARK, C. J.; OH, H. M.; LEE, J. S.; JIN, S. J.; UM, H. W.; LEE, H. J., OH, S. J., KIM, J. Y.; KANG, H. L.; LEE, S. Y.; LEE, K. J.; KANG, H. S. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nature Biotechnology**, v. 23, p.63–68.18, 2005.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN J. V.; MANN, M. In-gel digestion form mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2007.

SILVA, M. C. P. **Influência do controle do pH sobre a produção de levana pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meio à base de sacarose**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 1996.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, p. 301-307, 1996.

SWINGS, J.; DELEY, J. Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1-46, 1977.

TANNU, N. S.; HEMBY, S. E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1732-1742, 2006.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 242-244, 2003.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2000.

TAYLOR, M. P.; MULAKO, I.; TUFFIN, M.; COWAN, D. A. Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. **Biotechnology Journal**, v. 7, p. 1169-1181, 2012.

THANONKEO, P.; SOOTSUWAN, K.; LEELAVACHARAMAS, V.; YAMADA, M. Cloning and Transcriptional Analysis of *groES* and *groEL* in Ethanol-producing Bacterium *Zymomonas mobilis* TISTR 548. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 13-22, 2007.

THODEN, J. B.; HOLDEN, H. M. The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. **Protein Science**, v. 16, p. 432-434, 2007.

TOMA, M. M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1347-1350, 2003.

VIGANTS, A.; HICKE, H.G.; MARX, S.P. A simple and efficient method for the purification of membrane bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**, v. 42, p. 415-418, 2001.

VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 240-244, 1986.

VISWANATHAN, S.; UNLU, M.; MINDEN, J. S. Two-dimensional difference gel electrophoresis. **Nature Protocols**, v. 1, p 1351-1358, 2006.

WANG, J.; SHEN, L.; HUANG, S.; LIU, J.; REN, X.; TIAN, X.; QIAO, J.; ZHANG, W. RNA-seq based identification and mutant validation of gene targets related to ethanol resistance in cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 89, p. 1-33, 2012.

WEISSMAN, J. S.; HOHL, C. M.; KOVALENKO, O.; KASHI, Y.; CHEN, S.; BRAIG, K.; SAIBIL, H.R.; FENTON, W.A.; HORWICH, A.L. Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. **Cell**, v. 83, p. 577–587, 1995.

WESTERMEIER, R; NAVEN, T. A laboratory manual of proteome analysis. **Proteomics in Practice**, p. 329, 2002.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 61-65, 1996.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 13–18, 1999.

YANG, S.; TSCHAPLINSKI, T. J.; ENGLE, N. L.; CARROLL, S. L.; MARTIN, S. L.; DAVISON, B. H.; PALUMBO, A. V.; RODRIGUEZ JR, M; BROWN, S. D. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. **BMC Genomics**, v. 10, n. 34, 2009.

YOO, S. H.; YOON, E. J.; CHA, J.; LEE, H.G. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 37–41, 2004.

YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by a *Zymomonas* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 70, n. 4, p. 269-271,1990.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZHANG, W.; CULLEY, D. E.; NIE, L.; SCHOLTEN, J. C. M. Comparative transcriptome analysis of *Desulfovibrio vulgaris* grown in planktonic culture and mature biofilm on a steel surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 447-457, 2007.

ZHOU, Y.; CHEN, W. N. iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis of cytoplasmic protein profile in *Escherichia coli* incubated with apidaecin IB. **Journal of proteomics**, v. 75, p. 511-516, 2011.