

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

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS EM *Zymomonas mobilis*
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

RECIFE
2014

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS EM *Zymomonas mobilis*
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial 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
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Bruno Souza dos
Investigação das alterações proteômicas em *Zymomonas mobilis* sob
diferentes condições de fermentação etanólica/ Bruno Souza dos Santos.
– Recife: O Autor, 2014.

73 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, 2014.

Inclui bibliografia

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

579.33

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-137

BRUNO SOUZA DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS EM *Zymomonas mobilis*
SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

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

Aprovado em: 20/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Márcia Vanusa da Silva
Orientadora

Prof^a. Dr. Will Pitta
UFPE

Prof^a. Dr. Tercílio Calsa Júnior
UFPE

Recife, 20 de fevereiro de 2014

Dedico a minha mãe e meu pai outro, por tudo que representam para mim

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, que ilumina, está permitindo-me concretizar os meus sonhos e não fazer desistir

A minha mãe e meu pai outro, Mariza e Aurino, exemplos de dedicação, doação, honestidade e amor

A minha orientadora Prof^a Dr^a Márcia Vanusa, pela paciência, compreensão e por ter acredito em mim para a realização deste estudo

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Glícia Calazans, pela paciência e dicas sempre com palavras motivadoras

À Túlio Diego e Carolina Malafaia, pela contribuição e apoio nos experimentos, vocês foram vitais para este estudo

Aos meus amigos do mestrado, Lívia, Mariana, Ed, Temístocles, Raquel, Priscila, Milca, Gracy, Almerinda, Vinicius e Juliana

Aos meus amigos, Priscila Fragoso, Poliana, Ingrid, Danyllo e Jackson que não está mais entre nós, mas sei que está num lugar bem melhor

A Carlos Eduardo pela dedicação, companheirismo e tudo o que representa para mim

A FACEPE, pelo apoio financeiro dado ao projeto.

RESUMO

Zymomonas mobilis é uma bactéria gram-negativa que possui grande potencial biotecnológico, devido a sua capacidade de produzir bioetanol, além da produção de ácido glucônico, sorbitol, levana e oligossacarídeos. Para seu sucesso e segurança na utilização industrial, são necessários estudos que gerem conhecimento mais detalhado sobre fisiologia, processos metabólicos e sua regulação de *Z. mobilis* a fim de ampliar as informações sobre o metabolismo celular e complexidade da rede metabólica. Dessa forma este trabalho teve o objetivo de identificar proteínas envolvidas no mecanismo de mudanças e adaptação de rotas de metabólicas em *Z. mobilis* ZAG-12 em meios de cultura contendo 5, 10 e 20 % (w/v) de sacarose, visando à obtenção de genes candidatos a serem utilizados em futuros trabalhos de transformação genética de cepas a fim de aplicação na fermentação industrial. O meio de cultura com 20% (w/v) de sacarose obteve a maior produção de etanol, sorbitol e levana, com 61,73; 27,4 e 7,38 g/L, respectivamente. As proteínas foram separadas por géis 2D e identificadas por espectrometria de massas, observou-se 90 proteínas diferencialmente expressas entre as fermentações que estão relacionadas ao metabolismo de carboidratos, aminoácidos e tradução. Os resultados sugerem que *Z. mobilis* alterou a expressão de proteínas importantes do metabolismo de carboidratos, adaptando-se a concentração de sacarose e etanol e mostrou alto potencial para a produção biotecnológica de etanol, sorbitol e levana.

Palavras-chave: *Zymomonas mobilis*, proteômica, fermentação

ABSTRACT

Zymomonas mobilis is a gram -negative bacterium which has great biotechnological interest due to their ability to produce bioethanol , besides the production of gluconic acid, sorbitol, oligosaccharides and levan . To your success and safety in industrial use , studies are needed to generate more detailed knowledge of physiology, metabolic processes and their regulation *Z. mobilis* in order to expand the information on cell metabolism and complexity of metabolic network . Therefore this study aimed to identify proteins involved in the mechanism of changes and adaptation of metabolic routes in *Z. mobilis* ZAG -12 in culture media containing 5 , 10 and 20 % (w / v) sucrose , in order to obtain candidate genes to be used in future studies of genetic transformation of strains in order of application in the fermentation medium industrial.O culture with 20% (w/v) sucrose had the highest production of ethanol, sorbitol and levan with 61.73 , 27.4 and 7.38 g / L , respectively. Proteins were separated by 2D and identified by mass spectrometry gels , we observed 90 differentially expressed proteins between the fermentations that are related to the metabolism of carbohydrates , amino acids and translation . The results suggest that *Z mobilis* alter the expression of proteins important in the metabolism of carbohydrates , adjusting the concentration of sucrose and ethanol showed a high potential for the biotechnological production of ethanol, sorbitol and levan.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, fermentation, proteomics

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.	26
4.1 Microrganismo	26
4.2 Meios de cultivo	26
4.2.1 Meio para manutenção das culturas.....	26
4.2.2 Manutenção da linhagem bacteriana.....	26
4.2.3 Preparação do inóculo	26
4.2.4 Meios de fermentação.....	26
4.2.5 Testes de pureza	27
4.3 Experimentos	27
4.3.1 Efeito da concentração de sacarose na produção de etanol e coprodutos	27
4.4 Determinações quantitativas	27
4.4.1 Determinação de biomassa.....	27
4.4.2 Dosagem de sacarose, frutose, sorbitol, glicose e etanol.....	28
4.4.3 Determinações do pH.....	28
4.4.4 Dosagem de levana	28
4.5 Proteômica.....	29
4.5.1 Extração de proteínas totais.....	29
4.5.1.1 Método do trizol.....	29
4.5.1.2 Método do tampão de lise	30
4.5.1.3 Método do fenol	30
4.5.2 Quantificação de proteínas totais - Kit 2D Quant.....	30
4.5.3 Gel unidimensional SDS(Dodecilsulfato de sódio)-PAGE.....	31

4.5.4 Eletroforese Bidimensional.....	31
4.5.4.1 Primeira dimensão	31
4.5.4.2 Segunda dimensão	32
4.5.5 Visualização dos spots.....	32
4.5.6 Análise dos géis.....	32
4.5.7 Digestão in-gel e espectrometria de massas MALDI-TOF.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 Fermentações.....	34
5.2 Métodos de extração de proteínas.....	40
5.3 Análise da expressão diferencial de proteínas	42
6 CONCLUSÕES.....	63
7 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Metabolismo de carboidratos em <i>Z. mobilis</i>	17
Figura 2 - Curva de Crescimento de <i>Z. mobilis</i> nas diferentes condições de fermentação.....	35
Figura 3 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 no meio contendo 5% de sacarose	36
Figura 4 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 no meio contendo 10% de sacarose	36
Figura 5 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 no meio contendo 20% de sacarose	37
Figura 6 - Produção de levana ao longo da fermentação	40
Figura 7 - Representação dos perfis protéicos em gel bidimensional de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 usando (A) Trizol, (B) Tampão de lise e (C) fenol	41
Figura 8 - Gel SDS-PAGE 12% das proteínas totais de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 extraídas pelos método de trizol	43
Figura 9 - Géis bidimensionais das proteínas das células de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 crescidas em meios de fermentação com concentração de 5 e 20% de sacarose, respectivamente, durante a fase exponencial de crescimento	45
Figura 10 - Géis bidimensionais das proteínas das células de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 crescidas em meios de fermentação com concentração de 5 e 20% de sacarose, respectivamente, durante a fase estacionária de crescimento	46
Figura 11 - Géis bidimensionais das proteínas das células de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 crescidas em meios de fermentação com concentração de 5 e 20% de sacarose, respectivamente, no final da fermentação	47
Figura 12 - Representação proporcional da classificação das proteínas identificadas de acordo com a categoria funcional com base no NCBI/COG	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desempenho de <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 na fermentação de sacarose nos meios com diferentes concentrações por 72 horas	37
Tabela 2 - Concentração de proteínas (mg/ml) obtida por três diferentes métodos de extração de proteínas	40
Tabela 3 - Lista de spots diferencialmente expressos em <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 durante a fase exponencial de crescimento no meios com 5% e 20% de sacarose.....	50
Tabela 4 - Lista de spots diferencialmente expressos em <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 durante a fase estacionária de crescimento no meios com 5% e 20% de sacarose	53
Tabela 5 - Lista de spots diferencialmente expressos em <i>Z. mobilis</i> ZAG-12 no final da fermentação no meios com 5% e 20% de sacarose.....	59

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos são utilizados para produção de uma variedade de metabólitos aplicados nas indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica, química. Porém, para o sucesso da sua exploração industrial faz necessário grande rendimento do produto e alta utilização de substrato a fim de minimizar custos, esses resultados podem ser otimizados com estratégias como modificação das condições de cultivo do microrganismo ou engenharia metabólica.

Zymomonas mobilis é uma bactéria gram-negativa, obrigatoriamente fermentativa, anaeróbia apresentando aerotolerância, que tem atraído grande interesse biotecnológico nas últimas décadas, devido ao seu metabolismo singular e capacidade de produzir eficaz e rapidamente bioetanol a partir de açúcares simples, dado os adventos da alta dos preços do petróleo e a busca por recursos energéticos renováveis capazes de substituir o produtos petroquímicos (ROGERS, 2007).

Outras potenciais utilizações industriais de *Z. mobilis* também tem sido propostas para a produção dos seguintes produtos: frutose, ácido glucônico, sorbitol, levana, fruto-oligossacarídeos e diversas enzimas (CALAZANS et al. 1997; VIGANTS et al. 1998).

Vários estudos foram relatados sobre a caracterização genética de *Z. mobilis*, mostrando progresso na obtenção de linhagens recombinantes fermentadores de pentoses e sequenciamento completo do genoma, e cinética dos processos fermentativos evidenciando variadas taxas de crescimento e formação de bioetanol e outros coprodutos entre as diferentes linhagens e substratos utilizados, sugerindo que o funcionamento do metabolismo de *Z. mobilis* não é totalmente compreendido.

É importante a realização de estudos que gerem conhecimento mais detalhado sobre fisiologia, processos metabólicos e sua regulação de *Z. mobilis* a fim de ampliar as informações sobre o metabolismo celular e complexidade da rede metabólica.

Nesse sentido, os avanços na proteômica, estudo sistemático de um proteoma, aliado ao desenvolvimento de diferentes técnicas analíticas, tem possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática das proteínas expressas pelo genoma, permitindo a caracterização de

germoplasma, identificação de genes-alvos relacionados à produtividade e estudos sobre estruturação da modificação de vias para produção mais eficiente do produto-alvo (WASINGER et al., 1995).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - *Zymomonas mobilis*

2.1.1 - Breve histórico

As primeiras pesquisas sobre *Zymomonas mobilis* estão relacionadas a uma desordem conhecida como doença da sidra, que foi descrita pela primeira vez por Lloyd em 1903 na Inglaterra como ocorrência freqüente nas fermentações de suco de maçã, caracterizada pela presença de ácido sulfídrico, formação de CO₂, alta concentração de acetaldeído que altera o aroma e sabor para um estado desagradável, redução da doçura e turvação.(SAHM *et al.*, 2006; SWINGS E DELEY, 1977).

Em 1911, Barker e Hiller isolaram pela primeira vez a bactéria responsável pela doença da sidra, no entanto, eles não registraram um nome taxonômico em latim, chamando simplesmente de bacilo da doença da sidra, por isso a descrição deles não foi reconhecida (SWINGS E DELEY, 1977). Houve também uma situação semelhante na França, onde a doença da cidra era chamada de Framboisé em 1928 que mais tarde demonstrou também ser causada por *Z. mobilis* (COTON E COTON, 2003). Devido a este problema, o descobrimento desta bactéria é atribuído a Lindner que a isolou em 1924 do pulque no México e lhe deu táxon (SWINGS E DELEY, 1977). Em 1951, Millis demonstrou que o causador da contaminação da sidra era *Z. mobilis* pelos isolados de sidras e perries semelhantes aos descritos por Baker.

Lindner nomeou a bactéria como *Termobacterium mobilis*, no entanto, este gênero já não era mais aceito, e o nome desta bactéria foi fixado como *Zymomonas*, proposto por Kluyver e Van Niel (1936), com nomes diferentes na espécie, variedade ou o nível de subespécies (SWINGS E DELEY, 1977). Entre todos os nomes propostos, *Zymomonas* foi o que mais pareceu adequar-se ao Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (LAPAGE, 1975).

Z. mobilis pode encontrada na América tropical, África , Ásia e países subtropicais, em materiais açucarados utilizados na fabricação de bebidas alcoólicas. Há relatos de isolados desta bactéria a partir do caldo da cana-de- açúcar no Brasil e Ilhas Fiji, vinho de palma na África Central , cacau , mel em amadurecimento, cerveja e pulque (SAHM *et al.* , 2006; SWINGS E DE LEY, 1977).

Swings e De Ley, 1977, analisaram mais de 40 linhagens provenientes de diversas regiões do mundo por métodos taxonômicos e chegaram a conclusão que todas as linhagens eram constituídas por uma única espécie e esta é a única representante deste gênero, *Zymomonas mobilis*, e possuindo duas subespécies *mobilis* e *pomaceae*. A maioria das linhagens de *Z. mobilis* pertencem à subespécie *mobilis*, enquanto apenas alguns linhagens descritas na literatura pertencem à subespécie *pomaceae*. A principal diferença entre estas duas subespécies é que a última induz sintomas de doença da sidra (SAHM *et al.*, 2006; SWINGS E DE LEY, 1977). Em 2005, Coton *et al.* identificaram uma nova subespécie, *francesis*, oriunda de sidras frambiosé da França utilizando como método molecular a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA).

O grande interesse e popularidade sobre *Z. mobilis* surgiu após Gibbs e DeMoss descobrirem que o catabolismo da glicose anaeróbia é realizada através da via Entner - Doudoroff. Esta rota é limitada a algumas bactérias Gram-negativas com metabolismo oxidativo. Sua principal função é fornecer o piruvato celular. Os microrganismos mais representativas que realizam o metabolismo de carboidratos por esta via são: *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, e *Pseudomonas aeruginosa*. A bactéria *Zymomonas mobilis*, é o primeiro exemplo de um organismo anaeróbio que usa uma rota utilizada por bactérias aeróbias estritas (SWINGS E DELEY, 1977).

2.1.2 - Características gerais, fisiológicas e metabólicas

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa, não patogênica, anaeróbia com aerotolerância, suas células podem se apresentar na forma de bastonetes, com comprimento de 2 a 6 µm e diâmetro de 1 a 1,4 µm, ocorrem isoladamente ou aos pares, não formam esporos nem cápsula, possui resistência natural a vários antibióticos e não requer oxigênio para a síntese de lipídios, geralmente móveis apresentando de 1 a 4 flagelos que formam um tufo em uma ou ambas extremidades da célula. Seu crescimento é viscoso, branco cremoso, lento e limitado em meio de cultura sólido (SWINGS e DELEY, 1977). Taxonomicamente, *Z. mobilis* pertence a Família Sphingomonadaceae, classe Proteobacteria subclasse alfa, sendo a única espécie desse gênero. (KOSAKO *et al.*, 2000).

As células de *Z. mobilis* podem apresentar características morfológicas diferenciadas dependendo das condições de cultivo. Em meios de cultura com concentrações elevadas de glicose, as células tendem a ter grandes vesículas celulares e podem formar bolhas (DOELLE, et al, 1982; FEIN et al., 1983). Já com elevada concentração de CO₂ e etanol, as células podem exibir camadas viscosas e granulares a seu redor (DOELLE E MCGREGOR 1983). Além disso, podem formar filamentos muito longos (64µm de comprimento) em condições inibitórias (Fein, Barber et al., 1984).

Do ponto de vista nutricional, *Z. mobilis* são bactérias quimiorganotróficas e pouco exigentes que crescem em meios contendo apenas glicose e extrato de levedura. Utiliza como fonte de carbono sacarose, D-glicose e D-frutose e precisa de pantotenato de cálcio para seu crescimento. Portanto o uso de extrato de levedura no meio de cultivo é importante porque fornece a vitamina para multiplicação celular. Como estas bactérias ocorrem em ambiente rico em outros organismos sacarófilos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, não são fáceis de serem isoladas (FALCÃO DE MORAIS et al., 1982; CONWAY, 1992).

Galani et al. (1985) fizeram um estudo comparando meios de cultura com diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. As melhores fontes de nitrogênio para *Z. mobilis* foram (NH₄)₂SO₄ e NH₄Cl. O melhor resultado foi obtido com o meio contendo (NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl e os aminoácidos cisteína, serina, treonina, nicotinamida e pantotenato de cálcio. Esses pesquisadores sugeriram ainda que a glutaminase e a asparaginase são as enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio, e são sintetizadas quando o meio de cultivo tem como fonte de nitrogênio asparagina, aspartato, glutamina e glutamato.

Sua membrana plasmática contém importantes constituintes os hopanóides, como por exemplo, hopeno, hopanol e 1,2,3,4-tetrahidroxipentano-29-hopano (THBH) que estão envolvidos na manutenção da estabilidade e viscosidade da membrana plasmática, conferindo proteção celular contra altas concentrações de etanol presentes no meio de cultivo que poderia ser tóxico pois o álcool pode dissolver lipídeos da membrana e desestruturá-la (SCHMIDT et al., 1986).

Schmidt et al. (1986) estudou a influência da concentração de etanol sobre conteúdo de hopanóides e verificaram que THBH atingiu um valor máximo durante a

fase estacionária devido ao elevado nível de etanol acumulado no meio. Além disso, a mudança de temperatura de 14°C para 37°C também causou um incremento no conteúdo de hopanóides. Outra característica de *Z. mobilis* é a sua incapacidade de realizar a fosforilação oxidativa (DI MARCO E ROMANO, 1985).

A principal característica bioquímica de *Z. mobilis* é a fermentação de açúcares para produção de etanol, o que desperta seu interesse para a produção de combustível. Porém, as linhagens selvagens de *Z. mobilis* só conseguem fermentar glicose, frutose e sacarose através da via Entner-Doudoroff (ED) como mostrado na Figura 1 (ROGERS et al., 2007).

A D-glicose é o açúcar mais bem assimilado por *Z. mobilis* resultando em alta produção de etanol, com baixo crescimento em comparação com outras fontes como sacarose (DOELLE, 1993). O transporte de glicose do meio é feito de forma eficiente e com alta velocidade por difusão facilitada através de uma proteína transportadora que também pode facilitar outras hexoses, porém com menor afinidade. (SAHM et al., 2006).

Uma das características marcantes de *Z. mobilis* é sua capacidade de fermentar glicose com rendimentos perto do teórico máximo de etanol e CO₂, ou seja, 2 moles de etanol cada mol de glicose ou frutose em um período de tempo relativamente curto (SWINGS E DELEY, 1977). Swings (1977) analisou mais de 40 linhagens de *Zymomonas* sua própria coleção de laboratório e dados de outros pesquisadores e concluíram que a fermentação de glicose podem produzir etanol com rendimento de 75-99,5 % em comparação com o rendimento máximo teórico.

A taxa de substrato consumido não é proporcional ao crescimento celular, existe um desacoplamento da produção de etanol e incremento de biomassa, assim mesmo com uma pequena biomassa pode se produzir grandes quantidades de etanol.

A primeira reação da via de ED é a fosforilação da glicose com fosfato inorgânico pela glicoquinase em glicose-6-fosfato, seguida pela conversão de glicose-6-fosfato em 6- fosfogluconato, acompanhado pela redução de NAD⁺ (ou NADP⁺) a NADH (ou NADPH) , e a conversão do 3-fosfoglicerato de 2-fosfoglicerato , que são etapas limitantes dessa via. Duas moléculas de piruvato são produzidos a partir de cada molécula de glicose(BARROW et al. 1984).

Piruvato descarboxilase (PDC) é uma enzima muito importante de *Z. mobilis* devido ao seu papel na via de ED. Os níveis de expressão dessa enzima são muito elevados, chegando a constituir quase 5 % do total de proteínas solúveis de *Z. mobilis* (DOELLE *et al*, 1993). Sua função é descarboxilar o piruvato a acetaldeído, utilizando como cofatores tiamina pirofosfato e íons de magnésio (SAHM *et al.*, 2006).

O álcool desidrogenase (ADH) catalisa a redução do acetaldeído em etanol acoplada à oxidação de NADH a NAD^+ e apresenta-se como duas isoenzimas (ADH I, e ADH II). Representam cerca de 2 a 5 % do total de proteínas solúveis. ADH I é um homotetrâmero 148kDa que requer quatro moles de átomo de zinco para a atividade catalítica. ADH II é também um homotetrâmero , de 170 kDa , requer um átomo de ferro, um cofator de enzima bacteriana relativamente incomum, por subunidade para a catálise (KESHAV *et al* 1990).

Embora ADH I e ADH II sejam isoenzimas, elas não compartilham nenhuma homologia a nível de proteína (CABISCOL *et al.* , 1994), ADH I é mais ativa durante a fase exponencial de crescimento, e sua atividade diminui na fase estacionária (KESHAV *et al.*, 1990). Na ausência de etanol, ambas catalisam igualmente a redução de acetaldeído. Em concentrações elevadas de etanol, a ADH I pode ser fortemente inibida, mas a produção de etanol segue, pois a taxa de redução pela ADH II é aumentada significativamente, portanto a ADH II é característica de stress induzido pelo etanol e também altas temperaturas (MICHEL, 1993).

A alta expressão das enzimas ADH e PDC pode ser responsável pela elevada tolerância a meios contendo alta concentração de açúcar e são importantes fatores para alta taxa de produção de etanol. Outro fator que pode interferir na produção de etanol é a concentração de oxigênio, em condições anaeróbicas, há um maior rendimento de etanol, enquanto que essa taxa diminui à medida que a concentração de oxigênio aumenta. Isso ocorre devido ao NADH ser facilmente oxidado pelo oxigênio disponível, diminuindo assim a quantidade de NADH disponível para a redução do acetaldeído em etanol pela ADH, através da via de ED. Portanto, em condições aeróbicas, o acetaldeído iria se acumular e menos etanol seria produzido (PANESAR *et al.* 2006). A produção de acetaldeído, juntamente com H_2S produz o gosto desagradável e odor da doença da sidra (SWINGS E DELEY, 1977).

Já a D-frutose é fosforilada por enzima frutoquinase altamente específica a frutose-6-fosfato, em seguida, convertida a glicose-6-fosfato por uma isomerase prosseguindo a mesma via anteriormente citada para a produção de etanol. Sobre a regulação da enzima frutoquinase, concentrações elevadas de glicose podem inibi-la (SAHM et al. 2006).

Quando glicose e frutose estão disponíveis juntos no meio como fonte de carbono, a glicose seria o substrato preferido para a absorção e a fermentação. Além disso, verifica-se a produção de subprodutos, como dihidroxiacetona, manitol, glicerol, sorbitol, acetoína, acetaldeído, ácido acético, produzido durante a fermentação de frutose por *Z. mobilis*. Logo, o rendimento de etanol em meio contendo apenas frutose como substrato é menor em relação ao meio contendo apenas glicose (VIAKARI E KORHOLA, 1986; PANESAR et al 2006)..

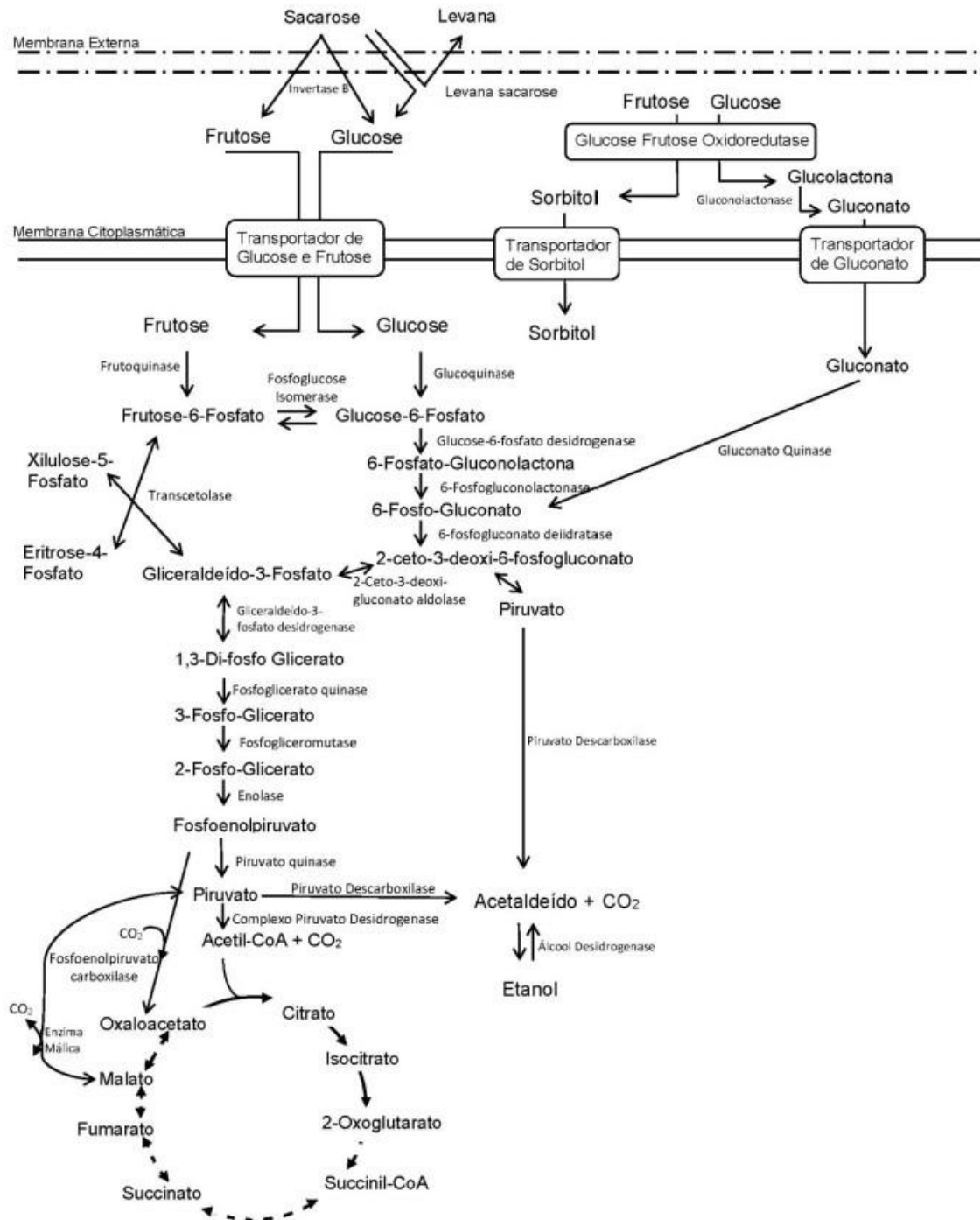
Nem todas as linhagens de *Z. mobilis* possuem a capacidade de utilizar a sacarose como fonte de carbono, para as que conseguem fermentar sacarose, esta primeiramente é hidrolisada no meio extracelular resultando em glicose e frutose, em seguida, são transportados para dentro da célula como descrito anteriormente. A partir da sacarose, também pode ser produzido um polímero de frutose com ligações β -2,6 pela ação das enzimas levanasacarase e invertase, além de fruto-oligossacarídeos, oligômeros contendo uma unidade de glicose ligada a 1 a 3 resíduos de frutose (VIAKARI E GISLER, 1986; DOELLE et al.1993).

As condições de cultivo de *Z. mobilis* são muito importantes, pois podem alterar as rotas metabólicas e a formação dos seus produtos. Um desses parâmetros é a fonte de carbono, a levana só é produzida a partir de sacarose e não pode ser produzida pelo mix de glicose e frutose. Concentração de açúcar inicial é um importante parâmetro que influencia, pois tem efeito direto sobre a taxa de fermentação e as células microbianas. A relação real entre o teor de açúcar inicial e a taxa de fermentação é um pouco mais complexa. Geralmente, a taxa de fermentação será aumentado com o aumento da concentração de açúcar, até um certo nível (PANESAR et al. 2006).

A concentração inicial de glicose acima de 15% pode gerar inibição do crescimento e diminuição da produção de etanol (CALAZANS et al, 1989). Galani et al. (1985) avaliaram o cultivo de *Z. mobilis* em concentrações de 2, 10 e 20% (p/v)

de glicose e constatou que o meio contendo 2% de glicose apresentou maior crescimento e produção de proteínas.

Outro fator é a temperatura, que é considerada ótima entre 30 e 35°C, podendo crescer numa faixa de temperatura que vai de 20 a 45°C. O aumento da temperatura provoca a acumulação de etanol no interior das células, amplificando, assim, o seu efeito inibitório. Sobre o pH, a maioria das linhagens de *Z. mobilis* pode crescer dentro de um espectro amplo de pH, entre 3,5 e 7,5, mas o melhor pH para o seu crescimento é de pH 6,0-7,0 (SAHM et al., 2006).

FIGURA 1 - Metabolismo de carboidratos em *Z. mobilis*

2.1.3 Metabólitos de importância biotecnológica

2.1.3.1 Bioetanol

Z. mobilis tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido ao seu alto potencial fermentativo, do qual resulta na produção de etanol com velocidade três a quatro

vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae* (RUANGLEK *et al.*, 2006). O etanol é obtido a partir da última reação da via fermentativa pela redução reversível do acetaldeído catalisado pela isoenzima álcool desidrogenase (SREEKUMAR *et al.*, 1999).

Diversos estudos, em diferentes países, têm explorado o potencial de *Z. mobilis* na produção de etanol. Na Austrália, Canadá, Estados Unidos e Japão, esta bactéria tem sido utilizada para estudos de produção de álcool etílico em larga escala (TANAKA *et al.*, 1999; SHANE *et al.*, 2000).

A produção de etanol a partir de *Z. mobilis* requer substratos ricos em glicose, frutose ou sacarose, pois meios contendo celulose, inulina ou amido não são usados diretamente como substratos para fermentação alcoólica uma vez que essa bactéria não hidrolisa estes polímeros (SWINGS e DE LEY, 1977).

A fonte de carbono mais utilizada para a produção de bioetanol é a sacarose e o caldo de cana-de-açúcar, mas há anos tem-se estudado o desempenho da produção a partir de várias fontes provenientes de agrocultivos como farinha e farelo de trigo melaço de cana-de-açúcar e algaroba (PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005).

Cazzeta *et al.* (2007) estudaram a produção de bioetanol a partir de cana de açúcar por *Z. mobilis* sob diferentes condições de cultivo e verificaram que as melhores condições foram o cultivo contendo 200 g/L de açúcares redutores, a 30°C e sem agitação, obtendo 55,8g/L de etanol.

As fermentações utilizando *Z. mobilis* em substituição da *Saccharomyces cerevisiae* tem sido propostas devido a algumas vantagens dessa bactéria, porém também há desvantagens. Pode-se destacar como vantagens (SAHM *et al.*, 2006):

- Tolerância a elevadas concentrações de etanol (127g/ L) e glicose (300g/L) e alta taxa específica de crescimento
- Alta produtividade, 80 g/ L de glicose metabolizada por *Z. mobilis* produziu uma concentração final de 39 g/L de etanol em 9 horas , enquanto *S. cerevisiae* produz 36 g/L de etanol, em 11 horas, o que corresponde a uma produtividade de 4,3 g/L/h e 3,3 g/L/h respectivamente
- Produz altos rendimentos de etanol, 0,48 g de etanol/g de glicose
- Pode ser facilmente manipulado geneticamente por ser um procarioto

- Não requer controle ou a adição de oxigênio durante a fermentação. Contém hopanóides em sua membrana plasmática, semelhante ao esteróis eucarióticos, permitindo uma adaptação da membrana com as mudanças de temperatura e as concentrações de etanol superior a 10 % durante a fermentação.

Como desvantagens pode-se citar (SAHM et al., 2006):

- Cataboliza apenas glicose, frutose e sacarose e esses são substratos caros
- Não fermenta celulose, inulina, amido ou pentoses
- Inadequado para a formação de biomassa, essa bactéria executa o catabolismo de carboidratos pela via de Entner-Doudoroff, o que provoca também o rendimento de 1 mol de ATP por mole de glicose fermentada, tornando necessário o fluxo rápido de carbono

2.1.3.2 Levana

A levana é um bioexopolímero, de alto peso molecular, constituído de resíduos lineares de (2-6)- β -D-frutofuranosil, contendo poucos pontos de ramificações (2-1)- β -D-frutofuranosil (YOO et al., 2004). Uma vez que este polímero é um anidrofructosilfructosídeo solúvel em água, a levana pode também ser chamada de polifrutana pelo fato de ser constituída de moléculas de frutose (GARCIA-CRUZ, 1997).

Z. mobilis metaboliza a sacarose por meio de três enzimas: levanasacarase (LevU), extracelular, responsável pela síntese de levana e fruto-oligossacarídeos; a sacarase (InvB), também extracelular, que hidrolisa a sacarose e a sacarase (SacA/InvA), sem localização nem função bem definidas. (DOELLE et al., 1993; SAHM et al., 2006). Ocorre a produção de dois tipos de levana, uma de alto peso molecular precipitável pelo etanol e outra de baixo peso molecular denominada de levana não precipitável, conhecida como levana solúvel em meio aquoso (VILKARI, 1986).

A enzima levanasacarase é responsável pela polimerização dos resíduos de frutose, que pode gerar desde levanas de alto peso molecular (107 Da) até pequenos oligossacarídeos com nove resíduos de frutose (BEKERS et al., 2002).

A levana é produzida por *Z. mobilis* a partir da sacarose, mas não a partir de uma mistura de glicose e frutose. Entretanto, esta produção depende da concentração de sacarose no meio, de forma que se esta for muito baixa (em torno de 0,5g/L) a formação de levana cessa e somente frutose livre é liberada para o meio, o que confirma a necessidade de redução do estresse osmótico (SWINGS; DE LEY, 1977).

A levanasacarase isolada de *Z. mobilis* tem massa molar de 55 kDa, o pH ótimo é 5,0, tanto para formação de levana quanto para a hidrólise da sacarose. A enzima encontra-se livre ou ligada à membrana é estável em pH de 5,0 a 7,0 e inativada em pH 9,0. A atividade hidrolítica ótima ocorre em temperatura de 50°C enquanto para a formação de levana, a temperatura é de 30°C. A levU de *Z. mobilis* é mais ativa em baixas temperaturas, o que contribui para condições de produção suaves e diminui as chances de contaminação (WENDT, 2001).

Várias pesquisas mostram que *Z. mobilis* quando cultivada em meio rico em sacarose promove a conversão do dissacarídeo em levana. Segundo Muro *et al.* (2000) não há síntese de levana em meio contendo apenas frutose. Dentre os organismos produtores de levana a *Z. mobilis* é o mais promissor para produção em escala industrial (ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999; MELO *et al.*, 2007).

Calazans *et al.* (1989) observaram que a concentração de levana produzida por *Z. mobilis* em condição de cultura por batelada contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio foi 12,7%, Carlos (1991) realizou estudos utilizando seis linhagens de *Z. mobilis*: AG11, CP4, P4, Z-1-81, Z-1-87 e Z-1-88, pertencentes a coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco - Recife em meio de cultura a base de sacarose, por batelada, e a linhagem Z-1-81 foi considerada a melhor linhagem produtora de levana precipitável, pois apresentou maior capacidade de conversão de substrato a levana, obtendo 3,7 g/L de levana (expressa como frutose).

Vinhas (1999) avaliou a produção de levana por duas linhagens de *Z. mobilis*, ZAG-12 e ZAP, sob a influência dos parâmetros agitação, concentração inicial de sacarose, os resultados mostraram que a linhagem *Z. mobilis* ZAG-12 foi a melhor produtora de levana quando a concentração de sacarose inicial foi de 200,0 g/L, sem agitação.

A literatura relata usos da levana em várias áreas, por exemplo, como complexo biologicamente ativo, substituto de plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, frutose altamente purificada para uso médico, agente hipocolesterolêmico e como imunomodulador e anticancerígeno (CALAZANS *et al.*, 1997).

Estudo realizados por Calazans *et al.* (2000) mostraram que as linhagens *Z. mobilis* CP-4, ZAP, ZAG-12 e Z-1-81 cultivadas em 100g/L de sacarose por 72 horas produziram levanas com diferentes pesos moleculares médios. Foi observado que levana com 46.000 Da promoveram a maior inibição do tumor sarcoma 180.

2.1.3.3 Sorbitol

Sorbitol é sintetizado a partir de frutose e glicose, por uma reação catalisada pela glicose-frutose oxidoredutase (CAZETTA *et al.*, 2005), apresenta uma ampla aplicação na indústria de alimentos, cosméticos, têxtil e farmacêutica (KRETCHMER; HOLLENBECK, 1991).

A utilização de processos fermentativos para a produção de sorbitol tornou-se uma opção viável nos últimos anos, devido à utilização de condições suaves de reação, diminuindo os custos de produção e os impactos ambientais (WEI, 2001; SILVEIRA; JONAS, 2002). Dentre os microrganismos candidatos à produção industrial de sorbitol por processo fermentativo, têm-se destacado *Z. mobilis* (KANNAN *et al.*, 1997).

Z. mobilis produz sorbitol a partir não só da sacarose, mas também a partir de uma mistura de glicose mais frutose em detrimento da produção de etanol (KANNAN *et al.*, 1997). A bactéria produz quantidades equimolares de sorbitol e ácidos orgânicos a partir de frutose e aldoses, em reações catalisadas por glicose-frutose oxidoredutase (GFOR) e glucono- δ -lactonase (GL), enzimas presentes no periplasma celular (SILVEIRA; JONAS 2002;). Segundo Vignoli *et al.* (2006) células livres e imobilizadas de *Z. mobilis* produzem 25 e 50 g/L de sorbitol, respectivamente.

Barros *et al.* (2002) estudaram a produção de sorbitol em meio de sacarose pré-tratado com invertase, empregando *Z. mobilis* ATCC 29191. A melhor produção de sorbitol foi 41,39 g/L e a melhor produtividade foi de 1,72g/L.h-1 em 24 horas de fermentação no meio de sacarose pré-tratada. Esses autores concluíram que esses

valores representam uma melhoria de 72,17% na produção de sorbitol com adição de invertase.

Oliveira *et al.* (2004) avaliaram o efeito da alta concentração de sacarose na produção de sorbitol e observaram que a elevação de sacarose de 100 para 300g/L resultou em aumento da produção de sorbitol de 4,979 para 20,633g/L.

Barros *et al.* (2006) investigaram o efeito da aplicação de ultra-som de baixa intensidade na liberação de sorbitol de células de *Z. mobilis* crescida em meio com sacarose a 200 g/L até 48 h de fermentação. A melhor produção de sorbitol foi de 36,09 g/L em 36 h de cultivo. A irradiação ultrasônica não alterou os valores de sorbitol detectados e o ultra-som levou ao rompimento das células após 20 minutos de tratamento.

2.1.4 Uso terapêutico

Lindner, após isolar em 1926 *Z. mobilis* do pulque mexicano observou seu uso terapêutico para doenças renais e doenças metabólicas. Ele afirmou que a fermentação é o meio mais simples de combater a putrefação e que a descoberta de um microrganismo produtor de uma fermentação tão potente, leva a sugerir a sua utilização na prática clínica, especialmente em supurações e infecções intestinais (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1972).

A ingestão de preparações líquidas de *Z. mobilis* já foi utilizada no tratamento de várias infecções entéricas as quais promoveram resultados promissores (GONÇALVES DE LIMA *et al.*, 1972).

Gonçalves de Lima *et al.* (1972) também mostraram a inibição antagônica de *Z. mobilis* CP1 em *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*. Além disso, a segurança terapêutica de *Z. mobilis* para os seres humanos sem capacidade patogênica encorajou o seu uso numa variedade de tratamentos clínicos.

2.2 Proteômica

O termo proteômica foi criado por analogia a genômica e introduzido nos anos de 1990 por Mark Wilkins, podendo ser definido como estudo do proteoma, ou seja, estudo do conjunto de proteínas totais expressas pelo genoma de um organismo ou tecido em um determinado momento e sob condição específica. O proteoma não é estático, ao contrario do genoma, modificando-se, dependendo das condições ou

estímulo aplicados ao organismo estudado, por isso é importante para elucidar a funcionalidade das proteínas a nível celular na adaptação do organismo ao ambiente (WASINGER et al., 1995; ROCHA et al., 2005).

A proteômica abrange três principais áreas: 1) proteômica estrutural - caracterização de proteínas, incluindo modificações pós-translacionais; 2) proteômica comparativa - comparação da expressão protéica em dois estados fisiológicos; 3) interação proteína-proteína usando técnicas como espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática.(PANDEY & MANN, 2000; FLOWLER et al., 2002;).

Foram desenvolvidas diversas técnicas e abordagens para estudar o proteoma, as mais utilizadas seguem pelo menos três princípios básicos sendo: 1) a separação ou resolução das proteínas presentes em uma mistura complexa; 2) a proteólise (digestão) das proteínas resultando peptídeos e; 3) a identificação dos peptídeos por espectrometria de massas (MS) e a consequente identificação das respectivas proteínas com acesso a informações de bancos de dados através da bioinformática (HAN et al., 2008).

Uma ferramenta muito poderosa e utilizada para a separação de proteínas é a eletroforese bidimensional (2-DE) que consiste em duas fases, a primeira dimensão quando um *pool* protéico é submetido à focalização isoeletrica em tiras de pH imobilizado, durante a qual as proteínas são separadas entre si por seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, as proteínas são separadas em gel de poliacrilamida (PAGE) por suas massas moleculares (MM). Os polipeptídeos são então identificados nos géis após a coloração como pequenos pontos (*spots*), que podem conter isoformas com coordenadas específicas de pI e massa molecular (GÖRG et al., 2004).

A utilização de espectrometria de massas (MS) nos estudos do proteoma objetiva identificar a massa molecular de uma proteína ou peptídeo através da sua relação massa/carga (m/z) após um processo de adição de carga (ionização) a essas moléculas (HOFFMANN, 2007). Para este processo, O MS possui fonte de ionização, como o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) ou o ESI (*Electrospray Ionization*) (HOFFMANN, 2007), e um analisador de massas (*Time-of-flight* (TOF), *Quadrupole* e *Ion Trap*) (YATES et al., 2009).

Com isso são obtidos espectros de massa típicos de uma determinada proteína ou peptídeo, determinando a sequência dos aminoácidos daquele peptídeo através do sequenciamento *de novo* ou com a comparação destes espectros (peptide mass fingerprinting - PMF) com base de dados de proteínas conhecidas (YATES *et al.*, 2009).

Na biotecnologia industrial, a análise proteômica de microrganismos é aplicada no monitoramento de alterações celulares durante a produção de proteínas heterólogas, na identificação de passos limitantes de velocidade nas vias metabólicas, no desenvolvimento de cepas mais eficientes na produção de bioprodutos e na busca de novas enzimas e promotores (HAN *et al.*, 2010).

Com *Z. mobilis*, os estudos proteômicos são bastante reduzidos, HAEJUNG *et al.* (1991) investigaram o stress provocado pela concentração de etanol (10%) e temperatura (45°C) sobre a expressão das doze principais proteínas da via fermentativa de *Z. mobilis* CP4 durante a fase exponencial e fase estacionária (72h) através de mapeamento em gel de eletroforese bidimensional com identificação das proteínas por semelhante migração das proteínas purificadas, comparação com linhagens recombinantes com genes superexpressos e Western blots, e concluíram que a maioria das proteínas estudadas permaneceram com volume semelhante durante as duas fases de crescimento, porém os níveis das proteínas piruvato quinase, álcool desidrogenase I, e glicoquinase diminuíram na fase estacionária e álcool desidrogenase II foi considerada a principal proteína marcadora de stress tendo aumento seu nível nas condições estudadas.

Yang *et al.* (2013) avaliaram os mecanismos moleculares da resposta ao estresse etanólico (6%) em *Z. mobilis* ZM4 através de biologia de sistemas integrando genômica, proteômica e transcriptômica. Nesse estudo, foram encontradas proteínas relacionadas ao metabolismo e ao estresse, como chaperonas e enzimas reguladoras como as mais abundantes e a maioria dos genes com expressão reduzida estão relacionados a tradução e biogênese ribossomal, os autores ressaltando que essa resposta ao estresse ao etanol é um processo dinâmico, complexo e envolve muitos genes de todas as diferentes categorias funcionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar e caracterizar proteínas envolvidas no mecanismo de mudanças e adaptação de rotas de metabólicas em *Zymomonas mobilis* durante diferentes condições de fermentação de sacarose, visando à obtenção de genes candidatos a serem utilizados em futuros trabalhos de transformação genética de cepas a fim de aplicação na fermentação industrial.

3.2 Específicos

- Quantificar levana produzida por precipitação e etanol, sacarose, glicose, frutose e sorbitol por cromatografia líquida de alta eficiência
- Definir a melhor metodologia para extração das proteínas de *Z. mobilis*;
- Realizar análise comparativa do padrão de expressão diferencial de proteínas de *Z. mobilis* em meio de sacarose
- Caracterizar as proteínas isoladas por sequenciamento de aminoácidos;
- Identificar proteínas específicas envolvidas nos mecanismo de produção de bioetanol e co-produtos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Foi utilizada a linhagem ZAG-12 de *Z. mobilis* (UFPEDA 241), pertencente à Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Esta linhagem foi obtida pela fusão de esferoplastos das linhagens ZAP e Ag11 de *Z. mobilis*.

4.2. Meios de Cultivo

4.2.1. Meio para manutenção das culturas

A linhagem ZAG-12 de *Z. mobilis* foi mantida em Meio Standard de SWINGS & DE LEY (SSDL), com a composição em g/L: glicose 20,0; extrato de levedura 5,0. O pH ajustado em 6,5 (SWINGS & DE LEY, 1977).

4.2.2. Manutenção da linhagem bacteriana

As culturas bacterianas foram repicadas a cada três meses, para tubos contendo meio de cultura SSDL. Os cultivos foram incubados a 30 °C por 48 horas e após crescimento satisfatório, a linhagem foi estocada sob refrigeração (aproximadamente 4°C).

4.2.3 Preparação do inóculo

Inóculo foi preparado a partir de cultura ativada em frasco de borossilicato com tampa rosqueada de 250ml contendo 150 mL de meio de fermentação (MPF), cuja composição é a seguinte: sacarose 50, 100 ou 200 g/L, extrato de levedura 5 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g/L e pH em torno de 6,5 que será desenvolvido em estufa a 30 °C por 18 horas. Após a incubação, o inóculo foi centrifugado durante 20 minutos a 4000 x g. As células foram decantadas, ressuspensas em água destilada estéril e padronizadas a 0,2g/L com auxílio de espectrofotômetro e curva de calibração.

4.2.4. Meios de fermentação

Foram utilizados nos experimentos para estudos da expressão de proteínas em diferentes condições de fermentação, os meios de fermentação com três diferentes concentrações de sacarose, em g/L: 50,0; 100,0; 200,00; sendo os mesmos suplementados com os demais nutrientes nas mesmas concentrações que

o meio do inóculo: extrato de levedura 5,0; KH_2PO_4 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0. O pH da solução de sacarose foi ajustado em 6,5, antes da autoclavação. As soluções de sacarose, sais e extrato de levedura foram preparadas e autoclavadas separadamente a 120 °C por 20 minutos. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.2.5 Teste de pureza

Foram realizadas semeaduras do mosto fermentado, em meio Ágar nutritivo, com o intuito de investigar a presença de possíveis contaminantes na fermentação nos tempos inicial e final. Nesse meio não se verifica crescimento de *Zymomonas mobilis* devido a ausência de determinados fatores essenciais para esta bactéria. O aparecimento de colônias implicará na presença de contaminantes.

Observações diretas do mosto fermentado, ao microscópio óptico, foram executadas.

4.3. Experimentos

4.3.1. efeito da concentração de sacarose na produção de etanol e co-produtos

Experimentos foram conduzidos com a linhagem *Z. mobilis* ZAG-12, em frascos de borossilicato com tampa roqueada de 500 mL, contendo 300 mL de meio de fermentação. As fermentações desenvolvidas em três diferentes meios de cultura com concentrações de 5%; 10% e 20% de sacarose, sem agitação, com limitação de oxigênio, a 30 °C $\pm$ 1 °C durante 72 horas, tiveram amostras retiradas ao longo do desenvolvimento do processo fermentativo para medidas da biomassa, sacarose, frutose, sorbitol, glicose, etanol e pH.

4.4. Determinações quantitativas para acompanhamento dos processos fermentativos

4.4.1. Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada medindo-se a absorbância a 660nm de uma suspensão de células em água destilada após a separação das mesmas por centrifugação a 4000 x g por 20 minutos. O correspondente de massa seca foi obtido da curva de calibração que relaciona massa seca e absorbância. Para a construção dessa curva, 100 mL de mosto fermentado de 72h foi centrifugado (4000x g por 20

minutos) e lavado duas vezes com água destilada a fim de se obter apenas as células. Posteriormente, foram feitas leituras da absorbância a 660nm de 10 diluições sucessivas desse concentrado e 5 mL de cada diluição foi retirado e colocado em pesa-filtros tarados e levados para estufa a 80°C por 24 horas e em seguida pesados.

4.4.2. Dosagem de sacarose, frutose, sorbitol, glicose e etanol

A sacarose, frutose, sorbitol, glicose e etanol serão dosados por *high-performance liquid chromatography (HPLC)*, utilizando “uma coluna Aminex HPX87H, com ácido sulfúrico 5,0 μ M 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 μ m”.

Na quantificação será utilizado 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, será necessário tal procedimento para cada análise. As amostras e os padrões serão diluídos em fase móvel, filtrados e injetados automaticamente em um volume de 5,0 μ L.

4.4.3. Determinações do pH

As medidas do pH foram realizadas em potenciômetro Metrohm Herisau, modelo F-3508.

4.4.4. Dosagem de levana

A levana do líquido fermentado foi precipitada com etanol absoluto, ajustando-se a mistura hidroalcoólica para 75 % (v/v) em etanol. Foram adicionados 15 mL do etanol a -20 °C a 5 mL do fermentado já filtrado em membrana porosa 0,22 μ 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 x 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, por peso seco em pesa-filtros previamente secos e tarados, que foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas.

4.5. Proteômica

4.5.1. Extração de proteínas totais

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 tiouréia 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 Fenol

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: 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 minutos, 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 SDS1% 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).

4.5.2. quantificação de proteínas totais - Kit 2D Quant

Foi preparada uma curva padrão utilizando a solução de BSA 2,0 mg/mL. 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 CopperSolution e 400 µL de

água mili-Q e colocados no vórtex para dissolver o pellet. As amostras foram lidas em espectrofotômetro na absorbância de 480 nm, usando água destilada como branco

4.5.3. Gel unidimensional SDS (Dodecil sulfato de sódio)-PAGE

Foram liofilizados 500 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.

4.5.4. Eletroforese bidimensional

4.5.4.1. Primeira dimensão

O equivalente a 500µg 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 isoelétrica IPGphor 3, GE Healthcare, por 16 a 20 horas a 20 °C. A focalização isoelétrica 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).

4.5.4.2. 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: uréia 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).

4.5.5. Visualização dos spots

Os géis bidimensionais foram visualizados por meio de coloração com Coomassie Blue coloidal. Para isto, os géis foram, primeiramente, mantidos durante 30 minutos em solução fixadora (Ácido acético - 40% e Etanol - 10%) e, em seguida, pernameceram por 1 hora em solução de Azul de Coomassie Brilhante (LAEMMLI, 1970). Depois, retirou-se o excesso de corante com sucessivas lavagens com água ultrapura possibilitando a visualização e análise dos spots corados. Após as lavagens os géis foram armazenados em solução de preservação, ácido acético 5%.

4.5.6. Análise dos géis

As imagens dos géis foram adquiridas 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 detecção dos spots foi realizada, seguida de correções manuais para retirada de artefatos que não correspondiam a proteínas e a quantidade de cada local foi normalizada pela intensidade total de spots válidos. As imagens de géis das amostras de cada condição foram comparadas para verificação diferencial de expressão. Para considerar uma proteína como expressa diferencialmente, verificou-se o aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes o volume normalizado.

4.5.7. Digestão In-gel e espectrometria de massas MALDI-TOF

Os spots diferencialmente expressos foram exisados manualmente dos géis corados e armazenados em microtubos a -20°C. A digestão seguiu o procedimento

descrito por Shevchenko *et al.* (2006), com algumas modificações. Os spots foram lavados com acetonitrila (ACN) 50% v/v e bicarbonato de amônio 50 mM e secos a vácuo. Dez microlitros de solução de tripsina modificada 2 µg/mL (Promega) foram adicionados sobre cada *spot*, que foi mantido no gelo por 40 minutos. Para iniciar a reação, foram adicionados 20 µL de 50 mM de bicarbonato de amônio e foram levados para estufa a 37°C, overnight.

Os peptídeos foram extraídos com 20 µL de ácido trifluoracético 0,1%/acetonitrila 50% (v/v), em três lavagens de 20 minutos no agitador orbital, seguidos de 30 minutos no banho de ultrassom. A solução de peptídeos foi concentrada a vácuo, e dessalinizados em minicolunas ZipTip (MilliPore), segundo as instruções do fabricante.

Para identificação das proteínas por *peptide mass fingerprinting* (PMF), 0,5 µL da solução de peptídeos e 0,5 µL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) 4 mg mL⁻¹ em acetonitrila (ACN) 50% e 0,3% TFA foram misturados na placa metálica Anchor Chip 800/384 (Briker Daltonic GmbH) do espectrômetro de massas. As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massa MALDI TOF/TOF (Ultraflex, Bruker Daltonics) no modo reflectron. Os parâmetros de aquisição dos espectros foram: taxa de repetição do laser de 5 Hz, 20 kV de voltagem de aceleração, intervalo de m/z de 500 a 4000 Da, 200 *shots* foram acumulados por espectro. O espectrômetro de massas foi calibrado internamente com mistura de peptídeos conhecidos. A lista de picos de espectros foi gerada utilizando o programa Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics).

A relação de massas dos peptídeos e de seus fragmentos foi utilizada para identificação das proteínas por PMF, com o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) com busca no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr>). Os parâmetros da busca foram: tolerância de 50 ppm, uma clivagem perdida, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável. A análise estatística foi determinada pela probabilidade baseada no *Mowse score* dado pelo MASCOT, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Fermentações

O crescimento celular de *Z. mobilis* de acordo com as condições de fermentação é mostrado na Figura 2, as células tiveram um bom crescimento em todos os meios de cultura atingindo um valor máximo de O.D. (660nm) de 1,9 em aproximadamente 40 horas. Observou-se a formação de uma fase *Lag* de crescimento que durou aproximadamente 10 horas em todos os cultivos, após esse intervalo começa a fase exponencial, período que o microrganismo encontra-se com a atividade metabólica intensa.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) nas concentrações de 50, 100 e 200 g/L de sacarose foram, respectivamente, $0,32 \text{ h}^{-1}$; $0,23 \text{ h}^{-1}$ e $0,34 \text{ h}^{-1}$. O valor de pH foi de 6,5 inicial para em torno de 4,5 final após 12 horas de fermentação em todas as condições mantendo esse valor até o período final (72h).

Para avaliar os efeitos das condições de fermentação sobre o proteoma de *Z. mobilis* é importante definir as fases de crescimento do microrganismo em cada condição de fermentação, pois a velocidade de crescimento pode ser diferente e o estágio de intensidade metabólico pode não ser o esperado, se pode investigar as alterações proteômicas associadas a cada fase nas diferentes condições obtendo as alterações completas durante o desenvolvimento do processo bem como relacionando esses dados com a formação dos produtos.

Para a retirada de células para extração de proteínas para a fase exponencial foi padronizado o valor de O.D.(660nm) 0,7 e da fase estacionária após o período de 24 horas de fermentação O.D.(660nm)1,4 para a condição com 50g/L de sacarose e 1,5 para as demais, aproximadamente.

O consumo de substrato nos três meios de fermentação foi elevado porém não foi completo, o meio com 5% de sacarose mostrou a menor porcentagem de consumo 88,38%, já os meios com 10% e 20% de sacarose apresentaram taxas de consumo semelhantes 96,95% e 96,51%. Esses valores estão acima dos obtidos por Ernandes e Garcia-Cruz (2009) que estudaram o efeito da alta concentração de sacarose sobre produção de levana por *Z. mobilis* CCT 4494 e verificaram uma taxa

de consumo de substrato de 84,4% e 81,3% com meios contendo 10 e 20% de sacarose.

Sobre o desempenho de quebra de substrato, o meio contendo 5% e 10% de sacarose após 6 horas de fermentação tinham 6 g/L e 20,90 g/L de sacarose residual enquanto que o meio com 20% de sacarose ainda apresentava 167 g/L, isso sugere uma inibição da atividade enzimática da invertase pela concentração de substrato, Doelle e Greenfield (1985) verificaram que a eficiência da hidrólise de sacarose diminui com altas concentrações de sacarose.

Figura 2 – Curva de Crescimento de *Z.mobilis* nas diferentes condições de fermentação

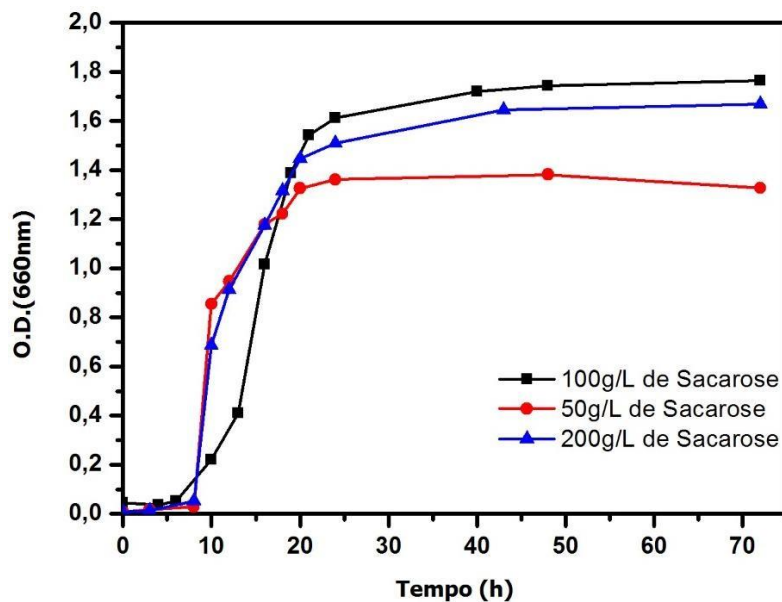


Figura 3 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de *Z. mobilis* ZAG-12 no meio contendo 5% de sacarose

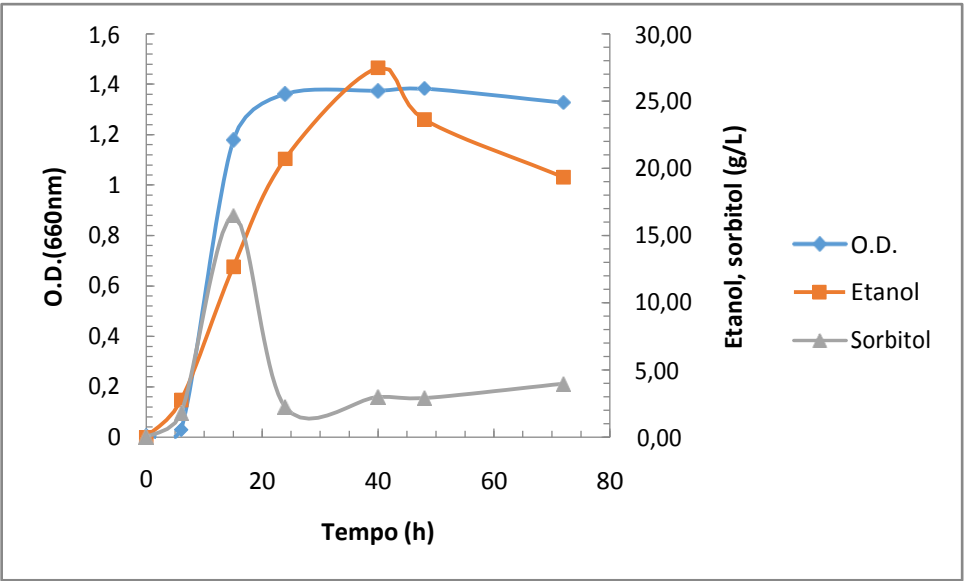


Figura 4 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de *Z. mobilis* ZAG-12 no meio contendo 100g/L de sacarose

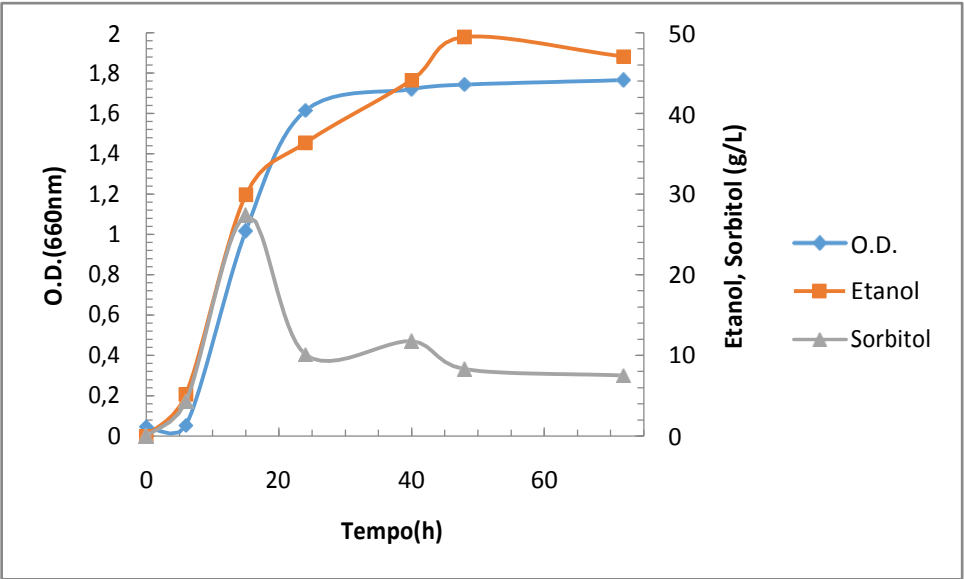
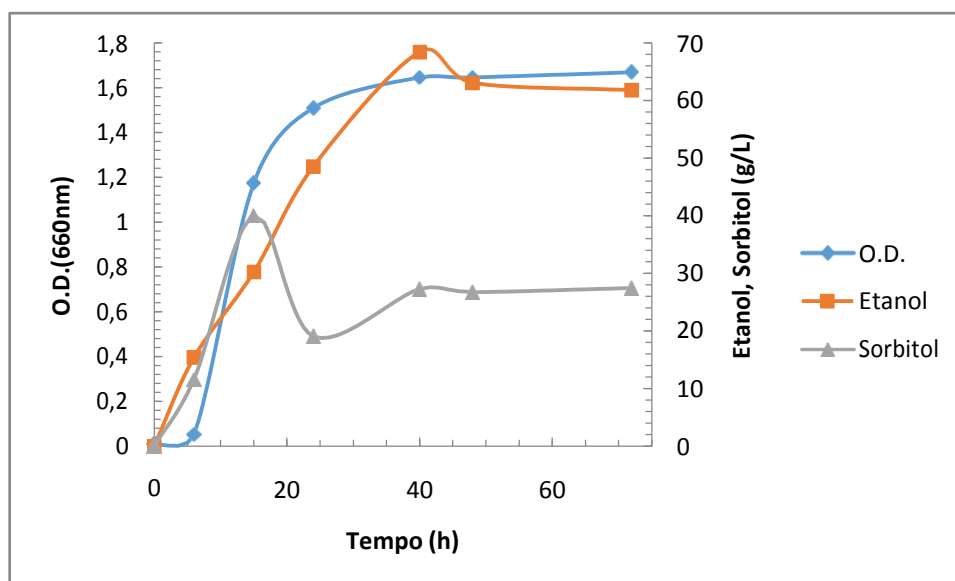


Figura 5 - Cinética de produção de etanol, sorbitol e crescimento celular de *Z. mobilis* ZAG-12 no meio contendo 200g/L de sacarose



O crescimento celular de *Z. mobilis* é menor que leveduras, Rogers *et al.* (1982) reportaram que apenas 2% da fonte de carbono são destinados à biomassa, convertendo a maior parte do substrato para a produção de etanol, seu principal produto. Porém, é possível observar uma associação desse crescimento com a produção de etanol como visto nas figuras 3, 4 e 5.

A máxima produção de etanol ocorreu no meio com 20% de sacarose em 40 horas de fermentação obtendo 68,36 g/L, seguido do meio com 10% de sacarose em 48 horas de fermentação com 49,45 g/L e do meio com 5% de sacarose com 27,47 g/L. Comparando com trabalhos apresentados na literatura, observa-se uma similaridade desses resultados, Barros (2006) encontraram uma produção de 54,88 g/L de etanol utilizando *Z. mobilis* ATCC 29191 em meio com 20% de sacarose.

Tabela 1 - Desempenho de *Z. mobilis* ZAG-12 na fermentação de sacarose nos meios com diferentes concentrações por 72 horas

Variáveis medidas e calculadas	Concentração de sacarose presente no meio de fermentação		
	5%	10%	20%
Células (g/L)	1,44	1,92	1,81
Substrato consumido (%)	88,38	96,95	96,51

Etanol (g/L)	19,32	47,06	61,73
Eficiência bioquímica - produção de etanol (%)	79,21	90,98	61,32
Taxa de utilização de substrato (g/L/h)	0,66	1,4	2,6
Fator de conversão de substrato em etanol(Y_p/s - g/g)	0,40	0,46	0,31
Fator de conversão de substrato em células (Y_x/s - g/g)	0,03	0,01	0,009
Produtividade volumétrica de etanol(g/L/h)	0,27	0,65	0,86
Sorbitol (g/L)	3,97	7,47	27,4

Os resultados apresentados na tabela 1 mostram que a eficiência bioquímica para produção de etanol foi maior no meio com 10% de sacarose com 90,98% do teórico máximo, enquanto que o meio com 5 % e 20% apresentaram taxas inferiores a citada, 79,21% e 61,32% do teórico máximo, respectivamente. A produtividade volumétrica de etanol no final da fermentação foi de 0,27; 0,65 e 0,86 g/L/h, no meios com 5, 10 e 20% de sacarose respectivamente. *Z. mobilis* é bastante conhecida por apresentar eficiência bioquímica próxima ao teórico máximo em meios contendo apenas glicose, mas em meios contendo sacarose há uma menor eficiência devido ao desvio do substrato para a produção de subprodutos como a levana e principalmente a formação de sorbitol (Viikari,1984).

A produção de sorbitol por *Z. mobilis* ZAG-12 foi máxima em 15 horas de fermentação nos três meios, no meio com 20% de sacarose foi encontrada a maior concentração, apresentando 40,04 g/L, já no meios com 10% e 5%, encontraram-se 27,41 g/L e 16,47 g/L. Alguns estudos encontrados na literatura, mostram a produção de sorbitol por *Z. mobilis*, Barros e Celligoi (2006) encontraram uma produção máxima de sorbitol de 42,35 g/L em meio contendo 20% de sacarose em 36 horas de fermentação. Lee e Huang (1995) encontram uma produção de sorbitol de 24,3 g/L por *Z. mobilis* ATCC 10988 em 24 horas de fermentação em meio contendo 20% de sacarose.

A produção de sorbitol por *Z. mobilis* é maior sob condições de estresse como alta pressão osmótica, sugerindo uma função osmo-protetora, porém em condições como altas temperaturas e concentrações de etanol pode haver um incremento da sua biossíntese, promovendo o crescimento celular e produção de etanol, esse

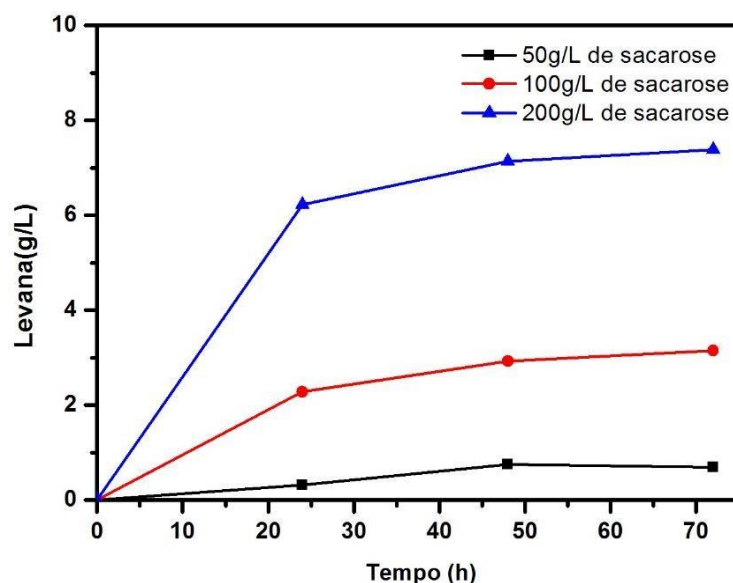
mecanismo molecular para essas condições ainda não é bem esclarecido (Sootsuwan et al., 2013).

Sootsuwan et al. (2013) mostraram a importância do sorbitol sob condições de estresse, como temperatura, concentração de etanol e pressão osmótica não só para o crescimento celular mas também para a produção de etanol, utilizando uma linhagem de *Z. mobilis* deficiente do gene *gfo*, que regula a enzima responsável pela biossíntese de sorbitol a glicose-frutose oxidoredutase, e verificaram nesta linhagem um nível de expressão diminuída das enzimas piruvato descarboxilase, álcool desidrogenase I e II, enzimas importantes da via fermentativa, bem como uma queda da síntese global de proteínas, sugerindo também uma função protetora da síntese de proteínas relacionadas a adaptação ao estresse.

Evidencia-se com essa informação a concordância dos resultados obtidos, o meio com 20% de sacarose, a maior concentração de açúcar e etanol dentre os meios estudados, apresentou a maior produção de sorbitol.

Foi observada a maior produção de levana na condição com 20% de sacarose com 7,38g/L, seguida da condição 10% de sacarose com 3,15g/L de levana e por fim a 5% de sacarose com 0,75g/L de levana. A figura 6 ilustra a produção de levana ao longo do tempo nas 3 condições de fermentação. Esses dados corroboram o estudo de Silva (1996), que realizou fermentações com *Z. mobilis* ZAG-12 em meio com concentração de 200g/L de sacarose.

Figura 6 – Produção de levana ao longo da fermentação



5.2 - Métodos de extração de proteínas

A concentração de proteínas pelos três métodos está representada na Tabela 1. Os resultados mostraram que a maior quantidade de proteínas foi obtida através do método fenólico, no entanto este se mostrou significativamente diferente ($p > 0,05$) em relação aos métodos de trizol e de tampão de lise, ambos com $p < 0,05$. As amostras após serem submetidas à eletroforese bidimensional e à coloração Comassie blue, percebeu-se que os três métodos detectaram uma ampla quantidade de proteínas ácidas, numa faixa de pH variando em torno de 3 a 6,5. Entretanto, o método de trizol mostrou-se eficiente na detecção de um número maior de proteínas numa faixa de pH entre neutro e alcalino, em comparação aos métodos de tampão de lise e fenol (Figura 7).

Tabela 2. Concentração de proteínas (mg/ml) obtida por três diferentes métodos de extração de proteínas.

Micro-organismo	Métodos de extração de proteínas		
	Trizol	Tampão de Lise	Fenol
<i>Z. mobilis</i> ZAG-12	1.11 ± 0.01	0.93 ± 0.01	1.44 ± 0.07

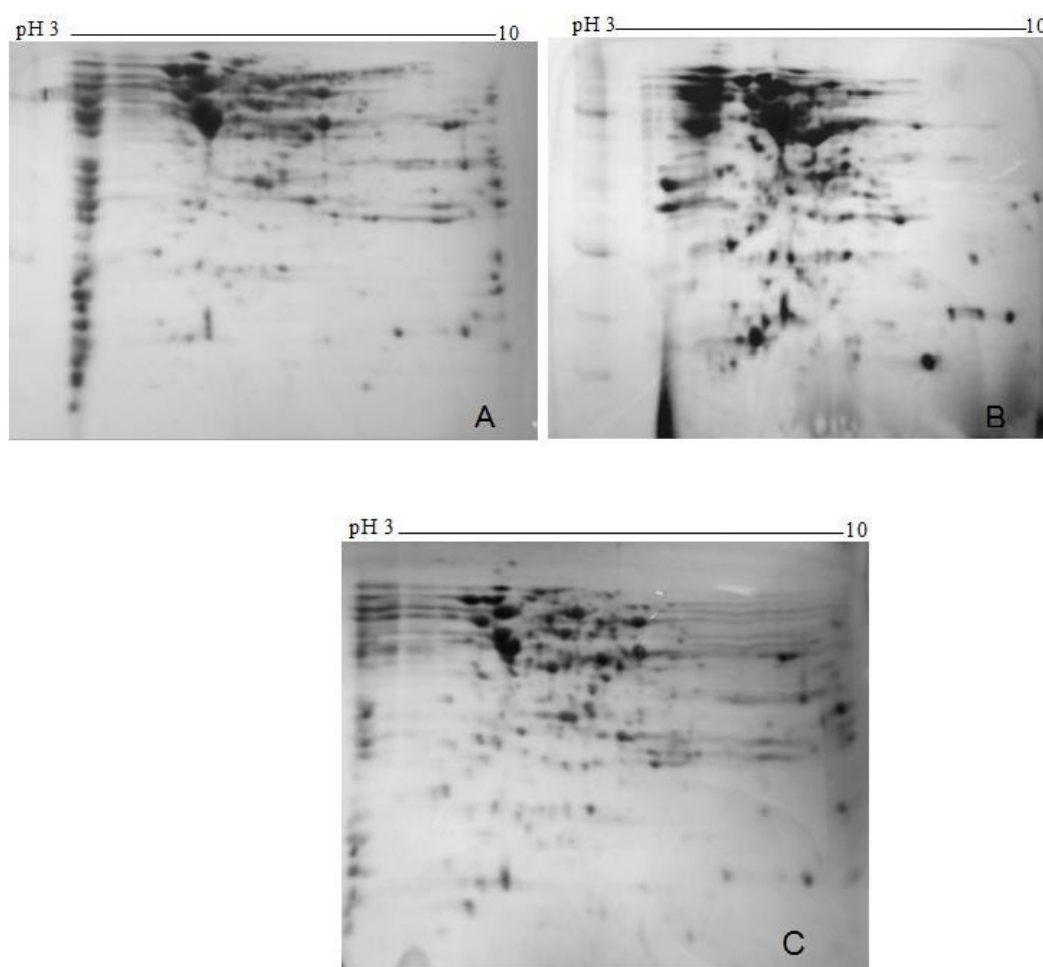


Figura 7. Representação dos perfis protéicos em gel bidimensional de *Z. mobilis* ZAG-12 usando (A) Trizol, (B) Tampão de lise e (C) fenol.

A preparação da amostra e/ou a resolução em alta qualidade de proteínas são os pontos mais importantes para a quantificação no intuito de analisar altas e baixas expressões proteicas em eletroforese bidimensional. É bastante relevante selecionar um ensaio padrão para escolha apropriada de uma amostra, uma vez que proteínas apresentam propriedades químicas e físicas diferentes, baseado no fator que determinados protocolos de extração podem favorecer diferentes tipos de proteínas da amostra (Mehmeti *et al.*, 2011). A obtenção de uma boa qualidade em géis de eletroforese bidimensional está relacionada com a maneira como a amostra é tratada antes da focalização isoeletrica (Lee e Lo 2008; Tan *et al.*, 2011).

Em proteômica, avaliação, seleção e padronização de métodos eficientes são necessários para a análise de proteínas, pois a presença de impurezas não

proteicos pode afetar gravemente a qualidade de separação 2D-PAGE pela formação de manchas de artefatos (Mehmeti *et al.*, 2011). *Z. mobilis* contém uma grande quantidade de substâncias que podem interferir no resultado de uma boa qualidade de eletroforetogramas tais como, sais, polissacarídeos, entre outros, que se não forem bem tratados desencadeará uma qualidade ruim na amostra de estudo. Os compostos anfotéricos em amostras irá diminuir o gradiente excessivamente nas áreas dos pontos isoelétricos deles, o que resulta em áreas verticais estreitas sem manchas de proteína.

Desta forma, os reagentes utilizados devem ser de baixo teor de sal e de elevado grau de pureza. O tempo também é um fator a ser levado em consideração no intuito de reduzir a possibilidade de perda de proteína e de modificação (Lee, Lo 2008).

Dos três procedimentos de extração de proteínas, a extração por trizol resultou numa menor concentração de proteínas quando comparada com a extração por fenol. No entanto, o método do reagente trizol apresentou uma boa resolução dos pontos manchados com um fundo claro (Figura 7 A). O método de extração por tampão de lise é o mais simples e o mais rápido dos três testados, todavia a quantidade de proteínas extraídas é bastante inferior em relação aos outros métodos.

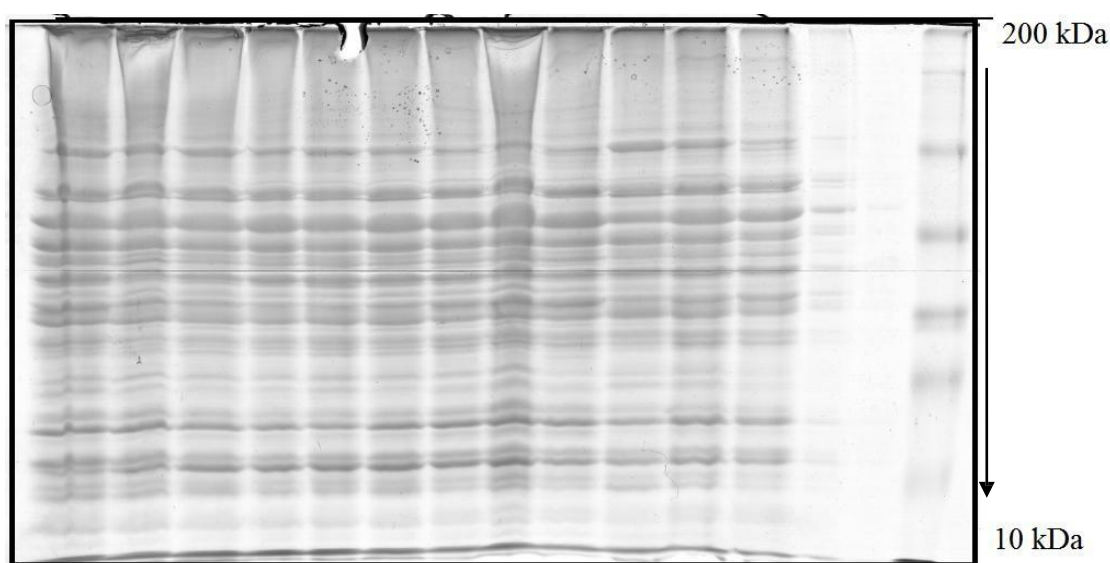
Segundo Lee e Lo (2008), o método de trizol foi testado em dinoflagelados e comparado com os métodos de tampão de lise e de precipitação por acetona, dentre estes, o trizol mostrou-se como melhor método de extração, tanto em concentração proteica quanto em resolução de imagem. Estrias em excesso, manchas e aglomerações em uma única região numa fita de pH 3 a 10, torna difícil discernir qualquer número apreciável qual o número de spots, como aconteceu no método de tampão de lise (Figura 7 B). Neste caso, fez-se necessária a utilização de fitas com pH de 4 a 7, uma vez que a maior concentração de proteínas são ácidas.

5.3 Análise da expressão diferencial das proteínas

As células de *Z. mobilis* ZAG-12 foram crescidas em três meios com diferentes concentrações de sacarose, 5; 10 e 20%, como fonte de carbono e retiradas amostras na fase exponencial, estacionária e final da fermentação (72h).

Primeiramente, foi utilizada a técnica de Eletroforese Unidimensional – SDS PAGE, a fim de avaliar a integridade das proteínas e obter um perfil prévio de proteínas expressas (Figura 8). A análise eletroforética unidimensional exibiu perfis com pesos moleculares entre 10 e 200 kDa para todas as amostras, porém não foram encontradas diferenças significativas de bandas.

Figura 8 - Gel SDS-PAGE 12% das proteínas totais de *Z. mobilis* ZAG-12 extraídas pelos método de trizol



Utilizando a eletroforese bidimensional - 2DE, foi investigada a expressão diferencial das proteínas de *Z. mobilis* ZAG-12 em resposta as diferentes concentrações de substrato comparando-se as suas fases de crescimento. Para confecção dos géis 2DE (Figuras 9, 10 e 11), foram utilizadas cerca de 500 µg de proteínas carregadas em cada gel mostrando uma média de 352 spots nos géis da fase exponencial, 373 spots nos géis da fase estacionária e final da fermentação das proteínas celulares provenientes dos meios de fermentação com 5 e 20% de sacarose, com pI variando entre 4 e 7 e massa molecular variando entre 100 kDa e 20 kDa. Todos os géis foram feitos em triplicatas e utilizados os recursos de normalização da intensidade dos spots e correção manual, adição e remoção dos spots, sempre mantendo uma intervenção concisa mínima durante a análise, essa ação ocorreu devido a sensibilidade do programa que pode detectar como spots alguns artefatos.

Os géis 2DE com as proteínas provenientes das células crescidas em meio de fermentação com 10% de sacarose apresentaram uma média 170 spots e não puderam ser estatisticamente comparáveis com os outros géis, logo foi mais prudente não utilizá-los na análise diferencial.

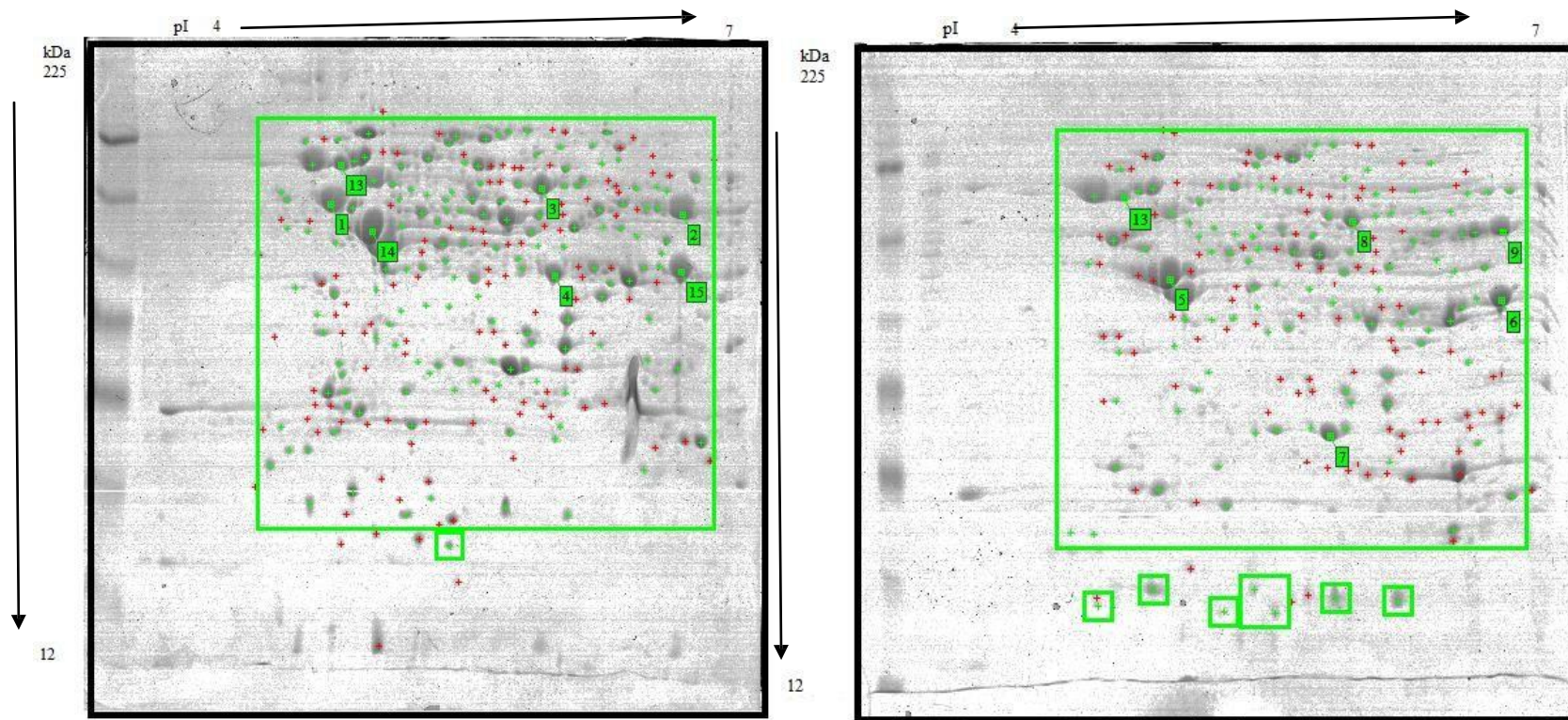


FIGURA 10 - Géis bidimensionais das proteínas das células de *Z. mobilis* ZAG-12 crescidas em meios de fermentação com concentração de 5 e 20% de sacarose, respectivamente, durante a fase estacionária de crescimento. Os spots numerados foram identificados pelo Programa ImageMaster e utilizados para pareamento entre os géis

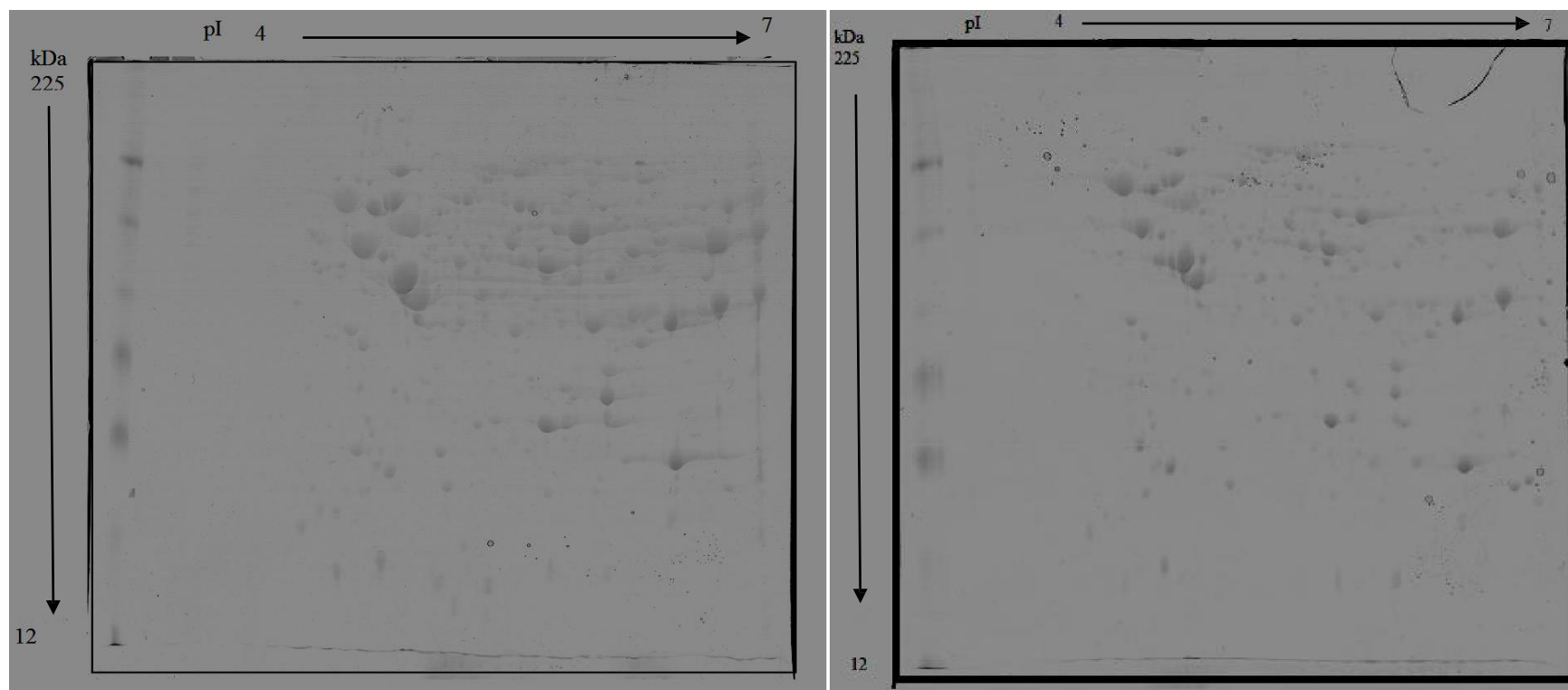


FIGURA 11 - Géis bidimensionais das proteínas das células de *Z. mobilis* ZAG-12 crescidas em meios de fermentação com concentração de 5 e 20% de sacarose, respectivamente, durante o final da fermentação

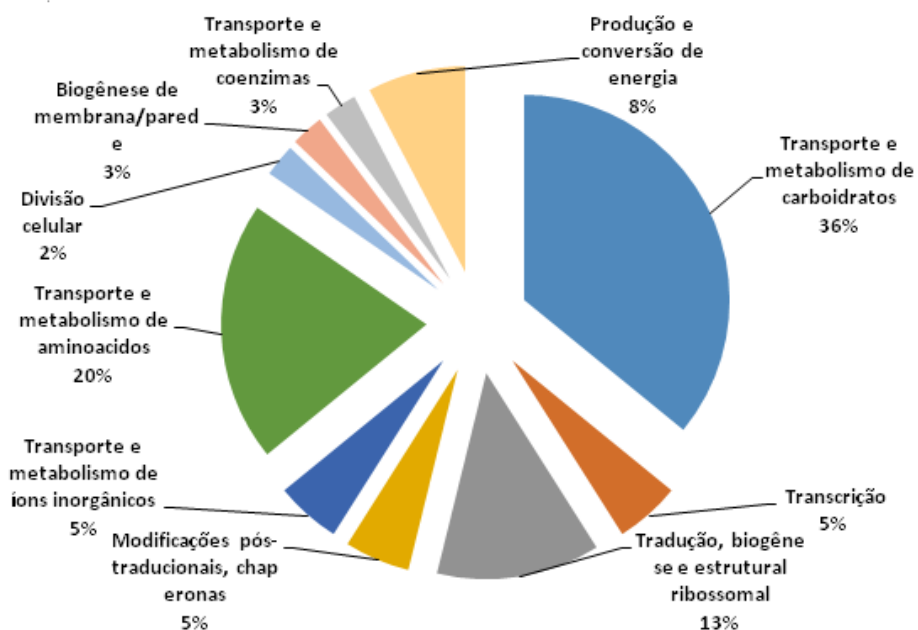
Após análise estatística ANOVA, realizada pelo programa ImageMaster dos géis bidimensionais contendo as proteínas celulares de *Z. mobilis* ZAG-12 crescida em meio de fermentação com 5 e 20% de sacarose, foram identificadas ao todo 90 spots diferencialmente expressos, sendo 28 spots na fase exponencial, 37 spots na fase estacionária e 25 spots no final da fermentação.

Desses 90 spots, 78 (86,66%) foram identificados com sucesso após serem submetidos a espectrometria de massas - MALDI-TOF, obtidos seus PMF e analisados pelo MASCOT e apenas 12 (13,34%) não corresponderam a proteínas com score significativo e não puderam ser identificadas.

Os spots identificados corresponderam a 39 proteínas, que puderam ser agrupadas de acordo com o National Center for Biotechnology Information (NCBI)/ clusters de grupos ortólogos (COG) em 10 categorias funcionais: transporte e metabolismo de carboidratos; transcrição; tradução, biogênese e estrutural ribossomal; modificações pós-traducionais e chaperonas; transporte e metabolismo de íons inorgânicos; transporte e metabolismo de aminoácidos; divisão celular; biogênese de membrana/parede; transporte e metabolismo de coenzimas; produção e conversão de energia.

A figura 12 mostra a representação proporcional dessa classificação, a maior parte das proteínas identificadas foram relacionadas ao transporte e metabolismo de carboidratos (36%), seguida do transporte e metabolismo de aminoácidos (20%) e tradução, biogênese e estrutura ribossomal (13%).

Figura 12 - Representação proporcional da classificação das proteínas identificadas de acordo com a categoria funcional com base no NCBI/COG



Abaixo segue as tabelas 3, 4 e 5 que listam os spots diferencialmente expressos provenientes de *Z. mobilis* ZAG-12 durante as fases exponencial, estacionária e final da fermentação nos meios de fermentação com 5 e 20% de sacarose, suas proteínas correspondentes identificadas, o microrganismo de referência, dados obtidos no programa MASCOT e o meio em que a proteína foi encontrada com aumento da expressão.

Tabela 3 - Lista de spots diferencialmente expressos em *Z. mobilis* ZAG-12 durante a fase exponencial de crescimento no meios com 5% e 20% de sacarose. M20% corresponde ao meio com 20% de sacarose e M5% ao meio com 5% de sacarose.

Número spot	Proteína	Microrganismo	Acesso	Score	Expect	pI	Mr (kDa)	Protein sequence coverage	Aumento da expressão protéica
B27	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411581	247	7e-18	5,02	49,35	43	M20%
B28	pyruvate kinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551048	80	0.34	6,26	51,52	26	M20%
B29	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551073	71	2,7	6,25	36,25	31	M20%
B30	30S ribosomal protein S2	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552052	100	0.0035	5,89	27,42	40	M20%
B31	50S ribosomal protein L9	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552123	93	0.018	4,78	22,78	51	M20%
B32	6-phosphogluconolactonase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753946	132	2.2e-06	5,18	25,54	56	M20%
B33	6-phosphogluconate dehydrogenase	Gluconobacter oxydans H24	gi 414341344	88	0.054	5,37	35,79	35	M20%
B34	pyruvate decarboxylase	Zymomonas mobilis	gi 156563549	93	0.016	5,74	61,28	35	M20%

B35	pyruvate decarboxylase	Zymomonas mobilis	gi 156563549	92	0.024	5,74	61,28	32	M20%
B36*(MIX)	phosphomannomutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411805	167	7e-10	5,64	49,84	41	M20%
B36*(MIX)	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397676758	148	5.6e-08	5,68	53,97	49	M20%
B37	aspartate 4-decarboxylase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397677284	144	1.4e-07	5,46	59,60	28	M20%
B38	arginyl-tRNA synthetase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856343	237	7e-17	5,43	63,36	42	M20%
B39	arginyl-tRNA synthetase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856343	99	0.0049	5,43	63,36	31	M20%
B40	trigger factor Tig	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397676242	186	8.8e-12	4,92	55,21	39	M20%
B41	trigger factor Tig	Zymomonas mobilis subsp. mobilis str. CP4 = NRRL B-14023	gi 560136289	194	1.4e-12	4,92	55,15	45	M20%
B42	phosphoserine phosphatase SerB	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411128	146	8.8e-08	4,88	32,26	40	M20%
B45	ketol-acid reductoisomerase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552037	142	2.2e-07	5,89	36,72	47	M20%

B46	phosphoglycerate kinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551074	151	2.8e-08	5,97	41,47	54	M20%
B47	peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753680	225	1.1e-15	5,84	96,26	37	M20%
B49	hypothetical protein ANA_C10416	Anabaena sp. 90	gi 414075712	93	0.019	4,97	22,93	51	M5%
B51	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis str. CP4 = NRRL B-14023	gi 560136030	111	0.00028	5,56	46,56	38	M5%
B52	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411581	201	2.8e-13	5,02	49,35	44	M5%
B53	ROK family protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552615	170	3.5e-10	5,79	32,93	57	M5%

Tabela 4 - Lista de spots diferencialmente expressos em *Z. mobilis* ZAG-12 durante a fase estacionária de crescimento no meios com 5% e 20% de sacarose. M20% corresponde ao meio com 20% de sacarose e M5% ao meio com 5% de sacarose.

Número do spot ^a	Proteína ^b	Microrganismo ^c	Acesso ^d	Score ^e	Expect	pI ^f	Mr (kDa) ^f	Protein sequence coverage	Aumento da expressão protéica
B54	50S ribosomal protein L9	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552123	90	0.034	4,78	22,78	51	M5%
B55	cold-shock DNA-binding domain-containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856223	143	1.8e-07	5,57	26,49	55	M5%
B56MIX	ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552806	157	7e-09	5,6	23,36	71	M5%
B56MIX	cold-shock DNA-binding domain-containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856223	79	0.4	5,57	26,49	32	M5%
B57	fructokinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397677248	111	0.00028	5,66	32,96	40	M5%
B58	glucokinase	Zymomonas mobilis subsp.	gi 56551265	157	7e-09	5,73	34,98	55	M5%

		mobilis ZM4 = ATCC 31821								
B59	30S ribosomal protein S2	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552052	125	1.1e-05	5,89	27,42	57		M5%
B60	cold-shock DNA- binding domain- containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856223	103	0.0018	5,57	26,49	45		M5%
B61	OmpA/MotB domain- containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260752248	141	2.8e-07	7,03	38,57	41		M5%
B62	class I and II aminotransferase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753133	145	1.1e-07	6,1	43,99	42		M5%
B63	hypothetical protein	zeta proteobacterium SCGC AB-137- I08	gi 517098087	100	0.0035	5,95	48,79	35		M5%
B64	phosphoglycerate kinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551074	125	1.1e-05	5,97	41,47	44		M5%
B65	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) E1 component subunit	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552502	190	3.5e-12	6,01	38,80	49		M5%

	alpha								
B66	ketol-acid reductoisomerase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552037	171	2.8e-10	5,89	36,72	54	M5%
B67	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis str. CP4 = NRRL B- 14023	gi 560136030	155	1.1e-08	5,56	46,56	36	M5%
B68	deoxyhypusine synthase-like protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551915	178	5.6e-11	5,14	39,26	50	M5%
B69	phosphoserine phosphatase SerB	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411128	160	3.5e-09	4,88	32,26	37	M5%
B70	cobalt chelatase, pCobS small subunit	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 56552440	134	1.4e-06	4,83	37,05	52	M5%
B71	3-deoxy-7- phosphoheptulonate synthase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411581	200	3.5e-13	5,02	49,35	42	M5%
B72	peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753680	225	1.1e-15	5,84	96,26	42	M5%

B73	thiamine biosynthesis protein ThiC	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411594	258	5.6e-19	5,5	67,40	47	M5%
B74	thiamine biosynthesis protein ThiC	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411594	278	5.6e-21	5,5	67,40	47	M5%
B75MIX	phosphomannomutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411805	207	7e-14	5,64	49,84	48	M5%
B75MIX	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397676758	112	0.00022	5,68	53,97	38	M5%
B76	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551263	201	2.8e-13	5,61	53,94	62	M5%
B77	pyruvate decarboxylase	Zymomonas mobilis	gi 156563549	99	0.0043	5,74	61,28	31	M5%
B78	argininosuccinate synthase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551932	155	1.1e-08	5,76	45,73	45	M5%
B79	succinic semialdehyde dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 4378160	132	2.2e-06	5,79	49,75	47	M5%

B80	elongation factor G	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260752977	224	1.4e-15	4,99	76,86	53	M5%
B81	pyruvate kinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551048	154	1.4e-08	6,26	51,52	46	M20%
B82	pyruvate kinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551048	159	4.4e-09	6,26	51,52	44	M20%
B83	glucan biosynthesis protein D	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551801	147	7e-08	6,35	58,95	37	M5%
B84	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551073	189	4.4e-12	6,25	36,25	62	M20%
B85	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397675981	259	4.4e-19	6,34	25,87	74	M20%
B86	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397675981	215	1.1e-14	6,34	25,87	67	M20%

	mutase								
B87	superoxide dismutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551956	124	1.4e-05	6,36	23,06	65	M20%
B88	superoxide dismutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551956	149	4.4e-08	6,36	23,06	63	M20%
B89	cold-shock DNA-binding domain-containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 283856223	88	0.06	5,57	26,49	41	M5%
B90	carbonate dehydratase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552029	93	0.011	5,14	23,48	55	M5%

Tabela 5 - Lista de spots diferencialmente expressos em *Z. mobilis* ZAG-12 no final da fermentação no meios com 5% e 20% de sacarose. M20% corresponde ao meio com 20% de sacarose e M5% ao meio com 5% de sacarose.

Número spot	Proteína	Microrganismo	Acesso	Score	Expect	pI	Mr (kDa)	Protein sequence coverage	Aumento da expressão protéica
B2	superoxide dismutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 56551956	131	2.8e-06	6.36	23,06	66%	M20%
B3	fructokinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397677248	89	0.041	5.66	32,96	45%	M5%
B4	glucokinase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 56551265	135	1.1e-06	5,73	34,98	51%	M5%
B5	cold-shock DNA-binding domain-containing protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 283856223	128	5.6e-06	5.57	26,49	57%	M5%
B6	ribosomal 5S rRNA E-loop binding protein Ctc/L25/TL5	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56552806	93	0.018	5,6	23,36	65%	M5%

B8	phosphopyruvate hydratase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 56552504	148	5.6e-08	4,99	45,88	42%	M20%
B11	phosphogluconate dehydratase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 11095426	90	0.034	6,56	63,17	30%	M5%
B12	peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase [	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753680	94	0.015	5,84	96,26	20	M20%
B14	ATP-dependent chaperone ClpB	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753989	132	2.2e-06	5,4	95,73	27	M20%
B17(mix)	phosphomannomutase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411805	156	8.8e-09	5,64	49,84	41	M20%
B17(MIX)	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 = ATCC 31821	gi 56551263	127	7e-06	5,61	53,94	51	M20%
B19	thiamine biosynthesis protein ThiC	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411594	191	2.8e-12	5,50	67,40	45	M5%
B20	pyruvate decarboxylase	Zymomonas mobilis	gi 156563549	71	2.7	5,74	61,28	32	M5%

B21	pyruvate decarboxylase	Zymomonas mobilis	gi 156563549	107	0.0007	5,74	61,28	34	M5%
B22	deoxyhypusine synthase-like protein	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 ATCC 31821	gi 56551915	152	2.2e-08	5,14	39,26	56	M5%
B23	carbonate dehydratase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4	gi 56552029	108	0.00056	5,14	23,48	64	M5%
B24	6-phosphogluconolactonase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis NCIMB 11163	gi 260753946	155	1.1e-08	5,18	25,54	54	M5%
B25	alcohol dehydrogenase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 29191	gi 397675985	160	3.5e-09	5,70	36,57	50	M5%
B26	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ATCC 10988	gi 384411581	209	4.4e-14	5,02	49,35	37	M5%

Durante a fase exponencial de crescimento foram expressas diferencialmente vinte proteínas, dessas quatro estavam com aumento da expressão no meio contendo 5% de sacarose. Já na fase estacionária esse número foi trinta e uma proteínas, dessas vinte e seis tiveram a expressão aumentada no meio contendo 5% de sacarose, no final da fermentação observamos o menor número de proteínas expressas diferencialmente dezoito, com doze apresentando aumento no meio com 5% de sacarose.

As proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de carboidratos foram a maioria, dentre estas podemos destacar as duas primeiras enzimas da via Entner-Doudoroff, glicoquinase e frutoquinase, que apresentaram aumento da expressão no meio com 5% de sacarose comparada com o meio de 20%. Altas concentrações de glicose podem inibir essas enzimas, favorecendo o desvio da rota de produção de etanol para a formação de outros produtos como o sorbitol (BEKERS et al., 2002).

A proteína D ligada a biossíntese de glucana exibiu um aumento da expressão na fase estacionária de crescimento no meio contendo 5% de sacarose, está envolvida na osmoregulação, formação de biofilme e resistência a antibióticos nas proteobacterias, essa proteína é sintetizada em condições hipo-osmótica e pode regular a formação de exopolissacarídeos e biofilme.

A proteína fator trigger Tig é uma chaperona que participa da síntese de novo de proteínas e pode ser um fator estimulante do crescimento celular, em *Pseudomonas* está ligada ao crescimento e adaptação a condições com metais pesados.(SANTOS et al., 2004). A maior formação de biomassa no meio com 20% de sacarose em relação ao de 5%, pode ter influência dessa proteína.

6 - CONCLUSÕES

Z. mobilis ZAG-12 alterou a sua expressão protéica e formação dos produtos, como etanol e sorbitol, em resposta a mudança de concentração de sacarose. Essa resposta foi caracterizada pela análise proteômica que detectou 39 proteínas diferencialmente expressas, a maioria relacionadas ao transporte e metabolismo de carboidratos, metabolismo de aminoácidos e tradução. Esse trabalho contribuiu para os estudos proteômicos de *Z. mobilis* que são poucos.

7 - PERSPECTIVAS

Esse estudo não conseguiu reprodutibilidade nos géis bidimensionais realizados com as células de *Z. mobilis* ZAG-12 crescidas em meio com 10% de sacarose, devido a obtenção de poucas proteínas, um próximo passo será realizar novos experimentos para obtenção desses géis.

REFERÊNCIAS

- ANANTHALAKSHMY VK, GUNASEKARAN P. 1999. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 42: 291-297.
- BARROS, M.; CELLIGOI, M. A. P. C.; VIGNOLI, J. A.; VARGAS, L. H. M. 2006. Influence of Ultrasound on Sorbitol Release by *Zymomonas mobilis* Grown on High Sucrose Concentration. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 49: 371-374.
- BARROS, M.; VIGNOLI, J. A.; SCHIABEL, V. C.; BUZATO, J. B. AND CELLIGOI, M. A. P. C. 2002. Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* em meio de sacarose pré-tratado com invertase. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológica** 23: 89-92.
- BARROW, K. D., J. G. COLLINS, *et al.* 1984. ³¹P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. **J Biol Chem** 259(9): 5711-5716.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS, A. 2002. Fructooligosaccharides and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry** 38: 701- 706.
- CABISCOL, E., J. AGUILAR, *et al.* 1994. Metal-Catalyzed Oxidation of Fe²⁺ Dehydrogenases - Consensus Target Sequence between Propanediol Oxidoreductase of *Escherichia-Coli* and Alcohol-Dehydrogenase-li of *Zymomonas-Mobilis*. **Journal of Biological Chemistry** 269(9): 6592-6597.
- CALAZANS, G. M. T., LOPES. C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. 1997. Antitumoral activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters** 19:19-21.

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

CALAZANS, G. M.T.; LIMA, R.C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **Biological Macromolecules** 27: 245-247.

CARLOS, T. F. **Produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* em mosto a base de sacarose**. 1991, 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1991.

CAZETTA, M. L., CELLIGOI, M. A. P. C., BUZATO, J. B., SCARMINO, I. S. Fermentations of molasses by *Zymomonas mobilis*: effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2824-2828, 2007.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.; SILVA, R. S. F. 2005. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry** 40:747- 751.

CONWAY, T. 1992.The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews** 9: 1–27

COTON, E. AND M. COTON, 2003. Microbiological origin of "framboise" in French ciders. **Journal of the Institute of Brewing** 109(4): 299-304.

COTON, M., J. M. LAPLACE, et al. 2005. *Zymomonas mobilis* subspecies identification by amplified ribosomal DNA restriction analysis. **Letters in Applied Microbiology** 40(2): 152-157.

DIMARCO, A. AND ROMANO, A. H. 1985. D-Glucose Transport-System of *Zymomonas-Mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology** 49(1): 151-157.

DOELLE, H. W. (1982). The Existence of 2 Separate Constitutive Enzymes for Glucose and Fructose in *Zymomonas-Mobilis*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** 15(1): 20-24

DOELLE, H. W. AND A. N. MCGREGOR, 1983. The Effect of High Ethanol and CO₂ Concentrations on the Ultrastructure of *Zymomonas-Mobilis*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology** 17(1): 44-48.

DOELLE, H. W., L. KIRK, et al. 1993. *Zymomonas mobilis* - Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology** 13(1): 57-98.

DOELLE, H.W., & GREENFIELD, P.F. (1985). The production of ethanol from sucrose using *zymomonas mobilis*. **Appl. Microbial. Biotechnol**, 22, 405-410.

ERNANDES, F.M.P.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.31, n.1, p.35-41, 2009.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. 1982. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos** 21:169-182

FEIN, J. E., B. C. ZAWADZKI, et al. 1983. Controlling Morphological Instability of *Zymomonas-Mobilis* Strains in Continuous Culture. **Applied and Environmental Microbiology** 45(6): 1899-1904.

FOWLER S., THOMASHOW M.F., Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. **Plant Cell**, 14:1675-1690, 2002.

GALANI, I.; DRAINAS, C.; TYPAS, M. A. 1985. Growth requirements and the establishment of a chemical defined minimal medium in *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters** 7: 673-678.

GARCIA-CRUZ, C. H. (1997), **Produção de polissacarídeos bacterianos**. Tese de Livre Docente, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil.

GIBBS, M., AND R. D. DEMOSS, 1951. Anaerobic dissimilation of C14-labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. **Arch. Biochem. Biophys.** 34: 478-479.

GONCALVES DE LIMA, O., I. E. SCHUMACHER, AND J. M. DE ARAUJO 1972. New observations about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev. Inst. Antibiot.** Univ. Recife 12: 57-69.

GÖRG A, WEISS W, DUNN MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**. 2004 Dec;4(12):3665-85.

HAN MJ, LEE SY, KOH ST, NOH SG, HAN WH. Biotechnological applications of microbial proteomes. **J Biotechnol**. 2010 Feb 15;145(4):341-9.

HAN X, ASLANIAN A, YATES JR 3RD. Mass spectrometry for proteomics. **Curr Opin Chem Biol**. 2008 Oct;12(5):483-90.

HEAJUNG, A.N.; SCOPES, R.K.; RODRIGUEZ, M.; KYLIE, F.K.; INGRAM, L.O. Gel Electrophoretic Analysis of *Zymomonas mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes: Identification of Alcohol Dehydrogenase II as a Stress Protein. **J. Bacteriol**. 1991, 173(19):5975.

HOFFMANN, E. D. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3. John Wiley & Sons Ltd, 2007.

KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. 1997. Influence of intraand extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the etanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters** 19: 661-664.

KESHAV, K. F., L. P. YOMANO, ET AL., 1990. "Cloning of the Zymomonas-Mobilis Structural Gene Encoding Alcohol Dehydrogenase-I (Adha) - Sequence Comparison and Expression in Escherichia-Coli." **J. of Bacteriology** 172(5): 2491-2497.

KLUYVER, A. J., AND K. VAN NIEL, 1936. Prospects for a natural system of classification of bacteria. **Zentralb. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2** 94: 369-403.

KOSAKO, Y., YABUUCHI, E., NAKA, T., FUJIWARA, N., AND KOBAYASI, K. (2000). Proposal of Sphinogomonadaceae fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov *et al.* 1994, *Porphyrobacter* Fuerst *et al.* 1993, *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov *et al.* 1997, with the type genus *Sphingomonas* Yabuuchi *et al.* 1990. **Microbiol Immunol** 44, 563-575.

KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C.B. 1991. **Sugars and Sweeteners**. Florida: CRC Press,

LAPAGE, S. P., P. H. A. SNEATH, E. F. LESSEL, V. B. D. SKERMAN, H. P. R. SEELIGER, AND W. A. CLARK, 1975. International code of nomenclature of bacteria. **American Society for Microbiology**, Washington, D. C.

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. 2007. Application of fractional factorial design to levam production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 45-51.

MICHEL, G. P. F., 1993. Cloning and Expression in *Escherichia-Coli* of the Dnak Gene of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bacteriology** 175(10): 3228-3231.

MILLIS, N. F., 1951. **Some bacterial fermentations of cider**. Bristol, UK., University of Bristol Ph. D. thesis.

OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B; SILVA, R. S. S. F. 2004. Estudo Experimental da Produção de Sorbitol por *Zymomonas mobilis* em Altas Concentrações de Sacarose. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas** 25: 197-202.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI G. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource technology** 96: 843-850.

PANDEY, A., and M. Mann.. Proteomics to study genes and genomes. **Nature** 405:837–846, 2000.

PANESAR, P. S., S. S. MARWAHA, et al., 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 81(4): 623-635.

ROCHA, T.L., Costa, P.H.A., **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Comunicado Tecnico da Embrapa. 2005

ROGERS, P. L., Y. J. JEON, et al., 2007. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 108: 263-288.

ROGERS, P.L., LEE, K.J., SKOTINICH, M.L., TRIBE, D.E., 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Adv. Biochem. Eng.** 23, 27–84.

RUANGLEK, V.; MANEEWATLHANA, D.; TRIPETCHKUL, S. 2006. Evaluation of thai agro industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry** 41: 1432-1437,

SAHM, H; BRINGER, M. S; SPRENGER, G. A. 2006. **The genus *Zymomonas***. Prokaryotes. 5, 201-221.

SANTOS PM, BENNDORF D, SÁ-CORREIA I (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. Proteomics (em impressão)

SCHMIDT, A., S. BRINGERMEYER, ET AL.1986. Effect of Alcohols and Temperature on the Hopanoid Content of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 25(1): 32-36.

SHANE, G. S.; JOACHIMSTHAL, E. L.; DUNN, N. W.; ROGERS, P. L. 2000. Isolation and preliminary characterization of a *Zymomonas mobilis* mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization. **Biotechnology Letters** 22: 157-164.

SHEEKUMAR, O.; CHAND, N.; BASAPPA, S. C. 1999. Optimization and Interaction of Media components in Ethanol production using *Zymomonas mobilis* response surface Methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 88: 334-338.

SILVEIRA, M.M.; JONAS, R. 2002. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology** 59: 400-408.

SWINGS, J. AND J. DELEY, 1977. Biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews** 41(1): 1-46.

TANAKA, H.; EBATA; T.; KUWAHARA, I.; MATSUO, M.; OGBONNA, J. C. 1999. Development and application of a system for analysis of mixed cultures of microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**.80: 51-64.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statical model for sorbitol production by free and imobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa Cylindrica*. **Process Biochemistry** 41: 240-243, 2006.

VIIKARI, L. AND M. KORHOLA (1986). "Fructose Metabolism in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 24(6): 471-476.

VIIKARI, L. AND R. GISLER (1986). By-Products in the Fermentation of Sucrose by Different *Zymomonas* Strains. **Applied Microbiology and Biotechnology** 23(3-4): 240-244.

VINHAS, G. M. , 1999. **Estudo da produção e do fracionamento de levanas produzidas por *Zymomonas mobilis***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.W.; HUMPHERYSMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WEI, W. 2001. Intergeneric protoplast fusion between *Kluveromyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to produce sorbitol from Jerusalem artichokes. **Biotechnology Letters** 23: 799-803.

WENDT, R. 2002. Estudo da Produção de Levana através de *Zymomonas mobilis*. 76p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. 1995. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome

should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews** 13: 19-50

YANG S, PAN C, TSCHAPLINSKI TJ, HURST GB, ENGLE NL, ET AL. (2013) Systems Biology Analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 Ethanol Stress Responses. **PLoS ONE** 8(7): e68886. doi:10.1371/journal.pone.0068886

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, p. 49-79, Jan 1 2009.

YOO S.H, YOON EJ, CHA J, LEE HG. 2004. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. **Biological Macromolecules** 34: 37-41.