



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE LEVEDURAS

Estudo dos mecanismos de resposta ao estresse
fermentativo em *Zymomonas mobilis*

TIAGO BENOLIEL ROCHA

Orientadora: Prof^ª Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes

Brasília, DF
2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE LEVEDURAS

Estudo dos mecanismos de resposta ao estresse
fermentativo em *Zymomonas mobilis*

TIAGO BENOLIEL ROCHA

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia e Biodiversidade.

Brasília, DF
2019

Trabalho realizado no Laboratório de Biotecnologia de Leveduras, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

Banca Examinadora:

- ✓ Prof^a Dra. Andrea Maranhão, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- ✓ Prof^a Dra. Nádia Skorupa Parachin, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- ✓ Prof^a Dra. Myrna Barbosa Gomes, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos (UNICEPLAC - DF).
- ✓ Prof. Dr. Fernando Araripe Torres, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília. (Suplente)

INDICE

LISTA DE TABELAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS.....	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Bioetanol	1
1.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	3
1.3. Metabolismo de <i>Z. mobilis</i>	5
1.4. Tolerância ao estresse fermentativo em <i>Z. mobilis</i>	9
1.5. <i>Quorum sensing</i> bacteriano e o autoindutor tipo 2 (AI-2) em <i>Z. mobilis</i>	11
1.6. A proteína ZMO0994 e o grupo das proteínas LEA.....	12
1.7. O genoma de <i>Z. mobilis</i>	14
1.8. Fatores sigma em <i>Z. mobilis</i> ZM4	16
1.9. Manipulação Genética em <i>Z. mobilis</i>	19
1.10. Aplicações Biotecnológicas para <i>Z. mobilis</i>	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos Gerais	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Linhagens Bacterianas e Plasmídeos	23
3.2. Oligonucleotídeos e genes sintetizados	25
3.3. Materiais e Soluções.....	26
3.3.1. Considerações gerais	26
3.3.2. Meios de cultura	26
3.3.4. Materiais e soluções para manipulação de DNA e RNA	31
3.3.5. Materiais e soluções para análise de proteínas.....	32
3.3.6. Soluções para cromatografia	34
3.3.7. Materiais e soluções para a síntese e análise de AI-2	35
3.4. Métodos	36
3.4.1. Método para quantificação de glicose, etanol e metabólitos	36
3.4.2. Métodos estatísticos e fórmulas para a análise dos dados de crescimento.....	36
3.4.3. Curva de crescimento em diferentes concentrações de Glicose.....	36

3.4.4. Curva de crescimento com alimentação	37
3.4.5. Ensaio de tolerância ao etanol no início da cultura	37
3.4.6. Quantificação de proteínas – Método de Bradford.....	37
3.4.7. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida – SDS PAGE	38
3.4.8. Produção e Purificação das enzimas LuxS e Psf	39
3.4.9. Síntese e Ensaio com AI-2	40
3.4.10. Ensaio de Resposta ao AI-2 por <i>Z. mobilis</i>	40
3.4.11. Ensaio de <i>Z. mobilis</i> com o sobrenadante da cultura de <i>E. coli</i> KX1123	41
3.4.12. Extração de DNA genômico de <i>Z. mobilis</i> ZM4	41
3.4.13. Extração de DNA plasmidial.....	42
3.4.14. Extração de RNA de <i>Z. mobilis</i>	42
3.4.15. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose	42
3.4.16. Quantificação de DNA e RNA.....	42
3.4.17. Digestão de DNA com enzimas de restrição.	43
3.4.18. Reações em cadeia da polimerase (PCR)	43
3.4.19. Purificação de produtos de PCR ou digestões de plasmídeos	43
3.4.20. RT-PCR em tempo real (qRT-PCR).....	43
3.4.21. Ligação de fragmentos de DNA por recombinação homóloga	44
3.4.22. Transformação de <i>E. coli</i> por choque térmico com RbCl.....	44
3.4.23. Transformação de <i>Z. mobilis</i> ZM4 por eletroporação	44
3.4.24. Análises da linhagem ZM4_Δ994.....	45
3.4.25. Análises das linhagens que expressam os fatores transcricionais sigma 24, sigma 32 e sigma 70.....	46
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Caracterização do perfil de crescimento e produção de <i>Z. mobilis</i> ZM4	49
4.2. Análises da resposta de <i>Z. mobilis</i> ao Autoindutor-2	54
4.3. Padronização de técnicas e ferramentas para a manipulação genética de <i>Z. mobilis</i>	59
4.4. Análise da relação da proteína ZMO0994 com a resposta ao estresse fermentativo em <i>Z. mobilis</i> ZM4	62
4.4.1. Deleção do locus ZMO0994 de <i>Z. mobilis</i> ZM4	62
4.4.2. Análise da linhagem ZM4_Δ994 quanto à resposta ao estresse fermentativo.	66
4.4.3. Análise da linhagem ZM4_Δ994 quanto à resposta ao estresse de Furfural.....	69
4.5. Estudo da relação dos fatores transcricionais sigma 70, sigma 32 e sigma 24 com os mecanismos de resposta ao estresse fermentativo em <i>Z. mobilis</i> ZM4.....	72

4.5.1. Construção de linhagens de <i>Z. mobilis</i> que superexpressam os fatores transcricionais sigma 24, sigma 32 e sigma 70.	72
4.5.2. Caracterização da expressão dos fatores sigma em <i>Z. mobilis</i>	76
4.5.3. Análise da resposta ao estresse fermentativo nas linhagens de <i>Z. mobilis</i> que expressam os fatores sigma.	78
5. DISCUSSÃO	89
5.1 Manipulação Genética em <i>Z. mobilis</i>	89
5.2. Resposta ao estresse fermentativo em <i>Z. mobilis</i>	91
6. CONCLUSÃO.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
8. ANEXOS.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de parâmetros fermentativos entre <i>Z. mobilis</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. cerevisiae</i>	4
Tabela 2. Linhagens de <i>Z. mobilis</i> com o genoma sequenciado	15
Tabela 3. Fatores Sigma de <i>E. coli</i> e correspondente em <i>Z. mobilis</i>	17
Tabela 4. Relação de linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.	23
Tabela 5. Relação de oligonucleotídeos utilizados.....	25
Tabela 6 Concentração de antibióticos utilizados para <i>E. coli</i> e <i>Z. mobilis</i> ZM4 ...	30
Tabela 7. Matriz de Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional	48
Tabela 8. Taxa de crescimento e rendimento fermentativo das culturas de <i>Z. mobilis</i> em diferentes concentrações iniciais de glicose.	51
Tabela 9. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p70	80
Tabela 10. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p70.....	81
Tabela 11. Acúmulo de metabólitos da linhagem ZM4_p70	81
Tabela 12. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p24.....	83
Tabela 13. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p24.....	84
Tabela 14. Acúmulo de metabólitos na linhagem ZM4_p24	84
Tabela 15. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p32.....	86
Tabela 16. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p32.....	87
Tabela 17. Acúmulo de metabólitos na linhagem ZM4_p32	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representativo da via glicolítica de Entner-Doudoroff em *Z. mobilis*.6
- Figura 2. Curva de crescimento de *Z. mobilis* ZM4 em diferentes concentrações iniciais de glicose..49
- Figura 3. Consumo de glicose por *Z. mobilis* ZM4 durante cultivo em diferentes concentrações iniciais de glicose.50
- Figura 4. Produção de etanol por *Z. mobilis* durante cultivo em diferentes concentrações iniciais de glicose..50
- Figura 5. Produção de etanol por *Z. mobilis* ZM4 em cultivo alimentado por 36h..52
- Figura 6. Curva de crescimento de *Z. mobilis* em diferentes concentrações iniciais de etanol..53
- Figura 7. Frações purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺² das proteínas LuxS (A) e Psf (B) em gel desnaturante de Poliacrilamida 12%, corado com Comassie Blue Coloidal..55
- Figura 8. Bioluminescência da bactéria *Vibrio harveyi* BB170 na presença de diferentes concentrações de AI-2.....55
- Figura 9. Produção de etanol por *Z. mobilis* em cultivo alimentado por 36h na presença de AI-2.....56
- Figura 10. Produção de etanol por *Z. mobilis* induzida com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123..57
- Figura 11. Extrato de proteínas intracelulares da linhagem ZM4 de *Z. mobilis* após 16h de cultivo e indução em gel desnaturante de Poliacrilamida 12%, corado com Comassie Blue Coloidal.57
- Figura 12. Mapa dos plasmídeos pB1_Amy e pB2_Amy, baseados nos plasmídeos pBBR1MCS e pBBR1MCS-2.....60
- Figura 13. Clones de *Z. mobilis* transformados com os plasmídeos pB1_Amy (1 e 2), pB2_Amy (3 e 4), pBBR1MCS (C1 e C2) e pBBRMCS-2 (C3 e C4) em placa com meio RM (contendo 1% de Amido) corado com vapor de Iodo após 24h de crescimento.61
- Figura 14. Análise eletroforética da extração de DNA genômico de *Z. mobilis* ZM4 e da amplificação dos fragmentos de homologia ao gene ZMO0994 por PCR.63

Figura 15. Mapa do vetor pKO0994, baseado no plasmídeo pGEM-T.....	63
Figura 16. Análise eletroforética do perfil de restrição do vetor pKO0994 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	64
Figura 17. Deleção do <i>locus</i> ZMO0994 do genoma de <i>Z. mobilis</i> ZM4.....	65
Figura 18. Curva de crescimento em condições padrões das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	66
Figura 19. Curva de crescimento em condições de estresse de temperatura das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	67
Figura 20. Curva de crescimento em condições de estresse de etanol das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	67
Figura 21. Curva de crescimento em condições de estresse osmótico das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	68
Figura 22. Tolerância ao etanol das linhagens ZM4_WT e ZM4_Δ994 de <i>Z. mobilis</i>	69
Figura 23. Curva de crescimento na presença de furfural das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	70
Figura 24. Curva de crescimento na presença de hidroximetilfurfural (HMF) das linhagens de <i>Z. mobilis</i> ZM4_WT e ZM4_Δ994.....	70
Figura 25. Análise eletroforética da amplificação da região codificadora dos genes <i>rpoD</i> , <i>rpoE</i> e <i>rpoH</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM4 por PCR.....	73
Figura 26. Mapa dos plasmídeos pB1_s70, pB1_s24 e pB1_s32, baseados no plasmídeo pBBR1MCS.....	74
Figura 27. Níveis relativos de expressão dos genes <i>rpoD</i> , <i>rpoE</i> e <i>rpoH</i> nas linhagens de <i>Z. mobilis</i>	76
Figura 28. Análise eletroforética do extrato de proteínas extracelulares (A) e intracelulares (B) de culturas das linhagens de <i>Z. mobilis</i> em gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Comassie Blue Coloidal.....	77
Figura 29. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p70 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose.....	79
Figura 30. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p70 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose.....	80

Figura 31. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p24 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose.	82
Figura 32. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p24 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose.	83
Figura 33. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p32 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose.	85
Figura 34. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p32 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose.	86

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

μF – Microfarad
μg - Micrograma
μL – Microlitro
Ω – Ohm
% - Porcentagem
ADP – Adenosina Difosfato
ADH – Álcool Desidrogenase
AI – Autoindutor
AI-1 – Autoindutor 1 (acil-homoserina lactonas)
AI-2 – Autoindutor 2 (furanosil-borato-diéster)
AI-3 – Autoindutor 3
AIP – Peptídeos Autoindutores
APS – Persulfato de amônio
ATP – Adenosina Trifosfato
cpm – Ciclos por minuto
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ECF – Fator transcricional extracitoplasmático
E.D. – Via Glicolítica de Entner-Doudoroff
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
ENO – Enolase
E.M.P. – Via Glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas
E.U.A. – Estados Unidos da América
FDP – frutose-1,6-difosfato
g – Grama
g – Força gravitacional
GAP – gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSR – Resposta geral ao estresse
GRAS – Geralmente Reconhecida como Segura (*Generally Recognized As Safe*)
h - Hora
kb – Quilo pares de bases nitrogenadas
kDa – Quilodalton
KDPG – 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
kg – Quilograma
L - Litro
LEA – Proteínas de Abundância Tardia na Embriogênese (*Late Embryogenesis Abundant*)
M – Molar
min - Minuto
mL – Mililitro
mM – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro
mV - Milivolts
NAD⁺ – Dinucleotídeo de Dicotinamida e Adenina
NADH – Dinucleotídeo de Dicotinamida e Adenina reduzido
nm – Nanômetro
OD_{600nm} – Densidade Celular medida a partir da absorbância a 600nm
ORFs – *Open Frame Reads*
pb – pares de base
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PDC – Piruvato Descarboxilase
pH – Potencial hidrogeniônico
p/v – Proporção peso por volume
qPCR – PCR quantitativo
RT-qPCR – Transcrição Reversa com PCR quantitativo
QS – Quorum sensing
rpm – rotações por minuto
RNA – Ácido Ribonucleico
rRNA – RNA ribossomal
s - Segundos
SDS – Dodecilsulfato de Sódio
TCA – Ciclo do Ácido Tricarboxílico
V – Volts
v/v – Proporção de volume por volume

RESUMO

A crescente demanda global por fontes de energia renováveis e sustentáveis tem aumentado o destaque econômico dos biocombustíveis nas últimas décadas. Entre os principais biocombustíveis produzidos industrialmente, está o etanol produzido por microrganismos. A produção de etanol a partir de biomassa vegetal é grande interesse econômico e ambiental. Neste contexto, a bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis* tem grande destaque devido à sua elevada produção de etanol e tolerância aos fatores de estresse fermentativo.

Neste trabalho, o principal objetivo foi estudar os mecanismos de tolerância ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* ZM4. Para tal, o perfil de crescimento, produção e tolerância ao etanol foi caracterizado e os métodos de manipulação genética em *Z. mobilis* foram estabelecidos, com a definição e teste de vetores de expressão, além de um sistema eficiente para a deleção gênica.

O gene correspondente à proteína ZMO0994 (LEA-like) foi deletado com sucesso do genoma de *Z. mobilis* ZM4 e a linhagem resultante demonstrou perda significativa da tolerância ao estresse osmótico induzido por glicose e aumento da tolerância ao etanol. Esse é o primeiro relato de correlação entre uma proteína LEA-like bacteriana e os mecanismos de resposta ao estresse de fermentação alcoólica.

Até o momento, não há nenhum trabalho publicado que demonstre experimentalmente o papel dos fatores sigma de *Z. mobilis* e nem a sua relação com os mecanismos de resposta ao estresse.

Desta forma, os fatores sigma 70, sigma 32 e sigma 24 foram superexpressos em *Z. mobilis* ZM4 para investigar como esses fatores transcricionais se relacionam com a resposta às diferentes condições de estresse fermentativo. A superexpressão do fator sigma 32 aumentou a velocidade de crescimento em cultivos a 39°C e com 160 g/L de glicose, além de aumentar em 10% a taxa de consumo de glicose. O efeito em relação à tolerância ao etanol foi antagônico, diminuído a tolerância. A linhagem que superexpressa o fator sigma 24 também apresentou tolerância aumentada ao choque térmico, mas a relação com os outros fatores de estresse não foi conclusiva.

Desta forma, é possível descrever o antagonismo existente entre a resposta ao estresse osmótico induzido por glicose e a resposta a elevadas concentrações de etanol, com o papel essencial desempenhado pela proteína ZMO0994 e pelo fator sigma 32. O melhor entendimento desses mecanismos contribui para o melhoramento de linhagens industriais de *Z. mobilis*, o que pode impactar diretamente a viabilidade econômica dos biocombustíveis produzidos por essa bactéria.

ABSTRACT

The growing global demand for renewable and sustainable energy sources has increased the economic prominence of biofuels in recent decades. Ethanol produced by microorganisms is among the most explored biofuels. The production of ethanol from plant biomass is of great economic and environmental interest. In this context, the Gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* is highlighted due to its high ethanol production and high tolerance to fermentative stress conditions.

In this work, the main goal was to study the mechanisms of tolerance to fermentative stress in *Z. mobilis* ZM4. To do so, the growth, production and ethanol tolerance was characterized. Genetic manipulation methods for *Z. mobilis* have also been established. Efficient expression vectors and an accurate system for genetic knockout were developed and tested.

The gene corresponding to the ZMO0994 protein (LEA-like) was successfully deleted from *Z. mobilis* ZM4 genome and the resulting strain showed significant loss of tolerance to osmotic stress induced by glucose and also showed increased tolerance to ethanol and heat. This is the first study to demonstrate a co-relation between a bacteria LEA-like protein and the mechanisms of fermentation stress response.

To date, there is no published work that demonstrate the role of *Z. mobilis* sigma factors and their relationship to stress response mechanisms. Therefore, sigma 70, sigma 32 and sigma 24 factors were overexpressed in *Z. mobilis* ZM4 to investigate how these transcriptional factors relate to the response to different fermentative stress conditions.

Overexpression of sigma 32 increased the strain growth rate at 39°C and with 160 g/L of glucose, also increasing in 10% the glucose consumption rates. The effect on ethanol tolerance was opposite, decreasing tolerance. The strain that overexpresses the sigma 24 also presented increased tolerance to heat shock, but the correlation to other stress factors was not conclusive.

Therefore, it is possible to describe the antagonism between glucose-induced osmotic stress response and the response to high ethanol concentrations in *Z. mobilis* ZM4, highlighting the essential role played by the ZMO0994 protein and the sigma 32 factor. The better understanding of these mechanisms contributes to the improvement of industrial strains of *Z. mobilis*, which may directly impact the economic viability of the biofuels produced by this bacterium.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioetanol

O mercado global de energia ainda é dependente de combustíveis fósseis derivados do petróleo, cuja queima sem controle é responsável diretamente pela poluição atmosférica e distúrbios climáticos (LELIEVELD et al., 2015; SOMMER, 2016). Neste cenário, a demanda por combustíveis renováveis e ambientalmente sustentáveis tem aumentado em diversos países do mundo, sendo os biocombustíveis produzidos por microrganismos uma opção de destaque no cenário econômico e tecnológico das últimas décadas (DEMIR; GOZGOR, 2018; FARRELL et al., 2006; LANZAFAME et al., 2017; LU, 2017).

Entre os biocombustíveis mais comuns estão os álcoois de cadeia curta como metanol, etanol, butanol e isopentanol produzidos a partir de carboidratos, e os ésteres de cadeia longa que compõem o biodiesel produzido por transesterificação de óleos e gorduras biológicas. Embora a quantidade de biocombustíveis que poderiam substituir a gasolina seja grande, apenas o etanol e biodiesel tiveram o seu uso difundido (WESTBROOK, 2013). Dentre os combustíveis líquidos, o etanol apresenta ótimo desempenho em motores do Ciclo de Otto, possuindo octanagem superior à gasolina, menor pressão de vapor e conseqüentemente menos emissões gasosas, além de ser menos inflamável, o que reduz o impacto das explosões no motor (GOLDEMBERG, 2008; WESTBROOK, 2013).

A produção mundial de etanol dobrou entre 2007 e 2017, principalmente devido ao aumento na produtividade de milho (E.U.A.) e de cana-de-açúcar (Brasil) e na eficiência dos processos de conversão de biomassa em etanol (MEKONNEN et al., 2018; RFA, 2017). No Brasil, o processo de fermentação para produção de etanol é feito em grandes dornas não-estéreis segundo adaptações do processo de Melle-Boinot, que utiliza altas densidades celulares em batelada alimentada semi-contínua para fermentar caldos com altas concentrações de açúcar, produzindo altas concentrações de etanol com rendimentos de 90-92% do máximo teórico. Outra peculiaridade do processo utilizado no país é a reciclagem das leveduras por meio de um processo de centrifugação e lavagem em ácido sulfúrico diluído (para reduzir a contaminação bacteriana), onde mais de 90% das células

INTRODUÇÃO

são reutilizadas nas fermentações subsequentes durante os 200-250 dias da estação de colheita. Este procedimento resulta em elevadas densidades celulares no fermentador (8-17% v/v), contribuindo para os curtos tempos de fermentação (6-10 horas) (AMORIM et al., 2011; BASSO et al., 2008; WHEALS et al., 1999).

Atualmente, o principal organismo escolhido pela indústria para a fermentação alcoólica é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta alta eficiência e resistência às condições de fermentação industrial (GONÇALVES; DOS SANTOS; DE MACEDO, 2015; KITICHANTAROPAS et al., 2016). Outro organismo que tem destaque no cenário global de produção de etanol é a bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis*, que também compartilha de diversas características importantes para a fermentação industrial, como a elevada resistência a condições de estresse fermentativo e a produtividade de etanol superior a *S. cerevisiae*, consequência da baixa produção de biomassa e elevado consumo de glicose (ROGERS et al., 2007; ZABED et al., 2014).

INTRODUÇÃO

1.2. *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis é uma bactéria Gram-negativa que naturalmente utiliza apenas algumas hexoses como fontes de carbono e produz quantidades equimolares de dióxido de carbono e etanol (SWINGS; DE LEY, 1977). É uma bactéria ubíqua, sendo isolada do solo de diversas partes do mundo, além de ser encontrada em vários produtos, como cidras e cervejas europeias (COTON et al., 2006; DADDS; MARTIN, 1973; MILLIS, 1956), fermentados de agave no México (GONCALVES DE LIMA; LARIOS; AZEARATE, 1951; LINDNER, 1928), fermentados de seiva de palmeiras na África e na Ásia (FAPARUSI, 1974; OKAFOR, 1975) e fermentado de cana-de-açúcar no Brasil (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970).

O primeiro isolamento e estudo de bactérias do gênero *Zymomonas* ocorreu em cidras contaminadas em 1912 (BARKER; HILLIER, 1912), mas os autores não deram uma nomenclatura científica às bactérias encontradas, então o primeiro estudo que classificou esses organismos foi proposto por Lindner (1928). Após cinco mudanças consecutivas de classificação, o gênero *Zymomonas* foi definido como uma alfa-proteobactéria com flagelos polares e capacidade de realizar fermentação alcoólica (KLUYVER; NIEL, 1936).

Após várias décadas de reclassificação de diferentes subespécies e linhagens, a espécie *Z. mobilis* é considerada, atualmente, a única espécie descrita para o gênero *Zymomonas*. Três subespécies são conhecidas: *Z. mobilis* subsp *mobilis*, que é um agente fermentador natural de vários substratos, como agave e cana-de-açúcar; *Z. mobilis* subsp *pomaceae*, que é encontrada como contaminante em cerveja e cidra inglesa; e *Z. mobilis* subsp *francensis*, caracterizada em 2006 como um contaminante de cidra francesa (COTON et al., 2006; DE LEY; SWINGS, 1976; SNEATH; MCGOWAN; SKERMAN, 1980).

A subespécie *Z. mobilis* subsp *mobilis* é tradicionalmente a mais utilizada em estudos fermentativos e aplicações biotecnológicas. Este grupo apresenta dezenas de linhagens isoladas (CHEN et al., 2018; COTON et al., 2006; DE ARAÚJO et al., 2018; SILVA et al., 2015), sendo a *Z. mobilis* ZM4 (ATCC 31821) a linhagem modelo e a primeira a ter o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) reconhecido e o genoma sequenciado (SEO et al., 2005).

INTRODUÇÃO

A linhagem ZM4 é derivada da linhagem CP4, que foi isolada originalmente em fermentados de cana-de-açúcar em Recife, Brasil (GONÇALVES DE LIMA et al., 1970; SWINGS; DE LEY, 1977). Apesar de diversos trabalhos considerarem que ambas são a mesma linhagem, alguns estudos demonstram diferenças genotípicas e fenotípicas entre estas (KOUVELIS et al., 2014; ZOU et al., 2011).

Entre as características que tornaram *Z. mobilis* ZM4 a linhagem modelo do gênero, destacam-se a elevada produção de etanol (próximo ao limite teórico), resistência a temperaturas superiores à 40°C (a temperatura ótima está entre 30°C e 32°C), capacidade de utilizar sacarose como substrato, rápido crescimento em altas concentrações de açúcares e crescimento em faixa de pH de 3,5 a 7,5 (JÖBSES et al., 1986; LAUDRIN-SEILLER et al., 1984; ROGERS et al., 2007; ROGERS; LEE; TRIBE, 1979; SKOTNICKI et al., 1981). Todas essas características contribuem para o potencial biotecnológico que *Z. mobilis* apresenta (Tabela 1), não apenas para a produção primária de etanol, mas também para a produção de outros metabólitos, como levana, sorbitol e ácido glicônico (JOHNS; GREENFIELD; DOELLE, 1991), e ainda para a indústria de conversão de biomassa de lignocelulose (HE et al., 2014).

Tabela 1. Comparação de parâmetros fermentativos entre *Z. mobilis*, *E. coli* e *S. cerevisiae*.

Parâmetro	<i>Z. mobilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Metabolismo Energético	ED ^a	EMP ^a e TCA ^a	EMP ^a e TCA ^a
Rendimento teórico de Etanol	98%	88% ^b	90-93%
Tolerância ao Etanol (v/v)	16%	6%	15%
Faixa de pH	3,5-7,5	4,0-8,0	2,0-6,5
Utilização de N ₂	Sim	Não	Não
Status GRAS	Sim	Não	Sim

a. ED – Via glicolítica de Entner-Doudoroff; EMP – Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas; TCA – Ciclo do ácido tricarboxílico. b. Rendimento na linhagem recombinante *E. coli* pLPA102. (OHTA et al., 1991; PANESAR; MARWAHA; KENNEDY, 2006; TAN et al., 2017; WANG et al., 2018)

INTRODUÇÃO

1.3. Metabolismo de *Z. mobilis*

A bactéria *Z. mobilis* ficou conhecida nos anos 1950s devido à descoberta que esta apresentava a via Entner-Doudoroff (ED) para utilização anaeróbia de glicose e produção de etanol (DEMOSS; GIBBS, 1951; ENTNER; DOUDOROFF, 1952). Isso chamou a atenção na época, pois, como nesta via há apenas o saldo de uma molécula de ATP para cada molécula de glicose utilizada, ela normalmente era encontrada em organismos estritamente aeróbios. Em estudos posteriores, foi identificado que a via ED pode apresentar algumas variações e que é amplamente distribuída entre bactérias Gram-negativas, além de ser encontrada em algumas bactérias Gram-positivas, arqueas e até em alguns eucariotos (AHMED et al., 2004, 2005; BUDGEN; DANSON, 1986; CONWAY, 1992; GARRITY; BELL; LILBURN, 2005; KERSTERS; DE LEY, 1968; ROMANO; CONWAY, 1996; SUTTER et al., 2016).

Em *Z. mobilis*, a via ED é detalhadamente descrita (BARROW et al., 1984; DE GRAAF et al., 1999; KALNENIEKS et al., 2014; OSMAN et al., 1987) e todas as enzimas já foram purificadas e caracterizadas cineticamente (PAWLUK; SCOPES; GRIFFITHS-SMITH, 1986; SCOPES, 1983, 1984; SCOPES et al., 1985; SCOPES; GRIFFITHS-SMITH, 1984; ZACHARIOU; SCOPES, 1985). O ponto chave de diferença entre essa via metabólica e a via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) está no intermediário de 6 carbonos utilizado para a clivagem por aldolases. A via EMP utiliza a clivagem de frutose-1,6-difosfato (FDP) pela enzima FDP aldolase para formar uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e outra molécula de dihidroxicetona-fosfato. Enquanto a via ED utiliza a clivagem de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG) pela enzima KDPG aldolase para formar uma molécula de GAP e outra molécula de piruvato (Figura 1). Desta forma, apenas uma molécula de GAP continua o caminho glicolítico até outro piruvato, diminuindo o saldo final de ATP de dois (na via EMP) para um (na via ED) (CONWAY, 1992; RUTKIS et al., 2013).

INTRODUÇÃO

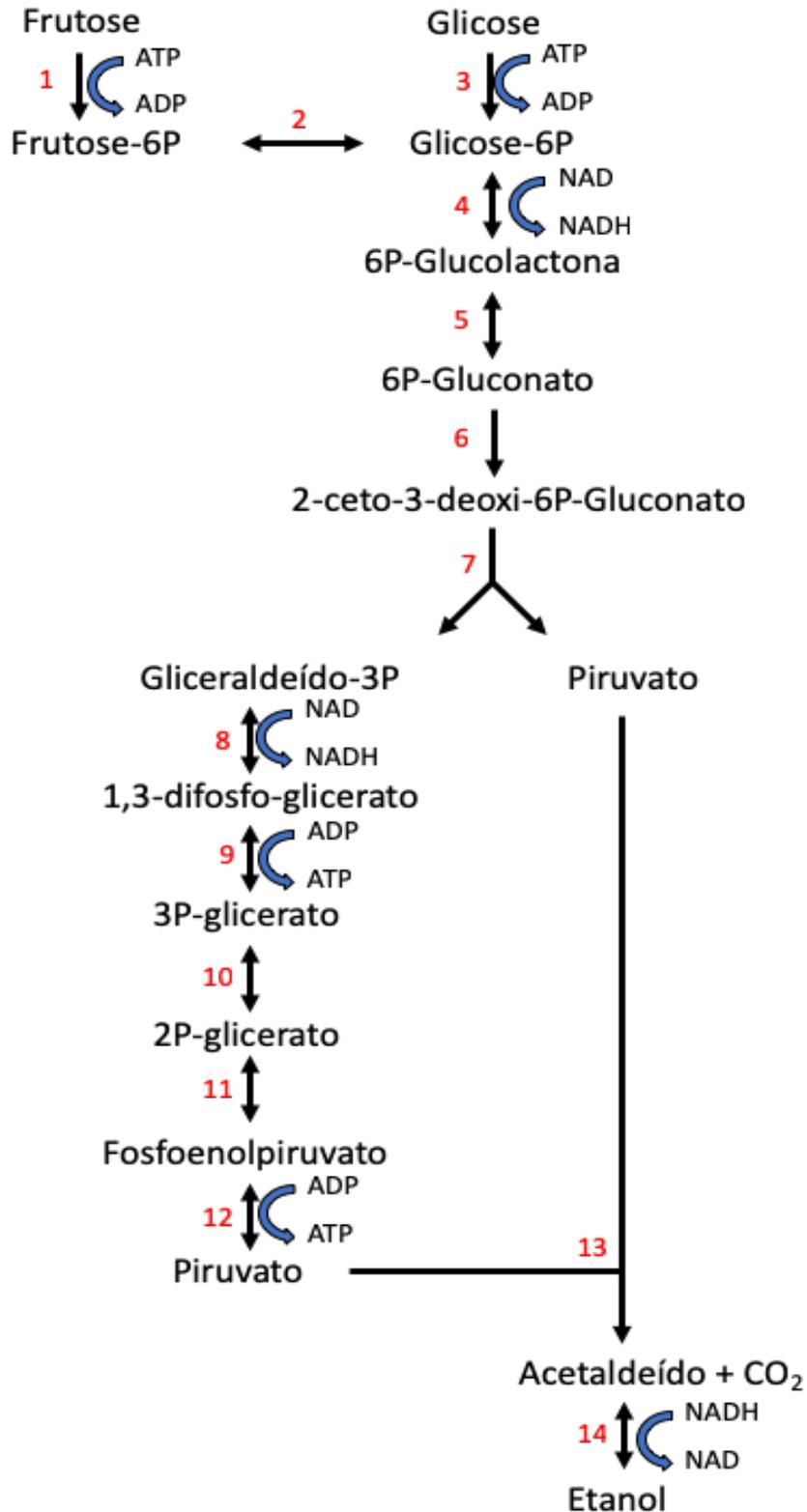


Figura 1. Esquema representativo da via glicolítica de Entner-Doudoroff em *Z. mobilis*. Os números em vermelho indicam as enzimas responsáveis pelas reações químicas. 1. Hexoquinase; 2. Fosfoglicose isomerase; 3. Glicoquinase; 4. Glicose-6P desidrogenase; 5. 6-Fosfoglucono-lactonase; 6. 6-fosfogluconato desidratase; 7. 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolase; 8. Gliceraldeído-3P desidrogenase; 9. 3-fosfoglicerato quinase; 10. Fosfoglicerato mutase; 11. Enolase; 12. Piruvato quinase; 13. Piruvato descarboxilase; 14. Álcool desidrogenase.

INTRODUÇÃO

Além da via glicolítica de ED, *Z. mobilis* possui uma versão reduzida do ciclo do ácido tricarboxílico. Diversas enzimas do ciclo estão ausentes em ensaios de atividade (BRINGER-MEYER; SAHM, 1989; DAWES; LARGE, 1970) e as sequências dos genes do complexo da α -cetoglutarato desidrogenase e da malato desidrogenase não foram encontradas no genoma (SEO et al., 2005). Aparentemente, esse ciclo metabólico é responsável apenas pela produção e reciclagem de metabólitos para biossíntese de moléculas em *Z. mobilis* (KALNENIEKS, 2006; SOOTSUWAN et al., 2008).

Outra peculiaridade metabólica em *Z. mobilis*, é o elevado uso de ATP em reações desacopladas do crescimento celular, o que leva a uma alta taxa de consumo de glicose (JONES; DOELLE, 1991; SPRENGER, 1996). Esse fenômeno está principalmente associado ao uso de bombas de H^+ dependentes de ATP (ATPases) para manter o pH intracelular equilibrado, levando a uma baixa eficiência energética. Desta forma, *Z. mobilis* chega a converter até 98% da glicose consumida em etanol e dióxido de carbono, e apenas 2% em biomassa (KALNENIEKS, 2006; MOTAMEDIAN; SAEIDI; SHOJAOSADATI, 2016; RUTKIS et al., 2014). Esse fato é o principal motivo que levou *Z. mobilis* a ser considerada uma bactéria de grande interesse biotecnológico e industrial.

Para produzir etanol, *Z. mobilis* utiliza duas enzimas para a conversão do piruvato obtido pela via glicolítica de ED, piruvato descarboxilase (PDC), que converte piruvato em acetaldeído e CO_2 , e álcool desidrogenase (ADH), que converte acetaldeído em etanol (Figura 1). Em diversas condições de cultivo, PDC é a proteína com maior nível de expressão em *Z. mobilis*, chegando a representar até 5% do total de proteínas do extrato intracelular (ALGAR; SCOPES, 1985; CONWAY et al., 1987; DAWES; RIBBONS; LARGE, 1966; DIEFENBACH; DUGGLEBY, 1991; RUTKIS et al., 2013). A PDC de *Z. mobilis* já foi produzida funcionalmente de forma heteróloga em diversos organismos, como em outras bactérias (BALAGURUNATHAN; TAN; ZHAO, 2018; LEE et al., 2014), em arquea (KACZOWKA et al., 2005) e em planta (BUCHER; BRÄNDLE; KUHLEMEIER, 1994)

Embora a utilização industrial de *Z. mobilis* seja promissora, ainda é restrita por conta da pequena diversidade de substratos que é capaz de utilizar. Basicamente, as linhagens selvagens utilizam apenas glicose, frutose e sacarose, e existem linhagens recombinantes capazes de consumir pentoses como xilose (ZHANG et al., 1995) e arabinose (DEANDA et al., 1996), e outras capazes de fermentar substratos complexos como madeira (YANASE et al., 2012) e lignocelulose (CHEN et al., 2009).

INTRODUÇÃO

A perspectiva de produção de etanol a partir de lignocelulose é de grande interesse econômico e ambiental, e *Z. mobilis* está entre os mais prováveis candidatos para uma solução economicamente viável, considerando que apresenta elevada resistência às condições e substâncias encontradas no hidrolisado de lignocelulose, como ácido acético, furfural e hidroximetil-furfural (GU; ZHANG; BAO, 2015; LIU et al., 2017; TODHANAKASEM et al., 2018; YI et al., 2015).

INTRODUÇÃO

1.4. Tolerância ao estresse fermentativo em *Z. mobilis*

As condições ambientais para a produção industrial de etanol variam muito durante o processo fermentativo. Pode ocorrer acidificação do meio de cultura, elevação da temperatura acima da ótima, elevada pressão osmótica e o acúmulo de produtos tóxicos para a célula, como o próprio etanol. Desta forma, a tolerância das células a essas condições é essencial para a produtividade e viabilidade econômica do processo (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; ATTFIELD, 1997; IVORRA; PÉREZ-ORTÍN; DEL OLMO, 1999).

A linhagem *Z. mobilis* ZM4 é considerada a linhagem selvagem mais robusta e produtiva nas condições de cultivo industrial, mas outras linhagens podem ser mais tolerantes a condições específicas de estresse (ROGERS et al., 2007). A linhagem TISTR 405 foi isolada na Tailândia e apresenta maior produção de etanol a 40°C do que a linhagem ZM4, mas é menos eficiente na utilização de sacarose e pouco tolerante à acidificação do meio (PORNTHAP et al., 2011; SOOTSUWAN et al., 2007). A linhagem TISTR 548 é outro isolado tailandês mais termotolerante do que a ZM4 e tem sido usado como um modelo de estudo para os mecanismos de choque térmico em *Z. mobilis* (CHAROENSUK et al., 2017).

Além das linhagens selvagens, existem algumas linhagens recombinantes que apresentam maior resistência às condições de estresse fermentativo. Com o uso de mutagêneses por transposon, a linhagem ZMT2 foi selecionada por apresentar melhor produção de etanol do que a linhagem ZM4 em meio contendo 20 g/L de cloreto de sódio (WANG et al., 2016b). Com o uso de outros métodos mutagênicos, também já foram desenvolvidas linhagens mais tolerantes a ácido acético e baixo pH (SHUI et al., 2015; WU et al., 2019), a altas concentrações de furfural (HUANG et al., 2018; TAN et al., 2015) e até mais tolerantes a etanol (TAN et al., 2016).

Embora diversos métodos já tenham sido utilizados para desenvolver linhagens industriais mais robustas de *Z. mobilis*, estes se baseiam em abordagens de mutagênese aleatória e geralmente pouco efetiva. Como o conhecimento sobre a regulação molecular dos mecanismos de resposta ao estresse em *Z. mobilis* é limitado e esse tipo de fenótipo é muito complexo, o uso de engenharia metabólica direcionada para o aumento de tolerância e produtividade ainda é restrito, mas promissor (WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

INTRODUÇÃO

Algumas abordagens transcriptômicas e proteômicas têm sido utilizadas para a caracterização da resposta de *Z. mobilis* a substâncias de estresse como acetato, furfural e etanol (HE et al., 2012a; YANG et al., 2013, 2014), além de condições de estresse osmótico (ZHANG et al., 2015) e térmico (CHAROENSUK et al., 2017), mas apesar do volume de dados adquiridos, ainda não há nenhum modelo proposto que descreva os mecanismos de adaptação a essas condições.

No trabalho de doutorado de Yang, (2011), foi observado que uma cultura de *Z. mobilis* ZM4 quando é estimulada com a molécula de *quorum sensing* bacteriano Autoindutor-2 (AI-2), produzido pela linhagem de *E. coli* KX1123 (XAVIER; BASSLER, 2005), aumentou a produção e a tolerância ao etanol, além de alterar o perfil de produção de proteínas produzidas pela célula. No entanto, os mecanismos e até a comprovação desse fenômeno ainda exigem mais estudos.

INTRODUÇÃO

1.5. *Quorum sensing* bacteriano e o autoindutor tipo 2 (AI-2) em *Z. mobilis*

Quorum sensing (QS) é um processo de comunicação química que as bactérias usam para perceber a densidade celular e coordenar o comportamento coletivo de uma comunidade (ATKINSON; WILLIAMS, 2009; SAFARI et al., 2014). Essa comunicação é mediada por moléculas chamadas de autoindutores (AI). Existem quatro modelos diferentes para os autoindutores: o grupo das acil-homoserina lactonas (AI-1), comum na comunicação intraespecífica de bactérias Gram-negativa (MILLER; BASSLER, 2001); um conjunto de substâncias interconvertíveis da classe do furanosil-borato-diéster (AI-2), que está associado à comunicação interespecífica tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (PAPPAS; WEINGART; WINANS, 2004); um possível sistema AI-3 que ainda não possui estrutura conhecida (SPERANDIO et al., 2003); e peptídeos (AIP) que são geralmente encontrados em bactérias Gram-positivas para a comunicação intraespecífica (MILLER; BASSLER, 2001).

No trabalho de Yang, (2011), foi descoberto que uma cultura de *Z. mobilis* quando é estimulada com o AI-2 (XAVIER; BASSLER, 2005), muda o perfil de proteínas produzidas em comparação com uma cultura controle. Duas proteínas citoplasmáticas que estavam superexpressas na presença de AI-2 foram identificadas por espectrometria de massa como piruvato descarboxilase (ZMO1360) e enolase (ZMO1608), o que corroborava a hipótese de aumento da via de *Entner-Doudoroff* e conseqüentemente do aumento na produção de etanol.

Outra proteína que foi identificada no sobrenadante da cultura de *Z. mobilis* com o estímulo do AI-2 é a proteína ZMO0994, até então somente prevista no genoma e que tem homologia ao grupo de proteínas LEA – abundância tardia na embriogênese (GOYAL; WALTON; TUNNACLIFFE, 2005). Em um trabalho ainda não publicado, a expressão dessa proteína em *E. coli* aumentou a tolerância da cultura a estresses ambientais, como temperatura e etanol, o que levou a hipótese de que o suposto aumento na tolerância ao etanol de *Z. mobilis* ZM4 na presença de AI-2 é uma conseqüência da expressão dessa proteína. Um efeito similar foi relatado para uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* quando exposta a moléculas de *quorum sensing* do tipo AI-1 (REN et al., 2016).

INTRODUÇÃO

1.6. A proteína ZMO0994 e o grupo das proteínas LEA

A proteína ZMO0994 de *Z. mobilis* ZM4 é uma pequena proteína hipotética com 172 aminoácidos. A região codificadora foi identificada na anotação do genoma (SEO et al., 2005), mas nenhum trabalho publicado até o momento, além da tese de Yang (2011), divulgou a detecção efetiva dessa proteína. Nos transcriptomas comparativos disponíveis, a única menção de alteração nos níveis do mRNA desse gene ocorreu quando *Z. mobilis* foi exposta à elevadas concentrações de glicose (HE et al., 2012a, 2012b; YANG et al., 2009a, 2013; YI et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

A análise de motivos revela que a proteína ZMO0994 apresenta similaridade ao grupo de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), que foram caracterizadas como um grupo heterogêneo de proteínas que se acumulam em elevados níveis na fase tardia da embriogênese vegetal, momento em que as sementes perdem quase todo o seu conteúdo de água (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001). De fato, vários estudos demonstram que essas proteínas se acumulam em diversos tecidos vegetais em resposta a falta de água, estresse osmótico e baixas temperaturas (BATTAGLIA et al., 2008; HINCHA; THALHAMMER, 2012; INGRAM; BARTELS, 1996).

Apesar do nome atribuído a esse grupo de proteínas, elas não são exclusivas de plantas. Uma grande variedade de proteínas “tipo-LEA” são encontradas em outros grupos de seres vivos (HAND et al., 2011), como bactérias (STACY; AALEN, 1998), leveduras (MTWISHA et al., 1998), artrópodes (HAND et al., 2007; KIKAWADA et al., 2006), nematoides (BROWNE; TUNNAcliffe; BURNELL, 2002) e humanos (HALL; OWENS; SINGH, 2011). Sete grupos de proteínas LEA são descritos baseados na similaridade das sequências de aminoácidos, sendo geralmente muito hidrofílicas e com ausência ou baixa presença de cisteína e triptofano (DURE, 1993; GARAY-ARROYO et al., 2000).

As proteínas LEA foram descritas pela primeira vez há 38 anos (DURE; GALAU, 1981), mas o seu funcionamento ainda não é totalmente compreendido. Sabe-se que a superexpressão de proteínas LEA levou ao aumento da resistência ao estresse hídrico e ao frio em plantas (OLVERA-CARRILLO et al., 2010; PUHAKAINEN et al., 2004; XU et al., 1996), e que a expressão heteróloga de proteínas LEA de plantas em bactéria e levedura levou ao aumento da tolerância ao estresse osmótico induzido por sais e ao estresse de congelamento (IMAI et al., 1996; LIU; ZHENG, 2005).

INTRODUÇÃO

Em *Z. mobilis*, a proteína ZMO0994 apresenta quatro repetições do motivo de 11 aminoácidos que caracterizam o grupo de proteínas LEA do tipo 3 (DURE, 1993). Em plantas é demonstrado que esse grupo de proteínas LEA pode conferir proteção ao sítio catalítico de algumas enzimas em condições de falta de água e em baixas temperaturas (FURUKI; SAKURAI, 2016; LIU et al., 2016), mas até o momento, nenhum estudo já foi publicado sobre o papel que apresentam as proteínas tipo-LEA nativas de bactérias.

INTRODUÇÃO

1.7. O genoma de *Z. mobilis*

O primeiro genoma sequenciado de *Z. mobilis* foi publicado em 2005 para a linhagem ZM4 (SEO et al., 2005) e, até o momento, mais oito outras linhagens tiveram o genoma sequenciado, tornando possível a comparação intraespecífica (Tabela 2). O pan-genoma de *Z. mobilis*, que representa a somatória dos genes encontrados nas diferentes linhagens de uma espécie, apresenta 1945 ORFs (*Open Frame Reads*), sendo 1428 genes essenciais, 507 genes acessórios e 10 genes únicos em alguma linhagem. Os genes essenciais estão relacionados ao metabolismo de carboidratos, replicação, transcrição e tradução e são muito conservados entre as diferentes linhagens (CHEN et al., 2018).

A anotação do genoma de *Z. mobilis* ZM4 foi atualizada em 2009 e novamente em 2018 (YANG et al., 2009b, 2018). Este é composto por um único cromossomo circular e quatro plasmídeos, com tamanho total de aproximadamente 2,06 Mpb, sendo encontrados 1819 genes, além de 3 regiões para a transcrição de RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) e 51 regiões codificadoras de RNA transportador (SEO et al., 2005; YANG et al., 2009b). Os plasmídeos só foram corretamente descritos na última atualização devido a erros de classificação das linhagens ZM4 e CP4, pois até então, era considerado que os cinco plasmídeos da linhagem CP4 fossem os mesmos da linhagem ZM4. Desta forma, os quatro plasmídeos de ZM4 apresentam entre 32 e 40 kpb cada, totalizando aproximadamente 141,6 kpb, com um total de 150 ORFs previstos. Todos os plasmídeos apresentam baixo número de cópias (entre uma e duas cópias por célula), mas podem variar a quantidade de acordo com as condições de cultivo e devido à presença de genes heterólogos (YANG et al., 2018).

A análise do genoma de *Z. mobilis* revela diferenças estruturais quando comparado com outras bactérias Gram-negativas, mas os mecanismos celulares básicos de transcrição e tradução são aparentemente conservados. Uma peculiaridade observada, é a ausência do gene da subunidade sigma 38 da RNA polimerase na anotação do genoma, isso chama a atenção para a regulação transcricional dos mecanismos de resposta ao estresse fermentativo, considerando que geralmente esse é o fator sigma responsável.

INTRODUÇÃO

Tabela 2. Linhagens de *Z. mobilis* com o genoma sequenciado

Linhagem	Tamanho (Mb)	GC%	Genes	Plasmídeos	Nº de acesso no NCBI	Origem	Referência
ZM4	2,06	46,3	1819	4	NC_006526.2	Brasil	(YANG et al., 2009b)
CP4	2,00	46,2	1860	5	CP006818.1	Brasil	(KOUVELI S et al., 2014)
NRRL B-14023	2,01	46,2	1776	5	NZ_CP003715.1	China	(CHEN et al., 2018)
NRRL B-12526	2,01	46,2	1776	4	NZ_CP003709.1	China	(CHEN et al., 2018)
ATCC 29192	1,99	44,1	1761	2	NC_015709.1	Reino Unido	(KOUVELI S et al., 2011)
NCIMB 11163	2,12	46,8	1879	3	NC_013355.1	Reino Unido	(KOUVELI S et al., 2009)
ATCC 10988	2,02	46,2	1815	6	NC_017262.1	México	(PAPPAS et al., 2011)
ATCC 29191	1,96	46,2	1787	3	NC_018145.1	Congo	(DESINIOTIS et al., 2012)
NRRL B-1960	2,05	46,1	1804	2	CP021053.1	Reino Unido	(CHACON-VARGAS et al., 2017)

INTRODUÇÃO

1.8. Fatores sigma em *Z. mobilis* ZM4

Em bactérias, os fatores sigma são subunidades da RNA polimerase responsáveis pelo reconhecimento da região promotora e o recrutamento do núcleo da RNA polimerase para o início da transcrição. Existem diferentes fatores sigma em uma bactéria, sendo cada sigma alternativo responsável por mudanças no perfil transcricional da célula em resposta a condições ambientais (COOK; USSERY, 2013).

Em *E. coli*, sete diferentes fatores sigma são conhecidos (tabela 3): sigma 70 (*rpoD*) é tradicionalmente o fator sigma utilizado para a transcrição de genes basais durante o crescimento vegetativo da bactéria (BURTON et al., 1981); sigma 38 (*rpoS*) é altamente expresso durante a fase estacionária e é considerado o regulador central da resposta aos estresses gerais (WEBER et al., 2005); sigma 54 (*rpoN*) é responsável pela transcrição de genes associados ao metabolismo de nitrogênio (ZHAO; LIU; BURGESS, 2010); sigma 28 (*fliA*) atua nos genes relacionados à biossíntese de flagelos (HEUNER; HACKER; BRAND, 1997); sigma 19 (*fecI*) não é encontrado em todas as linhagens de *E. coli* e está associado ao transporte de citrato férrico (COOK; USSERY, 2013); e os fatores sigma 24 (*rpoE*) e sigma 32 (*rpoH*) são responsáveis pelos mecanismos de resposta a choque térmico (KOO et al., 2009; RAINA; MISSIAKAS; GEORGOPOULOS, 1995; YURA, 1996).

A anotação do genoma de *Z. mobilis* ZM4 apresenta apenas cinco fatores sigma previstos (tabela 3): sigma 70 (ZMO1623), sigma 54 (ZMO0274), sigma 32 (ZMO0749), sigma 28 (ZMO0626) e sigma 24 (ZMO1404) (SEO et al., 2005; YANG et al., 2009b).

O fator sigma 70 é o mais estudado na maioria das bactérias e é o único fator sigma que já foi testado experimentalmente em *Z. mobilis* (TAN et al., 2016, 2015), mas o mecanismo completo de ativação da transcrição e as sequências de reconhecimento dos promotores ainda não são totalmente descritas para muitas bactérias, inclusive *Z. mobilis* (HE et al., 2018; PAGET; HELMANN, 2003).

INTRODUÇÃO

Tabela 3. Fatores Sigma de *E. coli* e correspondente em *Z. mobilis*

Fator Sigma	Gene	Função Principal	Equivalente em <i>Z. mobilis</i> ^a	Similaridade ^b
Sigma 70	<i>rpoD</i>	Metabolismo Basal	ZMO1623	63%
Sigma 54	<i>rpoN</i>	Metabolismo de Nitrogênio	ZMO0274	55%
Sigma 38	<i>rpoS</i>	Fase Estacionária (Estresse)	-	-
Sigma 32	<i>rpoH</i>	Choque Térmico (citoplasma)	ZMO0749	61%
Sigma 28	<i>fliA</i>	Biossíntese do Flagelo	ZMO0626	58%
Sigma 24	<i>rpoE</i>	Choque Térmico (periplasma)	ZMO1404	49%
Sigma 19	<i>fecI</i>	Transporte de Citrato Férrico	-	-

^aPreditas na anotação do genoma (COOK; USSERY, 2013; SEO et al., 2005; YANG et al., 2009b). ^bNível de similaridade baseado no alinhamento das sequências de aminoácidos (ALTSCHUL et al., 1990).

A ausência do fator sigma 38 em uma bactéria que apresenta elevada resistência a estresses ambientais e em que a concentração de etanol se torna muito elevada exatamente na fase estacionária, chama a atenção (SEO et al., 2005). Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos para tentar elucidar os mecanismos moleculares de tolerância ao etanol em *Z. mobilis*, e até o momento, nenhum substituto plausível para o fator sigma 38 foi encontrado (HE et al., 2012b; TAN et al., 2016; YANG et al., 2013, 2014). No trabalho de He *et al.* (2012), foi observado que a presença de etanol no meio de cultura induz a expressão diferencial de todos os fatores sigma, exceto o sigma 32, e que a maior diferença de expressão é no fator sigma 24, o que levou à hipótese de que sigma 24 sobrepõe as funções de resposta ao choque térmico e ao estresse de etanol.

O fator sigma 24 é um fator transcricional extracitoplasmático (ECF) e está diretamente associado à integridade do envelope celular. Este é responsável pelo controle da composição e do dobramento de proteínas do periplasma e das membranas da célula, podendo ser induzido por calor, etanol e estresse osmótico em outras bactérias (ADES, 2008; BIANCHI; BANEYX, 1999; ERICKSON; GROSS, 1989; GOPALKRISHNAN; NICOLOFF; ADES, 2014; RAINA; MISSIAKAS; GEORGOPOULOS, 1995). Em alfaproteobactérias, o fator sigma de resposta geral ao estresse (GSR) é frequentemente reportado como uma proteína ECF (STARÓN et al., 2009). O fator sigma 24 de *Z. mobilis* ZM4 é homólogo ao fator sigma GSR de outras alfaproteobactérias, como *Sphingomanas sp.* (KACZMARCZYK et al., 2011), mas não pertence a nenhum subtipo de ECF já caracterizado.

INTRODUÇÃO

Em relação ao choque osmótico, o fator sigma 32 é o único a apresentar aumento transcricional quando *Z. mobilis* é cultivada na presença de altas concentrações de glicose (ZHANG et al., 2015). Esse fator sigma é tradicionalmente o ativador do sistema de resposta a choque térmico e é muito conservado entre bactérias (NAKAHIGASHI; YANAGI; YURA, 1995). Sigma 32 pode também apresentar funções específicas, como a ativação da esporulação em *Bacillus subtilis* (NANAMIYA et al., 1998), ou a regulação do dobramento de proteínas em *E. coli* (LIM et al., 2013).

Até o momento, não há nenhum trabalho publicado que demonstre experimentalmente o papel dos fatores sigma de *Z. mobilis* e nem a sua relação com os mecanismos de resposta ao estresse.

INTRODUÇÃO

1.9. Manipulação Genética em *Z. mobilis*

A manipulação genética de organismos selvagens é sempre mais complexa do que a de linhagens laboratoriais. A presença de sistemas de restrição endógenos e a falta de informações a respeito de origens de replicação e mecanismos de estabilidade gênica dificultam os processos de transformação e manutenção do material genético heterólogo.

O primeiro obstáculo para a expressão de genes heterólogos em *Z. mobilis* é a escolha de um plasmídeo replicativo que tenha estabilidade e alta eficiência de transformação. Os primeiros plasmídeos utilizados em *Z. mobilis* basearam-se no plasmídeo pACYC184 (CHANG; COHEN, 1978), mas apresentam baixa eficiência de transformação, principalmente quando são maiores do que 6 kb (ZOU et al., 2011). Os plasmídeos da série pBBR1MCS apresentam origem de replicação inespecífica, que é replicativa em um grande número de bactérias Gram-negativas (KOVACH et al., 1994, 1995). Essa origem de replicação já foi utilizada em diversos estudos em *Z. mobilis*. Além de serem mais eficientes em vetores maiores, também são mais estáveis na ausência de pressão seletiva (ZOU et al., 2012). Alguns outros vetores com as origens de replicação naturais de *Zymomonas* também estão sendo criados e inicialmente apresentam elevada estabilidade, além de um controle maior sobre o número de cópias de acordo com a origem de replicação utilizada (CAO et al., 2016).

Outra questão pouco explorada em *Z. mobilis* são os promotores e mecanismos de controle transcricionais. Não há até o momento nenhum trabalho comparativo sobre o uso de diferentes promotores para a expressão heteróloga em *Z. mobilis*, praticamente todos os trabalhos utilizam a região promotora do gene da piruvato descarboxilase (*pdc*), da gliceraldeído-3P desidrogenase (*gap*) ou da enolase (*eno*), que foram demonstrados como constitutivamente expresso em altos níveis no início da década de 1990 (BURNETT; LIU; CONWAY, 1992; CONWAY et al., 1987; CONWAY; SEWELL; INGRAM, 1987; REYNEN et al., 1990; UHLENBUSCH; SAHM; SPRENGER, 1991). Também não há nenhum trabalho, até o momento, que identifique experimentalmente os motivos de ligação de fatores transcricionais em qualquer promotor de *Z. mobilis*.

Em um trabalho sobre o sistema de secreção de *Z. mobilis*, foram identificados alguns peptídeos sinais específicos. Vários destes foram testados em construções fusionadas a celulases, sendo que o sistema com secreção mais eficiente ocorreu quando o peptídeo sinal da proteína ZMO0130 de *Z. mobilis* ZM4 estava fusionado à extremidade

INTRODUÇÃO

amino-terminal da enzima (LINGER; ADNEY; DARZINS, 2010). Esse resultado possibilitou a expressão heteróloga de proteínas no sobrenadante da cultura de *Z. mobilis*, mas ainda não há na literatura uma caracterização deste sistema de secreção, nem dos mecanismos de transporte e clivagem dos peptídeos sinais.

Quando o objetivo é integrar o DNA heterólogo no genoma ou deletar algum gene de *Z. mobilis*, a principal estratégia utilizada é a recombinação homóloga dos fragmentos com a região alvo. Diversos trabalhos de deleção já foram realizados em *Z. mobilis* (HE et al., 2014) e a transformação direta com o fragmento homólogo amplificado por PCR ou a utilização de plasmídeos suicidas são os métodos mais funcionais, mas que ainda apresentam baixa eficiência (ALVIN et al., 2017; KERR et al., 2011; KHANDELWAL et al., 2018). O uso de transposon para integração no genoma também é efetivo em *Z. mobilis*, mas falha ao direcionar o *locus* de integração (ZHANG et al., 2013). E o uso de CRISPR-Cas9 é outra possibilidade para direcionar a integração no genoma que começou a ser utilizada recentemente em *Z. mobilis* (CAO et al., 2017; DONG; HE; FENG, 2016). Independente do método utilizado, o maior problema para a obtenção de uma linhagem com informação genética integrada estável em *Z. mobilis* é a presença de cópias parciais do cromossomo durante a fase exponencial de crescimento, o que promove a regeneração do fenótipo selvagem por recombinação homóloga (DEUTSCHBAUER et al., 2014).

Outro importante obstáculo para transformar *Z. mobilis* é a presença de um sistema de restrição endógeno, ainda pouco caracterizado, que degrada o DNA que entra na célula (KERR et al., 2011). A quebra do DNA exógeno parece estar associada a um padrão específico de metilação, que explica a maior eficiência de transformação quando os plasmídeos são previamente replicados e demetilados em *E. coli* JM110 (ZOU et al., 2011, 2012). Devido à pouca compreensão sobre esse sistema de restrição de *Z. mobilis*, o uso de conjugação como método de transformação era muito comum (ARFMAN; WORRELL; INGRAM, 1992; MISAWA; YAMANO; IKENAGA, 1991; PAPPAS; GALANI; TYPAS, 1997), mas com a otimização da técnica de eletroporação pode ser possível utiliza-la com mais eficiência (ZOU et al., 2012).

INTRODUÇÃO

1.10. Aplicações Biotecnológicas para *Z. mobilis*

O principal produto de *Z. mobilis* é obviamente o bioetanol, sendo que o maior interesse econômico e ambiental está na produção de bioetanol de segunda geração (a partir de lignocelulose). Atualmente, existem linhagens recombinantes de *Z. mobilis* que apresentam viabilidade econômica para a produção de etanol a partir de glicose e xilose derivadas do hidrolisado de lignocelulose, como a linhagem TMY-HFPX, que consegue atingir rendimento de etanol superior a 90% em fermentação de alta gravidade sem a suplementação de aminoácidos e vitaminas (WANG et al., 2016a). Outra linhagem de *Z. mobilis* comercialmente viável foi produzida em uma parceria entre o Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) e a empresa DuPont nos Estados Unidos. Até o momento, a NREL possui três fábricas de produção de etanol a partir de celulose de milho utilizando essa linhagem de *Z. mobilis*, com uma produção anual total de 280 milhões de litros em 2016 (SCANLON, 2018).

Além de etanol, outros produtos metabólicos são alvos de exploração econômica em *Z. mobilis*. Sorbitol, levana, ácido succínico, ácido lático e isoprenóides são produtos naturais dessa bactéria que já apresentaram resultados promissores para a produção comercial (HE et al., 2014). E alguns modelos metabólicos têm ajudado no desenvolvimento de linhagens para a produção de outros produtos por engenharia metabólica, como acetona, isopropanol, isobutanol e ácido telúrico (MOTAMEDIAN; SAEIDI; SHOJAOSADATI, 2016; PENTJUSS et al., 2013; WIDIASTUTI et al., 2011).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Estudar os mecanismos envolvidos na resposta ao estresse fermentativo em *Zymomonas mobilis* ZM4.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterizar as condições de produção de etanol e de tolerância ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* ZM4.

2.2.2. Analisar a tolerância ao etanol de *Z. mobilis* em resposta ao AI-2.

2.2.3. Desenvolver e consolidar ferramentas para a manipulação genética de *Z. mobilis* ZM4.

2.2.4. Estudar o papel da proteína ZMO0994 sobre a resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* ZM4.

2.2.5. Analisar o efeito dos fatores transcricionais sigma 70, sigma 32 e sigma 24 sobre a resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens Bacterianas e Plasmídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados estão na tabela 4. A linhagem ZM4 de *Z. mobilis* foi adquirida na ATCC (EUA) e as linhagens de *E. coli* BL21 (pProEx_LuxS), *E. coli* BL21 (pProEx_HTmtan), *E. coli* KX1123 e *E. coli* KX1218 foram doadas pelo professor Adrian Walmsley (Durham University, UK). O plasmídeo pGEMT (Anexo 1) foi comprado da Promega (E.U.A.), o plasmídeo pBBR1MCS (Anexo 2) foi doado pelo professor Henrique Ferreira (UNESP Rio Claro) e o plasmídeo pBBR1MCS-2 (Anexo 2) foi doado pela professora Gordana Maravic Vlahovicek (University of Zagreb, Croácia).

Tabela 4. Relação de linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.

Plasmídeos	Características relevantes	Referências
pGEM-T	Plasmídeo comercial de clonagem. Amp ^R	Promega, EUA
pBBR1MCS (cloranfenicol)	Plasmídeo com origem de replicação para amplo espectro de hospedeiros. Cm ^R	(KOVACH et al., 1994)
pBBR1MCS-2 (canamicina)	Plasmídeo com origem de replicação para amplo espectro de hospedeiros. Kan ^R	(KOVACH et al., 1995)
pB1_Amy	Vetor de expressão derivado do pBBR1MCS com o gene <i>AmyE</i> de <i>B. subtilis</i> sob o controle do promotor e do terminador PDC de <i>Z. mobilis</i> ZM4. Cm ^R	Neste trabalho
pB2_Amy	Vetor de expressão derivado do pBBR1MCS-2 com o gene <i>AmyE</i> de <i>B. subtilis</i> sob o controle do promotor e do terminador PDC de <i>Z. mobilis</i> ZM4. Kan ^R	Neste trabalho
pB1_s70	Vetor de expressão derivado do pBBR1MCS com o gene <i>rpoD</i> (Sigma 70) sob o controle do promotor e do terminador PDC de <i>Z. mobilis</i> ZM4. Cm ^R	Neste trabalho
pB1_s24	Vetor de expressão derivado do pBBR1MCS com o gene <i>rpoE</i> (Sigma 24) sob o controle do promotor e do terminador PDC de <i>Z. mobilis</i> ZM4. Cm ^R	Neste trabalho
pB1_s32	Vetor de expressão derivado do pBBR1MCS com o gene <i>rpoH</i> (Sigma 32) sob o controle do promotor e do terminador PDC de <i>Z. mobilis</i> ZM4. Cm ^R	Neste trabalho
pKO0994	Vetor de deleção derivado do pGEM-T. Contém o cassete de resistência a cloranfenicol flanqueado por regiões homólogas ao gene ZMO0994 de <i>Z. mobilis</i> .	Neste trabalho

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens bacterianas	Genótipos e/ou Características Relevantes	Referências
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4 ATCC 31821	Linhagem Selvagem	(LINDNER, 1928)
<i>Z. mobilis</i> ZM4_pB1	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pBBR1MCS.	Neste trabalho
<i>Z. mobilis</i> ZM4_Amy1	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pB1_Amy.	Neste trabalho
<i>Z. mobilis</i> ZM4_Amy2	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pB2_Amy.	Neste trabalho
<i>Z. mobilis</i> ZM4_p70	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pB1_s70.	Neste trabalho
<i>Z. mobilis</i> ZM4_p24	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pB1_s24.	Neste trabalho
<i>Z. mobilis</i> ZM4_p32	Linhagem <i>Z. mobilis</i> ZM4 contendo o plasmídeo pB1_s32.	Neste trabalho
<i>E. coli</i> DH5alpha ATCC 47093	<i>F</i> ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> φ80 <i>ΔlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17 λ</i> ⁻	(YANISCH-PERRON; VIEIRA; MESSING, 1985)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F <i>proAB lacIqZDM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr]	Stratagene, EUA
<i>E. coli</i> JM110 ATCC 47013	<i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]	(YANISCH-PERRON; VIEIRA; MESSING, 1985)
<i>E. coli</i> BL21 (pProEx_LuxS)	Linhagem de <i>E. coli</i> produtora da proteína LuxS de <i>E. coli</i>	(WINZER et al., 2002)
<i>E. coli</i> BL21 (pProEx_HTmtan)	Linhagem de <i>E. coli</i> produtora da proteína Psf de <i>E. coli</i>	(WINZER et al., 2002)
<i>E. coli</i> KX1123	Linhagem de <i>E. coli</i> produtora de AI-2	(XAVIER; BASSLER, 2005)
<i>E. coli</i> KX1218	Linhagem derivada de <i>E. coli</i> KX1123 com o gene da enzima LuxS deletado.	(XAVIER; BASSLER, 2005)
<i>Vibrio harveyi</i> 170BB	Linhagem de <i>V. harveyi</i> luminescente na presença de AI-2.	(BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997)

MATERIAIS E MÉTODOS

3.2. Oligonucleotídeos e genes sintetizados

Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados na empresa Exxtend (São Paulo, Brasil) com purificação por HPLC e estão dispostos na tabela 5. Os códons do gene da alfa-amilase de *Bacillus subtilis* (DE MORAES; ASTOLFI-FILHO; OLIVER, 1995) foram otimizados para *Z. mobilis* ZM4 com o programa *CodonCode Aligner*. Essa sequência foi fusionada ao peptídeo sinal do gene ZMO0130 de *Z. mobilis* ZM4 (LINGER; ADNEY; DARZINS, 2010) e ao promotor e terminador do gene da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* ZM4 (Anexo 3). O cassete completo foi sintetizado pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil) e subclonado nos plasmídeos pBBR1MCS e pBBR1MCS-2.

Tabela 5. Relação de oligonucleotídeos utilizados

Nome	Sequence
KO994_5'F	<u>AGGCGGCCGCACTAGTGATTGCAATAGCCGGAACCGCAAAG</u>
KO994_5'R	<u>ACAGGGACACCAGGACACCCGCAATAACCGGAGAAAG</u>
KO994_3'F	<u>GAAAGCGGGCAGTGATCTCTGGTGCATGGAAAGATGTC</u>
KO994_3'R	<u>GCCGCCATGGCCGCGGGATTCTCTGCGGTTGCTTTGTAATGCAG</u>
Cloran_5'	TCCTGGTGTCCCTGTTGATAACC
Cloran_3'	TCACTGCCCCGCTTTCCAGTCG
Cloran_In	TCGCTCTGGAGTGAATACCACGA
KO994_Ex5'	GTGACCCCGATATTACGCACC
KO994_Ex3'	GATTGGCCCCAAAGCTATAAGGG
rpoD_F	<u>ATATGGAGTAAGCATATGGCAGAGACGACTACGGCT</u>
rpoD_R	<u>TATTTAAAAAGTCGACCTAGTGGTCGAGGAAGCTCCG</u>
rpoE_F	<u>ATATGGAGTAAGCATATGATCGAAAATCATGAAAAAGAGACAAATTCTCC</u>
rpoE_R	<u>TATTTAAAAAGTCGACCTAGCGACCGTTACTAAGGTTCG</u>
rpoH_F	<u>ATATGGAGTAAGCATATGGCCACCAGTAGCACCCCT</u>
rpoH_R	<u>TATTTAAAAAGTCGACCTATGCCATAGCGGGTAACAGC</u>
R16S_F	AGAACATAGAAGAGGTAAGT
R16S_R	TCAACTATAGACCAGTAAGT
RTrpoD_F	GATCATACTTTGGAAGAAGT
RTrpoD_R	GAGAAGGATGTTTCAGTTT
RTrpoE_F	CCTTAGAAAAATTGGTGGA
RTrpoE_R	CGCTTACTTCATCCATAATC
RTrpoH_F	GAAGCGATGGATAAACTG
RTrpoH_R	TAGACCTGACTTAATTCTTC

As sequências sublinhadas representam a região de homologia para recombinação.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3. Materiais e Soluções

3.3.1. Considerações gerais

Todas as soluções e meios de cultura foram preparados com água destilada ou miliQ. Quando necessário esterilizar foram submetidos à autoclave a 121°C por 20 minutos. O material plástico e as vidrarias estéreis foram submetidas ao mesmo processo de esterilização por 40 minutos. Algumas soluções sensíveis ao calor foram esterilizadas por filtração usando-se membranas tipo Millipore com poro de 0,22 µm.

3.3.2. Meios de cultura

Meio Lúria – Bertani (LB) pH 7,2

Extrato de levedura	5,0 g/L
Peptona de caseína	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L

Para o meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. O pH foi corrigido com solução de NaOH 4M.

Meio SOB – pH 7,2

Extrato de levedura	5,0 g/L
Triptona	20,0 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,5 g/L
MgCl ₂ 1 M*	10,0 mL/L
MgSO ₄ 1 M*	10,0 mL/L

O pH foi corrigido com solução de NaOH 4M. *Adicionados no momento do uso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Meio 2xYT – pH 7,2

Extrato de levedura	10,0 g/L
Triptona	16,0 g/L
NaCl	5,0 g/L

O pH foi corrigido com solução de NaOH 4M

Meio Rico (RM) pH 6,0

Extrato de levedura	10,0 g/L
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L
Glicose	10,0 a 180,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/L

Para o meio sólido foram adicionados 1,5% (p/v) de ágar bacteriológico. O pH foi corrigido com solução de KOH 4M.

Meio Autoinducer Bioassay (AB) pH 7,0

NaCl	17,5 g/L
Casaminoácidos	2,0 g/L
MgSO ₄	12,3 g/L
Glicerol	10,0 mL/L
Tp. Fosfato de potássio 1M (pH 7,0)*	10,0 mL/L
L-arginina 0,1M*	10,0 mL/L

*Foram adicionados no momento do uso.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.3. Materiais e soluções para cultura e transformação de células

Solução de glicerol 50%

Glicerol	50% (v/v)
----------	-----------

Solução de glicerol 10%

Glicerol	10% (v/v)
----------	-----------

Solução de NaOH 4M

NaOH	160,0 g/L
------	-----------

Solução de KOH 4M

KOH	224,0 g/L
-----	-----------

Solução de L-arginina 0,1 M

L-arginina	17,4 g/L
------------	----------

Solução de MgCl₂ 1 M

MgCl ₂	95,2 g/L
-------------------	----------

Solução de MgSO₄ 1 M

MgSO ₄	120,4 g/L
-------------------	-----------

Tampão acetato de sódio 1 M pH 7,5

Acetato de sódio	81,85 g/L
------------------	-----------

Ácido acético glacial	10 mL/L
-----------------------	---------

MATERIAIS E MÉTODOS

MOPS 1M pH 6,8

Ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfônico	209,3 g/L
--	-----------

O pH foi corrigido com NaOH 4M.

Tampão de transformação 1 por RbCl

RbCl	12,0 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	9,9 g/L
Acetato de sódio 1 M pH 7,5	30,0 mL/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,5 g/L
Glicerol	150,0 mL/L

O pH foi corrigido para 5,8 com ácido acético glacial.

Tampão de transformação 2 por RbCl

RbCl	1,2 g/L
MOPS 1M pH 6,8	20 mL/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	11,0 g/L
Glicerol	150,0 mL/L

Solução de IPTG 1 M

Isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo	238,3 g/L
-------------------------------------	-----------

Antibióticos utilizados

Os antibióticos foram preparados por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionados ao meio de cultura no momento da utilização. As concentrações utilizadas são dispostas na tabela 6.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 6 Concentração de antibióticos utilizados para *E. coli* e *Z. mobilis* ZM4

Antibiótico	Concentração para <i>E. coli</i>	Concentração para <i>Z. mobilis</i> ZM4
Ampicilina	100 µg/mL	-
Canamicina	50 µg/mL	500 µg/mL
Cloranfenicol	25 µg/mL	100 µg/mL

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.4. Materiais e soluções para manipulação de DNA e RNA

Solução de Brometo de Etídeo 1% (p/v)

Brometo de etídeo	10,0 g/L
-------------------	----------

Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0

Ácido etilenodiamino tetra-acético	93,05 g/L
------------------------------------	-----------

O pH foi corrigido para 8,0 com a adição de NaOH em pastilhas.

Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose TAE 50X pH 8,5

Tris-base	242,0 g/L
Ácido acético glacial	57,1 mL/L
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100,0 mL/L

Tampão de amostra 6X para eletroforese em gel de agarose

TAE 50X	200,0 mL/L
Glicerol 50%	600,0 mL/L
Azul de Bromofenol	2,5 g/L

Gel de agarose 1% (p/v)

TAE 1X q.s.p.	1,0 L
Agarose	10,0 g/L

Marcadores de peso molecular para DNA

Foi utilizado o marcador 2-log DNA ladder da New England Biolabs – NEB (EUA), o marcador 1 Kb da Sinapse (Brasil) e o marcador GeneRuler 1 kb plus da Sigma-Aldrich (Alemanha).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.5. Materiais e soluções para análise de proteínas

Reagente de Bradford (BRADFORD, 1976)

Comassie Brilhante Blue G	100,0 mg/L
Etanol	47,0 mL/L
Ácido orto-fosfórico	85,0 mL/L

Solução SDS 10% (p/v)

Dodecil sulfato de sódio	100,0 g/L
--------------------------	-----------

Acrilamida:bis-acrilamida (28:2)

Acrilamida	280,0 g/L
Bis-acrilamida	20,0 g/L

A solução foi filtrada em papel de filtro e estocada ao abrigo da luz a 4,0°C.

Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

Trizma base	182,0 g/L
-------------	-----------

O pH foi ajustado com HCl fumegante 37% (p/p)

Tampão Tris-HCl 1,0 M pH 6,8

Trizma base	121,0 g/L
-------------	-----------

O pH foi ajustado com HCl fumegante 37% (p/p)

Solução APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio	100,0 g/L
----------------------	-----------

MATERIAIS E MÉTODOS

Solução TCA 100% (p/v)

Ácido tricloroacético	1,0 kg/L
-----------------------	----------

Tampão de amostra 2x para eletroforese em gel de poliacrilamida

Tris-HCl 1 M pH 6,8	200,0 mL/L
---------------------	------------

SDS	40,0 g/L
-----	----------

β -Mercaptoetanol	40,0 g/L
-------------------------	----------

Glicerol	200,0 mL/L
----------	------------

Azul de bromofenol	1,0 g/L
--------------------	---------

Marcador de peso molecular para proteínas

Foi utilizado o marcador de peso molecular de proteínas *Unstained Protein Molecular Weight Marker* da ThermoFisher (EUA), fervido por 5 minutos antes da utilização.

Tampão de corrida 10x para eletroforese em gel de poliacrilamida

Trizma-base	30,0 g/L
-------------	----------

Glicina	144,0 g/L
---------	-----------

SDS	10,0 g/L
-----	----------

Solução de Comassie Blue Coloidal

Comassie Brilhante Blue G	2,0 g/L
---------------------------	---------

Metanol	200,0 mL/L
---------	------------

Ácido acético	70,0 mL/L
---------------	-----------

Sulfato de Amônio	100,0 g/L
-------------------	-----------

A descoloração do gel é realizada com H₂O destilada

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.6. Soluções para cromatografia

Fase móvel para cromatografia por afinidade em coluna de Ni²⁺

Tris-HCl 1,0 M pH 7,6	50,0 mL/L
NaCl	29,2 g/L
Imidazol	20 – 500 mM

Fase móvel para HPLC por troca iônica em coluna de H⁺- H₂SO₄ 0,005 N

H ₂ SO ₄ 100%	560,0 µL/L
-------------------------------------	------------

Tampão de amostra para a lise das células e extração de proteínas

Tris-HCl 1,0 M pH 7,6	50,0 mL/L
NaCl	29,2 g/L
Inibidor de protease Roche (tablete)	10 mL/L
Imidazol*	20 mM

*Adicionado da hora do uso.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.7. Materiais e soluções para a síntese e análise de AI-2

Solução de SAH 100mM

S-adenosil-homocisteína	38,4 g/L
-------------------------	----------

Solução de redução de Fe(III) para quantificação de AI-2

(WATTANAVANITCHAKORN; PRAKITCHAIWATTANA; THAMYONGKIT, 2014)

Fenantrolina	1,98 g/L
--------------	----------

NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	1,6 g/L
---	---------

Solução de ácido ascórbico 0,5 M

Ácido ascórbico	88,1 g/L
-----------------	----------

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4. Métodos

3.4.1. Método para quantificação de glicose, etanol e metabólitos

Todas as medidas de glicose, etanol, glicerol, lactato e ácido acético foram realizadas no sobrenadante da cultura, após centrifugação a 6000 x g por 5 minutos e filtração em membrana Milipore de 0,22 μm . Para a análise, 20 μL do sobrenadante foi submetido à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC-Shimatzu) por troca iônica em coluna de H^+ (ROA – Rezex de 15 cm), com fase móvel de H_2SO_4 0,005N, fluxo de 0,6 mL/min e detecção por índice de refração com o detector RID10A (Shimatzu). A quantificação foi realizada a partir de curvas com as substâncias padrões em quantidades conhecidas (Anexo 4). Todas as análises em HPLC foram feitas em triplicatas técnicas.

3.4.2. Métodos estatísticos e fórmulas para a análise dos dados de crescimento

A taxa de crescimento específico (μ) foi calculada com a regressão não-linear da equação de crescimento exponencial no programa Prism 7 (GraphPad Software) considerando apenas a fase exponencial de crescimento. Todos os cálculos de média, desvio-padrão e erro padrão também foram feitos no programa Prism 7 (GraphPad Software).

3.4.3. Curva de crescimento em diferentes concentrações de Glicose

Uma colônia isolada de *Z. mobilis* ZM4 foi inoculada em 30 mL de meio RM e incubado a 30°C, 100 rpm por 24h. Em seguida, essa cultura foi utilizada para sete inóculos em 100 mL de meio RM cada com concentrações de glicose iguais a: 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 80 g/L, 100 g/L, 140 g/L e 180 g/L, todos com uma densidade óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) inicial de 0,1. Essas culturas foram incubadas a 30° C e 100 rpm por 24h. A cada 4h, 1 mL da cultura foi retirado para a medida da absorbância a 600 nm e para a dosagem de glicose e etanol no sobrenadante por HPLC. Esse experimento foi repetido três vezes com colônias de *Z. mobilis* ZM4 isoladas independentemente.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.4. Curva de crescimento com alimentação

Para determinar a concentração máxima de etanol produzida por *Z. mobilis*, uma colônia isolada foi cultivada a 30° C e 100 rpm em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose inicial por 24h. Em seguida, esse cultivo foi utilizado para o inóculo com OD_{600nm} inicial de 0,1 em 100 mL de meio RM com 100 g/L de glicose inicial. Após 10h de cultivo, 10 mL da cultura foi substituído por meio RM com 500 g/L de glicose, sendo repetida a cada 2h até completar 20h de cultivo. O experimento foi encerrado após 36h, quando uma alíquota de 100 µL da cultura foi inoculada em uma placa com meio RM sólido e incubado a 30° C por 96h. Esse experimento foi repetido três vezes com colônias de *Z. mobilis* ZM4 isoladas independentemente.

3.4.5. Ensaios de tolerância ao etanol no início da cultura

Uma cultura de *Z. mobilis* foi inoculada em frascos contendo 100 mL de meio RM com 20 g/L de glicose e com cinco diferentes concentrações de etanol (0 g/L, 50 g/L, 60 g/L, 70 g/L e 80 g/L) para uma OD_{600nm} inicial de 0,1. As culturas foram incubadas a 30° C e 100 rpm por 48h. Esse experimento foi repetido três vezes com colônias de *Z. mobilis* ZM4 isoladas independentemente.

3.4.6. Quantificação de proteínas – Método de Bradford

Cerca de 10 µL de amostra foram incubados com 200 µL do reagente de Bradford (BRADFORD, 1976) e incubados por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância foi medida a 595 nm e o valor obtido foi comparado com uma curva padrão construída a partir de quantidades conhecidas de albumina sérica bovina (BSA). Todas as quantificações foram realizadas em triplicata técnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.7. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida – SDS PAGE

A eletroforese de proteínas foi conduzida em gel desnaturante de poliacrilamida (SAMBROOK; GREEN, 2012) em um sistema de eletroforese da BioRad®. O preparo dos géis foi realizado adicionando-se as seguintes quantidades dos reagentes:

3.4.7.1. Gel Concentrador 4%

Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	1,0 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	940 µL
Água destilada (q.s.p.)	7,5 mL
SDS 10 % (p/v)	75 µL
APS 10 % (p/v)	40 µL
TEMED	10 µL

3.4.7.2. Gel Separador 12%

Acrilamida:Bis-acrilamida (28:2)	12,0 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	7,5 mL
Água destilada (q.s.p.)	30,0 mL
SDS 10 % (p/v)	300 µL
APS 10 % (p/v)	300 µL
TEMED	15 µL

3.4.7.3. Tratamento das amostras

No caso de amostras de sobrenadante de cultura, 1 mL das amostras foram precipitados com solução de TCA para a concentração final de 20% (v/v), homogeneizados e incubados por 12 horas a -20°C, em seguida, foram submetidos à centrifugação a 16000 x g a 4°C durante 20 minutos. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado em 500 µL de acetona gelada sendo repetida a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. O sedimento, resultante da centrifugação após a lavagem com acetona, foi ressuspenso em 30 µL de tampão de amostra para SDS PAGE 1X, fervido durante 5 minutos e aplicado no gel.

MATERIAIS E MÉTODOS

No caso de amostras de extrato intracelular ou de purificação de cromatografias, a quantidade equivalente a 10 µg de proteínas foi homogeneizada em tampão de amostra SDS PAGE 1X, fervida por 5 minutos e aplicada no gel.

3.4.7.4. Corrida eletroforética

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida Tris-Glicina 1X com voltagem constante de 120 mV no sistema de eletroforese vertical *Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (BioRad).

3.4.7.5. Coloração com azul de *Coomassie*

As proteínas presentes no gel foram visualizadas após a incubação deste durante uma hora, sob agitação, na solução corante de *Coomassie Blue Coloidal* seguida pela descoloração, incubando o gel durante a noite, sob agitação, em água destilada.

3.4.8. Produção e Purificação das enzimas LuxS e Psf

As linhagens de bactéria *E. coli* BL21 (pProEx_LuxS) e *E. coli* BL21 (pProEx_HTmtan) produzem, respectivamente, as enzimas heterólogas LuxS e Psf (S-adenosilhomocisteína nucleosidase) sob o controle do promotor *Lac*. As duas linhagens foram cultivadas individualmente em 500 mL de meio 2xYT a 37°C e 200 rpm até atingir a OD_{600nm} de 0,45, quando o análogo da lactose IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado para a concentração final de 1 mM para induzir o promotor *lac*. Após a indução, as culturas foram incubadas a 37° C e 200 rpm por 4h.

Em seguida, o pellet celular da cultura foi ressuspenso em 100 mL do tampão de amostra para lise de células e submetido a 10 pulsos ultrassônicos de 10 segundos, com intervalos de um minuto para o completo rompimento celular.

O extrato da lise celular foi submetido a cromatografia por afinidade com a coluna *HisTrap HP Histidine-tagged protein purification* 1 mL (GE Healthcare Life Science) com um gradiente de Imidazol de 20 mM a 200 mM automatizado no AKTA Pure (GE

MATERIAIS E MÉTODOS

Healthcare Life Science). O gradiente foi coletado em um total de 23 alíquotas e a presença de proteínas foi detectada por absorvância a 230 nm.

As alíquotas selecionadas foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% e coradas com azul de *Coomassie*, e em seguida quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.4.9. Síntese e Ensaio com AI-2

A síntese enzimática do AI-2 foi realizada segundo o protocolo estabelecido (WINZER et al., 2002) com uma concentração inicial igual a 4 mM de S-adenosil-homocisteína (SAH). Após a reação, o sistema foi dialisado em membrana de 10 kDa (Amicon) para a remoção das enzimas. Uma alíquota foi utilizada para a reação de redução do Fe (III) e comparada com uma curva padrão de ácido ascórbico (Anexo 5) para a quantificação do AI-2 (WATTANAVANITCHAKORN; PRAKITCHAIWATTANA; THAMYONGKIT, 2014).

Para a confirmação da atividade do AI-2, o *Vibrio harveyi* BB170 foi cultivado em meio líquido AB, padrão para ensaio de bioluminescência (BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997), por 24 h a 30° C e 200 rpm. Em seguida, o pellet celular foi lavado com água miliQ estéril duas vezes e utilizado para o ensaio de bioluminescência com diferentes concentrações de AI-2 segundo o protocolo padrão (BASSLER; GREENBERG; STEVENS, 1997). Como controles foram utilizados isoladamente o SAH, o AI-2 e o Meio AB, além do *V. harveyi* em água, com o SAH (4 mM) e com o sobrenadante da própria cultura. Todas as amostras tiveram a bioluminescência medida em Luminômetro *Synergy HTX* (BioTek, EUA). Todos os ensaios de bioluminescência foram realizados com três culturas independentes de *V. harveyi* BB170 e ainda em três repetições técnicas.

3.4.10. Ensaio de Resposta ao AI-2 por *Z. mobilis*

Uma colônia de *Z. mobilis* ZM4 foi cultivada a 30° C e 100 rpm em 5 mL de meio RM com 100 g/L de glicose inicial por 24 horas. Em seguida, esse cultivo foi utilizado para o inóculo em 100 mL de meio RM nas mesmas condições anteriores e OD_{600nm}

MATERIAIS E MÉTODOS

inicial de 0,1. Após 10h de cultivo, foi adicionado o AI-2 sintético para a concentração final de 10 μM e no controle foi adicionado a mesma quantidade do tampão do AI-2 (Tris-HCL 50mM pH 7,5). Neste ponto, 10 mL da cultura foram substituídos por meio RM com 500 g/L de glicose. Esta alimentação foi realizada a cada 2h até completar 22h de cultivo. O experimento foi encerrado após 36h, quando uma alíquota de 100 μL da cultura foi inoculada em uma placa com meio RM e incubado a 30° C por 96h. Nos pontos de alimentação, uma amostra teve a OD_{600nm} medida e a concentração de glicose e etanol verificada por HPLC. Esse experimento foi repetido três vezes com colônias isoladas independentes de *Z. mobilis* ZM4.

3.4.11. Ensaio de *Z. mobilis* com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123

Este ensaio foi baseado no trabalho de Yang (2011). A linhagem *E. coli* KX1123 é uma cepa que produz o AI-2 e a linhagem *E. coli* KX1218 é uma versão mutante que apresenta o gene da LuxS deletado e conseqüentemente não produz AI-2 (XAVIER; BASSLER, 2005).

Nesse ensaio, uma cultura de *E. coli* KX1123 foi crescida em meio RM até a OD_{600nm} de 1,0. Em seguida, as células foram retiradas por centrifugação a 10000 x g por 5 min e por filtração em membrana de 0,22 μm . Esse sobrenadante estéril foi adicionado em uma cultura de *Z. mobilis* ZM4, que havia crescido previamente até a OD_{600nm} de 0,5, em uma proporção de 1:1 (v/v). Esse sistema foi incubado por 16 horas a 30°C e 100 rpm. O mesmo procedimento foi realizado com uma cultura de *E. coli* KX1218 e com meio de cultura puro, como controles negativos. Amostras foram coletadas durante o experimento para análises no HPLC e para SDS-PAGE. Esse experimento foi repetido três vezes com colônias isoladas independentes de *Z. mobilis* ZM4, de *E. coli* KX1123 e de *E. coli* KX1218.

3.4.12. Extração de DNA genômico de *Z. mobilis* ZM4

A extração do DNA genômico da bactéria *Z. mobilis* ZM4 foi realizada com o kit de extração de DNA “*Wizard Genomic DNA Purification Kit*” (PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi ressuspensão em água miliQ.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.13. Extração de DNA plasmidial

Todas as extrações de DNA plasmidial para pequenos volumes foram realizadas com o kit de extração de DNA “*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System*” da PROMEGA™, de acordo com as instruções do fabricante. Para as extrações de grande volume, o kit utilizado foi “*Qiagen Plasmid Maxi Kit*” da QIAGEN, de acordo com as instruções do fabricante. Como o rendimento destes kits para *Z. mobilis* é muito baixo, após a extração de *Z. mobilis*, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* DH5a para amplificação e extraídos novamente.

3.4.14. Extração de RNA de *Z. mobilis*

As extrações de RNA total de *Z. mobilis* foram realizadas com o kit “*RNeasy Plus Mini Kit*” da QIAGEN, de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.15. Análise de Ácidos Nucléicos em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) foi realizada com TAE 1X, sendo utilizada para análise e avaliação do tamanho e integridade do DNA ou dos fragmentos de DNA (SAMBROOK; GREEN, 2012). O gel foi corado com solução de brometo de etídeo 5 mg/mL antes da corrida. Todas as corridas foram realizadas com a voltagem fixa de 70 mV em sistema de eletroforese da BioRad. Após o término da corrida, o gel foi visualizado em um fotodocumentador modelo *Gel-Doc EZ*, da BioRad com emissões de Ultravioleta.

3.4.16. Quantificação de DNA e RNA

A quantificação de DNA ou RNA purificado foi realizada por espectrofotômetro modelo *NanoDrop One* (*ThermoFisher Scientific*), segundo instruções do fabricante. E quando necessário, uma quantificação adicional foi realizada pela análise em gel de agarose com o programa *ImageLab* (*BioRad*).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.17. Digestão de DNA com enzimas de restrição.

Todas as enzimas de restrição foram compradas na New England Biolabs (NEB) e foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.18. Reações em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as reações de PCR (MULLIS et al., 1986) foram realizadas em um termociclador modelo BS-LifeEco (Bisen, China). A enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) foi utilizada em todas as reações de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.19. Purificação de produtos de PCR ou digestões de plasmídeos

As purificações de produtos de PCR ou de fragmentos da digestão de plasmídeos foram feitas com a excisão do fragmento de DNA do gel de agarose com uma lâmina cirúrgica e a posterior purificação com o kit “*Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*” (PROMEGA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.20. RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR para a quantificação de RNAs específicos foram feitas com o kit “*Two Steps qRT-PCR QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit*” (Qiagen) no termociclador *Rotor GeneQ* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, todas as reações foram feitas em triplicata técnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.21. Ligação de fragmentos de DNA por recombinação homóloga

Todas as ligações de fragmentos de DNA para a construção de vetores foram feitas por recombinação homóloga com o sistema *In-Phusion* (CLONTECH, 2012) de acordo com as instruções do fabricante. Para promover a recombinação, há sempre a sobreposição de no mínimo 15 nucleotídeos nas extremidades dos fragmentos.

3.4.22. Transformação de *E. coli* por choque térmico com RbCl

Uma cultura da linhagem escolhida de *E. coli* foi crescida em 50 mL de meio SOB a 37°C e 200 rpm até atingir a OD_{600nm} de 0,3. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min a 4°C. Depois, as células foram ressuspensas em 16 mL de tampão de transformação 1, incubadas por 15 min a 4°C e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Em seguida, as células foram ressuspensas em 4 mL de tampão de transformação 2 e incubadas por 30 min a 4°C. Depois, uma alíquota de 100 µL das células competentes foram incubadas com 100 ng de DNA e incubadas no gelo por mais 40 min. Esse sistema foi submetido a choque térmico a 42°C por 90 segundos e em seguida incubados com 1 mL de meio LB por uma hora a 37°C e 200 rpm. Após a recuperação, as células foram semeadas em placas com meio LB sólido contendo o antibiótico apropriado e incubadas por 16 horas a 37°C (SAMBROOK; GREEN, 2012).

3.4.23. Transformação de *Z. mobilis* ZM4 por eletroporação

O protocolo de eletroporação para *Z. mobilis* ZM4 foi desenvolvido a partir de adaptações de alguns protocolos propostos (JEON et al., 2002; JEON; SVENSON; ROGERS, 2005; ZOU et al., 2012). Para tal, uma colônia isolada de *Z. mobilis* ZM4 foi cultivada a 30°C e 100 rpm em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose inicial por 24 horas. Em seguida, esse cultivo foi utilizado para o inóculo em 100 mL de meio RM nas mesmas condições anteriores e OD_{600nm} inicial de 0,05. Essa cultura foi acompanhada até o OD_{600nm} de 0,60, quando as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min a 4°C. Depois, as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v),

MATERIAIS E MÉTODOS

incubadas por 15 min a 4°C e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de glicerol 10% (v/v) e incubadas por 30 min a 4°C. Aliquotas de 100 µL desse sistema foram incubadas com 1,0 µg de DNA plasmidial (10,0 µg foram utilizados para os sistemas de deleção) por 30 min no gelo. Esse sistema foi colocado em cubetas de 0,2 cm (BioRad) e submetido a corrente elétrica em eletroporador da BioRad nas seguintes condições: 12,5 mV/cm, 25 µF e 200 Ω. Após o choque, o sistema foi incubado com 1 mL de meio RM por 4 horas a 30°C e 100 rpm. Após a recuperação, as células foram semeadas em placas com meio RM sólido com o antibiótico apropriado e incubadas até 96 horas a 30°C. A eficiência foi calculada como o valor médio de colônias formadas em pelo menos três eventos independentes de transformação com 1 µg de DNA em cada.

3.4.24. Análises da linhagem ZM4_Δ994

Todos os experimentos de crescimento com a linhagem ZM4_Δ994 foram realizados em 1,0 mL de meio RM com 20 g/L de glicose (ou 160 g/L no ensaio específico), em placas de 24 poços com a superfície que repele as células (CELLSTAR®). As placas foram incubadas em um espectrofotômetro de microplacas (EPOCH™ – BioTek) a 30°C (ou 39°C no ensaio específico), com agitação de 237 cpm e a leitura de absorbância a 600nm a cada uma hora de intervalo. O inóculo inicial foi feito para uma OD_{600nm} igual a 0,01 a partir de uma cultura de *Z. mobilis* crescida previamente por 24h em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose, a 30°C e 100 rpm. A suplementação com etanol, furfural ou hidroximetil-furfural (HMF) foi feita no exato momento do início do experimento. Todos os experimentos foram feitos com cinco colônias isoladas independentes de cada linhagem.

O experimento de tolerância ao etanol com a linhagem ZM4_Δ994 foi realizado com uma cultura de *Z. mobilis* ZM4 ou ZM4_Δ994 crescida em frasco com 5 mL de meio RM 20 g/L de glicose, a 30°C e 100 rpm por 24 horas. Em seguida, essa cultura foi utilizada para um inóculo em 5 mL de meio RM 20 g/L de glicose, a 30 °C e 100 rpm com OD_{600nm} inicial igual a 1,0 e o suplemento de etanol nas concentrações de 0 g/L, 100 g/L, 110 g/L, 120 g/L, 130 g/L e 140 g/L. Após 24h de incubação, 3 alíquotas de cada cultura foram diluídas e semeadas em placas com meio RM sólido e incubadas por 96 horas a 30°C. Todas as colônias foram contadas e a média usada para o cálculo do CFC

MATERIAIS E MÉTODOS

(Células formadoras de colônias). Todas as culturas foram feitas com três colônias isoladas independentes de cada linhagem e repetido duas vezes.

3.4.25. Análises das linhagens que expressam os fatores transcricionais sigma 24, sigma 32 e sigma 70.

3.4.25.1. Quantificação da expressão gênica

As linhagens ZM4_pB1, ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 foram cultivadas em 100 mL de meio RM com 20 g/L de glicose e 100 µg/mL de cloranfenicol a 30°C e 100 rpm até atingir o início da fase exponencial de crescimento ($OD_{600nm} = 1,0$). Nesse ponto, o RNA total foi extraído de todas as linhagens e utilizado para as análises por qRT-PCR. Todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados para amplificar aproximadamente 100 pb da região interna do mRNA alvo. O RNA ribossomal 16S, codificado pelo gene ZMOr003 de *Z. mobilis* ZM4, foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade inicial de RNA em cada amostra. A eficiência da reação de cada par de *primers* foi calculada a partir de uma curva construída com diferentes concentrações de RNA molde (Anexo 6) e o método $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado para a quantificação relativa do mRNA alvo da linhagem teste (ZM4_p70, ZM4_p24 ou ZM4_p32) em relação à linhagem controle (ZM4_pB1). Os cultivos foram feitos com três colônias independentes de cada cultura e as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicata técnica.

3.4.25.2. Análise do perfil de proteínas

As linhagens ZM4_pB1, ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 foram cultivadas em 100 mL de meio RM com 20 g/L de glicose e 100 µg/mL de cloranfenicol a 30°C e 100 rpm até atingir o meio da fase exponencial de crescimento ($OD_{600nm} = 1,5$). Nesse ponto, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 10000 x g por 5 min. Em seguida, as proteínas intracelulares foram extraídas com o Kit *B-Per* (*ThermoScientific*), quantificadas pelo método de Bradford e analisadas por SDS-PAGE. As proteínas do sobrenadante das culturas foram precipitadas com TCA e analisadas também por SDS-PAGE.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.25.3. Análises de resposta aos estresses

Todos os experimentos de crescimento com as linhagens ZM4_pB1, ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 foram realizados em 1,0 mL de meio RM com 20 g/L de glicose (ou 160 g/L no ensaio específico), em placas de 24 poços com a superfície não aderente (CELLSTAR®). As placas foram incubadas em um espectrofotômetro de microplacas (EPOCH™ – BioTek) a 30°C (ou 39°C no ensaio específico), com agitação de 237 cpm e a leitura de absorbância a 600 nm a cada uma hora de intervalo. O inóculo inicial foi feito para uma OD_{600nm} igual a 0,01 a partir de uma cultura de *Z. mobilis* crescida previamente por 24h em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose, a 30°C e 100 rpm. A suplementação com etanol (50 g/L) foi feita no exato momento do início do experimento específico. Todos os experimentos foram feitos com cinco colônias isoladas independentes de cada linhagem. A distribuição das linhagens nas placas está no anexo 8.

3.4.25.4. Análises por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os experimentos por DCCR foram construídos baseados em duas variáveis (etanol e temperatura) e uma resposta (produção de biomassa após 10 horas de cultivo) para gerar uma superfície de resposta quadrática (RODRIGUES; LEMMA, 2014) em duas concentrações de glicose diferentes (20 g/L e 160 g/L). A matriz com os parâmetros utilizados para etanol e temperatura estão na tabela 7.

Todos os pontos experimentais foram realizados com 5 colônias independentes de cada linhagem e em cada repetição o ponto central foi feito em quadruplicata biológica. Tanto o planejamento quanto a análise dos dados experimentais foram feitos com o programa *Protimiza Experimental Design* (RODRIGUES; COSTA, 2018).

As condições de cultivo celular foram as mesmas descritas no tópico “4.4.24.3.”, com a temperatura e a concentração de etanol variando de acordo com a matriz planejada (tabela 7), e o inóculo inicial com OD_{600nm} igual a 0,10. O cálculo de biomassa foi baseado no método proposto por Kim (2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 7. Matriz de Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional

Variáveis	Valores da Matriz				
	-1,41	-1,00	0,00	+1,00	+1,41
Etanol (g/L)	1,72	10,00	30,00	50,00	58,28
Temperatura (°C)	28,34	30,00	34,00	38,00	39,66

3.4.25.5. Análises da fermentação em frasco

Uma colônia isolada das linhagens ZM4_pB1, ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 foi inoculada em 5 mL de meio RM com 20 g/L de glicose e 100 µg/mL de cloranfenicol e incubada a 30°C, 100 rpm por 24h. Em seguida, essa cultura foi utilizada para um inóculo com absorbância inicial de 0,10 (600 nm) em frascos de 250 mL com 100 mL de meio RM suplementado com 100 g/L de glicose e 100 µg/mL de cloranfenicol e foi incubada a 30°C e 100 rpm por 24h. A cada duas horas, 1 mL de amostra foi coletado para análise. Esse experimento foi realizado em triplicata biológica para cada uma das linhagens estudadas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do perfil de crescimento e produção de *Z. mobilis* ZM4

A primeira etapa deste trabalho teve o objetivo de caracterizar o perfil de crescimento, tolerância e produção de etanol por *Z. mobilis* ZM4. Para tanto, uma curva de crescimento foi realizada em 7 diferentes concentrações de glicose durante 24h. Neste experimento, foi medido o crescimento celular (Figura 2) e as concentrações de glicose (Figura 3) e etanol (Figura 4) no sobrenadante da cultura.

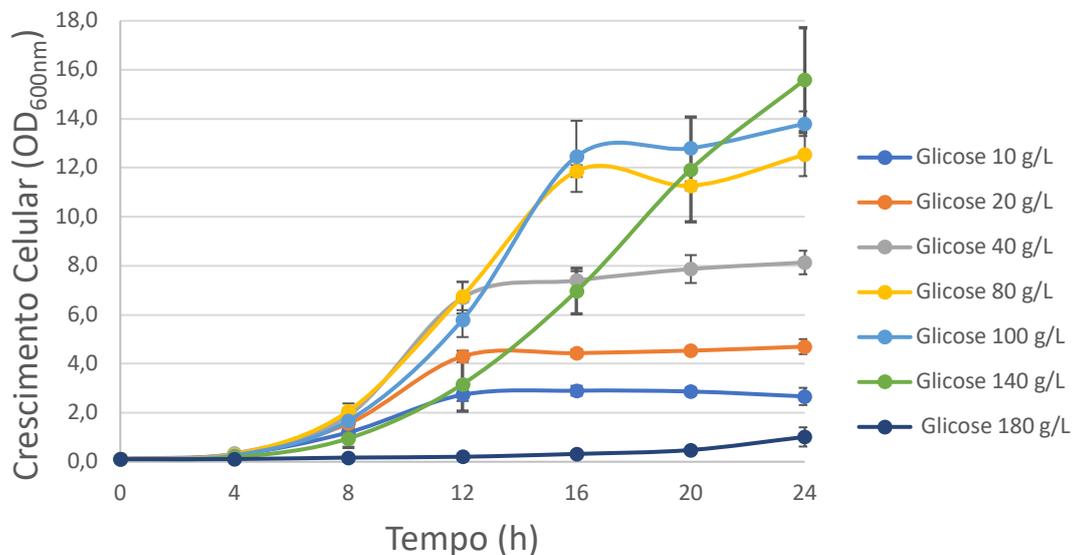


Figura 2. Curva de crescimento de *Z. mobilis* ZM4 em diferentes concentrações iniciais de glicose. O crescimento foi realizado em meio RM a 30°C com 100 rpm de agitação. A absorbância a 600 nm foi medida a cada 4h durante 24h. As cores representativas para a curva de cada concentração inicial de glicose estão dispostas na figura. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

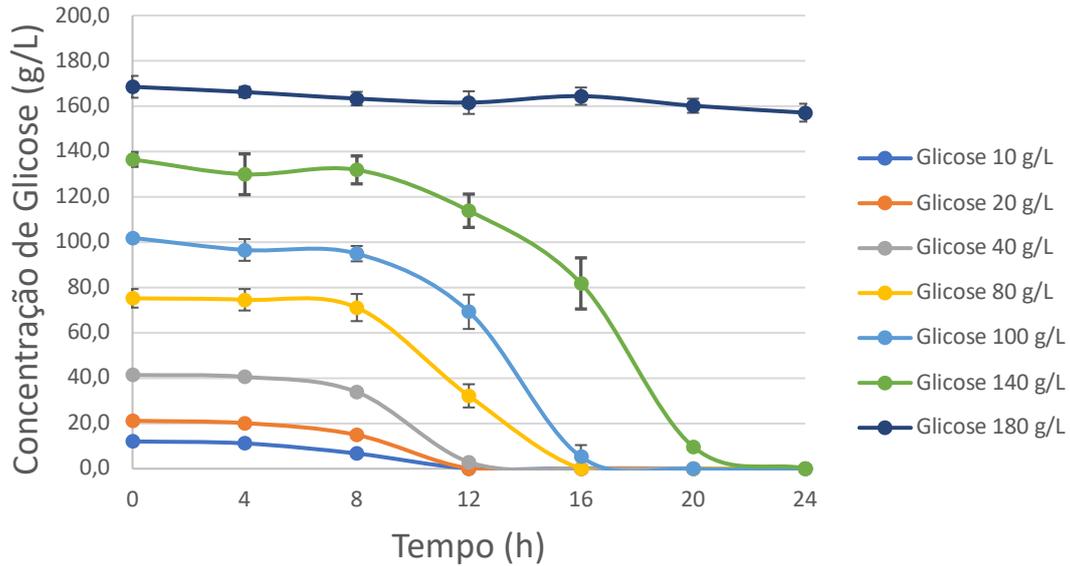


Figura 3. Consumo de glicose por *Z. mobilis* ZM4 durante cultivo em diferentes concentrações iniciais de glicose. O crescimento foi realizado em meio RM a 30°C com 100 rpm de agitação. A concentração de glicose no sobrenadante da cultura foi medida a cada 4h durante 24h. As cores representativas para a curva de cada concentração inicial de glicose estão dispostas na figura. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

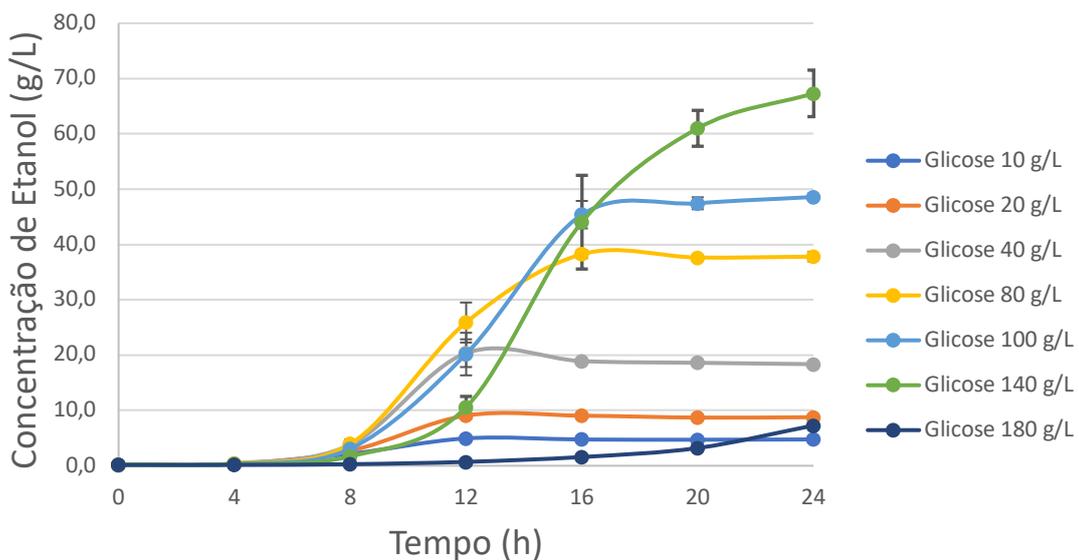


Figura 4. Produção de etanol por *Z. mobilis* durante cultivo em diferentes concentrações iniciais de glicose. O crescimento foi realizado em meio RM a 30°C com 100 rpm de agitação. A concentração de etanol no sobrenadante da cultura foi medida a cada 4h durante 24h. As cores representativas para a curva de cada concentração inicial de glicose estão dispostas na figura. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

Nas condições analisadas, a concentração de glicose de 180 g/L foi inibitória para o crescimento em 24h. Este efeito foi reduzido na concentração de 140 g/L e inexistente em concentrações inferiores. Em todas as culturas, a glicose disponível foi consumida antes de 24h, exceto na cultura de 180 g/L. Os dados de crescimento e rendimento estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8. Taxa de crescimento e rendimento fermentativo das culturas de *Z. mobilis* em diferentes concentrações iniciais de glicose.

Concentração inicial de Glicose (g/L)	Taxa de Crescimento Específico - μ (h^{-1}) ^a	Glicose consumida (g)	Etanol Produzido (g)	Rendimento (g/g) ^b
10	0,272 +/- 0,004	1,195 +/- 0,003	0,462 +/- 0,015	0,386 +/- 0,012
20	0,336 +/- 0,028	2,110 +/- 0,007	0,863 +/- 0,018	0,409 +/- 0,009
40	0,353 +/- 0,013	4,131 +/- 0,002	1,827 +/- 0,023	0,442 +/- 0,006
80	0,365 +/- 0,013	7,514 +/- 0,006	3,765 +/- 0,149	0,501 +/- 0,020
100	0,387 +/- 0,007	10,182 +/- 0,008	4,844 +/- 0,112	0,476 +/- 0,011
140	0,329 +/- 0,025	13,639 +/- 0,002	6,715 +/- 0,728	0,492 +/- 0,053
180	0,105 +/- 0,010	1,141 +/- 0,683	0,712 +/- 0,141	0,623 +/- 0,124

^aTaxa de crescimento celular durante a fase exponencial. ^bRendimento de etanol produzido em relação à glicose consumida.

Nenhuma cultura atingiu concentrações de etanol que fossem inibitórias ao crescimento de *Z. mobilis*. Desta forma, um novo experimento, com uma maior quantidade de glicose, foi realizado para analisar qual é o valor máximo de etanol que essa bactéria consegue produzir.

Neste experimento, a concentração inicial de 100 g/L de glicose foi utilizada e, após 10h de cultivo, a cultura foi alimentada periodicamente com mais glicose até completar 36h de crescimento (Figura 5). A concentração máxima de etanol obtida foi de 115,28 +/- 2,62 g/L. Ao final do cultivo, alíquotas da cultura foram plaqueadas em meio RM, mas não houve crescimento, comprovando que esta concentração de etanol tornou as células de *Z. mobilis* inviáveis.

RESULTADOS

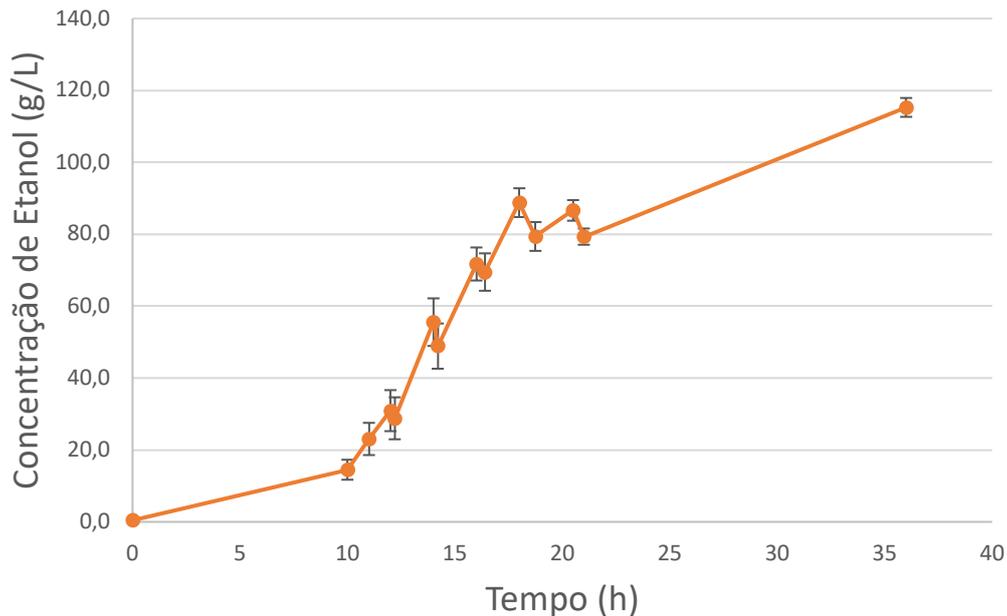


Figura 5. Produção de etanol por *Z. mobilis* ZM4 em cultivo alimentado por 36h. A partir de 10h de cultivo, 10% da cultura foi substituída por meio RM com 500 g/L de glicose a cada 2h em um total de seis vezes. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

Estabelecida a concentração máxima de etanol que *Z. mobilis* ZM4 pode produzir nas condições analisadas, foi realizado um experimento para caracterizar os efeitos causados pela presença de etanol no meio de cultura sobre o crescimento desta bactéria. Para tal, diferentes concentrações iniciais de etanol foram adicionadas ao meio de cultura no momento do inóculo das células (Figura 6).

Neste ensaio, foi observado que a partir de 50 g/L de etanol no meio de cultura já ocorre inibição no crescimento celular, enquanto 80 g/L de etanol inibe completamente o crescimento. Após 36h de cultivo, alíquotas foram plaqueadas em meio RM e todas as culturas continham células vivas.

RESULTADOS

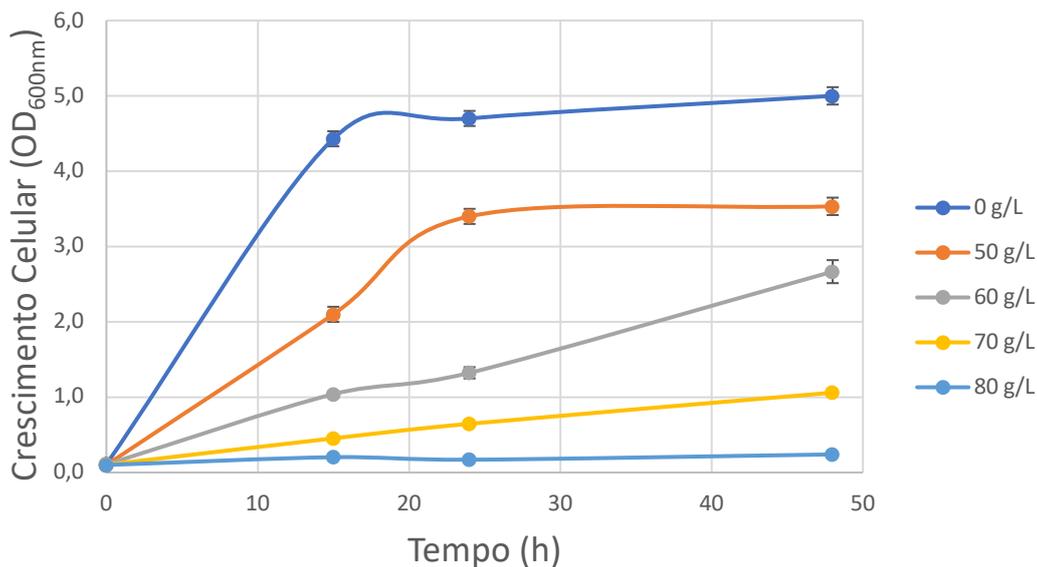


Figura 6. Curva de crescimento de *Z. mobilis* em diferentes concentrações iniciais de etanol. O crescimento celular foi medido durante 48h. As cores representativas para a concentração inicial de etanol em cada curva estão dispostas na figura. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

Como a concentração atingida durante a produção de etanol foi muito superior ao limite encontrado para o crescimento das células na presença de etanol exógeno, foi sugerido que algum sistema de adaptação tenha sido ativado para que as células cresçam em concentrações superiores de etanol. Para testar essa hipótese, a cultura crescida com 50 g/L de etanol foi utilizada como pré-inóculo para uma nova cultura com 60 g/L de etanol e após 36h de cultivo, esta foi utilizada como pré-inóculo para uma nova cultura com 70 g/L de etanol. Mas não houve qualquer diferença no crescimento das culturas que foram previamente tratadas com etanol em comparação com as culturas sem tratamento prévio.

Essa evidência sugere que a elevada tolerância ao etanol quando as próprias células o produzem, está ligada à produção do etanol e não à presença de etanol no ambiente extracelular.

A partir dessa caracterização inicial do perfil de crescimento e tolerância ao etanol de *Z. mobilis* ZM4, as próximas etapas foram realizadas para analisar mecanismos específicos de resposta ao estresse fermentativo nesta bactéria.

RESULTADOS

4.2. Análises da resposta de *Z. mobilis* ao Autoindutor-2

Com o indicativo de que *Z. mobilis* responde à molécula de *quorum sensing* AI-2 aumentando a produção e a tolerância a etanol, foram realizados experimentos para confirmar essas informações. No estudo original (YANG, 2011), a resposta de *Z. mobilis* ao AI-2 foi identificada quando esta foi cultivada com o sobrenadante de cultura de *E. coli* KX1123, uma linhagem produtora de AI-2 (XAVIER; BASSLER, 2005), mas o método utilizado não permitiu uma conclusão definitiva sobre a existência desse efeito e nem se o AI-2 é realmente o fator responsável (YANG, 2011). Sendo assim, neste trabalho foi proposto utilizar uma versão purificada do AI-2 para testar essa hipótese. Mas como não existe um método determinado para purificar o AI-2 diretamente, foi utilizado um procedimento para sintetizá-lo enzimaticamente (WINZER et al., 2002).

O processo para sintetizar o AI-2 enzimaticamente é a partir da conversão de S-adenosil-homocisteína (SAH) até AI-2 pela ação de duas enzimas: *LuxS* e *Psf* (S-adenosilhomocisteína nucleosidase). Para tal, essas enzimas foram produzidas de forma heteróloga em duas linhagens de *E. coli* BL21 (pProEx_LuxS e pProEx_HTmtan) e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺². O resultado da purificação foi analisado em SDS-PAGE (Figura 7).

Em seguida, as enzimas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e utilizadas para a reação de síntese do AI-2 segundo o protocolo estabelecido (WINZER et al., 2002).

Após a reação de síntese do AI-2, foi necessário quantificá-lo e testar a sua atividade, mas como não existe um método estabelecido para a quantificação absoluta do AI-2, foi realizado um ensaio colorimétrico baseado na redução de Fe (III) (WATTANAVANITCHAKORN; PRAKITCHAIWATTANA; THAMYONGKIT, 2014) para uma quantificação aproximada e depois foi realizado o ensaio com o *Vibrio harveyi* BB170 para a confirmação da atividade do AI-2 (Figura 8).

RESULTADOS

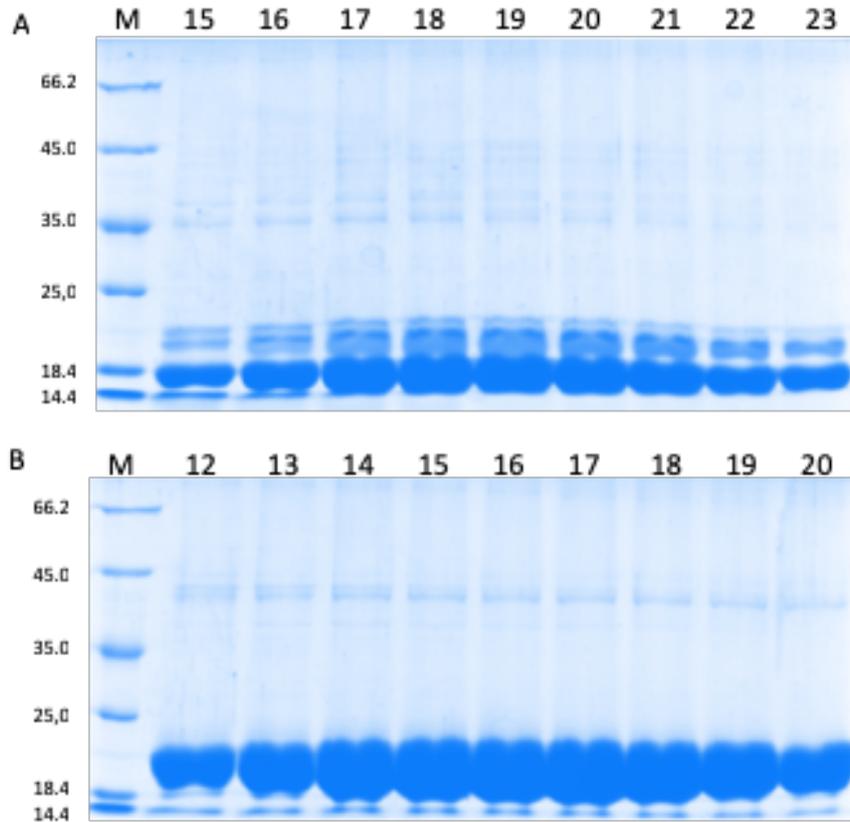


Figura 7. Frações purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Ni^{+2} das proteínas LuxS (A) e Psf (B) em gel desnaturante de Poliacrilamida 12%, corado com Comassie Blue Coloidal. Nas figuras estão indicados os números das frações coletadas em um gradiente de Imidazol de 20 a 200 mM, de um total de 23 frações. A enzima LuxS (A) é uma proteína de 18 kDa e a enzima Psf (B) de 21 kDa. **M** – o marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher), com os valores das bandas em kDa.

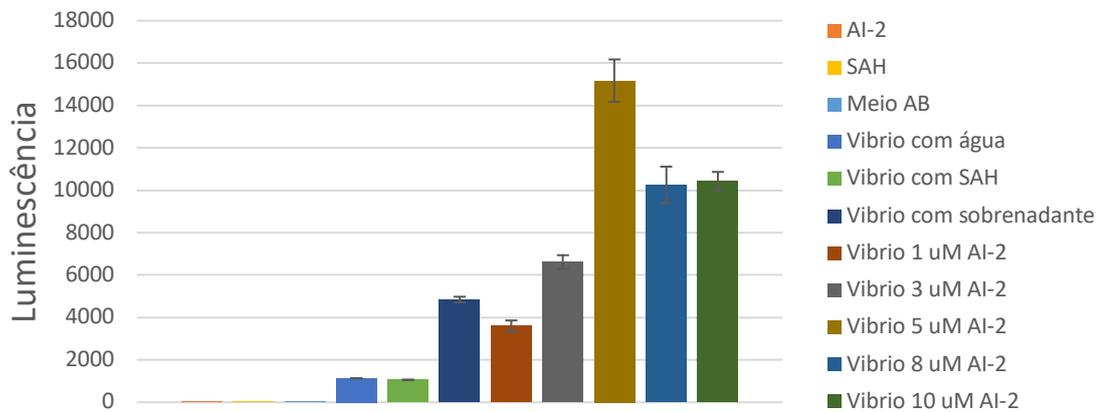


Figura 8. Bioluminescência da bactéria *Vibrio harveyi* BB170 na presença de diferentes concentrações de AI-2. Foram utilizados como controle o AI-2 isolado, o SAH isolado, o Meio AB e o *V. harveyi* em água, com 4 mM do SAH e no sobrenadante da sua própria cultura. As concentrações de AI-2 variaram entre 1 μM e 10 μM . A legenda com as cores de cada amostra está disposta na figura. O experimento foi realizado em triplicata biológica. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

Com o AI-2 sintético comprovadamente funcional em *V. harveyi* BB170, o ensaio com *Z. mobilis* foi realizado para avaliar o perfil de produção e tolerância ao etanol na presença do AI-2 (Figura 9).

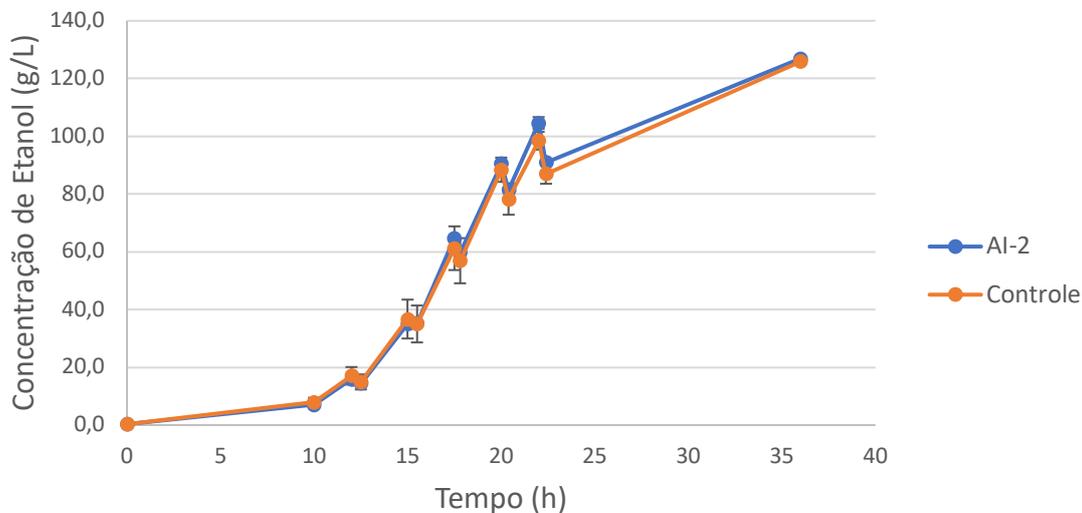


Figura 9. Produção de etanol por *Z. mobilis* em cultivo alimentado por 36h na presença de AI-2. Após 10h de cultivo, 10% da cultura foi substituída por meio RM contendo 500 g/L de glicose a cada 2h em um total de seis alimentações. Durante a primeira alimentação foi adicionado AI-2 para a concentração final de 10 μ M e no controle foi adicionado apenas o tampão do AI-2. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

O perfil da curva de produção de etanol neste experimento corresponde ao perfil observado anteriormente (Figura 5), validando a reprodutibilidade deste ensaio. Como em nenhum ponto há diferença significativa entre a cultura estimulada pelo AI-2 e a cultura sem o estímulo, este experimento sugere que *Z. mobilis* não responde ao AI-2 sintético. Por esta razão, foi decidido refazer o experimento original com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123 nas mesmas condições (YANG, 2011). Nesse experimento, uma cultura de *Z. mobilis* ZM4 foi cultivada em meio RM com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123 na proporção de 1:1 (v/v) por 16h. Como controles negativos, o mesmo procedimento foi realizado com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1218 (versão mutante que não produz AI-2) e com o meio de cultura puro. Amostras foram retiradas para a quantificação de etanol ao longo do experimento (Figura 10) e ao final, o extrato de proteínas intracelulares foi analisado em SDS-PAGE (Figura 11).

RESULTADOS

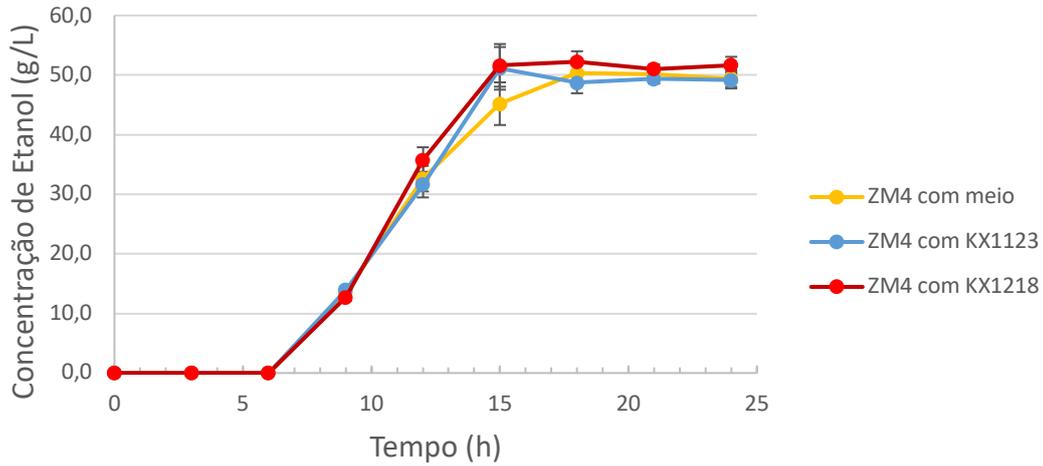


Figura 10. Produção de etanol por *Z. mobilis* induzida com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123. Uma cultura controle sem indução e outro controle induzido com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1218 foram usados para comparação. Todas as culturas foram realizadas em triplicatas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

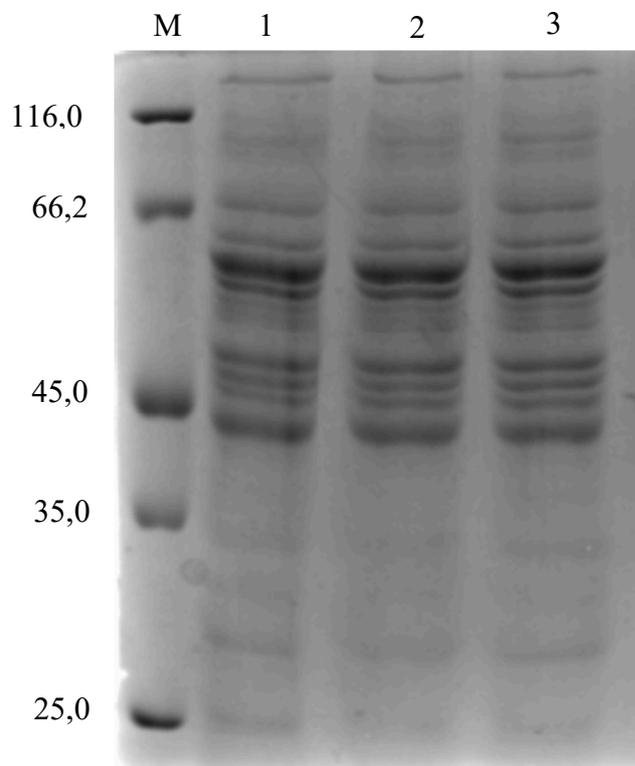


Figura 11. Extrato de proteínas intracelulares da linhagem ZM4 de *Z. mobilis* após 16h de cultivo e indução em gel desnaturante de Poliacrilamida 12%, corado com Comassie Blue Coloidal. **1** – ZM4 induzida apenas com meio de cultura. **2** – ZM4 induzida com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1123. **3** – ZM4 induzida com o sobrenadante da cultura de *E. coli* KX1218. **M** – o marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher), com os valores das bandas em kDa.

RESULTADOS

Nenhuma resposta diferencial foi encontrada tanto em relação à produção de etanol, quanto à produção de proteínas intracelulares visíveis em gel de poliacrilamida. Esses experimentos indicam que o AI-2 não induz qualquer modificação na resposta ao estresse fermentativo, ou na produção de etanol em *Z. mobilis* ZM4, contrariando os resultados obtidos por Yang (2011).

Dessa forma, os estudos em relação ao AI-2 foram encerrados e as outras abordagens para analisar os mecanismos de resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* continuaram sendo desenvolvidos.

RESULTADOS

4.3. Padronização de técnicas e ferramentas para a manipulação genética de *Z. mobilis*

A manipulação genética de *Z. mobilis* ainda não é totalmente estabelecida, existindo uma quantidade relativamente baixa de opções de plasmídeos replicativos e de métodos de transformação eficientes (CAO et al., 2016; DONG et al., 2011; JEON; SVENSON; ROGERS, 2005; ZOU et al., 2011, 2012). Logo, para o desenvolvimento deste projeto, foi necessário analisar e estabelecer as condições adequadas para transformar *Z. mobilis* de forma eficiente, e ainda obter um plasmídeo que fosse replicativo e estável.

Os plasmídeos da série pBBR1MCS (KOVACH et al., 1994, 1995) foram escolhidos por apresentarem uma origem de replicação inespecífica com alta estabilidade em *Z. mobilis* (DONG et al., 2011; ZOU et al., 2011, 2012). Os plasmídeos pBBR1MCS (resistência a cloranfenicol) e pBBR1MCS-2 (resistência a canamicina) foram testados com um cassete de expressão sintético contendo o gene repórter *AmyE* de *Bacillus subtilis* e o promotor e terminador do gene da piruvato descarboxilase (*pdC*) de *Z. mobilis*, gerando os vetores pB1_Amy e pB2_Amy (Figura 12). A região codificadora do gene da α -amilase foi otimizado para a expressão em *Z. mobilis* ZM4. Para possibilitar a secreção da enzima, o peptídeo sinal da proteína ZMO0130 de *Z. mobilis* foi fusionado à região 5' do gene da amilase (WANG et al., 2012). Após a síntese, os plasmídeos finais foram sequenciados (Anexo 3). Apesar de não existirem estudos comparativos específicos sobre promotores de *Z. mobilis*, o promotor e o terminador *pdC* são os mais utilizados e apresentam elevada atividade (CONWAY et al., 1987).

Um dos maiores problemas para a transformação de *Z. mobilis* é a presença de um sistema de restrição endógeno que degrada o DNA introduzido (KERR et al., 2011). Como o reconhecimento do plasmídeo pelo sistema de restrição está associado ao padrão de metilação do DNA, os vetores pB1_Amy e pB2_Amy foram transformados na linhagem de *E. coli* JM110, que não modifica o DNA com metilações, para diminuir a taxa de degradação (ZOU et al., 2012).

RESULTADOS

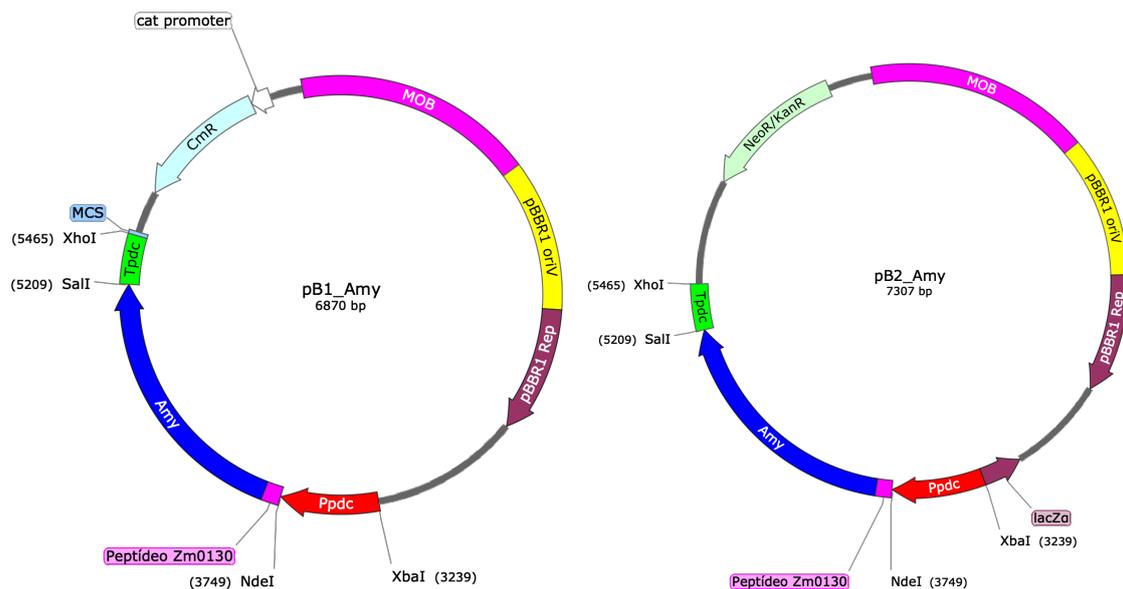


Figura 12. Mapa dos plasmídeos pB1_Amy e pB2_Amy, baseados nos plasmídeos pBBR1MCS e pBBR1MCS-2. **Amy** – gene sintético otimizado da α -amilase (*AmyE*) de *Bacillus subtilis*; **MOB** – Sequência de mobilidade; **MCS** – Sítios múltiplos de clonagem; **CmR** – gene da enzima cloranfenicol acetiltransferase; **KanR** – gene de resistência a kanamicina; **Ppdc** – Promotor do gene da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*; **TpdC** – Terminador do gene da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*; **pBBR1 oriV** e **Rep** – Origens de replicação do pBBR1MCS.

Após a passagem por *E. coli* JM110, os vetores pB1_Amy e pB2_Amy foram transformados por eletroporação em *Z. mobilis* ZM4 segundo adaptações do protocolo mais recente proposto (ZOU et al., 2012) e apresentaram eficiência de transformação aproximadamente igual a 5×10^3 colônias e 9×10^3 colônias por μg de DNA, respectivamente. Em seguida, algumas colônias transformadas foram selecionadas para o crescimento em placas com meio contendo amido e todas apresentaram halo de hidrólise (Figura 13).

Com esse resultado, fica estabelecido um sistema eficiente de transformação de *Z. mobilis*, além de garantida a funcionalidade do sistema de expressão montado nos plasmídeos pBBR1MCS, com o promotor e o peptídeo sinal ativos. Essas ferramentas serão utilizadas nas próximas etapas para os estudos dos mecanismos de resposta à estresse em *Z. mobilis* ZM4.

RESULTADOS



Figura 13. Clones de *Z. mobilis* transformados com os plasmídeos pB1_Amy (1 e 2), pB2_Amy (3 e 4), pBBR1MCS (C1 e C2) e pBBRMCS-2 (C3 e C4) em placa com meio RM (contendo 1% de Amido) corado com vapor de Iodo após 24h de crescimento.

RESULTADOS

4.4. Análise da relação da proteína ZMO0994 com a resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* ZM4

4.4.1. Deleção do locus ZMO0994 de *Z. mobilis* ZM4

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética específicas para *Z. mobilis* permitiu que a análise de genes e proteínas relacionados à resposta ao estresse fermentativo fossem conduzidas. A primeira análise realizada foi com a proteína hipotética ZMO0994. Esta proteína apresenta homologia ao grupo de proteínas LEA de plantas, tradicionalmente relacionadas à resposta ao estresse hídrico. Há indicativos de que a sua expressão é aumentada em *Z. mobilis* na presença de etanol (comunicação pessoal). Por esta razão, foi proposto um sistema de deleção do locus gênico que codifica essa proteína em *Z. mobilis* ZM4.

Um vetor para a recombinação homóloga foi montado com 674 pb da região 5' e 672 bp da região 3' do gene ZMO0994 flanqueando o gene de resistência a cloranfenicol. Para a montagem do vetor, o DNA genômico de *Z. mobilis* ZM4 foi extraído e utilizado como molde para amplificação dos fragmentos de homologia por PCR (Figura 14). O gene de resistência ao cloranfenicol também foi amplificado por PCR a partir do vetor pBBR1MCS. O plasmídeo pGEM-T (PROMEGA) foi utilizado como base para a construção do vetor. Os três fragmentos amplificados mais o plasmídeo linear foram ligados com o sistema In-Phusion (CLONTECH, 2012) e transformados em *E. coli* DH5a, formando o vetor pKO0994 (Figuras 15 e 16).

RESULTADOS

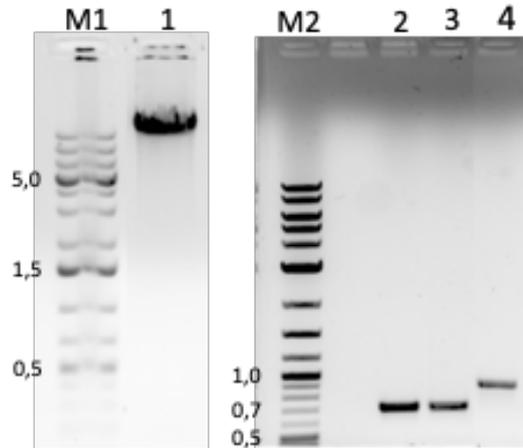


Figura 14. Análise eletroforética da extração de DNA genômico de *Z. mobilis* ZM4 e da amplificação dos fragmentos de homologia ao gene ZMO0994 por PCR. Eletroforese em Gel de Agarose 1% corado com brometo de etídeo. **M1** – Marcador GeneRuler 1 kb plus (Sigma-Aldrich). **M2** – Marcador 2-log DNA ladder (NEB). **1** – DNA genômico extraído de *Z. mobilis* ZM4. **2** – PCR da região 5' do gene ZMO0994 de *Z. mobilis* ZM4 (709 pb). **3** – PCR da região 3' do gene ZMO0994 de *Z. mobilis* ZM4 (707 pb). **4** – PCR do gene da cloranfenicol acetiltransferase (897 pb). Os tamanhos dos fragmentos dos marcadores estão indicados em kb.

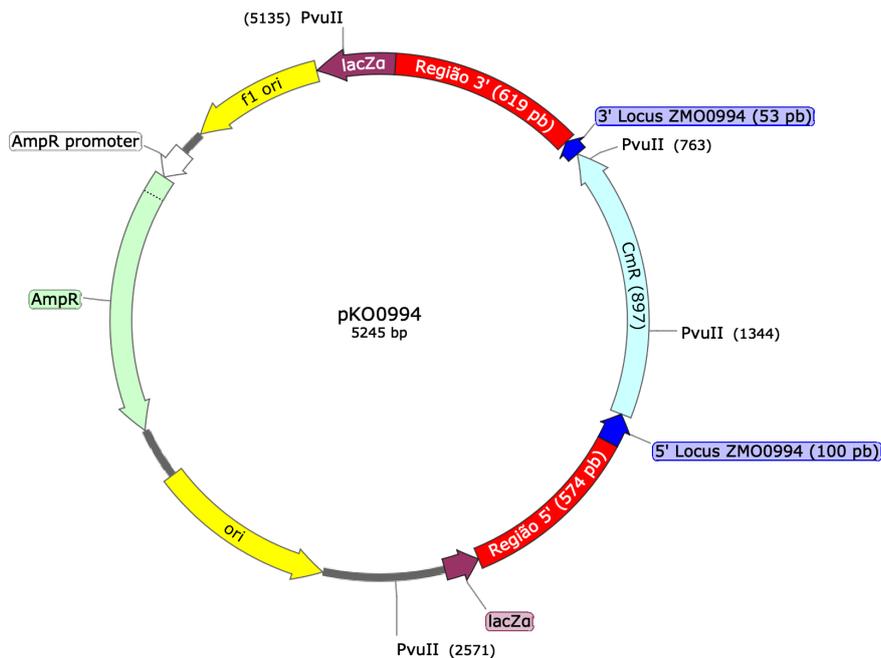


Figura 15. Mapa do vetor pKO0994, baseado no plasmídeo pGEM-T. **CmR** – Gene de resistência a Cloranfenicol. **Região 5'** e **5' Locus ZMO0994** – Sequência homóloga à região 5' do gene ZMO0994 (674 pb). **Região 3'** e **3' Locus ZMO0994** – Sequência homóloga à região 3' do gene ZMO0994 (672 pb). **Ori** e **F1 Ori** – Origens de replicação em *E. coli*. **AmpR** – Gene de resistência a Ampicilina. **lacZa** – Gene interrompido da Lactase.

RESULTADOS

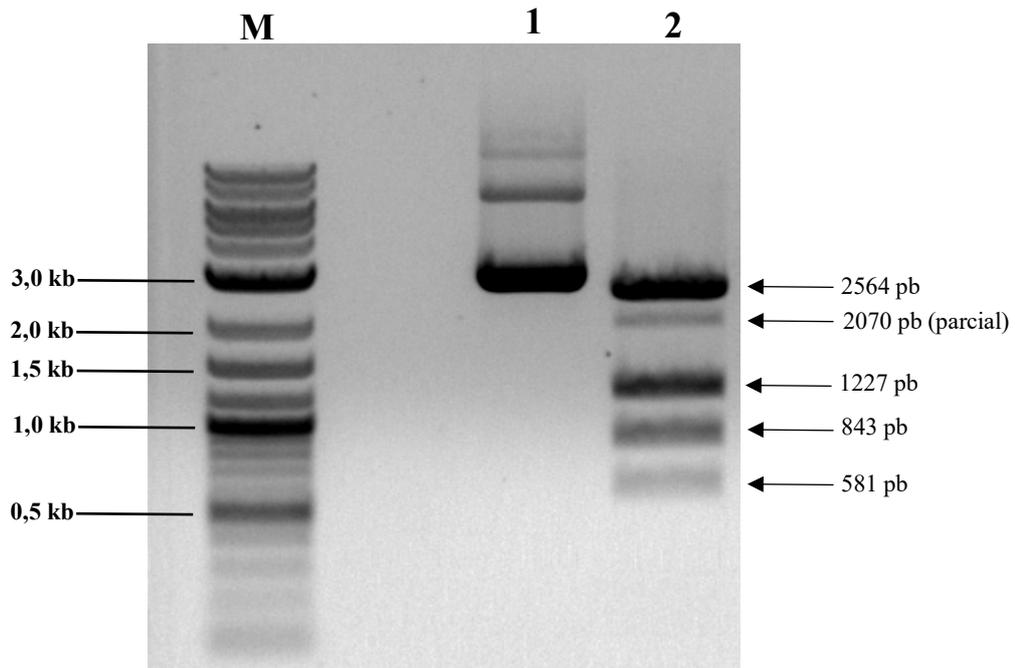
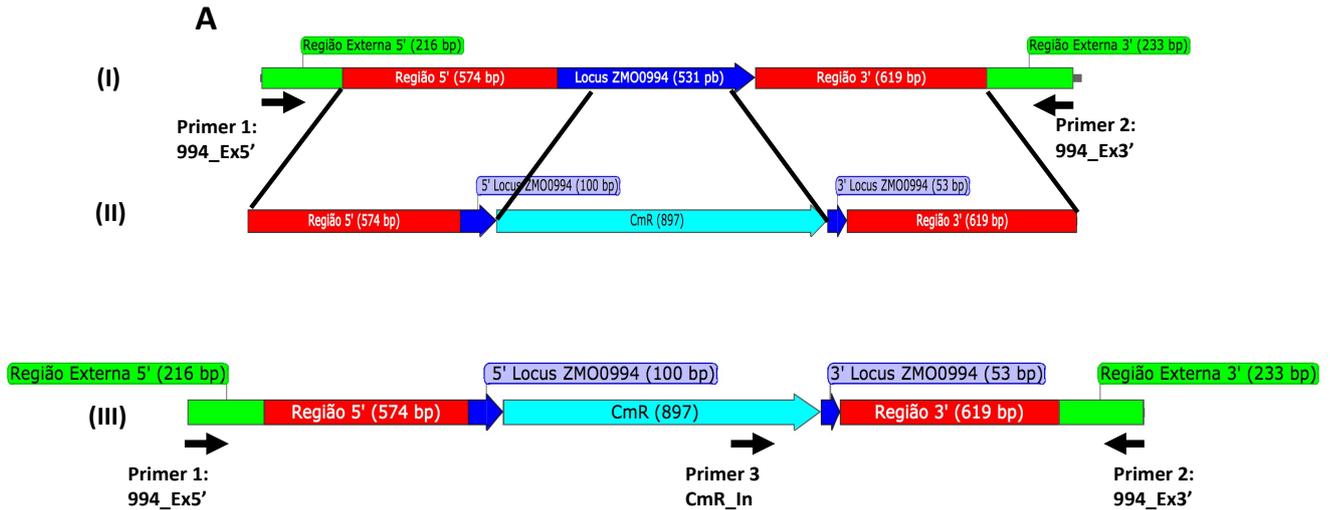


Figura 16. Análise eletroforética do perfil de restrição do vetor pKO0994 em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 – Plasmídeo intacto. 2 – Digestão do plasmídeo com a enzima *Pvu* II. M – Marcador de massa molecular 2-log (NEB), os valores referentes aos tamanhos dos fragmentos estão indicados na figura. As setas indicam o tamanho esperado para os fragmentos de DNA da digestão.

Caso ocorra a recombinação homóloga, 378 pb da região interna do *locus* ZMO0994 serão substituídos por 897 pb do gene de resistência ao cloranfenicol (Figura 17A). Como o pGEM-T não é replicativo em *Z. mobilis*, e alguns trabalhos demonstram a possibilidade de integração homóloga a partir do vetor intacto (ALEXEYEV, 1999; KERR et al., 2011; SENTHILKUMAR et al., 2004), foi realizada a transformação de *Z. mobilis* ZM4 por eletroporação com o plasmídeo circular após demetilação em *E. coli* JM110.

O clone transformante selecionado teve a deleção do *locus* ZMO0994 confirmada por PCR com a utilização de um par de primers externos ao *locus* de integração e uma combinação com um primer interno ao gene de resistência ao cloranfenicol (Figura 17). Com a deleção confirmada, a linhagem foi denominada *Z. mobilis* ZM4_Δ994.

RESULTADOS



B

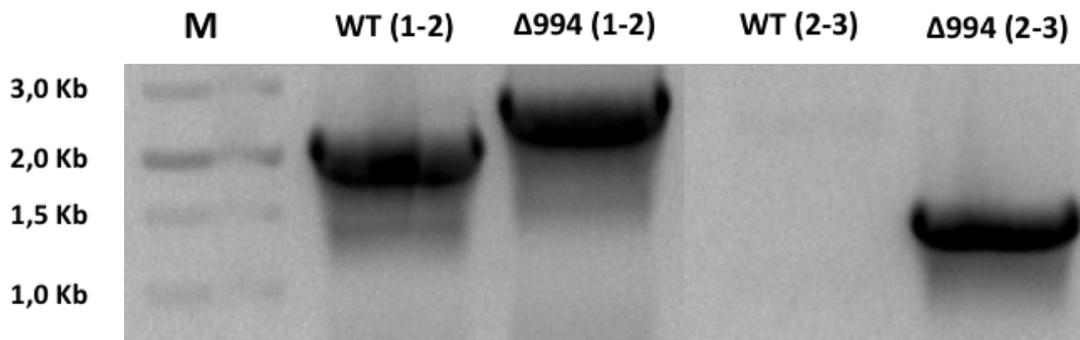


Figura 17. Deleção do *locus* ZMO0994 do genoma de *Z. mobilis* ZM4. (A) Esquema ilustrativo da recombinação homóloga no *locus* ZMO0994. Em (I) está representado o *locus* ZMO0994 nativo; Em (II) está representado o cassete de integração do plasmídeo pKO0994; Em (III) está representado o *locus* ZMO0994 após a interrupção por recombinação homóloga. O conjunto de primers usado para verificar a deleção está representado por setas pretas e números: (1) Primer 994_Ex5'; (2) Primer 994_Ex3'; (3) Primer CmR_In. (B) Eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos de PCR das linhagens ZM4_WT e ZM4_Δ994 com os pares de primers: 1-2 (WT – 2173 bp; Δ994 – 2773 bp) e 2-3 (WT – não reage; Δ994 – 1331 bp). **M** é o marcador de DNA 1Kb (SINAPSE, Brasil).

RESULTADOS

4.4.2. Análise da linhagem ZM4_Δ994 quanto à resposta ao estresse fermentativo.

Com a construção bem-sucedida da linhagem ZM4_Δ994, foi proposta a análise do crescimento dessa linhagem em condições de estresse térmico, estresse osmótico induzido por glicose e estresse de etanol. Desta forma, curvas de crescimento foram feitas com a incubação em leitor automático de placas por 24h nas 3 condições de estresse e na condição padrão de cultivo para a comparação com a linhagem selvagem (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Contrariando a premissa de que a proteína ZMO0994 é importante para a resposta ao estresse de etanol, foi observado um aumento na tolerância ao etanol e ao calor na linhagem deletada em relação à selvagem, sugerindo que essa proteína tenha um papel antagonico aos mecanismos de resposta ao estresse de etanol e temperatura.

Quanto ao estresse osmótico, a importância da proteína ZMO0994 foi evidenciada na diminuição da taxa de crescimento em condições de alta concentração de glicose que a linhagem ZM_Δ994 apresentou em relação à linhagem selvagem (Figura 21). Esse padrão é consistente com a hipótese de que a proteína ZMO0994 tenha um efeito similar em *Z. mobilis* ao efeito osmorregulador que o grupo de proteínas LEA apresenta em plantas.

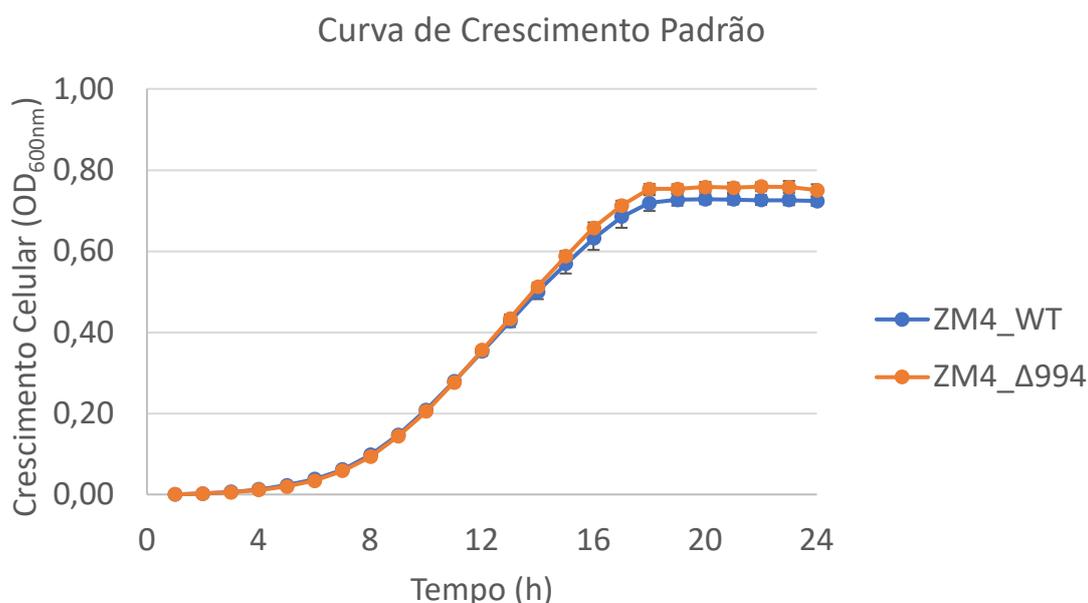


Figura 18. Curva de crescimento em condições padrões das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 2% de glicose, a 30°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado em cada ponto.

RESULTADOS

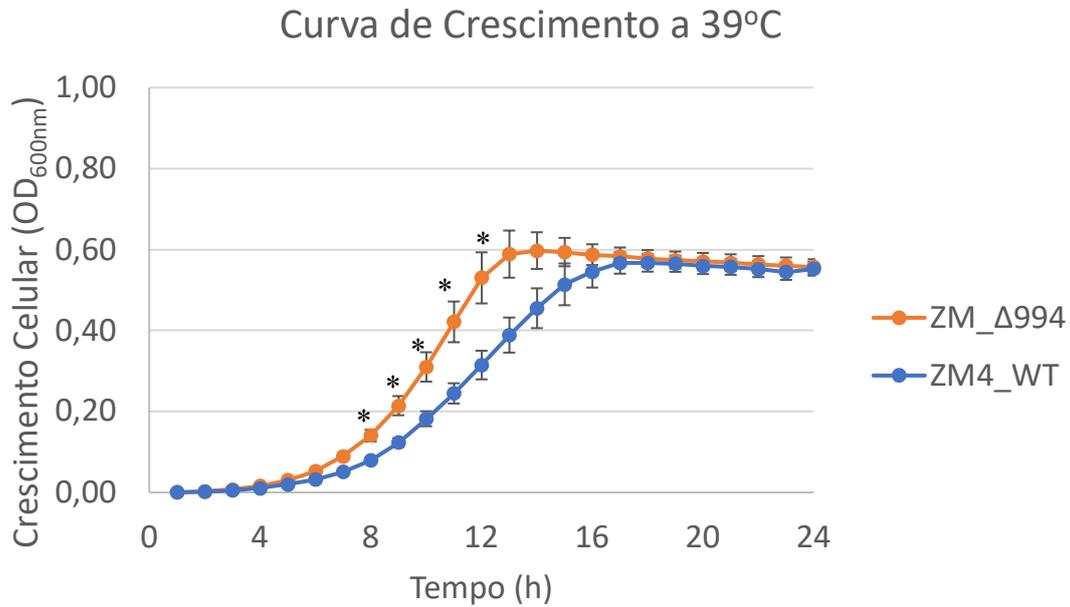


Figura 19. Curva de crescimento em condições de estresse de temperatura das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 2% de glicose, a 39°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto. *Nos pontos indicados, a diferença entre as duas linhagens é estatisticamente significativa em um teste t ponto-a-ponto ($p < 0,001$).

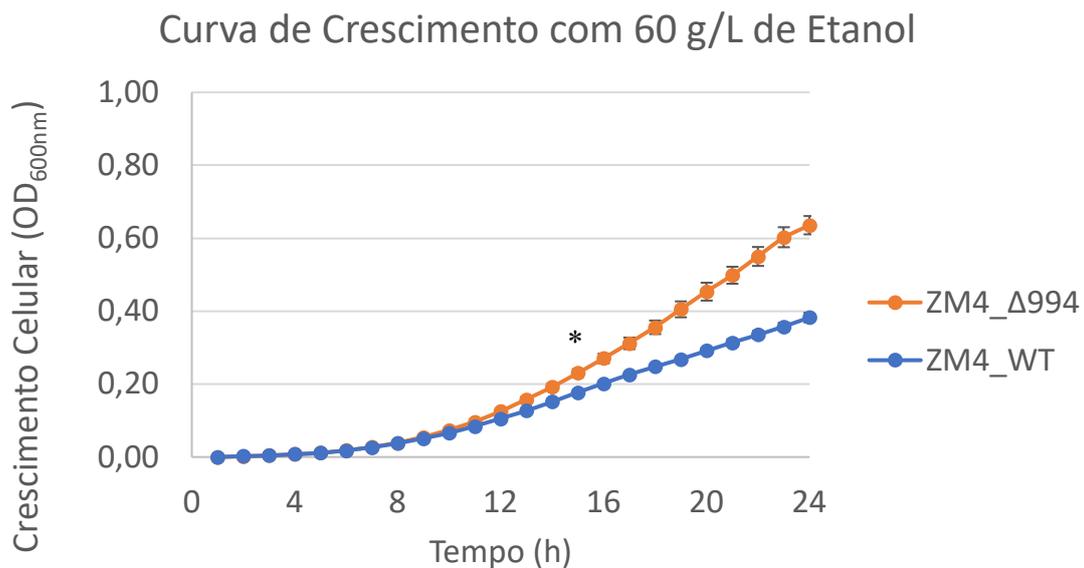


Figura 20. Curva de crescimento em condições de estresse de etanol das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 2% de glicose e 60 g/L de etanol, a 30°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto. *A partir deste ponto, a diferença entre as duas linhagens é estatisticamente significativa em um teste t ponto-a-ponto ($p < 0,001$).

RESULTADOS

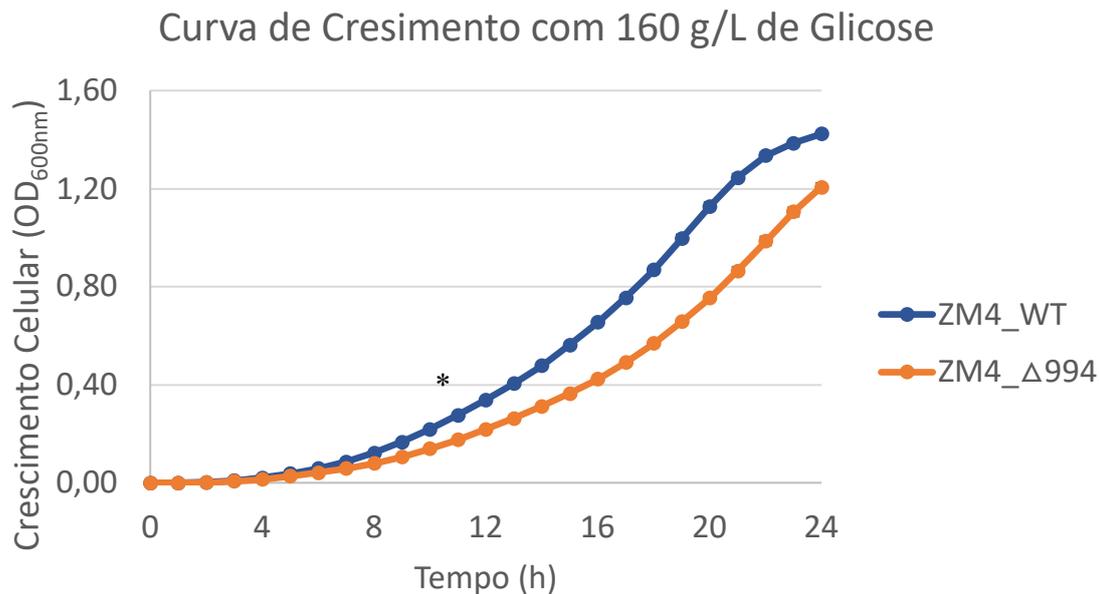


Figura 21. Curva de crescimento em condições de estresse osmótico das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 160 g/L de glicose, a 30°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto. *A partir deste ponto, a diferença entre as duas linhagens é estatisticamente significativa em um teste t ponto-a-ponto ($p < 0,001$).

Como o efeito na tolerância ao etanol, observado na linhagem ZM4_Δ994, foi oposto à premissa original, um segundo ensaio foi realizado para verificar o aumento na resposta ao etanol após a deleção do *locus* ZMO0994. Nesse ensaio, a viabilidade celular foi observada após culturas crescidas das linhagens ZM4_WT e ZM4_Δ994 serem expostas a diferentes concentrações de etanol por 24h (Figura 22).

Em concentrações de etanol superiores a 110 g/L, torna-se significativa a maior tolerância da linhagem ZM4_Δ994 em relação à selvagem. Esse efeito se contrapõe à redução da tolerância ao estresse osmótico observado nos experimentos anteriores, ratificando um possível antagonismo entre a resposta ao estresse de etanol e a resposta ao estresse osmótico em *Z. mobilis* ZM4. Apesar dos indícios observados nos experimentos, ainda não é possível descrever o mecanismo de atuação da proteína ZMO0994 na resposta aos estresses estudados.

RESULTADOS

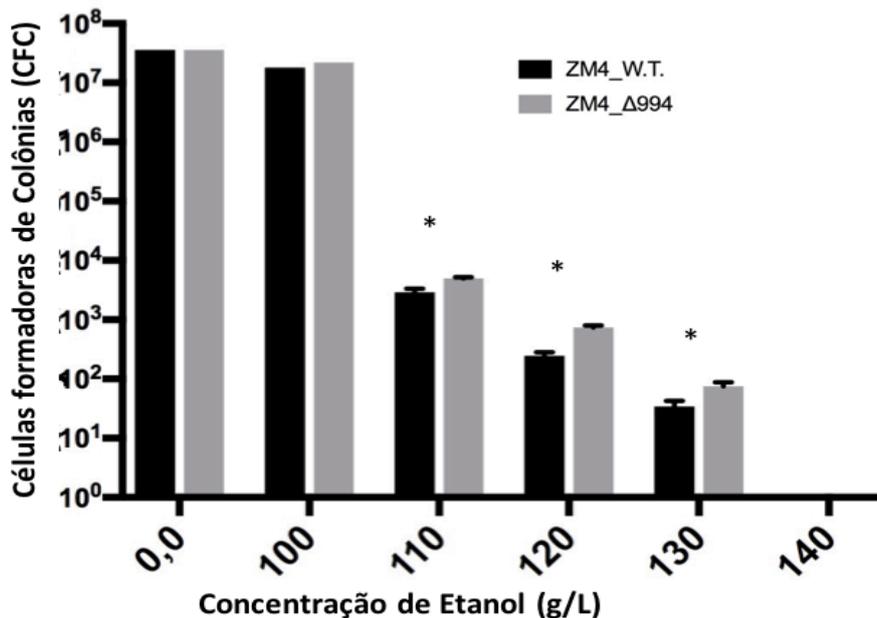


Figura 22. Tolerância ao etanol das linhagens ZM4_WT e ZM4_Δ994 de *Z. mobilis*. Após 24h de exposição a diferentes concentrações de etanol, três alíquotas de cada cultura foram plaqueadas e incubadas por 24h. Em seguida, as colônias foram contadas. Os dados estão apresentados como a média de amostras feitas em triplicata biológica repetida duas vezes. O erro padrão está representado por barras. *A diferença entre as duas linhagens é estatisticamente significativa em um teste t ($p < 0,001$).

4.4.3. Análise da linhagem ZM4_Δ994 quanto à resposta ao estresse de Furfural.

Foi proposto que a proteína ZMO0994 poderia ter um papel essencial na resposta ao estresse de metabólitos presentes em celulose hidrolisada (comunicação pessoal). Com a finalidade de testar essa hipótese, curvas de crescimento foram feitas em um leitor de placas, nas mesmas condições dos experimentos anteriores, com a presença de 10 mM de furfural (Figura 23) ou 10mM de HMF – Hidroximetilfurfural (Figura 24) no meio de cultura.

A premissa original sugere que a proteína ZMO0994 é importante para os mecanismos de tolerância a furfural e a HMF em *Z. mobilis*. Este experimento demonstrou que ambas linhagens reduzem a taxa de crescimento na presença desses inibidores, e que apenas na presença de furfural há uma diferença significativa entre o crescimento das duas linhagens após 20h de cultivo (Figura 23). Mas diferente do esperado, a linhagem ZM4_Δ994 apresentou crescimento mais rápido do que a linhagem selvagem.

RESULTADOS

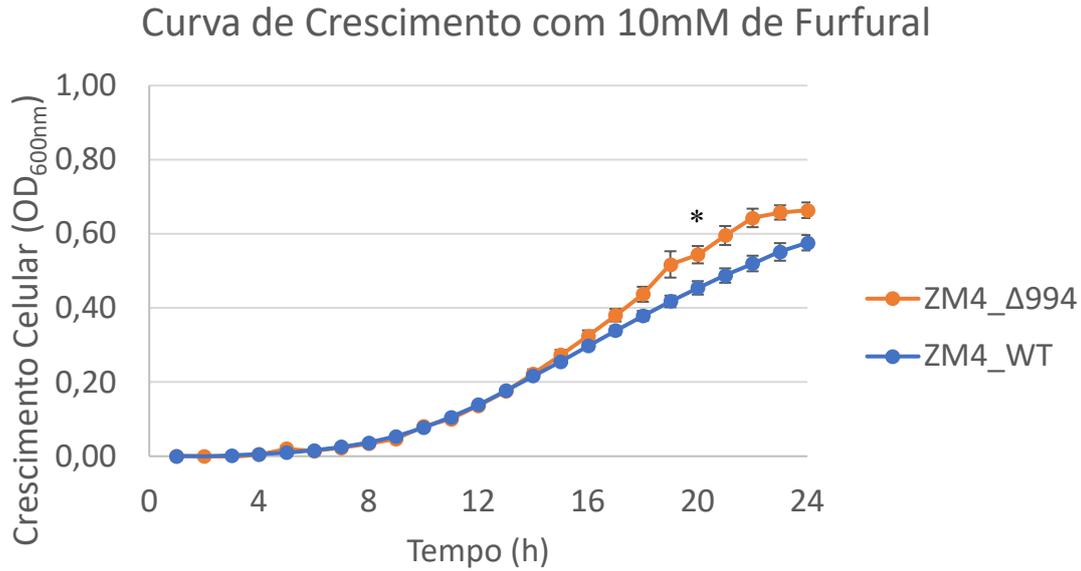


Figura 23. Curva de crescimento na presença de furfural das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 2% de glicose e 10 mM de furfural, a 30°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto. *A partir deste ponto, a diferença entre as duas linhagens é estatisticamente significativa em um teste t ponto-a-ponto ($p < 0,001$).

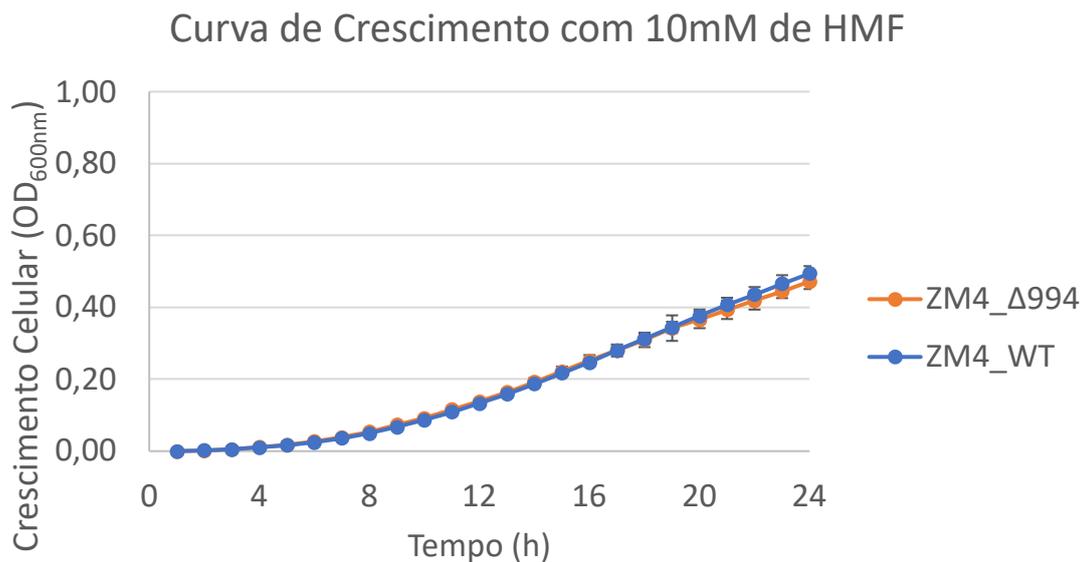


Figura 24. Curva de crescimento na presença de hidroximetilfurfural (HMF) das linhagens de *Z. mobilis* ZM4_WT e ZM4_Δ994. O cultivo foi realizado em 1,0 mL de meio RM com 2% de glicose e 10 mM de HMF, a 30°C por 24h em leitor automático de placas. Todas as culturas foram realizadas em quintuplicadas biológicas. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

Todas as análises da linhagem com a proteína ZMO0994 deletada corroboram a ideia de que há uma relação direta entre essa proteína e os mecanismos de resposta ao estresse osmótico, especificamente a altas concentrações de glicose. Simultaneamente, observa-se que há uma função antagônica dessa proteína em relação à resposta a elevadas concentrações de algumas substâncias tóxicas como etanol e furfural.

Considerando o conjunto de fenótipos que foram afetados pela deleção dessa proteína, é possível afirmar que ela possui uma ampla atuação nos mecanismos de resposta a estresses em *Z. mobilis*. Principalmente em relação ao estresse osmótico, efeito que, até o momento, só havia sido demonstrado em procariotos que expressavam, de forma heteróloga, proteínas da família LEA de plantas (LIU et al., 2015; ZENG et al., 2018).

Após a finalização da análise da linhagem ZM4_Δ994 e do papel de uma proteína específica, iniciou-se a próxima estratégia com uma abordagem mais generalista para tentar observar a correlação entre os diferentes tipos de estresse fermentativo e os principais mecanismos transcricionais relacionados.

RESULTADOS

4.5. Estudo da relação dos fatores transcricionais sigma 70, sigma 32 e sigma 24 com os mecanismos de resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis* ZM4

Na anotação do genoma de *Z. mobilis* ZM4 existem 5 fatores sigmas descritos. O fator sigma 38, que geralmente é responsável pela resposta às condições gerais de estresse, não foi encontrado até o momento (SEO et al., 2005). Desta forma, levantou-se a hipótese de que os fatores sigma 32 e sigma 24, geralmente associados aos mecanismos transcricionais de resposta ao estresse de temperatura em outras bactérias (ERICKSON; GROSS, 1989; GOPALKRISHNAN; NICOLOFF; ADES, 2014; NAKAHIGASHI; YANAGI; YURA, 1995; RAINA; MISSIAKAS; GEORGOPOULOS, 1995), assumiriam essa função, levando há uma sobreposição entre os mecanismos de resposta ao estresse de temperatura, estresse osmótico e estresse de etanol.

Até o momento, não há estudos experimentais que demonstrem a função dos fatores transcricionais sigma 32 e sigma 24 em *Z. mobilis*, logo, foi proposta a construção de linhagens que superexpressam esses fatores sigma com o objetivo de testar o efeito causado na resposta aos estresses fermentativos. Para efeito comparativo, também foi construída uma linhagem que superexpressa o fator sigma 70, o único fator transcricional já testado experimentalmente em *Z. mobilis* (TAN et al., 2016), e uma linhagem que contém o plasmídeo vazio como controle negativo.

4.5.1. Construção de linhagens de *Z. mobilis* que superexpressam os fatores transcricionais sigma 24, sigma 32 e sigma 70.

Para a construção das linhagens, o plasmídeo pB1_Amy (Figura 12) foi utilizado como base. Apesar de tanto a construção com o gene de resistência à cloranfenicol, (pB1_Amy) quanto a construção com o gene de resistência à canamicina (pB2_Amy) serem funcionais, a concentração de cloranfenicol utilizada para selecionar os clones transformante é cinco vezes menor do que a concentração de canamicina necessária (tabela 6), tornando o vetor pB1_Amy a melhor escolha.

O gene da α -amilase foi excisado do vetor pB1_Amy com as enzimas de restrição *Nde* I e *Sal* I e a região codificadora dos genes nativos dos fatores sigma 70, sigma 24 e sigma 32 (*rpoD*, *rpoE* e *rpoH*, respectivamente) foram amplificados por PCR do genoma

RESULTADOS

de *Z. mobilis* ZM4 (Figura 25). Os fragmentos amplificados foram ligados ao plasmídeo linearizado utilizando o sistema In-Phusion (CLONTECH, 2012). Em seguida, os vetores de expressão foram transformados em *E. coli* DH5a, dando origem aos vetores pB1_s70, pB1_s24 e pB1_s32 (Figura 26). Nessa construção, os genes estão sob o controle do promotor constitutivo da piruvato descarboxilase (*pdc*), que é uma das proteínas mais expressas em *Z. mobilis* (YANG et al., 2009a).

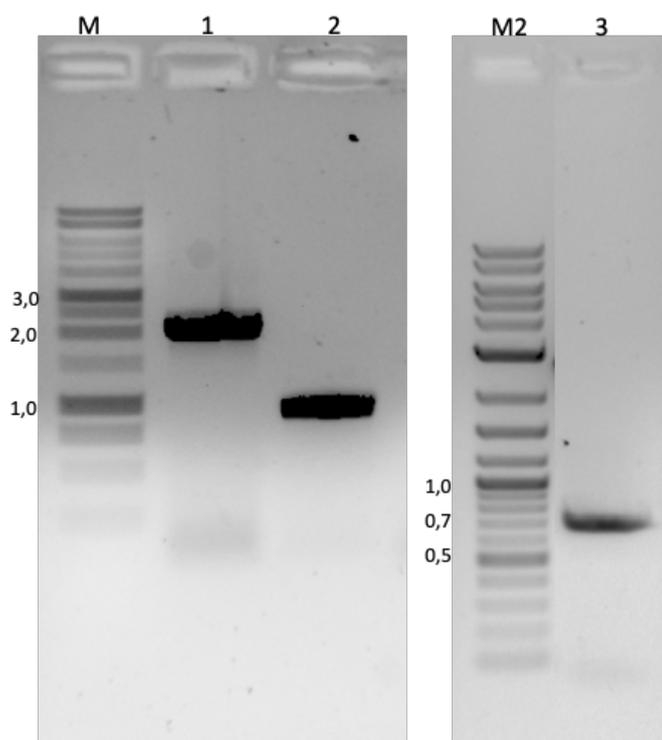


Figura 25. Análise eletroforética da amplificação da região codificadora dos genes *rpoD*, *rpoE* e *rpoH* de *Z. mobilis* ZM4 por PCR. Eletroforese em Gel de Agarose 1% corado com brometo de etídeo. **M** – Marcador 1 kb DNA ladder (PROMEGA). **M2** – Marcador 2-log DNA ladder (NEB). **1** – Produto de PCR do gene *rpoD* (ZMO1623) de *Z. mobilis* ZM4 (2047 pb). **2** – Produto de PCR do gene *rpoH* (ZMO0749) de *Z. mobilis* ZM4 (940 pb). **3** – Produto de PCR do gene *rpoE* (ZMO1404) de *Z. mobilis* ZM4 (729 pb). Os tamanhos dos fragmentos dos marcadores estão indicados em kb.

RESULTADOS

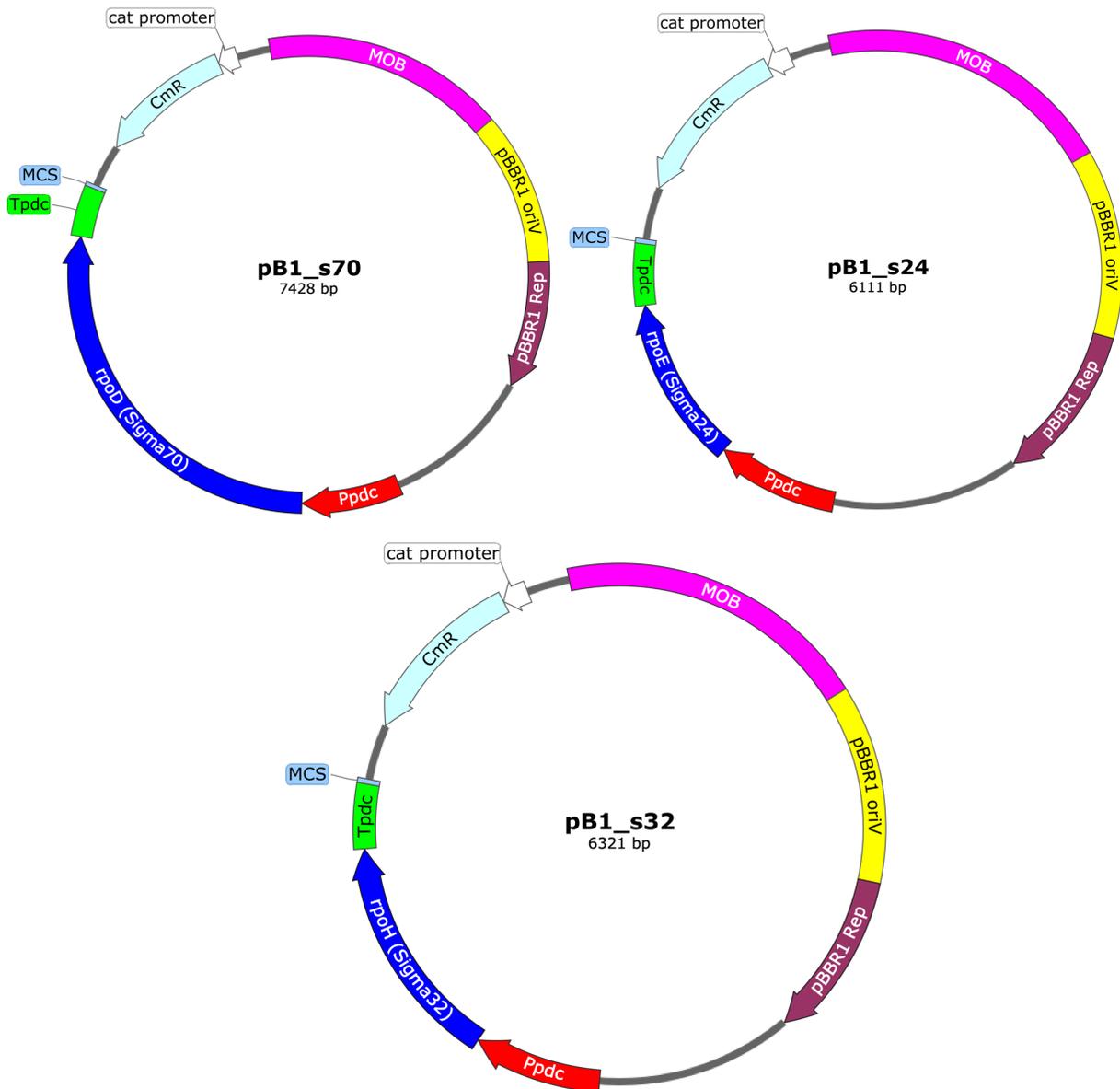


Figura 26. Mapa dos plasmídeos pB1_s70, pB1_s24 e pB1_s32, baseados no plasmídeo pBBR1MCS. **rpoD** – gene nativo de *Z. mobilis* que codifica o fator sigma70; **rpoE** – gene nativo de *Z. mobilis* que codifica o fator sigma24; **rpoH** – gene nativo de *Z. mobilis* que codifica o fator sigma32 **MOB** – Sequência de mobilidade; **MCS** – Sítios múltiplos de clonagem; **CmR** – gene da enzima cloranfenicol acetiltransferase; **Ppdc** – Promotor do gene da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*; **TpdC** – Terminador do gene da piruvato descarboxilase de *Z. mobilis*; **pBBR1 oriV** e **Rep** – Origens de replicação do pBBR1MCS.

RESULTADOS

Todos os vetores foram transformados em *E. coli* JM110 para serem demetilados e, em seguida, transformados em *Z. mobilis* ZM4 por eletroporação, obtendo-se as seguintes linhagens: ZM4_pB1 (Controle negativo), ZM4_p70 (Sigma 70), ZM4_p24 (Sigma 24) e ZM4_p32 (Sigma 32).

A seleção dos clones transformantes foi feita em placas com meio RM e cloranfenicol, mas para confirmar a presença e integridade dos plasmídeos, eles foram extraídos de *Z. mobilis*, transformados em *E. coli* DH5a para amplificação, extraídos e depois sequenciados em triplicata nas duas direções pelo método de Sanger (Anexo 7).

Com isso, as linhagens construídas foram confirmadas e serão utilizadas para estudar o efeito desses fatores sigmas na resposta ao estresse fermentativo.

RESULTADOS

4.5.2. Caracterização da expressão dos fatores sigma em *Z. mobilis*.

A confirmação de que os fatores sigma estão sendo expressos nas linhagens de *Z. mobilis* é essencial para dar continuidade às análises de resposta aos estresses. Os fatores sigma são proteínas nativas da própria bactéria e como não há anticorpos comerciais disponíveis, a utilização de Western Blot quantitativo é inviável.

Sendo assim, o RNA total de cada linhagem foi extraído durante o início da fase exponencial de crescimento e utilizado para análise por RT-qPCR para quantificar o mRNA correspondente ao gene introduzido em cada linhagem e comparar com o controle negativo (Figura 27). Em outra análise, um SDS-PAGE foi feito com o extrato de proteínas intracelular e extracelular de cada linhagem durante a fase exponencial de crescimento (Figura 28).

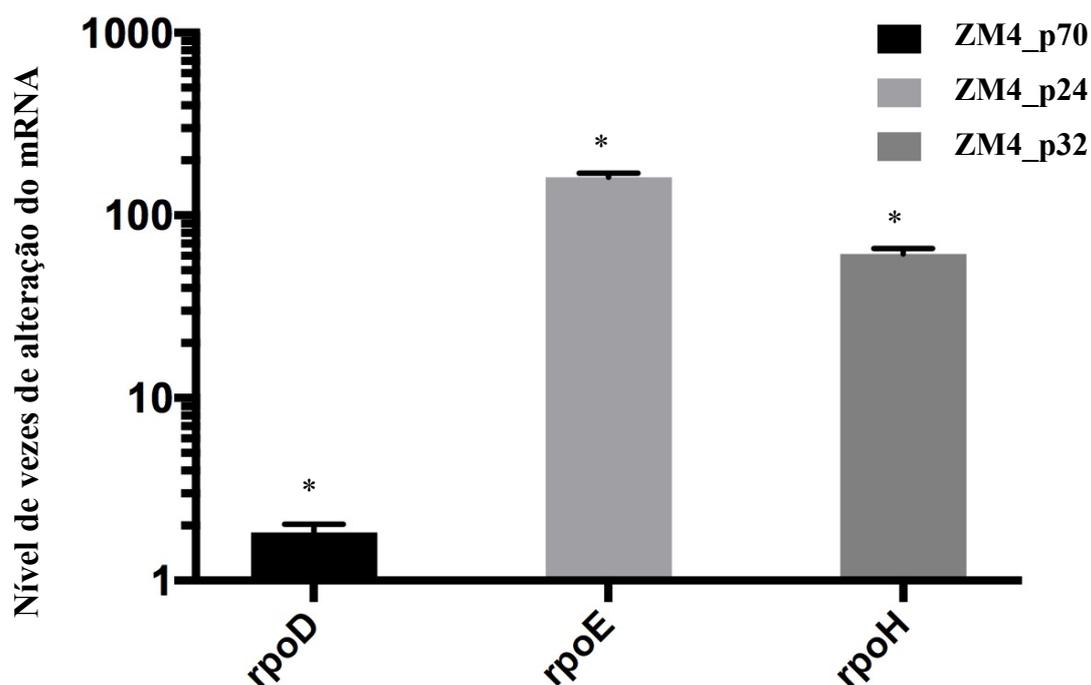


Figura 27. Níveis relativos de expressão dos genes *rpoD*, *rpoE* e *rpoH* nas linhagens de *Z. mobilis*. O RNA extraído de culturas crescidas até $OD_{600nm} = 1,0$ (início da fase exponencial) foi quantificado por RT-PCR em tempo real com iniciadores específicos para os genes *rpoD*, *rpoE* e *rpoH* nas linhagens ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32, respectivamente. A alteração dos níveis de mRNA foi calculado em relação a expressão do mesmo gene na linhagem controle (ZM4_pB1) e normalizado pela expressão do rRNA 16S. Os dados apresentados são o valor médio de amostras feitas em triplicata biológica e técnica e o erro padrão está representado por barras. *A diferença para o controle negativo é estatisticamente significativa em um teste-t ($p < 0,001$).

RESULTADOS

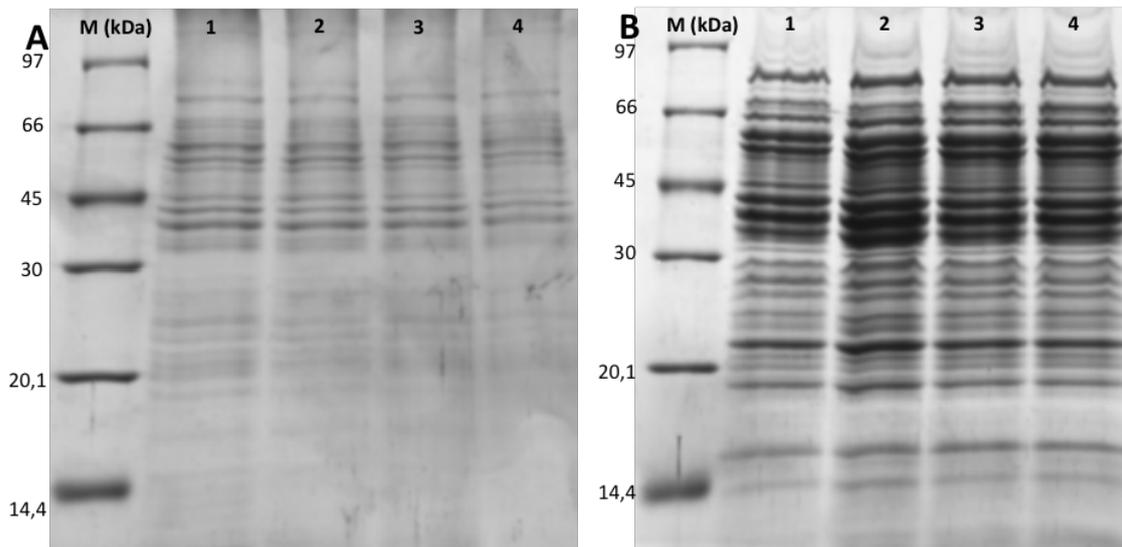


Figura 28. Análise eletroforética do extrato de proteínas extracelulares (A) e intracelulares (B) de culturas das linhagens de *Z. mobilis* em gel de poliacrilamida desnaturante 12%, corado com Coomassie Blue Coloidal. As linhagens tiveram as proteínas extraídas após crescimento até $OD_{600nm} = 1,5$ (fase exponencial). Linhagens: 1 - ZM4_pB1; 2 - ZM4_p70; 3 - ZM4_p24; 4 - ZM4_p32. M – marcador *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher), com os valores das bandas em kDa.

Apesar de nenhuma diferença ser visível no perfil de proteínas das linhagens que expressam os fatores sigma, o nível de expressão do mRNA correspondente a cada linhagem está consideravelmente aumentado. O gene *rpoD* foi o que apresentou o menor aumento da expressão relativa ao controle ($1,84 \pm 0,20$ vezes), o que pode ser explicado pela elevada transcrição que o fator sigma 70 já apresenta nas células durante a fase exponencial. Os genes *rpoE* e *rpoH* estão relativamente muito mais expressos ($161,9 \pm 8,9$ vezes e $61,5 \pm 4,2$ vezes, respectivamente) do que o controle, já que os níveis transcricionais desses genes na linhagem selvagem são muito baixos em condições normais de cultivo.

Em seguida, com o objetivo de averiguar se há alguma mudança fenotípica nas linhagens construídas e se essas mudanças refletem na resposta ao estresse fermentativo, cada linhagem foi estudada quanto à sua capacidade de crescimento nas diferentes condições de estresse osmótico induzido por glicose, estresse de etanol e estresse de temperatura.

RESULTADOS

4.5.3. Análise da resposta ao estresse fermentativo nas linhagens de *Z. mobilis* que expressam os fatores sigma.

A análise das linhagens ZM4_pB1, ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 foi realizada em três abordagens experimentais. O primeiro foi um experimento de crescimento em microplacas de 24 poços em 3 condições distintas de estresse e na condição de crescimento padrão. Como o objetivo deste ensaio é observar a relação entre toda a cinética de crescimento celular e as condições impostas de estresse osmótico, de temperatura e de etanol, foi utilizado um baixo inóculo inicial ($OD_{600nm} = 0,01$).

Além do efeito sobre o crescimento das células causado por um fator de estresse isoladamente, é importante estudar a correlação entre os diferentes fatores de estresse. Dessa forma, o segundo experimento realizado avaliou o crescimento das células em condições simultâneas e variadas desses fatores de estresse. Para tanto, a análise multifatorial de superfície de resposta (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR) foi idealizada para testar a correlação entre o estresse de temperatura e de etanol em duas condições diferentes de concentração de glicose, com 20 g/L e com 160 g/L. Como essa análise é um estudo transversal de um momento do crescimento das células, uma quantidade maior de células foi utilizada para o início da cultura ($OD_{600nm} = 0,10$).

Apesar da abordagem de DCCR acarretar em um mapeamento do perfil de crescimento das linhagens de *Z. mobilis* em diferentes condições de estresse, essa análise tem mais relevância qualitativa para observar as tendências da superfície de resposta do que realmente um valor quantitativo da resposta, por isso é fundamental que haja a validação do modelo por meio de ensaios experimentais nas condições previstas por cada superfície de resposta (RODRIGUES; LEMMA, 2014). Sendo assim, após a construção do modelo de superfície de resposta de cada linhagem, foram escolhidos três pontos dentro de cada modelo e os resultados foram validados por experimentos em quintuplicatas biológicas em cada ponto escolhido.

Por último, o terceiro experimento foi uma fermentação em frasco para estudar a influência da superexpressão dos fatores sigma sobre o consumo de glicose, a produção de etanol e sobre o acúmulo de metabólitos. Essa análise é necessária para estudar a influência dos fatores sigma sobre o metabolismo de *Z. mobilis*, levando à observação de fenômenos específicos que não estão atrelados ao crescimento celular.

Como a expressão de cada fator sigma é independente, a apresentação e análise dos resultados correspondentes serão apresentados individualmente sobre cada linhagem.

RESULTADOS

4.5.3.1. Sigma 70

A expressão do fator sigma 70 alterou drasticamente o crescimento celular quando o cultivo foi realizado em altas concentrações de glicose. Em todos os experimentos, a linhagem ZM4_p70 apresentou inibição do crescimento quando a concentração de glicose estava em 160 g/L (Figuras 29 e 30). Mas a taxa de consumo de glicose não foi alterada durante a fermentação em frasco (Tabela 10), sugerindo que a inibição do crescimento não tem relação com os transportadores de glicose, mas provavelmente com o estresse osmótico.

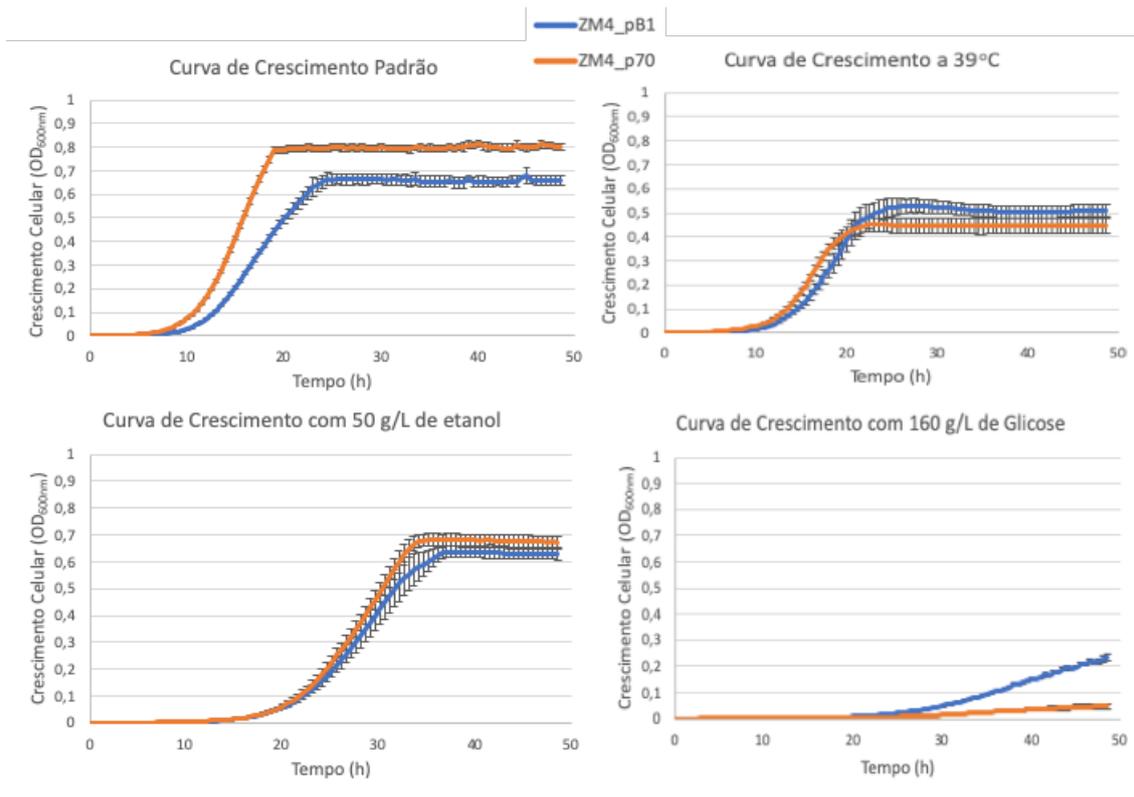


Figura 29. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p70 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose. Os dados representam a média de uma quintuplicata biológica. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

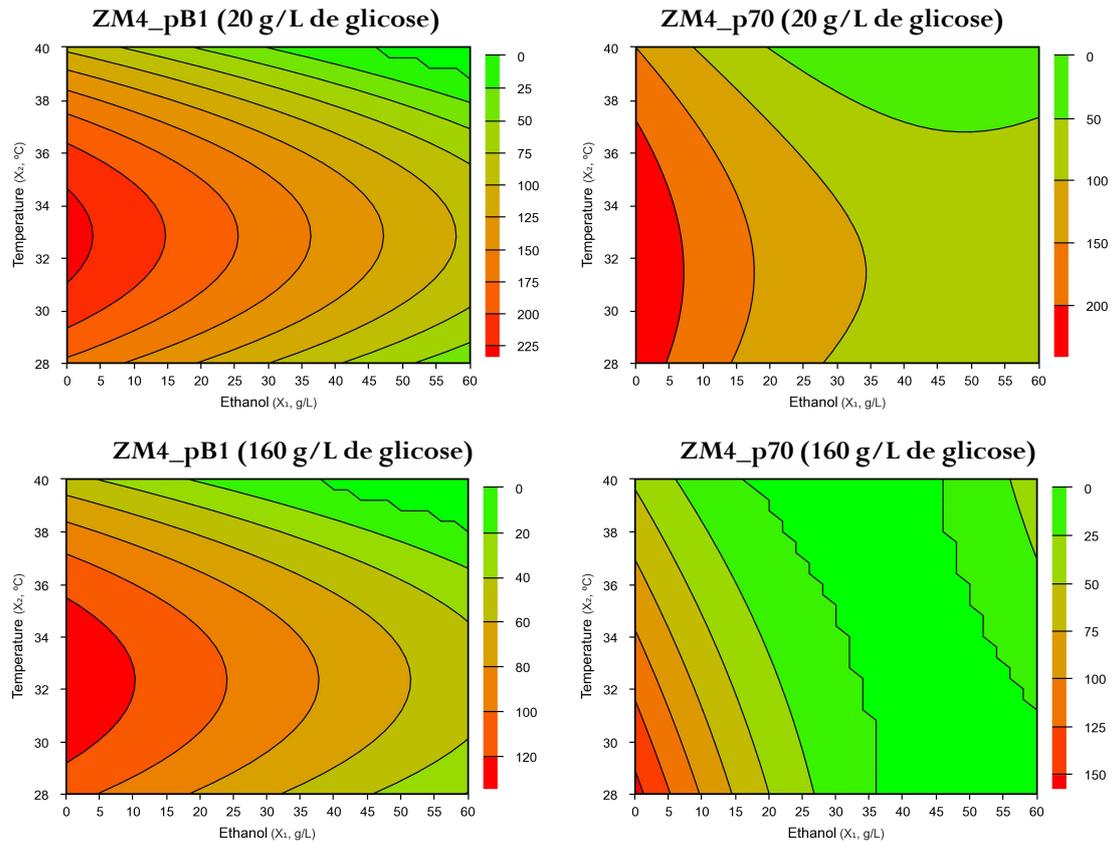


Figura 30. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p70 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose. A produção de biomassa (barra de cores em mg/L) após 10h de cultivo foi analisada em resposta à variação da concentração de etanol e da temperatura de crescimento. Todos os modelos foram parametrizados para um nível de significância $p < 0,05$ e confirmados experimentalmente por quintuplicatas biológicas em três diferentes pontos de cada modelo.

Tabela 9. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p70

Linhagens	Condições experimentais					
	39°C e 10 g/L ^a		34°C e 30 g/L ^a		32°C e 55 g/L ^a	
	Crescimento com 20 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	106,70 ± 7,24	111,41 ± 0,87	160,85 ± 3,40	155,13 ± 1,80	104,94 ± 4,94	99,43 ± 1,20
ZM4_p70	112,63 ± 9,23	111,39 ± 1,03	101,07 ± 5,21	95,95 ± 0,34	87,91 ± 8,30	95,22 ± 0,80
	Crescimento com 160 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	53,54 ± 6,60	57,09 ± 0,15	87,06 ± 3,10	91,02 ± 0,48	54,68 ± 4,50	51,30 ± 0,33
ZM4_p70	20,48 ± 8,70	1,67 ± 0,29	0,00 ± 3,84	0,00 ± 0,01	0,00 ± 8,17	0,01 ± 0,01

^aQuantidade de etanol presente no meio de cultura no início do cultivo. ^bBiomassa celular (mg/L) medida após 10h de cultivo. Todos os cultivos foram repetidos 5 vezes com colônias distintas de *Z. mobilis*.

RESULTADOS

O aumento na concentração do fator sigma 70 pode ser competitivo com outros fatores transcricionais pelo recrutamento do núcleo da RNA polimerase, afetando a síntese e o transporte de osmoprotetores e levando a uma resposta adaptativa ao choque osmótico mais lenta. Mais estudos são necessários para testar essa hipótese.

Outra curiosidade observada na linhagem ZM4_p70 foi a drástica redução no acúmulo de ácido láctico (tabela 11). Como a única via de produção de lactato em *Z. mobilis* é por meio da enzima lactato desidrogenase, é provável que o excesso de fator sigma 70 tenha inibido a expressão dessa enzima, ou tenha alterado o fluxo de piruvato para o ciclo de ácido cítrico, já que os outros possíveis caminhos, que seriam a produção de acetato ou de etanol, não foram aumentados.

Tabela 10. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p70

Linhagem	μ^a (h ⁻¹)	Produtividade de Biomassa ^b (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	Consumo de Glicose ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Produtividade de etanol ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)
ZM4_pB1	0,3327 ± 0,0134	265,5 ± 2,8	6,598 ± 0,058	3,193 ± 0,028
ZM4_p70	0,3598 ± 0,0086	255,4 ± 2,5	6,435 ± 0,060	3,137 ± 0,022

^aMédia da taxa de crescimento em fase exponencial de uma fermentação em meio RM com 100 g/L de glicose por 24h. ^bProdutividade e consumo médio de amostras das culturas após 14h de fermentação. Não há diferença estatística entre as linhagens. Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

Tabela 11. Acúmulo de metabólitos da linhagem ZM4_p70

Linhagens	Concentração de Lactato ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Glicerol ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Acetato ^a (mg L ⁻¹)
ZM4_pB1	125,4 ± 1,9	211,4 ± 3,1	1061,8 ± 12,0
ZM4_p70	3,2 ± 2,6***	226,7 ± 14,1	640,2 ± 2,3***

^aMédia da concentração máxima do metabólito após 24h de fermentação. É estatisticamente significativa a diferença para o controle (ZM4_pB1) em um teste t (***p<0,001). Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

RESULTADOS

4.5.3.2. Sigma 24

A linhagem ZM4_p24 mostrou aumento significativo na tolerância a temperaturas elevadas (Figuras 31 e 32). Isso é consistente com o papel desse fator sigma em algumas bactérias, como um mediador auxiliar do Sistema de Resposta a Choque Térmico (HSRS). Apesar desta confirmação, não foram encontradas evidências claras de que a resposta ao etanol também é controlada por este fator sigma.

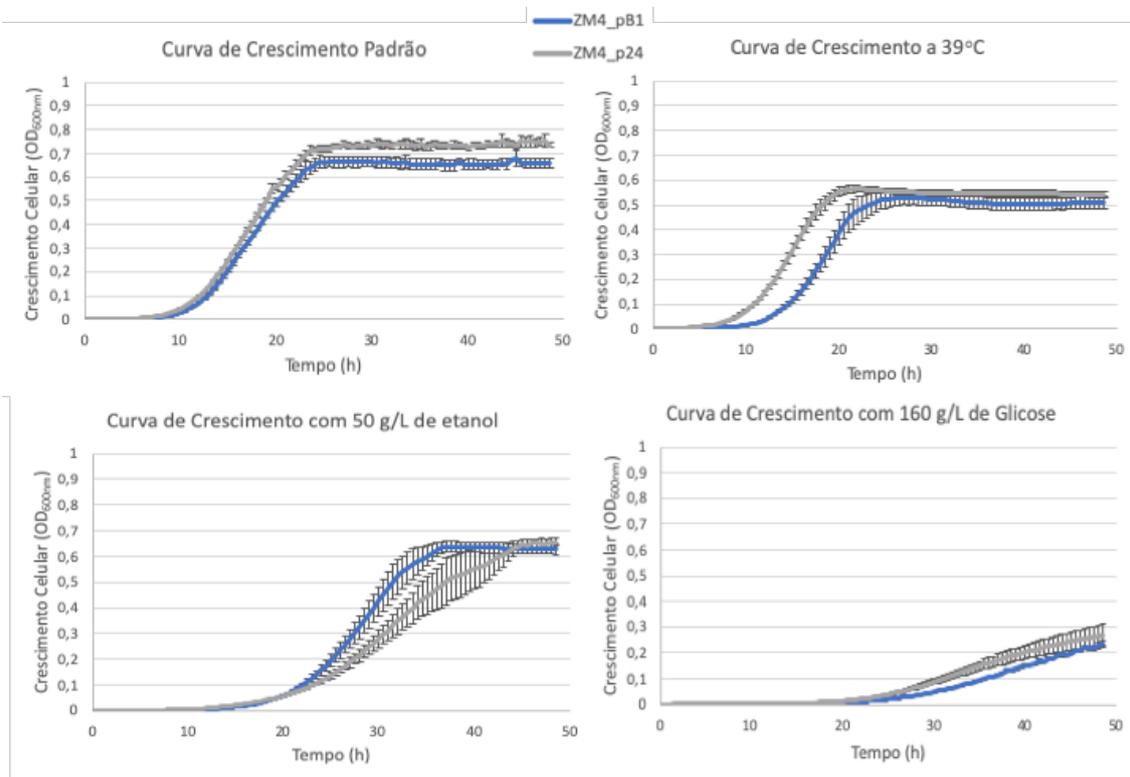


Figura 31. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p24 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose. Os dados representam a média de uma quintuplicata biológica. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

De fato, a superfície de resposta apresenta pequenas variações na tolerância ao etanol. Analisando a resposta com 20 g/L de glicose (Figura 32), a linhagem ZM4_p24 é mais resistente ao etanol a 30°C, mas é menos resistente do que a linhagem controle a 34°C (tabela 12). A relação do fator sigma 24 com a sobreposição dos mecanismos de resposta aos diferentes fatores de estresse não ficaram claros nesses experimentos.

RESULTADOS

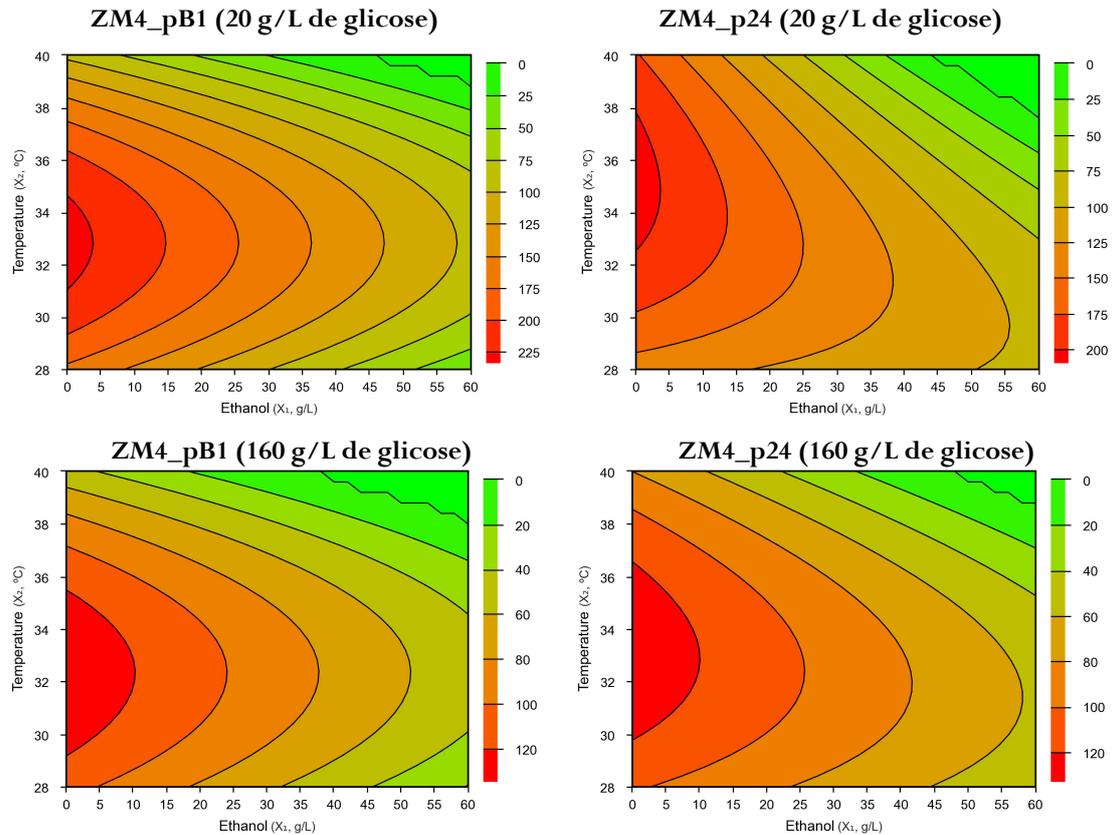


Figura 32. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p24 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose. A produção de biomassa (barra de cores em mg/L) após 10h de cultivo foi analisada em resposta à variação da concentração de etanol e da temperatura de crescimento. Todos os modelos foram parametrizados para um nível de significância $p < 0,05$ e confirmados experimentalmente por quintuplicatas biológicas em três diferentes pontos de cada modelo.

Tabela 12. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p24

Linhagens	Condições experimentais					
	39°C e 10 g/L ^a		34°C e 30 g/L ^a		32°C e 55 g/L ^a	
	Crescimento com 20 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	106,70 ± 7,24	111,41 ± 0,87	160,85 ± 3,40	155,13 ± 1,80	104,94 ± 4,94	99,43 ± 1,20
ZM4_p24	151,10 ± 8,11	162,02 ± 1,70	135,28 ± 3,21	127,63 ± 0,79	93,34 ± 5,15	94,03 ± 1,77
	Crescimento com 160 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	53,54 ± 6,60	57,09 ± 0,15	87,06 ± 3,10	91,02 ± 0,48	54,68 ± 4,50	51,30 ± 0,33
ZM4_p24	77,01 ± 5,00	73,95 ± 0,21	90,99 ± 1,98	89,73 ± 0,12	63,44 ± 3,18	60,87 ± 0,69

^aQuantidade de etanol presente no meio de cultura no início do cultivo. ^bBiomassa celular (mg/L) medida após 10h de cultivo. Todos os cultivos foram repetidos 5 vezes com colônias distintas de *Z. mobilis*.

RESULTADOS

Então, apesar da hipotética relação entre as respostas aos estresses de calor e de etanol em *Z. mobilis*, estes resultados não a associam ao fator sigma 24. E considerando a redução na produtividade de etanol e biomassa observada durante a fermentação da linhagem ZM4_p24 (Tabela 13), é possível que o excesso de sigma 24 interfira com os mecanismos de adaptação ao etanol.

Tabela 13. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p24

Linhagens	μ^a (h ⁻¹)	Produtividade de Biomassa ^b (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	Consumo de Glicose ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Produtividade de etanol ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)
ZM4_pB1	0,3327 ± 0,0134	265,5 ± 2,8	6,598 ± 0,058	3,193 ± 0,028
ZM4_p24	0,3464 ± 0,0108	238,0 ± 4,9**	6,439 ± 0,094	2,937 ± 0,036**

^aMédia da taxa de crescimento em fase exponencial de uma fermentação em meio RM com 100 g/L de glicose por 24h. ^bProdutividade e consumo médio de amostras das culturas após 14h de fermentação. É estatisticamente significativa a diferença para o controle (ZM4_pB1) em um teste t (**p<0,01). Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

Tabela 14. Acúmulo de metabólitos na linhagem ZM4_p24

Linhagens	Concentração de Lactato ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Glicerol ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Acetato ^a (mg L ⁻¹)
ZM4_pB1	125,4 ± 1,9	211,4 ± 3,1	1061,8 ± 12,0
ZM4_p24	11,1 ± 5,4***	141,3 ± 4,5***	1001,6 ± 12,2

^aMédia da concentração máxima do metabólito após 24h de fermentação. É estatisticamente significativa a diferença para o controle (ZM4_pB1) em um teste t (***p<0,001). Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

RESULTADOS

4.5.3.3. Sigma 32

A superexpressão do fator sigma 32 aumentou a tolerância a temperaturas elevadas, confirmando o papel predito como um fator transcricional do HSRS, mas o resultado mais intrigante foi o aumento na resposta a elevadas concentrações de glicose e a redução na tolerância ao etanol que a linhagem ZM4_p32 apresentou (Figuras 33 e 34).

Esse resultado sugere que o HSRS, modulado pelos fatores sigma 24 e sigma 32, não tem relação direta com os mecanismos de resposta ao etanol em *Z. mobilis* ZM4. E com uma análise mais detalhada das superfícies de resposta, parece existir uma tendência antagônica entre esses dois mecanismos de adaptação.

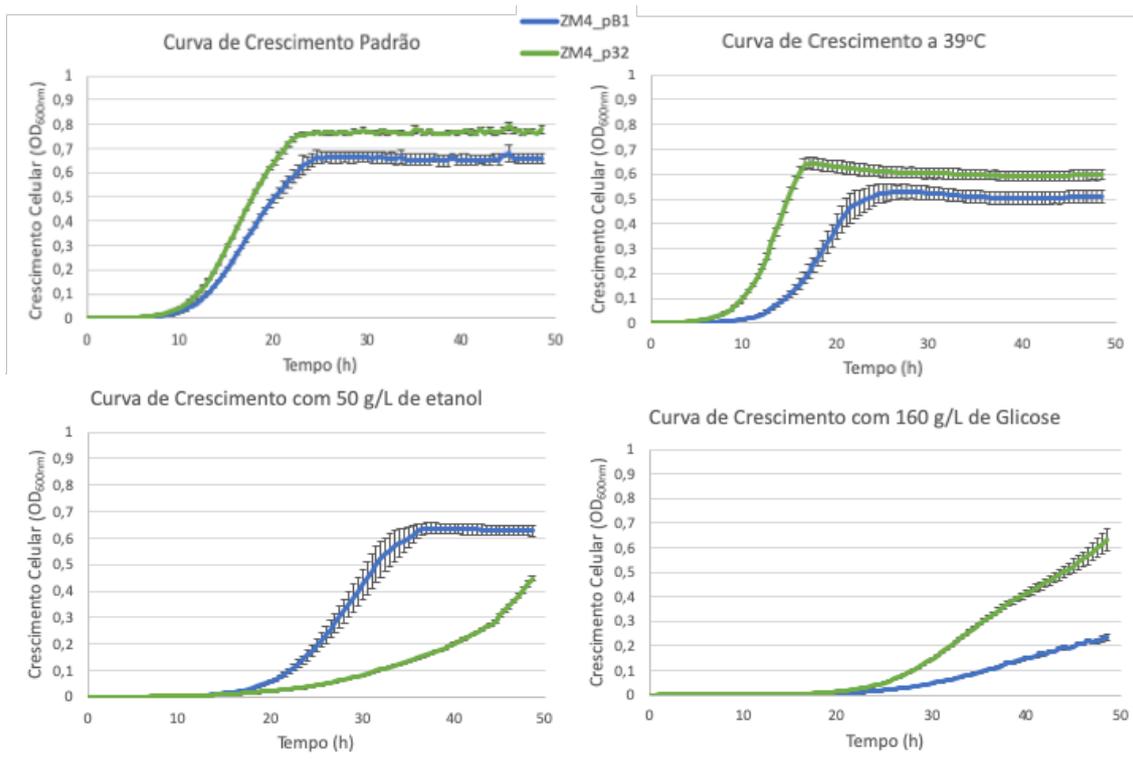


Figura 33. Curvas de crescimento das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p32 em meio RM na condição padrão de cultivo (20 g/L de glicose e 30°C), a 39°C, com 50 g/L de etanol e com 160 g/L de glicose. Os dados representam a média de uma quintuplicata biológica. O erro padrão está representado por barras em cada ponto.

RESULTADOS

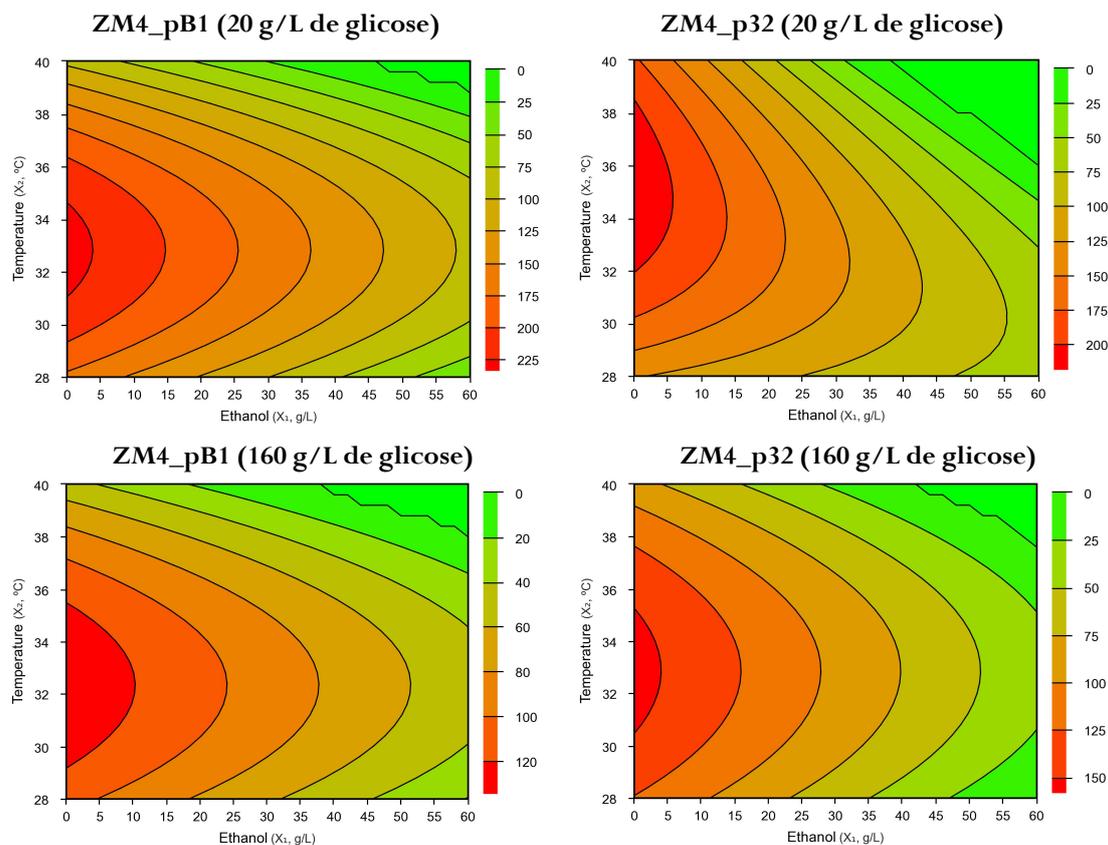


Figura 34. Superfície de resposta das linhagens ZM4_pB1 e ZM4_p32 em um delineamento composto central rotacional em meio RM com 20 g/L de glicose e com 160 g/L de glicose. A produção de biomassa (barra de cores em mg/L) após 10h de cultivo foi analisada em resposta à variação da concentração de etanol e da temperatura de crescimento. Todos os modelos foram parametrizados para um nível de significância $p < 0,05$ e confirmados experimentalmente por quintuplicatas biológicas em três diferentes pontos de cada modelo.

Tabela 15. Validação experimental dos modelos de DCCR para a linhagem ZM4_p32

Linhagens	Condições experimentais					
	39°C e 10 g/L ^a		34°C e 30 g/L ^a		32°C e 55 g/L ^a	
	Crescimento com 20 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	106,70 ± 7,24	111,41 ± 0,87	160,85 ± 3,40	155,13 ± 1,80	104,94 ± 4,94	99,43 ± 1,20
ZM4_p32	147,67 ± 9,39	150,88 ± 0,51	126,02 ± 3,72	125,89 ± 0,56	70,19 ± 5,97	58,19 ± 0,26
	Crescimento com 160 g/L de glicose					
	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b	Predito ^b	Obtido ^b
ZM4_pB1	53,54 ± 6,60	57,09 ± 0,15	87,06 ± 3,10	91,02 ± 0,48	54,68 ± 4,50	51,30 ± 0,33
ZM4_p24	77,01 ± 5,00	73,95 ± 0,21	90,99 ± 1,98	89,73 ± 0,12	63,44 ± 3,18	60,87 ± 0,69

^aQuantidade de etanol presente no meio de cultura no início do cultivo. ^bBiomassa celular (mg/L) medida após 10h de cultivo. Todos os cultivos foram repetidos 5 vezes com colônias distintas de *Z. mobilis*.

RESULTADOS

Quando analisada a resposta ao choque osmótico, a linhagem ZM4_p32 além de mais tolerante, também apresenta um aumento significativo na taxa de consumo de glicose (Tabela 16), mas sem alterar os outros parâmetros fermentativos ou o acúmulo de metabólitos (Tabela 17). O aumento da taxa de crescimento celular observado na figura 32 não foi observado durante a análise de fermentação em frasco, pois com apenas 100 g/L de glicose no meio de cultura não há estresse osmótico para as células.

Tabela 16. Parâmetros fermentativos da linhagem ZM4_p32

Linhasgens	μ^a (h ⁻¹)	Produtividade de Biomassa ^b (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	Consumo de Glicose ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Produtividade de etanol ^b (g L ⁻¹ h ⁻¹)
ZM4_pB1	0,3327 ± 0,0134	265,5 ± 2,8	6,598 ± 0,058	3,193 ± 0,028
ZM4_p32	0,3396 ± 0,0151	255,9 ± 2,8	6,900 ± 0,057***	3,177 ± 0,060

^aMédia da taxa de crescimento em fase exponencial de uma fermentação em meio RM com 100 g/L de glicose por 24h. ^bProdutividade e consumo médio de amostras das culturas após 14h de fermentação. É estatisticamente significativa a diferença para o controle (ZM4_pB1) em um teste t (***p<0,001). Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

Tabela 17. Acúmulo de metabólitos na linhagem ZM4_p32

Linhasgens	Concentração de Lactato ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Glicerol ^a (mg L ⁻¹)	Concentração de Acetato ^a (mg L ⁻¹)
ZM4_pB1	125,4 ± 1,9	211,4 ± 3,1	1061,8 ± 12,0
ZM4_p32	95,1 ± 1,2***	213,3 ± 2,2	977,0 ± 15,5

^aMédia da concentração máxima do metabólito após 24h de fermentação. É estatisticamente significativa a diferença para o controle (ZM4_pB1) em um teste t (***p<0,001). Todas as culturas foram feitas em triplicata biológica.

O fator sigma 32 pode levar a modificações na composição da membrana plasmática, como observado em outras bactérias (LIM et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2008), o que poderia aumentar o influxo de glicose e diminuir a tolerância ao etanol sem alterar o metabolismo primário na linhagem ZM4_p32.

Esse efeito observado na linhagem ZM4_p32 parece muito similar aos resultados encontrados para a linhagem ZM4_Δ994. A deleção da proteína ZMO0994 diminuiu a resposta ao choque osmótico e aumentou a tolerância ao etanol, o que é exatamente o oposto do observado com a superexpressão do fator sigma 32. É possível que a proteína ZMO0994 tenha alguma função sinalizadora que se relacione com o controle

RESULTADOS

transcricional de *Z. mobilis*, mas os dados até o momento são insuficientes para concluir se essa correlação é verdadeira.

As evidências apresentadas sugerem a sobreposição dos mecanismos de choque térmico e choque osmótico em *Z. mobilis* ZM4, o que corrobora a hipótese de que em *Z. mobilis* o fator sigma 32 atua simultaneamente na resposta a diferentes fatores de estresse, como é sugerido para outras bactérias (BIANCHI; BANEYX, 1999; COOK; USSERY, 2013).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Manipulação Genética em *Z. mobilis*

O desenvolvimento de técnicas eficientes para a manipulação genética de *Z. mobilis* foi o primeiro desafio a ser superado neste trabalho. Tratando-se de uma bactéria selvagem, não havia ferramentas e métodos específicos para a edição genômica ou para a transformação com plasmídeos no início deste projeto. O principal método de transformação utilizado na época era a conjugação com uma bactéria doadora, o que limitava o tipo de DNA a ser introduzido nas células, além de ser uma técnica muito dispendiosa (DEANDA et al., 1996; SKOTNICKI et al., 1982).

Em paralelo ao desenvolvimento deste trabalho, diversos estudos foram produzidos com otimizações para a técnica de eletroporação, além do desenvolvimento de plasmídeos específicos e métodos para a edição genômica (CAO et al., 2017, 2016; DONG et al., 2011; ZOU et al., 2012). De maneira geral, o método de eletroporação utilizado com sucesso durante este projeto foi uma adaptação do trabalho de Zou *et al.* (2012), com algumas variações quanto ao inóculo e o tempo de crescimento das culturas de *Z. mobilis*. Ainda assim, a quantidade de DNA necessária inviabiliza a transformação direta de sistemas de ligação, sendo necessária a montagem dos vetores em *E. coli* e a posterior passagem por uma linhagem de *E. coli* que não metile o DNA.

A utilização do vetor pBBR1MCS foi eficiente, e o ensaio com a α -amilase de *B. subtilis* demonstrou como a expressão de proteínas heterólogas pode ser funcional em *Z. mobilis* (BARROS et al., 1996; IKUTA et al., 1990). Esse aspecto biotecnológico é comumente ignorado nos trabalhos científicos, pois devido à baixa massa celular produzida por *Z. mobilis*, é geralmente aceito que esta bactéria não é uma boa produtora de proteínas heterólogas (LINGER; ADNEY; DARZINS, 2010; ROGERS et al., 2007; WANG et al., 2012). Com algumas otimizações, esse mesmo sistema pode ser utilizado como base para uma nova plataforma de expressão de proteínas heterólogas, aproveitado o status GRAS desta bactéria, seria possível a sua utilização na indústria farmacêutica e alimentícia.

Durante a deleção do *locus ZMO0994*, inicialmente foi tentada a transformação direta do produto de PCR linear (SOOTSUWAN et al., 2013), mas não houve sucesso, só então a utilização do plasmídeo não replicativo (pKO0994) foi feita. Na primeira

DISCUSSÃO

tentativa de deleção do *locus* ZMO0994 com o sistema pKO0994 foi observado que as colônias isoladas apresentavam os dois genótipos simultaneamente, tanto o *locus* selvagem quanto o *locus* deletado. Inicialmente foi pensado que o isolamento das colônias não havia sido eficiente, levando a culturas mistas, mas mesmo após diversas etapas de novos isolamentos e aumento na concentração do antibiótico, os dois genótipos continuavam presentes. Esse mesmo fenômeno foi observado durante a deleção de outros genes em trabalhos paralelos do nosso grupo de pesquisa, mas não foram encontrados registros na literatura. Em um trabalho que caracterizou as mutações presentes nos genes de *Z. mobilis* foi observado indícios de que essa bactéria apresenta cópias parciais do cromossomo durante a fase exponencial (DEUTSCHBAUER et al., 2014), o que explicaria a recombinação homóloga estar ocorrendo em apenas uma das cópias e os dois genótipos serem mantidos. Aumentando a concentração do DNA utilizado para 10 µg no sistema de transformação possibilitou a seleção de um clone completamente deletado para o gene alvo, como foi demonstrado nos resultados.

Apesar dos resultados positivos para a manipulação genética neste projeto, ainda existem muitas questões que devem ser melhoradas para viabilizar projetos mais complexos de engenharia genética e metabólica em *Z. mobilis* (ZHANG et al., 2019). O uso de promotores mais controláveis ainda é um problema. O promotor *pdv*, que foi utilizado neste trabalho, é forte e constitutivo, mas ainda não é completamente caracterizado e não é possível controlar o seu nível de expressão. Em uma tese de doutorado, oito versões mutantes deste promotor foram construídas para modular a sua atividade, sendo que sete dessas versões apresentaram atividade gradativamente menor do que o selvagem e uma versão apresentou atividade superior ao selvagem, possibilitando algum nível de controle sobre a expressão de genes. Neste mesmo trabalho, foi construída uma versão otimizada do promotor *lac* de *E. coli* funcional para *Z. mobilis*, mas o nível de expressão foi muito baixo (DUNN, 2015).

A recente deleção dos plasmídeos naturais da linhagem *Z. mobilis* ZM4, junto com o desenvolvimento do sistema CRISPR-Cas9 para essa bactéria (CAO et al., 2017; DUNN, 2015), possibilitam a criação de linhagens recombinantes mais estáveis e consequentemente mais adaptáveis às exigências industriais. No entanto, ainda é necessário o desenvolvimento de plasmídeos ou cromossomos artificiais que permitam a transformação de múltiplos genes e fragmentos maiores de DNA em *Z. mobilis*.

DISCUSSÃO

5.2. Resposta ao estresse fermentativo em *Z. mobilis*

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez que os fatores sigma 32 e sigma 24 ativam o HSRS em *Z. mobilis* ZM4. Essa evidência corrobora com as ideias correntes que *Z. mobilis* apresenta um controle transcricional canônico para a resposta ao estresse de temperatura e que essa resposta se sobrepõe, ao menos em parte, aos outros mecanismos de resposta ao estresse, como osmótico e etanol.

Os mecanismos de resposta ao estresse térmico em *Z. mobilis* começaram a ser mais estudados nos últimos anos. Com abordagens genômicas e transcriptômicas, diversos genes e proteínas têm sido descritos como essenciais para a tolerância ao calor, especialmente na linhagem termotolerante *Z. mobilis* TISTR 548 (CHAROENSUK et al., 2017; MATSUSHITA et al., 2016; SOOTSUWAN et al., 2007). Até o momento, as evidências indicam que *Z. mobilis* possui um sistema de choque térmico similar ao de *E. coli*, com mecanismos que contribuem para a estabilização da membrana e a manutenção de macromoléculas (CHAROENSUK et al., 2017).

É lógico assumir que mudanças na membrana e a manutenção de macromoléculas também estejam relacionadas à resposta celular ao etanol e a altas concentrações de glicose, mas até o momento os dados experimentais que se têm são baseados em alguns trabalhos com *Z. mobilis* na presença de altas concentrações de glicose (DOUKA et al., 1999; ZHANG et al., 2015) ou de etanol (HE et al., 2012b; TAN et al., 2016; YANG et al., 2013, 2014). Porém, a sobreposição destes dados ainda não é conclusiva.

Com os dados aqui observados, é possível sugerir uma correlação entre essas diferentes formas de estresse, mas contrariando o proposto na literatura, a correlação entre etanol e os outros estresses (choque osmótico e choque térmico) parece estar ligada de forma antagônica à proteína ZMO0994 e ao controle do fator sigma 32. Essa dualidade entre a tolerância ao etanol e o choque osmótico induzido por glicose tem sentido fisiológico, considerando que as culturas de células geralmente iniciam com a concentração de glicose elevada e, ao decorrer do tempo, a concentração de glicose diminui e a de etanol aumenta.

O principal mecanismo de controle do sigma 32 descrito para *E. coli* é baseado na degradação desse fator sigma em condições normais de temperatura pela protease FtsH, que mantém os níveis intracelulares de sigma 32 relativamente baixos (HERMAN et al.,

DISCUSSÃO

1995). Após o choque térmico, os níveis de sigma 32 aumentam significativamente (fase de indução), o que leva à produção das proteínas de resposta ao choque térmico. Em seguida, há uma rápida desativação da fase de indução pela ação das chaperonas DnaK e DnaJ, que inibem a atividade de sigma 32 por meio de uma associação multimérica reversível, controlando a quantidade deste fator sigma (NOGUCHI et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2008; SUZUKI et al., 2012).

Em um estudo com deleções por transposon em *Z. mobilis*, algumas proteínas de resposta ao choque térmico foram identificadas como essenciais para o crescimento a 39°C (CHAROENSUK et al., 2017). Outro trabalho observou um aumento na expressão do fator sigma 32 e de algumas proteínas de resposta ao choque térmico (inclusive algumas com domínio DnaJ) quando *Z. mobilis* ZM4 está sob estresse osmótico induzido por glicose (ZHANG et al., 2015). Mas, o transcriptoma da *Z. mobilis* ZM4 não apresentou nenhuma expressão diferencial dessas proteínas quando exposta a 5% de etanol (HE et al., 2012b). Como ainda não há informações suficientes sobre o controle do fator sigma 32 em *Z. mobilis*, apenas é possível concluir que a presença desta proteína ativa tanto o mecanismo de resposta ao choque térmico quanto o mecanismo de resposta ao estresse osmótico, aumentando a taxa de consumo de glicose, e ainda reduzindo a tolerância ao etanol.

O papel da proteína ZMO0994 na resposta ao estresse osmótico ficou comprovado nos resultados apresentados, mas ainda não é possível descrever o mecanismo pelo qual ela atua. Parece existir alguma relação entre o papel dessa proteína e o fator sigma 32, considerando que o fenótipo das linhagens ZM4_Δ994 e ZM4_p32 são opostos em relação à resposta ao estresse osmótico e de etanol. O aumento na tolerância ao etanol provocado pela deleção do gene da proteína ZMO0994 pode ser de grande interesse econômico. Até o momento, o único trabalho com engenharia genética que obteve êxito em aumentar a tolerância ao etanol em *Z. mobilis*, o fez utilizando a Engenharia Global da Maquinaria Transcricional (gTME) (ALPER; STEPHANOPOULOS, 2007) com o fator sigma 70 sob o controle do promotor *pdg*. No entanto, não foram feitas análises transcriptômicas dessa linhagem e não foram identificados genes específicos (TAN et al., 2016).

Ao utilizar a técnica de gTME com o fator sigma 70 de *Z. mobilis*, deve-se ter cuidado com a concentração de glicose utilizada, pois aqui foi demonstrado que a linhagem que tem a expressão aumentada do sigma 70 perde adaptabilidade ao choque osmótico induzido por altas concentrações de glicose. Desta forma, as versões mutantes

DISCUSSÃO

do fator sigma 70 poderiam ter o crescimento aumentado em relação a um controle pela simples inativação desse fator, e não por um real aumento nos mecanismos de tolerância ao etanol. O uso de gTME com outros fatores sigma poderia fornecer informações relevantes e ajudar na elucidação desses mecanismos de resposta ao estresse.

Os fatores sigma 24, sigma 70, sigma 54 e sigma 28 são diferencialmente mais expressos quando *Z. mobilis* ZM4 está na presença de etanol (HE et al., 2012b). Aqui, apenas a superexpressão do fator sigma 24 não resultou em um aumento significativo da tolerância de *Z. mobilis* ZM4 ao etanol, tornando impossível uma conclusão sobre o real papel desse fator transcricional na resposta ao etanol. Mas considerando que tolerância ao etanol é uma característica complexa que envolve um conjunto de respostas em diferentes níveis, é provável que seja necessária a combinação dos diversos fatores sigma em concentrações específicas para ter um aumento significativo desse fenótipo. Sendo assim, técnicas mais abrangentes de análise podem ter um sucesso maior para o estudo da resposta ao etanol, como a proteômica e transcriptômica das linhagens ZM4_p32 e ZM4_Δ994.

Outra possibilidade para estudar a tolerância ao etanol em *Z. mobilis* seria utilizar uma técnica de deleções randômicas por transposon (PAPPAS; GALANI; TYPAS, 1997) na linhagem ZM4 e na linhagem ZM4_p32 (que é sensível ao etanol) e verificar quais mutações inibiriam o crescimento em etanol na linhagem selvagem e quais recuperariam a tolerância ao etanol na linhagem ZM4_p32, identificando assim os genes essenciais para a tolerância ao etanol e os genes cuja superexpressão dificultam a ativação desse mecanismo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram aprimoradas técnicas para a manipulação genética de *Z. mobilis* que permitiram o desenvolvimento deste e de outros projetos de expressão de proteínas heterólogas e de engenharia metabólica nessa bactéria. Além disso, a hipótese de que o AI-2 aumentaria a produção e a tolerância ao etanol demonstrou estar equivocada.

Novas evidências foram apresentadas sobre os mecanismos de resposta ao estresse fermentativo e a relação com a proteína ZMO0994 e com os fatores sigma 32 e sigma 24 em *Z. mobilis* ZM4:

- Os fatores sigma 32 e sigma 24 desempenham função reguladora dos mecanismos de resposta ao choque térmico.
- A deleção da proteína ZMO0994 aumenta a tolerância ao etanol e diminui a adaptabilidade das células a concentrações elevadas de glicose.
- A superexpressão do fator sigma 32 aumenta a tolerância ao estresse osmótico induzido por glicose, assim como a taxa de consumo de glicose em condições fermentativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADES, S. E. Regulation by destruction: design of the σ E envelope stress response. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 535–540, 2008.

AHMED, H. et al. Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation? **Biochemical Society transactions**, v. 32, n. Pt 2, p. 303–4, abr. 2004.

AHMED, H. et al. The semi-phosphorylative Entner–Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: a re-evaluation. **Biochemical Journal**, v. 390, n. 2, p. 529–540, 1 set. 2005.

ALEXEYEV, M. F. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. **BioTechniques**, v. 26, n. 5, p. 824–828, 1999.

ALGAR, E. M.; SCOPES, R. K. Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 275–287, 1 jul. 1985.

ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Global transcription machinery engineering: A new approach for improving cellular phenotype. **Metabolic Engineering**, v. 9, n. 3, p. 258–267, 2007.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ALVIN, A. et al. Industrial robustness linked to the gluconolactonase from *Zymomonas mobilis*. 2017.

AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 7 set. 2011.

ANSANAY-GALEOTE, V. et al. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 9, p. 677–681, 2001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARFMAN, N.; WORRELL, V.; INGRAM, L. O. Use of the tac promoter and lacIq for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 22, p. 7370–8, 1 nov. 1992.
- ATKINSON, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. 40, p. 959–978, 6 nov. 2009.
- ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 13, p. 1351–1357, dez. 1997.
- BALAGURUNATHAN, B.; TAN, L.; ZHAO, H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for acetaldehyde overproduction using pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 58–65, fev. 2018.
- BARKER, B. T. P.; HILLIER, V. F. Cider sickness. **Journal of agricultural Science**, v. 5, p. 67–85, 1912.
- BARROS, E. V et al. A novel cloning system for direct screening using a suicidal strategy. **Gene**, v. 179, n. 2, p. 287–9, 14 nov. 1996.
- BARROW, K. D. et al. 31P nuclear magnetic resonance studies of the fermentation of glucose to ethanol by *Zymomonas mobilis*. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 9, p. 5711–6, 10 maio 1984.
- BASSLER, B. L.; GREENBERG, E. P.; STEVENS, A. M. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 12, p. 4043–4045, 1997.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.
- BATTAGLIA, M. et al. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. **PLANT PHYSIOLOGY**, v. 148, n. 1, p. 6–24, 18 jul. 2008.
- BIANCHI, A. A.; BANEYX, F. Hyperosmotic shock induces the sigma32 and sigmaE stress regulons of *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1029–38, dez. 1999.
- BRADFORD, M. Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein utilizing principle of Protein-Dye-Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. Junctions of catabolic and anabolic pathways in *Zymomonas mobilis*: phosphoenolpyruvate carboxylase and malic enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31–31, n. 5–6, p. 529–536, out. 1989.

BROWNE, J.; TUNNAcliffe, A.; BURNELL, A. Plant desiccation gene found in a nematode. **Nature**, v. 416, n. 6876, p. 38–38, 7 mar. 2002.

BUCHER, M.; BRÄNDLE, R.; KUHLEMEIER, C. Ethanol fermentation in transgenic tobacco expressing *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. **The EMBO journal**, v. 13, n. 12, p. 2755–63, 15 jun. 1994.

BUDGEN, N.; DANSON, M. J. Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. **FEBS Letters**, v. 196, n. 2, p. 207–210, 1986.

BURNETT, M. E.; LIU, J.; CONWAY, T. Molecular characterization of the *Zymomonas mobilis* enolase (eno) gene. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6548–53, out. 1992.

BURTON, Z. et al. The nucleotide sequence of the cloned rpoD gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12. **Nucleic acids research**, v. 9, n. 12, p. 2889–903, 25 jun. 1981.

CAO, Q.-H. et al. Using the CRISPR/Cas9 system to eliminate native plasmids of *Zymomonas mobilis* ZM4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 3, p. 453–459, 4 mar. 2017.

CAO, Q. et al. Three new shuttle vectors for heterologous expression in *Zymomonas mobilis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 33–40, 2016.

CHACON-VARGAS, K. et al. Genome Sequence of *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* NRRL B-1960. **Genome Announcements**, v. 5, n. 30, 27 jul. 2017.

CHANG, A. C.; COHEN, S. N. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. **Journal of bacteriology**, v. 134, n. 3, p. 1141–56, jun. 1978.

CHAROENSUK, K. et al. Thermotolerant genes essential for survival at a critical high temperature in thermotolerant ethanologenic *Zymomonas mobilis* TISTR 548. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–11, 2017.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, C. et al. Genome comparison of different *Zymomonas mobilis* strains provides insights on conservation of the evolution. **PLoS one**, v. 13, n. 4, p. e0195994, 25 abr. 2018.
- CHEN, J. et al. Optimization of metabolic pathways for bioconversion of lignocellulose to ethanol through genetic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 593–598, set. 2009.
- CLONTECH. In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual. **In-Fusion Cloning**, v. 1, n. 011614, p. 1–15, 2012.
- CONWAY, T. et al. Promoter and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 3, p. 949–54, mar. 1987.
- CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway : history , physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 103, n. 1, p. 1–28, set. 1992.
- CONWAY, T.; SEWELL, G. W.; INGRAM, L. O. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Zymomonas mobilis*: cloning, sequencing, and identification of promoter region. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5653–62, dez. 1987.
- COOK, H.; USSERY, D. W. Sigma factors in a thousand *E. coli* genomes. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 3121–3129, dez. 2013.
- COTON, M. et al. Polyphasic study of *Zymomonas mobilis* strains revealing the existence of a novel subspecies *Z. mobilis* subsp. *francensis* subsp. nov., isolated from French cider. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 56, n. 1, p. 121–125, 1 jan. 2006.
- DADDS, M. J. S.; MARTIN, P. A. THE GENUS *ZYMOMONAS* -A REVIEW. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 5, p. 386–391, 10 set. 1973.
- DAWES, E. A.; LARGE, P. J. Effect of Starvation on the Viability and Cellular Constituents of *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 31–42, 1 jan. 1970.
- DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W.; LARGE, P. J. The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. **The Biochemical journal**, v. 98, n. 3, p. 795–803, mar. 1966.
- DE ARAÚJO, L. C. A. et al. Molecular identification and physiological characterization of *Zymomonas mobilis* strains from fuel-ethanol production plants in north-east Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 54–63, jul. 2018.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE GRAAF, A. A. et al. Metabolic state of *Zymomonas mobilis* in glucose-, fructose-, and xylose-fed continuous cultures as analysed by ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy. **Archives of microbiology**, v. 171, n. 6, p. 371–85, 1999.
- DE LEY, J.; SWINGS, J. Phenotypic Description, Numerical Analysis, and Proposal for an Improved Taxonomy and Nomenclature of the Genus *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 2, p. 146–157, 1 abr. 1976.
- DE MORAES, L. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; OLIVER, S. G. Development of yeast strains for the efficient utilisation of starch: evaluation of constructs that express alpha-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 1067–76, nov. 1995.
- DEANDA, K. et al. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4465–70, dez. 1996.
- DEMIR, E.; GOZGOR, G. Are shocks to renewable energy consumption permanent or temporary? Evidence from 54 developing and developed countries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 4, p. 3785–3792, 24 fev. 2018.
- DEMOSS, R. D.; GIBBS, M. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 34, n. 2, p. 478–9, dez. 1951.
- DESINIOTIS, A. et al. Complete Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Centrotype ATCC 29191. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, p. 5966–5967, 1 nov. 2012.
- DEUTSCHBAUER, A. et al. Towards an informative mutant phenotype for every bacterial gene. **Journal of bacteriology**, v. 196, n. 20, p. 3643–55, 15 out. 2014.
- DIEFENBACH, R. J.; DUGGLEBY, R. G. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Structure and re-activation of apoenzyme by the cofactors thiamin diphosphate and magnesium ion. **The Biochemical journal**, v. 276 (Pt 2), p. 439–45, 1 jun. 1991.
- DONG, G.; HE, M.; FENG, H. Functional Characterization of CRISPR-Cas System in the Ethanologenic Bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 03, p. 178–189, 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DONG, H. W. et al. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1616–1627, 2011.

DOUKA, E. et al. A *Zymomonas mobilis* mutant with delayed growth on high glucose concentrations. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4598–604, ago. 1999.

DUNN, K. L. **ENGINEERING ZYMOMONAS MOBILIS FOR THE PRODUCTION OF BIOFUELS AND OTHER VALUE-ADDED PRODUCTS**. Tese de Doutorado. University of Illinois, 2015.

DURE, L. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 3, n. 3, p. 363–9, mar. 1993.

DURE, L.; GALAU, G. A. Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: XIII. REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS. **Plant physiology**, v. 68, n. 1, p. 187–94, jul. 1981.

ENTNER, N.; DOUDOROFF, M. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. **The Journal of biological chemistry**, v. 196, n. 2, p. 853–62, maio 1952.

ERICKSON, J. W.; GROSS, C. A. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. **Genes & development**, v. 3, n. 9, p. 1462–71, set. 1989.

FAPARUSI, S. I. MICROORGANISMS FROM OIL PALM TREE (*Elaeis guineensis*) TAP HOLES. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 4, p. 755–757, 1 jul. 1974.

FARRELL, A. E. et al. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 506–508, 27 jan. 2006.

FURUKI, T.; SAKURAI, M. Group 3 LEA protein model peptides protect enzymes against desiccation stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 9, p. 1237–1243, set. 2016.

GARAY-ARROYO, A. et al. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5668–74, 25 fev. 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. Boston, MA: Springer US, 2005. p. 1–574.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 6, 1 maio 2008.

GONÇALVES DE LIMA, O. et al. Studies of antagonistic microorganisms present in fermented beverages by the people of Recife. I - On a variety of *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver and Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var. recifensis isolated from the popular drink "chopped cane bro. **Rev Inst de Antibiot**, v. 10, p. 57–69, 1970.

GONCALVES DE LIMA, O.; LARIOS, C.; AZEARATE, E. Aislamiento y estudio de nuevas cepas de *Pseudomonas lindneri* Kluyver et Hoppenbrouwers (*Termobacterium mobile* Lindner), en aguamiel de la meseta Central Mexicana. **Ciencia (Mexico City)**, v. 11, p. 273–277, 1951.

GONÇALVES, F. A.; DOS SANTOS, E. S.; DE MACEDO, G. R. Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 695–708, 2015.

GOPALKRISHNAN, S.; NICOLOFF, H.; ADES, S. E. Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, with other *Escherichia coli* sigma factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. **Molecular microbiology**, v. 93, n. 3, p. 479–93, ago. 2014.

GOYAL, K.; WALTON, L. J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. **Biochemical Journal**, v. 388, n. 1, p. 151–157, 15 maio 2005.

GU, H.; ZHANG, J.; BAO, J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 9, p. 1770–1782, set. 2015.

HALL, B. M.; OWENS, K. M.; SINGH, K. K. Distinct functions of evolutionary conserved MSF1 and late embryogenesis abundant (LEA)-like domains in mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 45, p. 39141–52, 11 nov. 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAND, S. C. et al. Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 307A, n. 1, p. 62–66, 1 jan. 2007.

HAND, S. C. et al. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. **Annual Review of Physiology**, v. 73, n. 1, p. 115–134, 2011.

HE, M. et al. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 101, 2014.

HE, M. X. et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 189–199, 2012a.

HE, M. X. et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under ethanol stress. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2012b.

HE, W. et al. 70ProPred: a predictor for discovering sigma70 promoters based on combining multiple features. **BMC systems biology**, v. 12, n. Suppl 4, p. 44, 24 abr. 2018.

HERMAN, C. et al. Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3516–20, 11 abr. 1995.

HEUNER, K.; HACKER, J.; BRAND, B. C. The alternative sigma factor sigma28 of *Legionella pneumophila* restores flagellation and motility to an *Escherichia coli* fliA mutant. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 1, p. 17–23, jan. 1997.

HINCHA, D. K.; THALHAMMER, A. LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 5, p. 1000–1003, 2012.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 9, p. 431–8, set. 2001.

HUANG, S. et al. Furfural-tolerant *Zymomonas mobilis* derived from error-prone PCR-based whole genome shuffling and their tolerant mechanism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 3337–3347, 21 abr. 2018.

IKUTA, N. et al. The α -Amylase Gene as a Marker for Gene Cloning: Direct Screening of Recombinant Clones. **Nature Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 241–242, 1 mar. 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IMAI, R. et al. A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 170, n. 2, p. 243–8, 8 maio 1996.

INGRAM, J.; BARTELS, D. THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 377–403, jun. 1996.

IVORRA, C.; PÉREZ-ORTÍN, J. E.; DEL OLMO, M. L. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 6, p. 698–708, 20 set. 1999.

JEON, Y. J. et al. Kinetic analysis of ethanol production by an acetate-resistant strain of recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 10, p. 819–824, 2002.

JEON, Y. J.; SVENSON, C. J.; ROGERS, P. L. Over-expression of xylulokinase in a xylose-metabolising recombinant strain of *Zymomonas mobilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 1, p. 85–92, 2005.

JÖBSES, I. M. L. et al. Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: Oscillations in continuous cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 868–877, jun. 1986.

JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; DOELLE, H. W. **Byproducts from *Zymomonas mobilis***. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 97–121.

JONES, C.; DOELLE, H. Kinetic control of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 4–9, abr. 1991.

KACZMARCZYK, A. et al. Role of Sphingomonas sp. Strain Fr1 PhyR-NepR-EcfG Cascade in General Stress Response and Identification of a Negative Regulator of PhyR. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 23, p. 6629–6638, 1 dez. 2011.

KACZOWKA, S. J. et al. Recombinant production of *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. **Archaea (Vancouver, B.C.)**, v. 1, n. 5, p. 327–34, maio 2005.

KALNENIEKS, U. **Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some Unanswered Questions**. v. 51, p. 71-117, 2006.

KALNENIEKS, U. et al. Modeling of *Zymomonas mobilis* central metabolism for novel metabolic engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KERR, A. L. et al. DNA restriction-modification systems in the ethanologen, *Zymomonas mobilis* ZM4. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 761–769, 2011.
- KERSTERS, K.; DE LEY, J. The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 34, n. 4, p. 393–408, 1968.
- KHANDELWAL, R. et al. Deletion of pyruvate decarboxylase gene in *Zymomonas mobilis* by recombineering through bacteriophage lambda red genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 151, p. 111–117, ago. 2018.
- KIKAWADA, T. et al. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 1, p. 56–61, 15 set. 2006.
- KIM, I. S.; BARROW, K. D.; ROGERS, P. L. Kinetic and nuclear magnetic resonance studies of xylose metabolism by recombinant *Zymomonas mobilis* ZM4(pZB5). **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 1, p. 186–93, jan. 2000.
- KITICHANTAROPAS, Y. et al. Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 107, 8 dez. 2016.
- KLUYVER, A. J.; NIEL, K. VAN. Prospects for a natural system of classification of bacteria. **Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr.**, v. 2, n. 94, p. 369–403, 1936.
- KOO, B.-M. et al. Dissection of recognition determinants of *Escherichia coli* σ^{32} suggests a composite –10 region with an ‘extended –10’ motif and a core –10 element. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 815–829, maio 2009.
- KOUVELIS, V. N. et al. Complete Genome Sequence of the Ethanol Producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 7140–7141, 15 nov. 2009.
- KOUVELIS, V. N. et al. Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. pomaceae Lectotype Strain ATCC 29192. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 5049–5050, 15 set. 2011.
- KOUVELIS, V. N. et al. Finished Genome of *Zymomonas mobilis* subsp. mobilis Strain CP4, an Applied Ethanol Producer. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, 27 fev. 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KOVACH, M. E. et al. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, n. 5, p. 800–802, 1994.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad host range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic resistance cassettes. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 175–176, 1995.

LANZAFAME, P. et al. Beyond Solar Fuels: Renewable Energy-Driven Chemistry. **ChemSusChem**, v. 10, n. 22, p. 4409–4419, 23 nov. 2017.

LAUDRIN-SEILLER, I. et al. Alcoholic fermentation by *Zymomonas mobilis*: Effect of initial substrate on physiological parameters. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 7, p. 477–480, jul. 1984.

LEE, S.-M. et al. Enhancement of 1,3-propanediol production by expression of pyruvate decarboxylase and aldehyde dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in the acetolactate-synthase-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1259–1266, 20 ago. 2014.

LELIEVELD, J. et al. The contribution of outdoor air pollution sources to premature mortality on a global scale. **Nature**, v. 525, n. 7569, p. 367–371, 17 set. 2015.

LIM, B. et al. Heat Shock Transcription Factor σ 32 Co-opts the Signal Recognition Particle to Regulate Protein Homeostasis in *E. coli*. **PLoS Biology**, v. 11, n. 12, p. e1001735, 17 dez. 2013.

LINDNER, P. Gärungsstudien über Pulque in Mexiko. **Bericht des Westpreussischen Botanisch-Zoologischen Vereins**, v. 50, p. 253–255, 1928.

LINGER, J. G.; ADNEY, W. S.; DARZINS, A. Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6360–6369, 2010.

LIU, Y.-F. et al. Effect of acetic acid on ethanol production by *Zymomonas mobilis* mutant strains through continuous adaptation. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 63, 1 dez. 2017.

LIU, Y. et al. CpLEA5, the Late Embryogenesis Abundant Protein Gene from *Chimonanthus praecox*, Possesses Low Temperature and Osmotic Resistances in Prokaryote and Eukaryotes. 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LIU, Y. et al. Group 3 LEA Protein, ZmLEA3, Is Involved in Protection from Low Temperature Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 07, p. 1011, 14 jul. 2016.
- LIU, Y.; ZHENG, Y. PM2, a group 3 LEA protein from soybean, and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in Escherichia coli. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 331, n. 1, p. 325–32, 27 maio 2005.
- LU, W.-C. Renewable energy, carbon emissions, and economic growth in 24 Asian countries: evidence from panel cointegration analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 33, p. 26006–26015, 23 nov. 2017.
- MATSUSHITA, K. et al. Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 4, p. 655–668, 2016.
- MEKONNEN, M. M. et al. Water, Energy, and Carbon Footprints of Bioethanol from the U.S. and Brazil. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 24, p. 14508–14518, 18 dez. 2018.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 165–199, out. 2001.
- MILLIS, N. F. A Study of the Cider-sickness Bacillus--a New Variety of *Zymomonas anaerobia*. **Journal of General Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 521–528, 1 dez. 1956.
- MISAWA, N.; YAMANO, S.; IKENAGA, H. Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1847–9, jun. 1991.
- MOTAMEDIAN, E.; SAEIDI, M.; SHOJAOSADATI, SEYED A. Reconstruction of a charge balanced genome-scale metabolic model to study energy-uncoupled growth of *Zymomonas mobilis* ZM1. **Mol. BioSyst.**, 2016.
- MTWISHA, L. et al. HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **Plant molecular biology**, v. 37, n. 3, p. 513–21, jun. 1998.
- MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 51 Pt 1, p. 263–73, 1986.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NAKAHIGASHI, K.; YANAGI, H.; YURA, T. Isolation and sequence analysis of rpoH genes encoding sigma 32 homologs from gram negative bacteria: conserved mRNA and protein segments for heat shock regulation. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4383–90, 11 nov. 1995.

NANAMIYA, H. et al. ClpC regulates the fate of a sporulation initiation sigma factor, sigmaH protein, in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. **Molecular microbiology**, v. 29, n. 2, p. 505–13, jul. 1998.

NOGUCHI, A. et al. DnaJ-Promoted Binding of DnaK to Multiple Sites on 32 in the Presence of ATP. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 9, p. 1694–1703, 1 maio 2014.

OHTA, K. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 4, p. 893–900, abr. 1991.

OKAFOR, N. Microbiology of Nigerian Palm Wine with Particular Reference to Bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 38, n. 2, p. 81–88, 1 abr. 1975.

OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 373–390, set. 2010.

OSMAN, Y. A. et al. Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: enzyme and metabolite levels during batch fermentation. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 8, p. 3726–36, ago. 1987.

PAGET, M. S. B.; HELMANN, J. D. The sigma70 family of sigma factors. **Genome biology**, v. 4, n. 1, p. 203, 2003.

PANESAR, P. S.; MARWAHA, S. S.; KENNEDY, J. F. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 623–635, 1 abr. 2006.

PAPPAS, K. M. et al. Genome Sequence of the Ethanol-Producing *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* Lectotype Strain ATCC 10988. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 18, p. 5051–5052, 15 set. 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PAPPAS, K. M.; GALANI, I.; TYPAS, M. A. Transposon mutagenesis and strain construction in *Zymomonas mobilis*. **Journal of applied microbiology**, v. 82, n. 3, p. 379–388, 1997.

PAPPAS, K. M.; WEINGART, C. L.; WINANS, S. C. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 755–769, 1 jul. 2004.

PAWLUK, A.; SCOPES, R. K.; GRIFFITHS-SMITH, K. Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase. **The Biochemical journal**, v. 238, n. 1, p. 275–81, 15 ago. 1986.

PENTJUSS, A. et al. Biotechnological potential of respiring *Zymomonas mobilis*: A stoichiometric analysis of its central metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 1, p. 1–10, 10 maio 2013.

PORNTHAP, T. et al. Ethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by *Zymomonas mobilis* TISTR548. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 52, p. 10691–10697, 12 set. 2011.

PUHAKAINEN, T. et al. Overexpression of Multiple Dehydrin Genes Enhances Tolerance to Freezing Stress in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 54, n. 5, p. 743–753, mar. 2004.

RAINA, S.; MISSIAKAS, D.; GEORGOPOULOS, C. The rpoE gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of Escherichia coli. **The EMBO journal**, v. 14, n. 5, p. 1043–1055, 1995.

REN, G. et al. Bacterial signals N-acyl homoserine lactones induce the changes of morphology and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 117, 21 dez. 2016.

REYNEN, M. et al. Construction of expression vectors for the Gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 223, n. 2, p. 335–41, set. 1990.

RFA. **Ethanol Industry Statistics**. Washinton, DC: 2017.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RODRIGUES, M. I.; COSTA, P. **Protimiza Experimental Desing**. Disponível em: <<http://experimental-design.protimiza.com.br>>.
- RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. First ed. [s.l.] CRC Press, 2014.
- RODRIGUEZ, F. et al. Molecular Basis for Regulation of the Heat Shock Transcription Factor σ_{32} by the DnaK and DnaJ Chaperones. **Molecular Cell**, v. 32, n. 3, p. 347–358, 2008.
- ROGERS, P. L. et al. *Zymomonas mobilis* for Fuel Ethanol and Higher Value Products. In: **Biofuels**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 263–288.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 1, n. 4, p. 165–170, abr. 1979.
- ROMANO, A. H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 6–7, p. 448–455, 1996.
- RUTKIS, R. et al. Kinetic modelling of the *Zymomonas mobilis* Entner-Doudoroff pathway: Insights into control and functionality. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 12, p. 2674–2689, 2013.
- RUTKIS, R. et al. The inefficient aerobic energetics of *Zymomonas mobilis*: Identifying the bottleneck. **Journal of Basic Microbiology**, 2014.
- SAFARI, M. et al. Microbial metabolism of quorum-sensing molecules acyl-homoserine lactones, γ -heptalactone and other lactones. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3401–3412, 9 abr. 2014.
- SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Fourth ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- SCANLON, B. **National Renewable Energy Laboratoy**. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/news/features/2015/16468.html>>. Acesso em: 10 jul. 2019.
- SCOPES, R. K. An iron-activated alcohol dehydrogenase. **FEBS letters**, v. 156, n. 2, p. 303–6, 13 jun. 1983.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SCOPES, R. K. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis*. **Analytical biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 525–9, fev. 1984.
- SCOPES, R. K. et al. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. **The Biochemical journal**, v. 228, n. 3, p. 627–34, 15 jun. 1985.
- SCOPES, R. K.; GRIFFITHS-SMITH, K. Use of differential dye-ligand chromatography with affinity elution for enzyme purification: 6-phosphogluconate dehydratase from *Zymomonas mobilis*. **Analytical biochemistry**, v. 136, n. 2, p. 530–4, fev. 1984.
- SENTHILKUMAR, V. et al. Disruption of the *Zymomonas mobilis* extracellular sucrose gene (sacC) improves levan production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 671–676, 2004.
- SEO, J.-S. et al. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 63–68, 12 jan. 2005.
- SHUI, Z.-X. et al. Adaptive laboratory evolution of ethanologenic *Zymomonas mobilis* strain tolerant to furfural and acetic acid inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5739–5748, 3 jul. 2015.
- SILVA, L. C. N. et al. Genetic variability analysis of *Zymomonas mobilis* strains from the UFPEDA microorganisms collection. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 805–814, 2 fev. 2015.
- SKOTNICKI, M. L. et al. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 41, n. 4, p. 889–93, abr. 1981.
- SKOTNICKI, M. L. et al. Genetic Alteration of *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production. In: **Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals**. Boston, MA: Springer US, 1982. p. 271–290.
- SNEATH, P. H. A.; MCGOWAN, V.; SKERMAN, V. B. D. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 225–420, 1 jan. 1980.
- SOMMER, A. Burning Fossil Fuels. **International Journal of Health Services**, v. 46, n. 1, p. 48–52, 30 jan. 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SOOTSUWAN, K. et al. Thermotolerant *Zymomonas mobilis*: Comparison of ethanol fermentation capability with that of an efficient type strain. **The Open Biotechnology Journal**, v. 1, n. 1, p. 59–65, 2007.
- SOOTSUWAN, K. et al. Analysis of the Respiratory Chain in Ethanologenic *Zymomonas mobilis* with a Cyanide-Resistant-Type Ubiquinol Oxidase as the Only Terminal Oxidase and Its Possible Physiological Roles. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 163–175, 2008.
- SOOTSUWAN, K. et al. Sorbitol required for cell growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* under heat, ethanol, and osmotic stresses. p. 1–13, 2013.
- SPERANDIO, V. et al. Bacteria-host communication: The language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8951–8956, 22 jul. 2003.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, n. 3, p. 301–307, 15 dez. 1996.
- STACY, R. A. P.; AALEN, R. B. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. **Planta**, v. 206, n. 3, p. 476–478, 24 ago. 1998.
- STARON, A. et al. The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 557–581, 2009.
- SUTTER, J.-M. et al. Key Enzymes of the Semiphosphorylative Entner-Doudoroff Pathway in the Haloarchaeon *Haloferax volcanii*: Characterization of Glucose Dehydrogenase, Gluconate Dehydratase, and 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconate Aldolase. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 16, p. 2251–62, 15 ago. 2016.
- SUZUKI, H. et al. Synergistic Binding of DnaJ and DnaK Chaperones to Heat Shock Transcription Factor σ^{32} Ensures Its Characteristic High Metabolic Instability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 23, p. 19275–19283, 1 jun. 2012.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–46, mar. 1977.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- TAN, F. et al. Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 4, 13 dez. 2016.
- TAN, F. R. et al. Improving furfural tolerance of *Zymomonas mobilis* by rewiring a sigma factor RpoD protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5363–5371, 2015.
- TAN, Z. et al. Engineering *Escherichia coli* membrane phospholipid head distribution improves tolerance and production of biorenewables. **Metabolic Engineering**, v. 44, p. 1–12, nov. 2017.
- TODHANAKASEM, T. et al. Inhibition analysis of inhibitors derived from lignocellulose pretreatment on the metabolic activity of *Zymomonas mobilis* biofilm and planktonic cells and the proteomic responses. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 1, p. 70–81, jan. 2018.
- UHLENBUSCH, I.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1360–6, maio 1991.
- WANG, G. J. et al. Cloning and expression of amyE gene from *Bacillus subtilis* in *Zymomonas mobilis* and direct production of ethanol from soluble starch. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 4, p. 780–786, 2012.
- WANG, H. et al. Very high gravity ethanol and fatty acid production of *Zymomonas mobilis* without amino acid and vitamin. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 861–871, jun. 2016a.
- WANG, J.-L. et al. Engineered *Zymomonas mobilis* for salt tolerance using EZ-Tn5-based transposon insertion mutagenesis system. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 101, 10 dez. 2016b.
- WANG, X. et al. Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 57–73, nov. 2018.
- WATTANAVANITCHAKORN, S.; PRAKITCHAIWATTANA, C.; THAMYONGKIT, P. Rapid and simple colorimetric method for the quantification of AI-2 produced from *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Microbiological Methods**, 2014.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WEBER, H. et al. Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*: S-Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1591–1603, 1 mar. 2005.
- WESTBROOK, C. K. Biofuels Combustion. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 201–219, abr. 2013.
- WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1 dez. 1999.
- WIDIASTUTI, H. et al. Genome-scale modeling and in silico analysis of ethanologenic bacteria *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 3, p. 655–665, mar. 2011.
- WINZER, K. et al. LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 4, p. 909–922, 2002.
- WU, B. et al. Engineered *Zymomonas mobilis* tolerant to acetic acid and low pH via multiplex atmospheric and room temperature plasma mutagenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 10, 5 dez. 2019.
- XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 238–248, 2005.
- XU, D. et al. Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. **Plant physiology**, v. 110, n. 1, p. 249–257, jan. 1996.
- YANASE, H. et al. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1667–1678, 11 jun. 2012.
- YANG, J. W. **Enhanced bioethanol production by *Zymomonas mobilis* in response to the quorum sensing molecules AI-2**. Tese de Doutorado. Durham University, 2011.
- YANG, S. et al. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 34, 2009a.
- YANG, S. et al. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 893–894, 1 out. 2009b.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YANG, S. et al. Systems Biology Analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 Ethanol Stress Responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

YANG, S. et al. Elucidation of *Zymomonas mobilis* physiology and stress responses by quantitative proteomics and transcriptomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–13, 2014.

YANG, S. et al. Complete genome sequence and the expression pattern of plasmids of the model ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 and its xylose-utilizing derivatives 8b and 2032. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 125, 2 dez. 2018.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, n. 1, p. 103–19, 1985.

YI, X. et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 153, 22 dez. 2015.

YURA, T. Regulation and conservation of the heat-shock transcription factor sigma32. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 1, n. 3, p. 277–84, mar. 1996.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, p. 1–11, 2014.

ZACHARIOU, M.; SCOPES, R. K. Gluconate kinase from *Zymomonas mobilis*: isolation and characteristics. **Biochemistry international**, v. 10, n. 3, p. 367–71, mar. 1985.

ZENG, X. et al. LEA proteins from *Gastrodia elata* enhance tolerance to low temperature stress in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 646, p. 136–142, 10 mar. 2018.

ZHANG, K. et al. Transcriptional analysis of adaptation to high glucose concentrations in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 2009–2022, 2015.

ZHANG, K. et al. New technologies provide more metabolic engineering strategies for bioethanol production in *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 19 jan. 2019.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ZHANG, M. et al. Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, v. 267, n. 5195, p. 240–243, 13 jan. 1995.

ZHANG, X. et al. Use of a Tn5-based transposon system to create a cost-effective *Zymomonas mobilis* for ethanol production from lignocelluloses. **Microbial cell factories**, v. 12, p. 41, 2013.

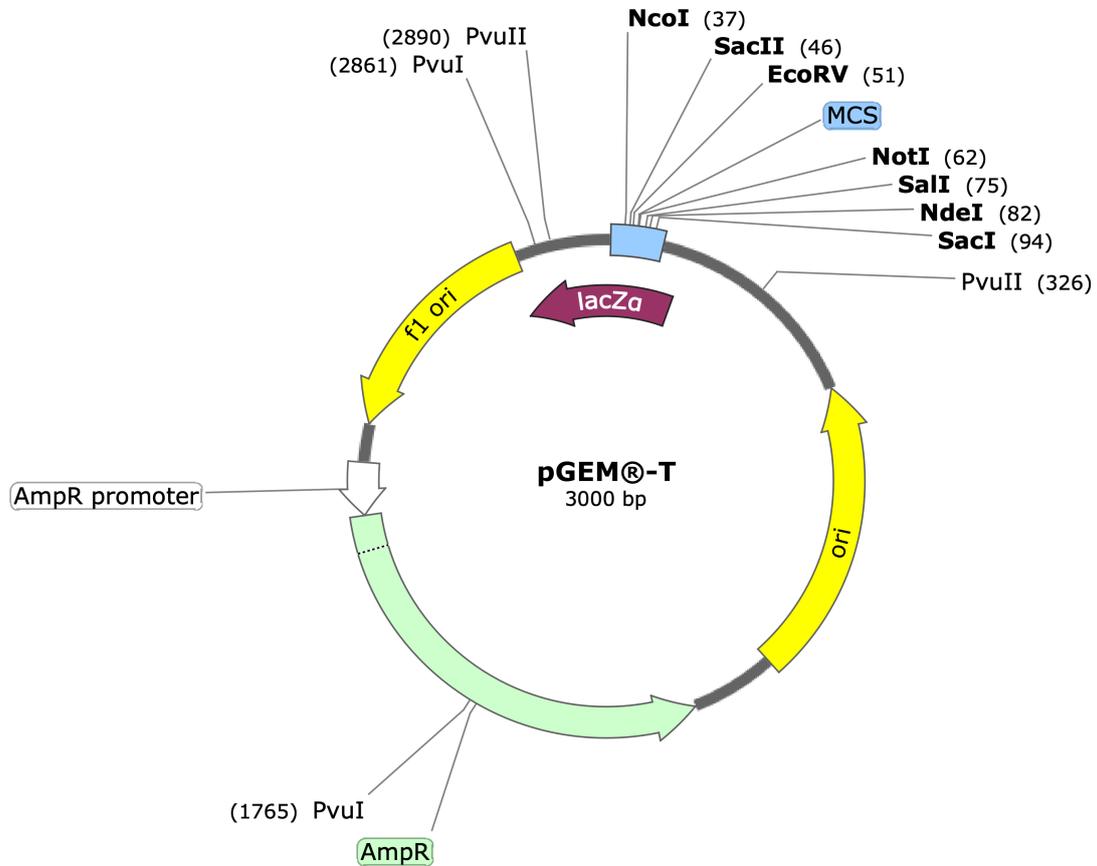
ZHAO, K.; LIU, M.; BURGESS, R. R. Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, σ_{54} , reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 4, p. 1273–1283, mar. 2010.

ZOU, S. et al. Comparison of the electro transformation of plasmids and plasmid stability between mo ZM4 and CP4. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 12, p. 2026–2033, 2011.

ZOU, S. L. et al. Enhanced electrotransformation of the ethanologen *Zymomonas mobilis* ZM4 with plasmids. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, p. 155–164, 2012.

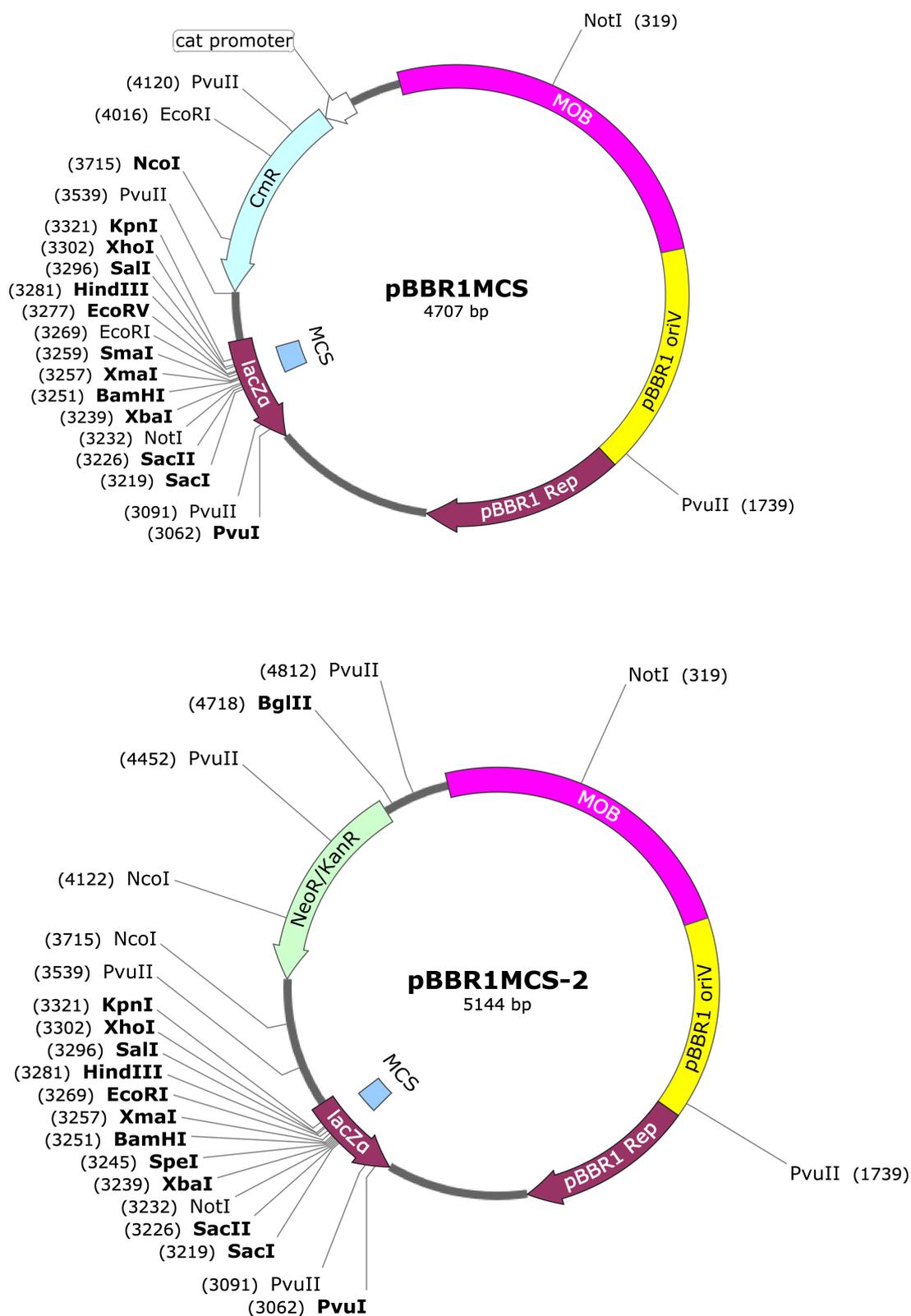
ANEXOS

8. ANEXOS



Anexo 1. Mapa do plasmídeo de clonagem pGEM-T (Promega, EUA). **f1 ori** – origem de replicação do bacteriófago f1. **lacZa** – gene da b-galactosidase. **MCS** – Múltiplo sítios de clonagem. **AmpR** – gene de resistência a ampicilina.

ANEXOS



Anexo 2. Mapa dos plasmídeos pBBR1MCS e pBBR1MCS-2. **MOB** – Sequência de mobilidade; **MCS** – Sítios múltiplos de clonagem; **CmrR** – gene da enzima cloranfenicol acetiltransferase; **KanR** – gene de resistência a canamicina; **pBBR1 oriV** e **Rep** – Origens de replicação do pBBR1MCS.

ANEXOS

Anexo 3. Mapa e sequência do cassete de expressão sintético da alfa-amilase de *B. subtilis* otimizado para *Z. mobilis* ZM4 (azul), com o promotor e terminador da piruvato descarboxilase (vermelho) e o peptídeo sinal na proteína ZMO0130 de *Z. mobilis* ZM4 (roxo).



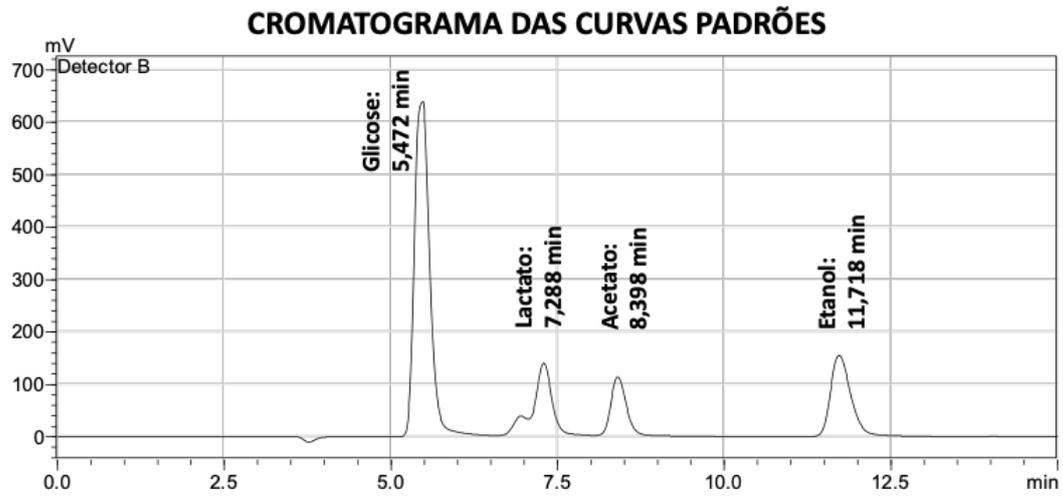
CTAGACTAGATGCGGTATAATATCTGTAACAGCTCATTGATAAAGCCGGTCGCTCGCCT
CGGGCAGTTTTGGATTGATCCTGCCCTGTCTTGTGGAAATTGATGAGGCCGTTTCATGA
CAACAGCCGGAAAAATTTAAAACAGGCGTCTTCGGCTGCTTTAGGTCTCGGCTACGTT
TCTACATCTGGTTCTGATTCCCGGTTTACCTTTTTCAAGGTGTCCCGTTCCTTTTTCC
CTTTTTGGAGGTTGGTTATGTCCTATAATCACTTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTT
GTCCATCATGGTTGTTTATCGCTCATGATCGCGACATGTTCTGATATTTTTCTCTAAA
AAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAGGTTTCATCATGAACAAAAATTCGGCA
TTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCC
TGATTCAGACATAGTGTGTTTGAATATATGGAGTAAGCATATGATCAAGGTCCCTCGCTT
CATTTGTATGATCGCCTTAACGTCTAGCGTGTGGCTTCTGGACTGTCTCAATCCGTCT
CCGCTCATGCTGAAACAGCCAATAAATCCAATAAAGTTACTGCCAGCTCTGTTAAGAAT
GGTACGATCTTACATGCGTGGAATTGGAGCTTCAATACCTTGACCAGAATATGAAAGA
CATCCGTGATGCGGGTTATGCTGCTATTCAGACCTCTCCGATTAATCAGGTCAAGGAAG
GCAATCAAGGAGATAAGTCTATGCGGAATTGGTATTGGTTGTATCAACCGACCTCTTAT
CAGATTGGTAATCGCTATCTGGGTACAGAACAGGAGTTCAAGGATATGTGCGCTGCTGC
GGAGAAATATGGTGTCAAAGTCATTGTTGACGCGGTGATTAATCATACTACCTCTGACT
ATGGAGCGATCAGCGATGAAATCAAGCGTATTCCGAATTGGACGCATGGGAATACGCAA
ATCAAGAATTGGTCTGATCGCTGGGATGTCACCCAGAATAGCCTTCTGGGCCTGTATGA
TTGGAATACGCAGAATACCGAGGTTCAAGCATATCTGAAACGCTTTCTTGAACGTGCGT
TGAATGATGGAGCTGATGGTTTCCGTTATGATGCAGCGAAACATATCGAATTGCCAGAC
GATGGCAATTATGGTAGCCAGTTCTGGCCCAATATTACCAATACGTCTGCCGAGTTCCA
GTATGGCGAGATTCTGCAAGATAGCGCCAGCCGTGATACCGCCTATGCCAATTATATGA
ATGTGACTGCCAGCAATTATGGTCATAGCATCCGCTCTGCATTGAAGAATCGTAATCTT
TCTGTCAGCAATATTAGCCATTATGCGAGCGATGTTTCCGCAGATAAGCTGGTTACTTG
GGTCGAAAGCCATGATACCTATGCGAATGATGATGAAGAGTCTACGTGGATGAGCGATG
ACGACATTCGCCTGGGCTGGGCAGTTATCGGCAGCCGGAGCGGAAGCACTCCGTTGTTC
TTCTCTCGTCTGAAGGTGGAGGTAATGGTGTCCGGTTTCCAGGCAATCTCAGATTGG
AGATCGTGGGTCTGCCCTGTTCAAGGATCAAGCCATTACCGCAGTCAATACTTTCCATA

ANEXOS

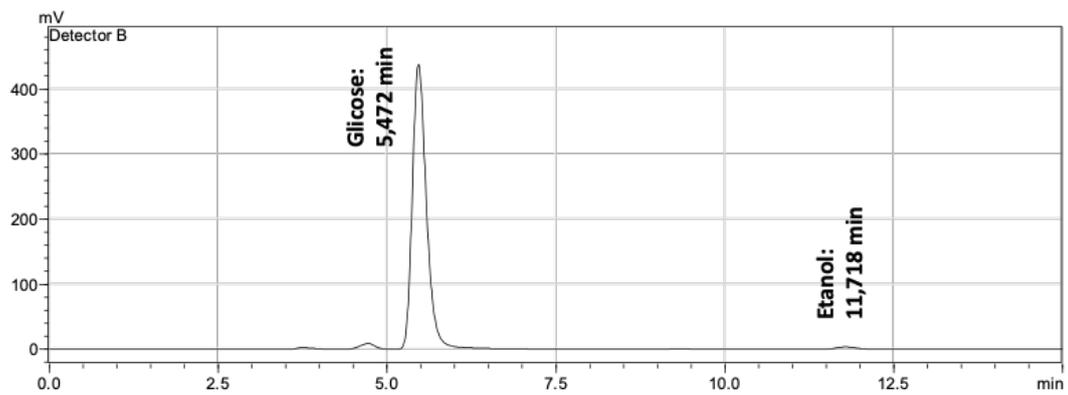
ATGTTATGGCTGGACAGCCAGAAGAATTGTCCAATCCGAATGGCAATAATCAGATCTTC
ATGAATCAACGCGGTTCCAAAGGTGTTGTTCTTGCCAATGCCGGTTCCTCTTCTGTGAC
CATCAATACGTCTACTAAGTTGCCGGATGGCCGTTATGACAATCGCGCTGGTGCAGGTT
CCTTCCAGGTGGCGAATGGTAAGTTAACAGGGACCATTAATGCTCGTTCCTGCTGCCGTT
CTGTATCCCGACGACATTGGAAATGCTCCTCATGTGTTTCTGGAGAATTATCAGACTGG
TGCTGTGCATTCCTTCAATTGAGTCGACTTTTTTAAATAAACTTAGAGCTTAAGGCGAAA
AGCCCGTCCGGTTTTACCGGGCGGGCTTTTTTTTATCCAAGACGACTCAAATGATGGGGT
AGGAGGCATAGCGCTTTTTTACGCGTTCCTTTTTTCTGATTTTCCCTCTCAACAAAA
ATGTCTTATTGAAACATAAATGACAGCTTTGTTTTTCTTTTCTATAAAATTGTTACAGA
ATCCCTTGCTAAGCAGGGCTGGCTCTTGACCGATAAAAAGAAC

ANEXOS

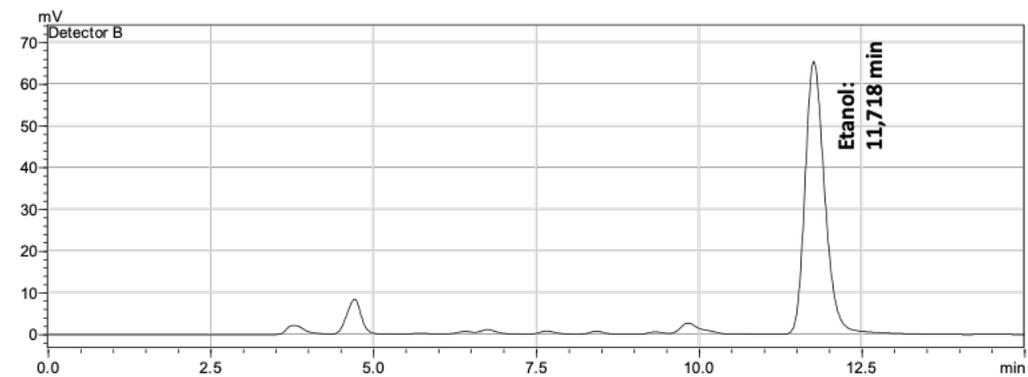
Anexo 4. Cromatogramas e curvas padrões para a quantificação de metabólitos por HPLC. Os tempos de retenção com a identificação de cada metabólito estão indicados nas figuras.



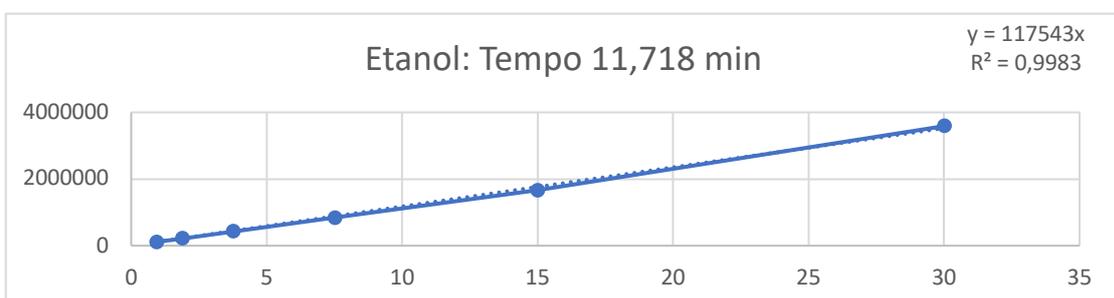
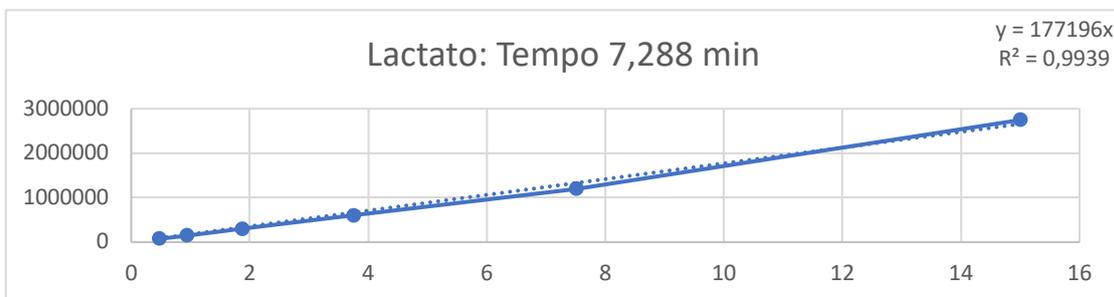
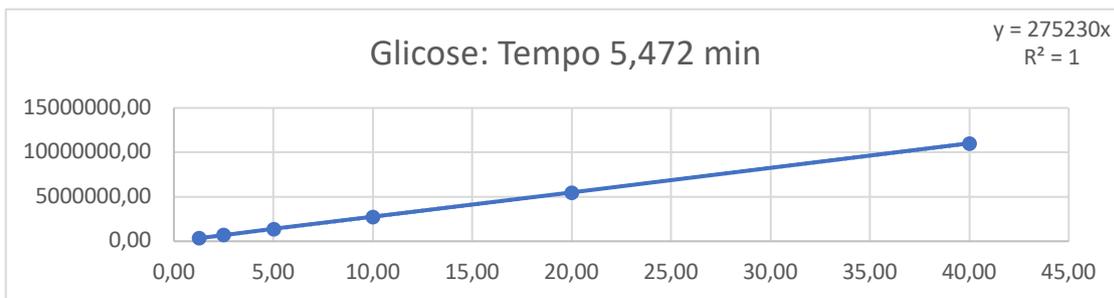
CROMATOGRAMA DO SOBRENADANTE INICIAL DE UMA CULTURA DE *Z. MOBILIS*



CROMATOGRAMA DO SOBRENADANTE DE UMA CULTURA DE *Z. MOBILIS* APÓS 24h

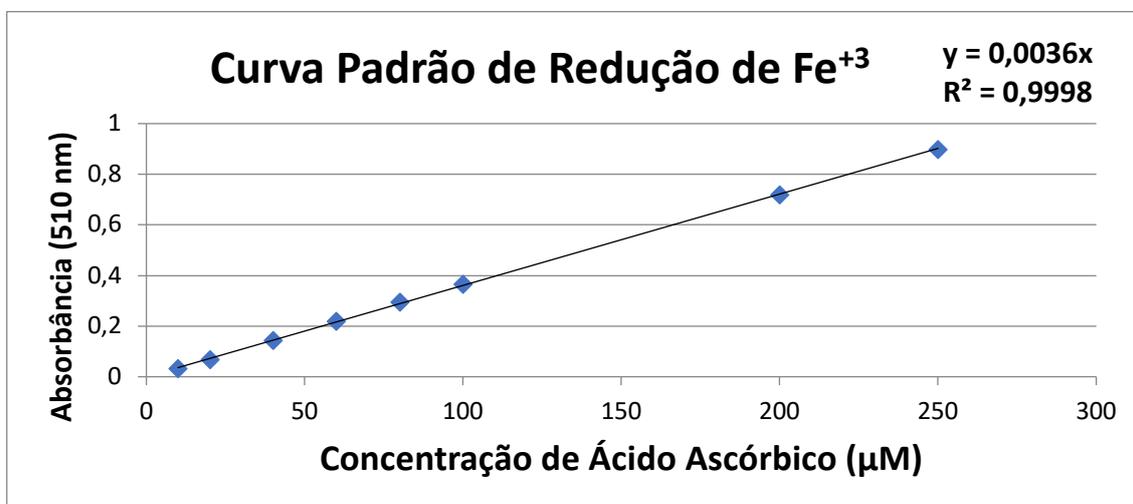


ANEXOS



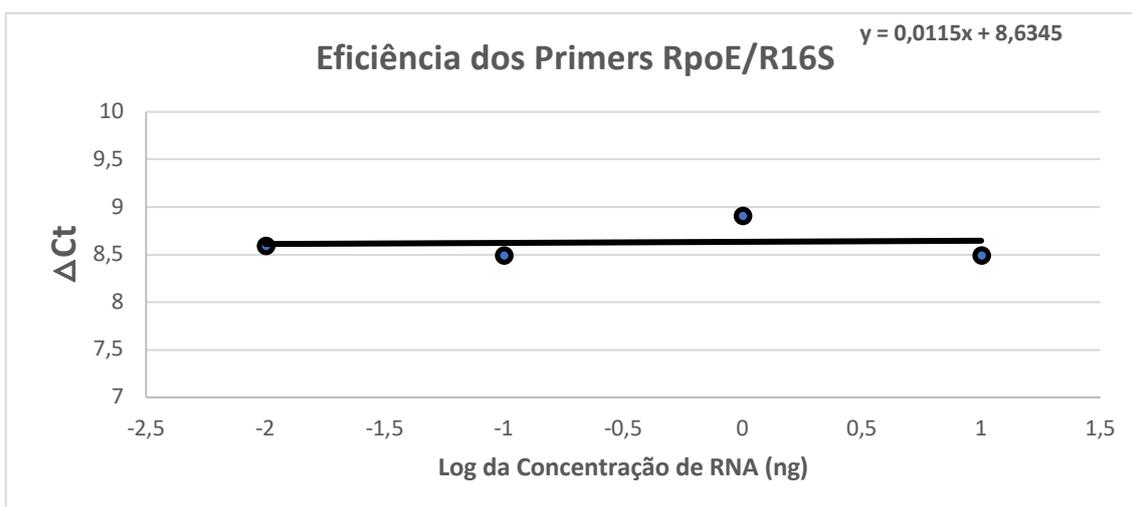
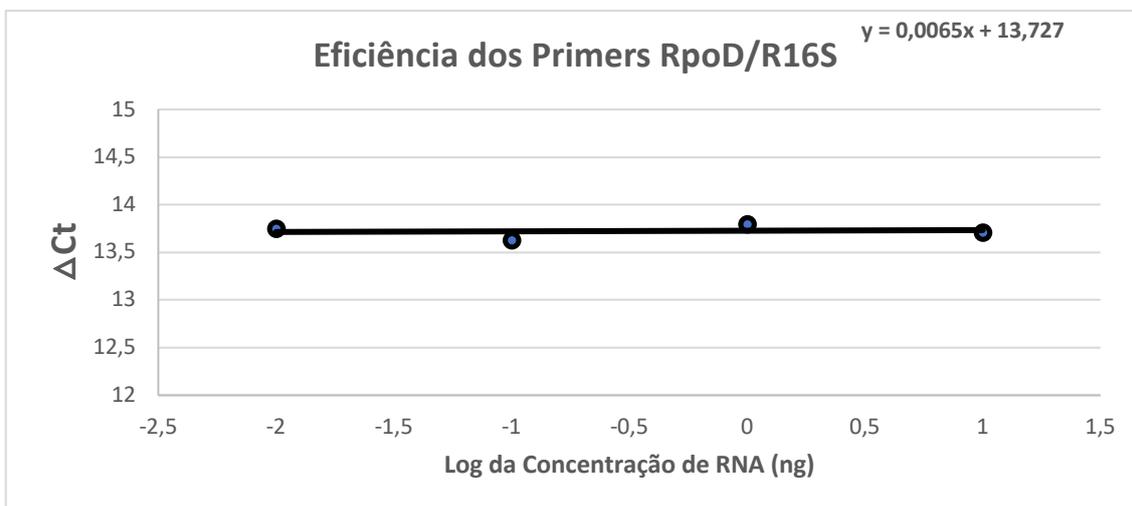
ANEXOS

Anexo 5. Curva padrão da redução do Fe^{3+} com ácido ascórbico para a quantificação relativa de AI-2 (WATTANAVANITCHAKORN; PRAKITCHAIWATTANA; THAMYONGKIT, 2014).

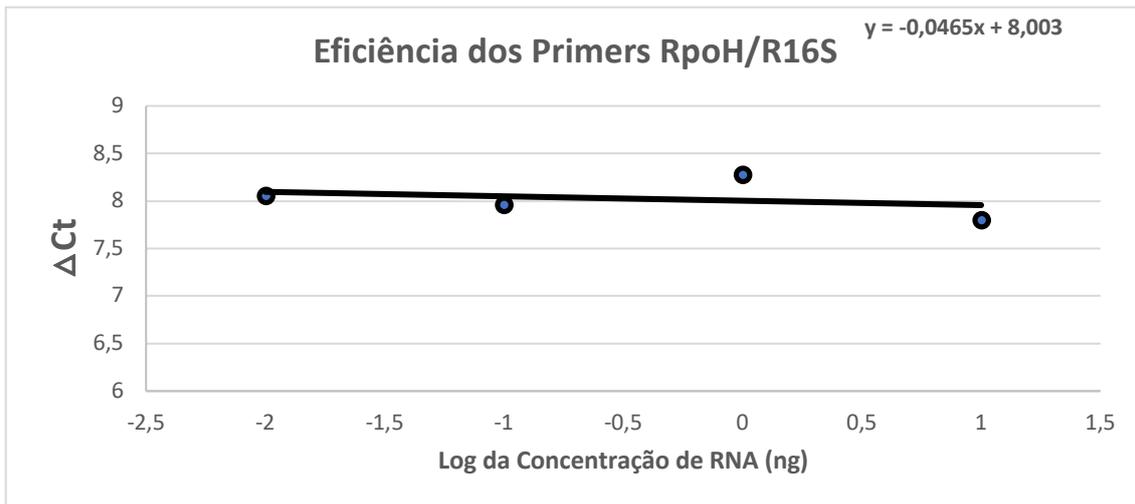


ANEXOS

Anexo 6. Curva de eficiência relativa dos pares de iniciadores para as reações de RT-qPCR. Os pares de iniciadores que amplificam regiões dos genes *rpoD*, *rpoE* e *rpoH* de *Z. mobilis* ZM4 foram comparados com o par de iniciadores que amplifica a região do RNA ribossomal 16S de *Z. mobilis* ZM4. O ΔCt foi calculado como a diferença entre o Ct de amplificação do gene alvo e do rRNA 16S. Para todos foi mantido o mesmo limiar de amplificação.



ANEXOS



ANEXOS

Anexo 7. Análise do sequenciamento dos plasmídeos pB1_s70, pB1_s24 e pB1_s32 nas linhagens ZM4_p70, ZM4_p24 e ZM4_p32 respectivamente. A sequência *Query* é a referência prevista na construção *in silico* e inicia-se no primeiro nucleotídeo do promotor PDC. A sequência *Subject* é o resultado do sequenciamento pelo método de Sanger realizado por dois iniciadores em triplicata para cada plasmídeo, sendo considerada apenas a região em que há qualidade no sequenciamento. Os códons de início e final estão destacados em cada sequência.

pB1_s70

```
Query 332 TGTTCCTGATATTTTCCCTCTAAAAAAGATAAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAGAGAGGTT 391
          |||
Sbjct 1 TGTTCCTGATATTTTCCCTCTAAAAAAGATAAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAGAGAGGTT 60

Query 392 CATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACT 451
          |||
Sbjct 61 CATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGACACT 120

Query 452 TTAGAGGTTTCTGGGTCATCCGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCAT 511
          |||
Sbjct 121 TTAGAGGTTTCTGGGTCATCCGATTCAGACATAGTGTTTTGAATATATGGAGTAAGCAT 180

Query 512 ATGCGCAGAGACGACTACGGCTGAAGCGAAAAAAAATGCCGGTGATGCGCCGCTGATCGAT 571
          |||
Sbjct 181 ATGCGCAGAGACGACTACGGCTGAAGCGAAAAAAAATGCCGGTGATGCGCCGCTGATCGAT 240

Query 572 TTGAATGAAACGTCGATCCGTAATTCATAACGCAAGCCAAAAAGCGCGGATATGTAACC 631
          |||
Sbjct 241 TTGAATGAAACGTCGATCCGTAATTCATAACGCAAGCCAAAAAGCGCGGATATGTAACC 300

Query 632 TATGACCAGCTGAATGAAGCTCTTCCACAGGACCAGATGTCTTCGGAACAGATCGAAGAT 691
          |||
Sbjct 301 TATGACCAGCTGAATGAAGCTCTTCCACAGGACCAGATGTCTTCGGAACAGATCGAAGAT 360

Query 692 ATTATGTCTGCCCTTTCGGAAATGGGCATCAATATCGTCGAAAAATGAAGATAGCGGCGAG 751
          |||
Sbjct 361 ATTATGTCTGCCCTTTCGGAAATGGGCATCAATATCGTCGAAAAATGAAGATAGCGGCGAG 420

Query 752 GATGGTCAGCAGGAAGAAGAAGACGCAGCCGAAGAGCTTCAGGGCGACGGTGCGACTTCT 811
          |||
Sbjct 421 GATGGTCAGCAGGAAGAAGAAGACGCAGCCGAAGAGCTTCAGGGCGACGGTGCGACTTCT 480

Query 812 CCGGCTCCGGCCATTACGACCAAGAAAGAAACATCCGACCGGACAGATGATCCGGTGCGT 871
          |||
Sbjct 481 CCGGCTCCGGCCATTACGACCAAGAAAGAAACATCCGACCGGACAGATGATCCGGTGCGT 540

Query 872 ATGTATCTCCGCGAAATGGGTGCGGTCGAGCTTTTGAGCCGTGAAGGTGAAATTCGCGATC 931
          |||
Sbjct 541 ATGTATCTCCGCGAAATGGGTGCGGTCGAGCTTTTGAGCCGTGAAGGTGAAATTCGCGATC 600

Query 932 GCCAAGCGGATCGAAGCTGGTTCGCGACACCATGATTTTAGGGCTTTGCGAAAGCCCGATT 991
          |||
Sbjct 601 GCCAAGCGGATCGAAGCTGGTTCGCGACACCATGATTTTAGGGCTTTGCGAAAGCCCGATT 660

Query 992 ACTTTTGACAACATTATCGAATGGTTCGAATGCTCTGAATGAAGGCACGCTACAATTGCGT 1051
          |||
Sbjct 661 ACTTTTGACAACATTATCGAATGGTTCGAATGCTCTGAATGAAGGCACGCTACAATTGCGT 720

Query 1052 GAAATCATTGATCTGGATGCGATGTTGACCCAAGGCCCTCCCCGATCAATTCGAGGAA 1111
          |||
Sbjct 721 GAAATCATTGATCTGGATGCGATGTTGACCCAAGGCCCTCCCCGATCAATTCGAGGAA 780

Query 1112 GACGGCGATGATAACGACAACGAGATTTCCGAGCGGAATGCGGGCCCGACCTTCAAAGAA 1171
          |||
Sbjct 781 GACGGCGATGATAACGACAACGAGATTTCCGAGCGGAATGCGGGCCCGACCTTCAAAGAA 840
```

ANEXOS

Query	1172	GATGATGATGAAGATGATGACAGCGAAGGCGAGCTAGACGAAAACGGTCAGCGCATCCAG 	1231
Sbjct	841	GATGATGATGAAGATGATGACAGCGAAGGCGAGCTAGACGAAAACGGTCAGCGCATCCAG 	900
Query	1232	CGTGAGAATATGGACGAGGAAGATGAAAACACCTTGTCTCTGGCGCAAATGGAAGAACAG 	1291
Sbjct	901	CGTGAGAATATGGACGAGGAAGATGAAAACACCTTGTCTCTGGCGCAAATGGAAGAACAG 	960
Query	1292	CTTAAGCCAGCTTCTTTAGAAAAATTTGCTAAAAATTGCTGATCTTTACCGCCAATTCTCG 	1351
Sbjct	961	CTTAAGCCAGCTTCTTTAGAAAAATTTGCTAAAAATTGCTGATCTTTACCGCCAATTCTCG 	1020
Query	1352	GTTCTTCAGAAATGCACGGATGCGGGCTTTAGGCGCGAATGAAGAATTTCCAGAGGATCAG 	1411
Sbjct	1021	GTTCTTCAGAAATGCACGGATGCGGGCTTTAGGCGCGAATGAAGAATTTCCAGAGGATCAG 	1080
Query	1412	GAAAACGCCTATCAGCAGCTTAGAGAAGAGCTGACCGCAGAAGTTGAAAGCGTCAAATTC 	1471
Sbjct	1081	GAAAACGCCTATCAGCAGCTTAGAGAAGAGCTGACCGCAGAAGTTGAAAGCGTCAAATTC 	1140
Query	1472	CATAACGCTCGTATCGAATTTTTGGTTGAACAGCTTTATAACTATAACAGCCGCTTTAGA 	1531
Sbjct	1141	CATAACGCTCGTATCGAATTTTTGGTTGAACAGCTTTATAACTATAACAGCCGCTTTAGA 	1200
Query	1532	ACGCTGAATGGTCAGATGTTGCGTCTGGCAGAACGTTATAAAGTGCCGCGTGATCTTTTC 	1591
Sbjct	1201	ACGCTGAATGGTCAGATGTTGCGTCTGGCAGAACGTTATAAAGTGCCGCGTGATCTTTTC 	1260
Query	1592	CTCAATGCCTATTTGGGCAATGAAATGGAAGAAGGCTGGGTGCAACGCGTTTCAAAAATC 	1651
Sbjct	1261	CTCAATGCCTATTTGGGCAATGAAATGGAAGAAGGCTGGGTGCAACGCGTTTCAAAAATC 	1320
Query	1652	GACAAAAAATGGGCTAACTTCACGACGAGTGAAGCCGAAAGCATCGAACGCATCCGTTTCG 	1711
Sbjct	1321	GACAAAAAATGGGCTAACTTCACGACGAGTGAAGCCGAAAGCATCGAACGCATCCGTTTCG 	1380
Query	1712	GAAGTAGCCGAAATCGCCCAAGTCACCGGTATGACGTTAAAAGAATTACGTCGTATTGTG 	1771
Sbjct	1381	GAAGTAGCCGAAATCGCCCAAGTCACCGGTATGACGTTAAAAGAATTACGTCGTATTGTG 	1440
Query	1772	ACCATGGTACAAAAAGGCGAAAGAGAAGCCCGCATCGCTAAAACCGAAATGGTTGAAGCC 	1831
Sbjct	1441	ACCATGGTACAAAAAGGCGAAAGAGAAGCCCGCATCGCTAAAACCGAAATGGTTGAAGCC 	1500
Query	1832	AATCTGCGTTTGGTTATCTCTATTGCCAAAAAATATACCAATCGCGGTTGCAGTTCCTT 	1891
Sbjct	1501	AATCTGCGTTTGGTTATCTCTATTGCCAAAAAATATACCAATCGCGGTTGCAGTTCCTT 	1560
Query	1892	GATCTTATTTCAGGAAGGCAATATCGGTTTGTATGAAGGCGGTCGATAAATTTGAATATCGT 	1951
Sbjct	1561	GATCTTATTTCAGGAAGGCAATATCGGTTTGTATGAAGGCGGTCGATAAATTTGAATATCGT 	1620
Query	1952	CGCGGTTATAAATTTCTCGACCTATGCCACTTGGTGGATTTCGTCAGGCGATCACCCGTTCT 	2011
Sbjct	1621	CGCGGTTATAAATTTCTCGACCTATGCCACTTGGTGGATTTCGTCAGGCGATCACCCGTTCT 	1680
Query	2012	ATTGCCGATCAGGCAAGAACCATCCGTATTCCAGTGCATATGATCGAAACGATCAACAAA 	2071
Sbjct	1681	ATTGCCGATCAGGCAAGAACCATCCGTATTCCAGTGCATATGATCGAAACGATCAACAAA 	1740
Query	2072	CTGGTTCGGACAAGTCGCCAGATCTTGATGAAATCGGTCGCGAACCAGCCGGAAGAA 	2131
Sbjct	1741	CTGGTTCGGACAAGTCGCCAGATCTTGATGAAATCGGTCGCGAACCAGCCGGAAGAA 	1800
Query	2132	TTAGCTGAGCGTCTTTCCATGCGCTTGAAAAAGTACGCAAGGTTATGAAAATCGCGAAA 	2191
Sbjct	1801	TTAGCTGAGCGTCTTTCCATGCGCTTGAAAAAGTACGCAAGGTTATGAAAATCGCGAAA 	1860
Query	2192	GAGCCGATCAGTCTCGAAACGCCTATCGGTGATGAAGAAGACAGCCATCTCGGTGACTTT 	2251
Sbjct	1861	GAGCCGATCAGTCTCGAAACGCCTATCGGTGATGAAGAAGACAGCCATCTCGGTGACTTT 	1920
Query	2252	ATCGAAGATAAAAAACGCCATTATTCGGTTCGATGCCGCTATTTCAGGCCAATTTGAAAGAA 	2311
Sbjct	1921	ATCGAAGATAAAAAACGCCATTATTCGGTTCGATGCCGCTATTTCAGGCCAATTTGAAAGAA 	1980
Query	2312	ACGGTCACCCGTGTCTTGGCCAGCCTGACCCCGCGTGAAGAACCGGTTTTGCGGATGCGC 	2371
Sbjct	1981	ACGGTCACCCGTGTCTTGGCCAGCCTGACCCCGCGTGAAGAACCGGTTTTGCGGATGCGC 	2040

ANEXOS

```
Query 2372 TTTGGTATCGGGATGAATACCGATCATACTTTGGAAGAAGTCGGGCAGCAATTCTCGGTT 2431
          |||
Sbjct 2041 TTTGGTATCGGGATGAATACCGATCATACTTTGGAAGAAGTCGGGCAGCAATTCTCGGTT 2100

Query 2432 ACCCGCGAACGTATTTCGTCTCAGATCGAAGCAAAGCGCTTCGGAAACTGAAACATCCTTCT 2491
          |||
Sbjct 2101 ACCCGCGAACGTATTTCGTCTCAGATCGAAGCAAAGCGCTTCGGAAACTGAAACATCCTTCT 2160

Query 2492 CGTTCACGGAAGATGCGGAGCTTCCTCGACCCTAGGTCGACTTTTTAAATAAACTTAGA 2551
          |||
Sbjct 2161 CGTTCACGGAAGATGCGGAGCTTCCTCGACCCTAGGTCGACTTTTTAAATAAACTTAGA 2220

Query 2552 GCTTAAGGCGAAAAGCCGTCGGTTTTACCGGGCGGGCTTTTTTTATCCAAGACGACTC 2611
          |||
Sbjct 2221 GCTTAAGGCGAAAAGCCGTCGGTTTTACCGGGCGGGCTTTTTTTATCCAAGACGACTC 2280

Query 2612 AAATGATGGGGTAGGA 2627
          |||
Sbjct 2281 AAATGATGTGGTAGGA 2296
```

pB1_s24

```
Query 149 CTTTCGGCTGCTTTAGGTCCTCGGCTACGTTTCTACATCTGGTTCTGATTCCTCGGTTTACCT 208
          |||
Sbjct 1 CTTTCGGCTGCTTTAGGTCCTCGGCTACGTTTCTACATCTGGTTCTGATTCCTCGGTTTACCT 60

Query 209 TTTTCAAGGTGTCCCGTTCCTTTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGTCTATAATCAC 268
          |||
Sbjct 61 TTTTCAAGGTGTCCCGTTCCTTTTTCCCTTTTTGGAGGTTGGTTATGTCTATAATCAC 120

Query 269 TTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGCTCATGATCGCG 328
          |||
Sbjct 121 TTAATCCAGAAACGGGCGTTTAGCTTTGTCCATCATGGTTGTTTATCGCTCATGATCGCG 180

Query 329 ACATGTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAG 388
          |||
Sbjct 181 ACATGTTCTGATATTTTCTCTAAAAAAGATAAAAAGTCTTTTCGCTTCGGCAGAAGAG 240

Query 389 GTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGAC 448
          |||
Sbjct 241 GTTCATCATGAACAAAAATTCGGCATTTTTAAAAATGCCTATAGCTAAATCCGGAACGAC 300

Query 449 ACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCTGATTCAGACATAGTGTGTTTGAATATATGGAGTAAG 508
          |||
Sbjct 301 ACTTTAGAGGTTTCTGGGTCATCTGATTCAGACATAGTGTGTTTGAATATATGGAGTAAG 360

Query 509 CATATGATCGAAAATCATGAAAAGAGACAAATCTCCGGCTTTTGATTCCTCAAATTA 568
          |||
Sbjct 361 CATATGATCGAAAATCATGAAAAGAGACAAATCTCCGGCTTTTGATTCCTCAAATTA 420

Query 569 GCAAAAGACAAAAGGATTCCTTCTCCAATTACTGATGATACGGGCGATAAACCGGAACAT 628
          |||
Sbjct 421 GCAAAAGACAAAAGGATTCCTTCTCCAATTACTGATGATACGGGCGATAAACCGGAACAT 480

Query 629 ATTTCCCTTATCCGACGAAGATTTCAGAATCCAGCTTGCCGAAGTCATTCCTCCATCTCCGT 688
          |||
Sbjct 481 ATTTCCCTTATCCGACGAAGATTTCAGAATCCAGCTTGCCGAAGTCATTCCTCCATCTCCGT 540

Query 689 GCTTTCGGTTCGCTCACTTTCGGGCAATCGTGACGTTGCCGATGATCTGGTGCAAGAAACG 748
          |||
Sbjct 541 GCTTTCGGTTCGCTCACTTTCGGGCAATCGTGACGTTGCCGATGATCTGGTGCAAGAAACG 600

Query 749 CTGTTAAAGGCATGGGGCGCACGTCAAAGATTCAGGCTGGCACCAGTATGCGGGCTTGG 808
          |||
Sbjct 601 CTGTTAAAGGCATGGGGCGCACGTCAAAGATTCAGGCTGGCACCAGTATGCGGGCTTGG 660

Query 809 ACTTTTATTATTTTGCCTAACCTATTCTGTCTCAAATGCGGCGTTCTCGCTTCAGAAGT 868
          |||
Sbjct 661 ACTTTTATTATTTTGCCTAACCTATTCTGTCTCAAATGCGGCGTTCTCGCTTCAGAAGT 720
```


ANEXOS

Query	745	TGTTTCCGAATTGATTTCAGAAGGCAATATCGGCCTGATGCAGGGTGTCAAAAAATTTGA	804
Sbjct	421	TGTTTCCGAATTGATTTCAGAAGGCAATATCGGCCTGATGCAGGGTGTCAAAAAATTTGA	480
Query	805	CCCCGAACGCGGTTTTTCGCCTCGCAACCTATGCCATCTGGTGGATAAAGGCTTCTATTCA	864
Sbjct	481	CCCCGAACGCGGTTTTTCGCCTCGCAACCTATGCCATCTGGTGGATAAAGGCTTCTATTCA	540
Query	865	GGAAATATATCCTGCGGTCTTGGAGTCTCGTTAAAAATGGGAACACTGCGGCACAAAAGAA	924
Sbjct	541	GGAAATATATCCTGCGGTCTTGGAGTCTCGTTAAAAATGGGAACACTGCGGCACAAAAGAA	600
Query	925	GCTGTTCTTCAACCTCCGGCGTTTAAAGAGCAATATGAATGCCTTTGAAGACGGGGATTT	984
Sbjct	601	GCTGTTCTTCAACCTCCGGCGTTTAAAGAGCAATATGAATGCCTTTGAAGACGGGGATTT	660
Query	985	AAAACCGGATGAAGTCGACTCCATTGCGACCAATCTTGGGGTCAGCAATGAAGAAGTCGT	1044
Sbjct	661	AAAACCGGATGAAGTCGACTCCATTGCGACCAATCTTGGGGTCAGCAATGAAGAAGTCGT	720
Query	1045	CAATATGAATCGCCGCATGGCGATGGGTGGCGACAGCTCGCTCAACATCACGATGCGGGA	1104
Sbjct	721	CAATATGAATCGCCGCATGGCGATGGGTGGCGACAGCTCGCTCAACATCACGATGCGGGA	780
Query	1105	AGACGGCGAAGGCCAGATGCAAGACTGGTGGTTCGATCAGGAACCGCTACAAGACCAACA	1164
Sbjct	781	AGACGGCGAAGGCCAGATGCAAGACTGGTGGTTCGATCAGGAACCGCTACAAGACCAACA	840
Query	1165	GATCGAAGAGGAAGAAGAAAGCCTCGTTCGTCATAAAATGTTGATCGAAGCGATGGATAA	1224
Sbjct	841	GATCGAAGAGGAAGAAGAAAGCCTCGTTCGTCATAAAATGTTGATCGAAGCGATGGATAA	900
Query	1225	ACTGAACGACCGTGAAAAACATATTCTGACAGAAAGACGGTTAAGCGATAACCCGAAAAC	1284
Sbjct	901	ACTGAACGACCGTGAAAAACATATTCTGACAGAAAGACGGTTAAGCGATAACCCGAAAAC	960
Query	1285	ACTGGAAGAATTAAGTCAGGTCATGGTGTGACCCGCGAACGTGTCCGGCAAATCGAGGT	1344
Sbjct	961	ACTGGAAGAATTAAGTCAGGTCATGGTGTGACCCGCGAACGTGTCCGGCAAATCGAGGT	1020
Query	1345	GAGAGCCTTCGATAAAATGCAAAAGGCGATCATGGAACTCGCCGGAGACAGAAAGCTGTT	1404
Sbjct	1021	GAGAGCCTTCGATAAAATGCAAAAGGCGATCATGGAACTCGCCGGAGACAGAAAGCTGTT	1080
Query	1405	ACCCGCTATGGCATAGGTCGACTTTTTAAATAAACTTAGAGCTTAAGGCGAAAAGCCCGT	1464
Sbjct	1081	ACCCGCTATGGCATAGGTCGACTTTTTAAATAAACTTAGAGCTTAAGGCGAAAAGCCCGT	1140
Query	1465	CCGGTTTTACCGGGCGGGCTTTTTTTTATCCAAGACGACTCAAATGATGGGGTAGGA	1520
Sbjct	1141	CCGGTTTTACCGGGCGGGCTTTT-TTATCCAAGACGACTCGAATGATGGGGTAGGA	1196

ANEXOS

Anexo 8. Padrão de distribuição das culturas de *Z. mobilis* em placa de 24 poços com a superfície não aderente (CELLSTAR®). BR = Branco, contém apenas o meio de cultura.

pB1	p24	p24	p70	p70	p32	A
pB1	p32	BR	BR	pB1	p32	B
p70	p24	BR	BR	p70	p24	C
p70	p32	p32	pB1	pB1	p24	D
1	2	3	4	5	6	