



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CCNH

“Avaliação do aumento da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, em resposta ao auto-indutor de *quorum sensing* (QS) tipo 2 (AI-2)”

Vinícius Manganaro Farnézio

SANTO ANDRÉ, OUTUBRO DE 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

CCNH

“Avaliação do aumento da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, em resposta ao auto-indutor de *quorum sensing* (QS) tipo 2 (AI-2)”

Aluno: Vinícius Manganaro Farnézio

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes

Co-orientadora: Dra. Valquíria Campos Alencar

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
ABC como pré-requisito para obtenção
do diploma de Bacharel em Ciências
Biológicas.**

SANTO ANDRÉ, OUTUBRO DE 2020

Resumo

A bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis* apresenta diversas características que a tornam atrativa para a produção industrial de diferentes bioprodutos, incluindo o bioetanol. Por exemplo, *Z. mobilis* pode ser cultivada tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, é capaz de converter glicose a etanol com uma eficiência ainda maior do que a própria *Saccharomyces cerevisiae* e tolera maiores concentrações deste álcool durante o processo de fermentação. Além disso, estudos recentes sugerem que a produção de etanol pode ser incrementada quando a bactéria é exposta ao indutor de *quorum sensing* (QS) do tipo 2 (denominado auto-indutor 2, ou AI-2). O AI-2 é uma das moléculas utilizadas por bactérias para controlar o processo de QS de forma interespecífica, sendo responsável por avaliar a densidade populacional do meio e sincronizar seu comportamento em escala comunitária, através da expressão de fenótipos alternativos (como bioluminescência, motilidade ou formação de biofilme, entre outros). Nesse sentido, estudos preliminares sugeriram que AI-2 pode induzir significativo aumento na produção de etanol por *Z. mobilis*, servindo como base para a concessão de duas patentes internacionais, envolvendo o uso deste sinalizador como um adjuvante para aumentar a produção deste biocombustível em processos industriais baseados em fermentação por esta bactéria. No entanto, estes experimentos não foram realizados com AI-2 purificado, justificando o desenvolvimento do presente projeto, que procurou confirmar alguns dos resultados obtidos em tais estudos, com o auxílio de amostras puras de AI-2 sintético.. Surpreendentemente, os experimentos aqui descritos mostraram que AI-2 não é capaz de aumentar a produção absoluta de etanol em culturas de *Z. mobilis*, como inicialmente sugerido, mas induz uma elevação significativa na eficiência de produção de etanol por célula.

Palavras chave: *Zymomonas mobilis*, AI-2, Microbiologia, biotecnologia, etanol.

Abstract

The gram-negative bacterium *Zymomonas mobilis* presents a variety of characteristics that make it attractive to the industrial production of several bio-products, such as bioethanol. *Zymomonas mobilis* is a facultative anaerobic organism and can grow under both aerobic and anaerobic conditions. Moreover, it converts glucose to ethanol at a rate that surpasses the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and tolerates higher concentrations of this alcohol during the fermentative process. Recent studies have shown that ethanol production can be enhanced when *Z. mobilis* is exposed to the type 2 quorum sensing (QS) inducer (also called auto-inducer 2, or AI-2). AI-2 works as a trans-specific signaling molecule, used by many bacteria to monitor population density in their surrounding environment and synchronize the onset of several alternative behaviors (such as bioluminescence, motility and biofilm formation, among others) in a community scale. Previous studies have suggested that AI-2 is capable of enhancing ethanol production by *Z. mobilis* and these studies resulted in two international patents, proposing the use of this signaling molecule to increase ethanol production in industrial processes based on *Z. mobilis* fermentation. However, the experiments that support these patents did not display a direct correlation between the presence of auto-inducer and increased ethanol production, as they were not conducted with purified AI-2. Thus, the experiments described herein aimed at confirming these preliminary results, using *Z. mobilis* cultures treated with purified samples of synthetic AI-2. Surprisingly, our results show that AI-2 is not capable of increasing the absolute ethanol content in *Z. mobilis* cultures, as originally suggested, but induces a significant increase in the rate of ethanol molecules produced by individual bacterial cells.

Keywords: *Zymomonas mobilis*, AI-2, microbiology, biotechnology, ethanol.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do ABC por toda a estrutura fornecida para o meu aprendizado.

Agradeço também meu orientador, Prof. Dr. Luiz Roberto Nunes, pela paciência e por incentivar meu crescimento acadêmico e profissional, assim como minha co-orientadora, Dr.a Valquíria Campos de Alencar, pelo auxílio nos experimentos realizados.

Agradeço a minha namorada Luana, por acreditar em mim e valorizar minhas escolhas.

Agradeço à minha família, especialmente minha mãe, pai e irmão (Ozélia, Onésimo e Guilherme), por sempre me apoiarem.

Agradeço, finalmente, a todos os pesquisadores e profissionais que me auxiliaram, principalmente meus colegas do laboratório Sistemas Biológicos e Genômica da UFABC.

Sumário

1 – Introdução	0
1.1 - Considerações gerais	0
1.2 – <i>Quorum sensing</i> em bactérias.	3
1.3 – Resposta de <i>Z. mobilis</i> ao auto-indutor de <i>quorum sensing</i> tipo 2 (AI-2)	6
2 – Objetivos	7
3 – Material e métodos	8
3.1 – Cultivo bacteriano e extração de material genético	8
3.2 – Crescimento de <i>Z. mobilis</i> em meio de cultura MM, contendo diferentes concentrações de AI-2.	8
3.3 – Coleta de amostras para extração de RNA e quantificação da produção de etanol.	86
3.4 – Análise da modulação da expressão gênica em células de <i>Z. mobilis</i> , tratadas com concentrações crescentes de AI-2	9
4 – Resultados	10
4.1 Análise da resposta de <i>Z. mobilis</i> à presença de AI-2 em diferentes concentrações.	10
4.2 Quantificação da produção de etanol em <i>Z. mobilis</i> na presença de AI-2	11
4.3 Análise da modulação da expressão de genes envolvidos com a produção de etanol em <i>Z. mobilis</i> .	1120
5 – Discussão	172
6 – Conclusões	17
7 – Referências Bibliográficas	18

1 – Introdução

1.1 – Considerações gerais

Um número significativo de setores da indústria faz uso de microrganismos em seus respectivos sistemas de produção, seja através de processos fermentativos ou de outras formas de biotransformação, capazes de converter diferentes tipos de matéria orgânica em produtos de alto valor agregado, como alimentos, biofármacos, ou biocombustíveis, por exemplo (Somerville, 2007; Biddy *et al.*, 2016). Dentre os microrganismos considerados com grande potencial para uso em processos industriais, destaque deve ser dado para a bactéria gram-negativa *Zymomonas mobilis*, que apresenta diversos atributos importantes para seu uso em processos de biotransformação (Jeffries, 2005; Rogers *et al.*, 2007). Por exemplo, *Z. mobilis* é uma bactéria anaeróbia facultativa, que apresenta crescimento vigoroso tanto em condições aeróbicas, como anaeróbicas, dispensando a necessidade de aeração dos tanques para garantir seu crescimento e produtividade. Além disso, trata-se de um microrganismo de alta rusticidade, que se adapta com facilidade a diferentes condições de cultivo em diferentes escalas e cujo genoma completo já foi descrito há mais de dez anos, sendo que ferramentas necessárias à sua manipulação (como sistemas de transferência e expressão de genes exógenos baseados em vetores *shuttle*, bem como mecanismos para nocaute e integração gênica, via transposons) vêm sendo desenvolvidas desde a década de 1980 (He *et al.*, 2014).

Por se tratar de um microrganismo etanologênico, esta bactéria vem chamando a atenção da indústria de bioetanol há algumas décadas, sobretudo por apresentar algumas vantagens quando comparada à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no que se refere à produção deste biocombustível. Nesse sentido, verifica-se que *Z. mobilis* é capaz de crescer e produzir etanol em uma ampla faixa de pH (pH 3,5-7,5), além de exibir uma maior tolerância a este álcool (12-15%), quando comparada com *S. cerevisiae* (8-12%) (Panesar *et al.*, 2006). A bactéria também apresenta uma tolerância naturalmente elevada a muitos dos compostos inibitórios encontrados em hidrolisados provenientes de diferentes tipos de pré-tratamentos a que a biomassa lignocelulósica pode ser submetida, tornando-se, portanto, uma alternativa interessante à produção de etanol de segunda geração (Rogers *et al.*, 2007). Mais importante, no entanto, verificou-se que *Z. mobilis* é capaz de fermentar hexoses exclusivamente através da via glicolítica de Entner-Doudoroff (ED *Pathway*), uma vez que esta bactéria apresenta mutações que inativam genes que codificam enzimas envolvidas na via glicolítica

de Ebdén-Meyerhof-Parnas (EMD *Pathway*), como 6-fosfofrutoquinase (6PK) e no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, como 2-oxoglutarato desidrogenase (2OD) e malato desidrogenase (MD) (Seo *et al.*, 2005). Ao contrário da via EMP, que gera dois moles de ATP para cada mol de glicose fermentada a etanol, a via ED tem um rendimento líquido de apenas um ATP por mol de glicose.

De maneira a compensar este baixo rendimento de ATP, a bactéria consome glicose em um ritmo extremamente elevado, convertendo este monossacarídeo a etanol com elevada eficiência, de maneira a atender adequadamente às demandas energéticas da célula. Como resultado, a bactéria apresenta uma baixa incorporação da glicose à sua biomassa, resultando em um elevado rendimento quanto à produção de etanol. De fato, *Z. mobilis* atinge uma produção de etanol que se aproxima da máxima produtividade possível para esta bioconversão, já que quase toda a glicose absorvida pelas células é convertida a etanol, sendo o rendimento deste processo limitado quase que exclusivamente pela tolerância da bactéria ao próprio etanol por ela produzido. (Panesar *et al.*, 2006).

Nesse sentido, diversos esforços destinados ao aprimoramento de *Z. mobilis*, com vistas à sua utilização na indústria de bioetanol vêm sendo implementados nos últimos anos (revisto em Yang *et al.*, 2016). Por exemplo, uma vez que linhagens selvagens de *Z. mobilis* são reconhecidas por possuírem uma reduzida gama de utilização de substratos (fermentam basicamente sacarose, ou as hexoses glicose e frutose, dela derivados), linhagens recombinantes de *Z. mobilis*, capazes de degradar xilose e arabinose já foram desenvolvidas (Zhang *et al.*, 1995; Deanda *et al.*, 1996), possibilitando seu uso na produção de etanol de segunda geração, a partir de material lignocelulósico, que possui alto teor destas pentoses em sua composição (Himmel *et al.*, 2007).

Para tanto, os genes de assimilação de xilose, *xylA* e *xylB*, que codificam as enzimas xilose isomerase e xilulocinase, bem como dos genes de via de pentose fosfato, *talB* e *tktA* (que produzem transaldolase e transcetolase) foram incorporados ao genoma de *Z. mobilis* Zm4 (Zhang *et al.*, 1995). Subsequentemente, utilizou-se o transposon mini-Tn10 para a integração ao genoma da bactéria do operon *araBAD*, contendo os três genes responsáveis pela assimilação de arabinose [codificando L-arabinose isomerase (*araA*), L-ribulocinase (*araB*), L-ribulose-5-fosfato-4 (*araD*)], o que levou à produção de uma linhagem recombinante de *Z. mobilis* capaz de utilizar tanto xilose como arabinose para a produção de etanol (Zhang *et al.*, 2007). Experimentos destinados a produzir linhagens de *Z. mobilis* capazes de degradar diretamente o material lignocelulósico também vêm sendo conduzidos, através da incorporação ao seu genoma, de genes capazes de degradar os diferentes componentes deste complexo material, com vistas à obtenção de uma linhagem de *Z. mobilis* que possa ser utilizada em sistemas de bioprocessamento integrado (SBI), em que um único microrganismo poderia ser

usado para a degradação do material lignocelulósico e fermentação dos monossacarídeos dele derivados, a etanol (Lejeune *et al.*, 1988; Misawa *et al.*, 1988; Yoon *et al.*, 1988; Brestic-Goachet *et al.*, 1989; Yanase *et al.*, 2005; Linger *et al.*, 2010).

Z. mobilis também contém vias metabólicas endógenas, que vêm sendo utilizadas e/ou manipuladas para adaptar a bactéria à produção de outros subprodutos de elevado interesse industrial (Figura 1). Por exemplo, estirpes de *Z. mobilis* foram desenvolvidas de maneira a aprimorar a utilização de sacarose para a produção de levano, uma substância de alto valor para a indústria cosmética e farmacêutica (Silbir *et al.*, 2014), bem como gluconato, succinato, lactato e sorbitol (Silveira *et al.*, 1999; Erzinger e Vitolo, 2006; Lee *et al.*, 2010 Kim *et al.*, 2014). Além disso, diferentes vias heterólogas foram introduzidas em *Z. mobilis* visando à produção de biopolímeros, como polihidroxilbutirato (PHB) (Lai e Chen, 2006), ou *building blocks* para a produção de biocombustíveis alternativos, como 2,3-butanodiol (2,3-BDO) (Yang *et al.*, 2016). Nesse sentido, a manipulação gênica de *Z. mobilis* se destaca como um interessante campo de atuação, capaz de levar ao desenvolvimento de novas linhagens da bactéria, que encontrariam aplicação em diversos processos industriais.

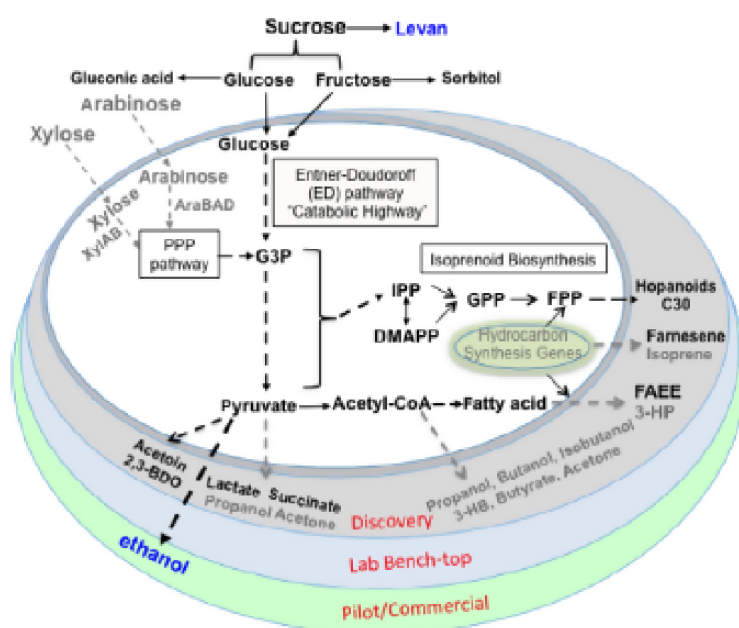


Figura 1. Exemplos de bioprodutos(nativos e/ou heterólogos) que podem ser obtidos de *Z. mobilis*, a partir de sacarose, glicose, frutose, arabinose e xilose. A figura mostra os diferentes estágios de bioprodução de cada substância, incluindo (I) estágio de pesquisa básica (*Discovery*); (II) produção em escala de bancada (*Lab Bench-top*); (III) produção em escala piloto ou comercialização (*Pilot/Commercial*). PPP: Via das pentose fosfato; G3P: gliceraldeído 3-fosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; GPP: geranyl pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato; FAEE: ésteres etílicos de ácidos graxos; 3-HP: ácido 3-hidroxipropiônico; 3HB: 3-hidroxibutirato; 2,3-BDO: 2,3-butanodiol. Fonte: Yang *et al.* (2016).

1.2 – Quorum sensing em bactérias.

Quorum sensing (QS) é um processo de comunicação química que as bactérias utilizam para avaliar a densidade populacional do ambiente e sincronizar seu comportamento em escala comunitária (Waters e Bassler, 2005; Bassler e Losick, 2006). Esta comunicação é mediada por pequenas moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutores (AI). Geralmente, bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos para este tipo de comunicação, enquanto bactérias Gram-negativas utilizam derivados de acil-homoserino-lactonas (acil-HSL). Coletivamente, estas moléculas recebem o nome de auto-indutor do tipo 1, ou AI-1 (Bassler e Losick, 2006; Papenfort e Bassler, 2016). Via de regra, os indutores do tipo AI-1 apresentam estrutura espécie-específica e são produzidos de maneira constitutiva pelas células durante todas as etapas de seu desenvolvimento. Dessa forma, quando a cultura celular atinge densidades mais elevadas, a concentração de AI-1 do meio torna-se crítica, desencadeando uma resposta coordenada de todas as células do ambiente, que reprogramam sua expressão gênica de maneira simultânea, promovendo diminuição na expressão de genes envolvidos com a divisão celular, ao mesmo tempo em que ativam genes envolvidos com uma série de atividades alternativas, como bioluminescência, motilidade, produção de biofilme e, em muitos casos, secreção de fatores de patogenicidade (Papenfort e Bassler, 2016).

Nesse sentido, a resposta ao QS envolve a expressão de fenótipos que seriam demasiadamente custosos e contraproducentes, se executados por apenas algumas células, mas que acabam resultando em respostas eficientes quando expressos de maneira coordenada, por toda a população (Papenfort e Bassler, 2016). Além disso, diversos estudos vêm mostrando que tanto bactérias Gram-negativas, quanto Gram-positivas, podem se utilizar de um sistema alternativo de QS, que envolve uma molécula conhecida como auto-indutor do tipo 2 (AI-2). Estruturalmente, o AI-2 é uma molécula completamente diferente dos oligopeptídeos utilizados para a sinalização QS em bactérias Gram-positivas, bem como dos derivados de acil-HSL, que caracterizam os diferentes tipos de AI-1 das bactérias Gram-negativas (Pereira *et al.*, 2013; Papenfort e Bassler, 2016). Mais importante, o AI-2 possui a capacidade de ser reconhecido tanto por bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, constituindo um sistema trans-específico de comunicação entre bactérias (Pereira *et al.*, 2013). A estrutura básica do AI-2 é uma 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), que cicliza espontaneamente, para formar uma série de derivados que se interconvertem espontaneamente entre as formas R/S-DHMF (2,4-dihidroxi-2-metildihidrofurano-3-ona) e R/S-THMF (2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurana), como mostrado na Figura 3. No caso de *Vibrio* spp., a ciclização de

DPD é acompanhada pela incorporação de uma molécula de boro para produzir um furanosil-borato-diéster (S-THMF-borato), que atua como AI-2 nestas bactérias (Figura 2).

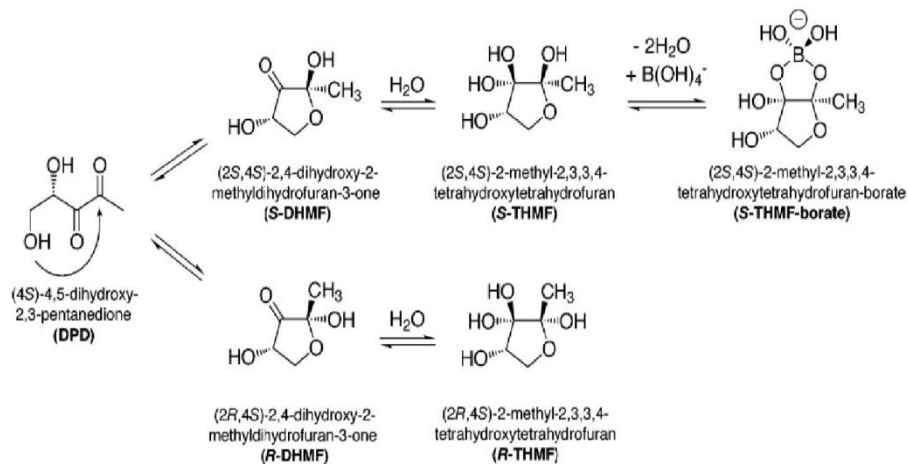


Figura 2. Equilíbrio dinâmico representando as moléculas derivadas da ciclização espontânea de 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona (DPD). Veja texto para detalhes. Fonte: Yang (2011).

A síntese do AI-2 está associada à produção de S-adenosil-metionina (SAM), um importante cofator que atua como doador de grupos metila para uma série de substratos, durante a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (Sun *et al.*, 2004). No entanto, a retirada dos grupos metila do SAM gera o subproduto tóxico S-adenosil-homocisteína (SAH), que pode ser detoxificado através de duas vias de reciclagem, que convertem SAH em homocisteína (que é posteriormente convertida em metionina, como mostrado na Figura 3) (Sun *et al.*, 2004). O processo mais simples de detoxificação envolve a interconversão direta do SAH em homocisteína, através da atividade da enzima SAH hidrolase (reação indicada pela linha azul, na Figura 3), que produz ainda, uma molécula de adenosina como subproduto (Sun *et al.*, 2004). Algumas bactérias, no entanto, não possuem SAH hidrolase e detoxificam SAH através de uma via constituída por duas etapas sequenciais (linhas vermelhas, na Figura 3). Na primeira etapa, mediada pela enzima Pfs, SAH é interconvertido a S-ribosil-homocisteína (SRH), gerando, ainda, adenina como um subproduto. Na segunda etapa, mediada pela enzima LuxS, SRH é interconvertido a homocisteína, que é posteriormente convertida a metionina (Figura 3) (Sun *et al.*, 2004). No entanto, a ação de LuxS também gera a forma básica do AI-2, DPD, como subproduto de sua reação. Como mencionado anteriormente, DPD cicliza espontaneamente e estabelece um equilíbrio dinâmico entre as várias formas de AI-2 mostradas na Figura 2.

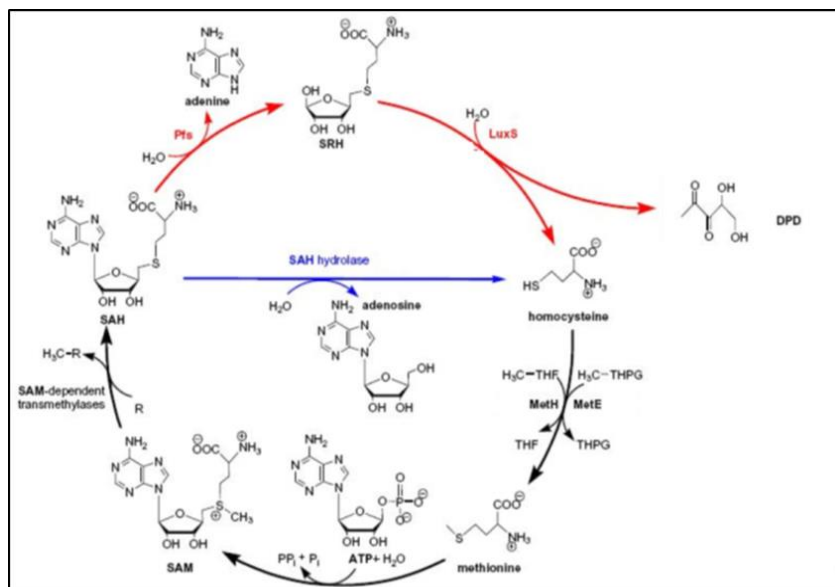


Figura 3. Reações envolvidas na produção/detoxificação de SAH e síntese de AI-2. SAH é produzido a partir da retirada de um grupamento metila, existente em moléculas de S-adenosil-metionina (SAM), que é doado a precursores de vias de biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos. As setas azuis representam a detoxificação de SAH em um passo, através de enzima SAH hidrolase, enquanto as setas vermelhas representam a detoxificação em dois passos, através das enzimas Pfs e LuxS, que gera DPD (AI-2) como subproduto. Veja texto para detalhes. Abreviaturas: SAM, S-adenosil-metionina; SAH, S-adenosil-homocisteína; SRH, S-ribosil-homocisteína; DPD, 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona. Adaptado de Yang (2011).

Os mecanismos de QS baseados em AI-2 foram caracterizados de maneira detalhada apenas em algumas bactérias e se dividem em duas classes, tipificadas por *Vibrio* spp (AI-2-QS tipo 1), bem como por *Salmonella typhimurium* e *E. coli* (AI-2-QS Tipo 2) (Miller *et al.*, 2002; Ahmer, 2004). Estes dois mecanismos são mostrados, de maneira sumária, na Figura 4. Em *V. cholera*, por exemplo, AI-2 liga-se à proteína periplasmática LuxP, que interage com uma proteína de membrana (LuxQ) que possui um domínio intracelular com atividade de histidina-quinase. A interação entre AI-2/LuxP/LuxQ desencadeia uma cascata de fosforilações que, em última análise, ativa o fator de transcrição LuxR, que ativa a transcrição dos genes de resposta a QS (Miller *et al.*, 2002). Em *S. typhimurium*, por outro lado, AI-2 é reconhecido pela proteína periplasmática LsrB, que se liga ao sistema de transporte do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) LsrACD, ligado à membrana interna da bactéria. Esta interação leva à internalização da molécula de AI-2, que é posteriormente fosforilada pela enzima LsrK (Taga *et al.*, 2001). O AI-2 fosforilado interage com fatores de transcrição, como o repressor LsrR, que controla a expressão do operon *lsr*, envolvido na resposta a QS nestas bactérias. Um operon *lsr* homólogo ao de *S. typhimurium* foi também encontrado em *E. coli*, sugerindo que esta bactéria também responde a AI-2 através do processo de internalização desta molécula sinalizadora, diferentemente de *Vibrio* spp, em que AI-2 se concentra na membrana interna das células, tendo seu sinal transduzido para o citoplasma através dos domínios de histidina quinase presentes em receptores

transmembrana, (Xavier e Bassler, 2005). Vale ressaltar que homólogos para os genes que codificam as proteínas acima mencionadas não foram encontrados no genoma de *Z. mobilis*, o que sugere que esta bactéria pode apresentar um mecanismo diferente para reconhecer AI-2 e responder à presença deste sinalizador (Seo *et al.*, 2005; Yang, 2011).

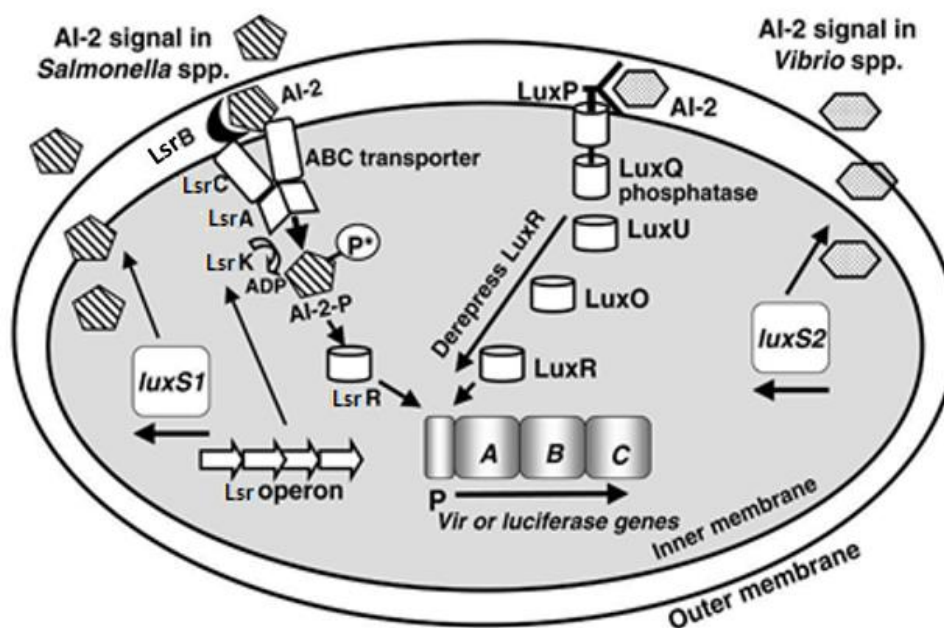


Figura 4. Sistemas de detecção de *quorum sensing* (QS) baseados em derivados de DPD (AI-2) encontrados em *Salmonella spp* (porção esquerda da figura) e *Vibrio spp.* (porção direita da figura). Em *Salmonella spp.*, a molécula AI-2 é o isômero R-THMF (Figura 3), sendo este, reconhecido internalizado e fosforilado por uma série de proteínas codificadas pelo operon *lsr*. O AI-2 fosforilado ativa o fator de transcrição LsrR, responsável pela ativação da transcrição dos genes de resposta a QS. Já em *Vibrio spp.*, a molécula AI-2 encontra-se na forma S-THMF-borato (Figura 3), que não é internalizado e liga-se a um receptor de membrana (LuxP/Q), que transduz o sinal para o citoplasma da célula, levando a expressão de genes de resposta a QS quando o gene *LuxR* deixa de ser reprimido. Fonte: adaptado de Asad e Opal (2008).

1.3 – Resposta de *Z. mobilis* ao auto-indutor de *quorum sensing* tipo 2 (AI-2)

Como mencionado anteriormente, os derivados de DPD que constituem o sinalizador AI-2 possuem a capacidade de afetar diversas espécies bacterianas, atuando como um controlador de QS trans-específico. Nesse sentido, estudos preliminares, conduzidos pelo grupo de pesquisa e um de nossos colaboradores (Dr. Adrian Walmsley, da Universidade de Durham, UK) mostraram que *Z. mobilis* é responsiva a este sinalizador, embora não possua os genes *pfs* e *luxS*, necessários à sua síntese (Yang, 2011). Nestes estudos, amostras de meio de cultura, previamente utilizado para crescer

células de *E. coli* até a fase estacionária, foram utilizados como fonte de AI-2. Quando alíquotas provenientes desse meio foram inoculadas em culturas de *Z. mobilis*, verificou-se que as células apresentavam superexpressão de uma série de proteínas, sendo que este fenômeno não era observado quando as culturas eram tratadas com meio proveniente de culturas de uma linhagem *luxS⁻* de *E. coli*, que é incapaz de produzir AI-2. Cinco proteínas superexpressas em resposta a AI-2 foram caracterizadas por espectrometria de massa (Yang, 2011), sendo duas delas identificadas como proteínas citoplasmáticas, enquanto as outras três são proteínas secretadas para o ambiente extracelular. Curiosamente, as duas proteínas citoplasmáticas cuja expressão foi elevada em resposta a AI-2 foram identificadas como enolase (codificada pelo gene *eno*, ou ZMO1608) e piruvato decarboxilase (codificada pelo gene *pdc*, ou ZMO 1360) (Yang, 2011) - duas enzimas que atuam na via que leva à produção de etanol em *Z. mobilis* (Savvides *et al.*, 2001). Experimentos adicionais demonstraram, ainda, que as culturas de *Z. mobilis* tratadas com alíquotas do sobrenadante de *E. coli* apresentaram um aumento na produção de etanol, que podia atingir concentrações próximas de 15% (v/v) no meio de cultura - valor máximo tipicamente tolerado pela bactéria (Shakirova *et al.*, 2008). Nesse sentido, a possibilidade de utilizar AI-2 para estimular a produção de etanol por *Z. mobilis* foi objeto de um pedido de patente, concedido ao grupo de pesquisa do Dr. Walmsley na Europa (Borges-Walmsley *et al.*, 2009) e nos Estados Unidos (Walmsley *et al.*, 2012), sendo que uma solicitação similar já foi depositada no Brasil.

No entanto, a elevada complexidade dos sobrenadantes de cultura de *E. coli*, utilizados como fonte de AI-2 nestes experimentos, torna difícil concluir com exatidão se era realmente o AI-2 a molécula responsável pelo aumento na produção de etanol. Recentemente, uma empresa norte-americana (Carbosynth, Inc.) passou a comercializar AI-2 sintético purificado, permitindo confirmar se é realmente esta a molécula que induziu em *Z. mobilis* o conjunto de respostas verificadas por Yang *et al.* (2011). Dessa forma, o projeto aqui proposto tem por objetivo avaliar a produção de etanol em células de *Z. mobilis* submetidas a diferentes concentrações de AI-2, bem como verificar a variação na transcrição de alguns genes-chave da via ED desta bactéria, em resposta à presença deste sinalizador

2 – Objetivos

O objetivo do presente trabalho envolveu confirmar os resultados obtidos por Yang *et al.* (2011), utilizando AI-2 sintético para avaliar o eventual aumento na produção de etanol por células

de *Zymomonas mobilis*, tratadas com concentrações definidas e crescentes deste auto-indutor de QS. Além disso, alterações provocadas pela presença de AI-2 sobre a transcrição de alguns genes-chave da via ED (*pdc* e *eno*) foram quantificadas.

3 - Material e métodos

A linhagem Zm4 de *Z. mobilis* (ATCC 14990) foi utilizada durante este projeto. Para sua manutenção e cultivo em laboratório, foram utilizados dois tipos de meio: o meio de cultura indefinido RM e um meio mínimo (MM) específico para *Z. mobilis* (Yang, 2011). Cada litro de meio RM é constituído por 20 g de glicose, 10 g de extrato de levedura e 2 g de K_2HPO_4 , que são dissolvidos em água, com o pH sendo ajustado para 6,0, seguido de autoclavagem a 120 °C durante 15-20 minutos. Já o MM (por litro) é constituído de: 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de NaCl, 1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,25 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,25 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, e 20 g de glicose. Após autoclavagem a 121°C durante 15 minutos, adiciona-se 1 ml de uma solução de vitaminas (contendo 0,005 g de pantotenato de cálcio, 0,001 g de cloridrato de tiamina, 0,001 g de biotina e 0,001g de Ácido nicotínico), pré-esterilizada por filtração. A bactéria foi mantida, inicialmente, em placas de Petri contendo o meio RM sólido, através da adição de ágar-ágar (Difco), a uma concentração final de 1,5%. As placas foram mantidas em estufa bacteriana, a 30°C e amostras da bactéria repicadas para placas frescas a cada 10-15 dias. Culturas líquidas foram estabelecidas em meio MM, quando necessário, a partir de colônias isoladas, selecionadas das placas de Petri, sendo então inoculadas em frascos apropriados para cultivo laboratorial. Nestes casos, o crescimento bacteriano foi feito tanto sob condições aeróbicas quanto semi-anaeróbicas (em estufa, sem agitação), sempre a 30°C.

3.2 – Crescimento de *Z. mobilis* em meio de cultura MM, contendo diferentes concentrações de AI-2.

Uma colônia isolada de *Z. mobilis* foi colhida de uma cultura em placa e usada para inocular 3 – 5 ml de meio MM líquido. Esta cultura inicial foi crescida por 36 horas e utilizada para inocular culturas maiores, contendo 80 ml de MM, a uma OD_{600} inicial de 0,05. Estas culturas foram, então, crescidas a 30°C, sem agitação, por 14 horas quando atingiram fase exponencial de crescimento (OD_{600} entre 0,6 e 0,8). Neste momento, cada cultura de 80 ml foi dividida em quatro subculturas de 20 ml, que receberam tratamento com concentrações crescentes (0, 18, 36 e 45 μM) de AI-2 sintético

(adquirido da empresa *Carbosynth*, UK). Todas as subculturas foram então incubadas por mais seis horas, até que todas atingissem fase exponencial de crescimento.

3.3 – Coleta de amostras para extração de RNA e quantificação da produção de etanol.

Amostras de 1 ml foram colhidas nos momentos $t = 14h$ (imediatamente antes da adição de AI-2), $t = 16h$ e $t = 20h$. Estas amostras foram então centrifugadas a $8.000 \times g$ por 2 minutos e os *pellets* de células foram utilizados para extração de RNA total, com o auxílio do *Qiagen RNeasy Power Soil Total RNA Kit*, segundo recomendações do fabricante (*Qiagen*). Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de $0,2 \mu m$ e a concentração de etanol em cada amostra foi mensurada com o auxílio do *EnzychromTM Ethanol Assay Kit*, de acordo com instruções do fabricante (*Bioassay Systems*).

3.4 – Análise da modulação da expressão gênica em células de *Z. mobilis*, tratadas com concentrações crescentes de AI-2

Culturas bacterianas foram estabelecidas em 50 ml meio líquido (MM) e incubadas (com, ou sem AI-2) nas mesmas condições descritas acima. As células foram coletadas por centrifugação, nas condições (etapa do crescimento) que resultaram na maior diferença observada para a produção de etanol, ao comparar-se as culturas tratadas com AI-2, com aquela crescida na ausência de AI-2 (condições a identificadas através dos experimentos descritos no item 3.2). O RNA total de cada cultura foi extraído, como descrito acima (3.3), e utilizado para construir bibliotecas de RNA-seq. A expressão relativa dos genes de *Z. mobilis* nas condições testadas cada um destes genes foi feita através da avaliação de $\log_2$ (RPKM Teste/ RPKM Controle).

4 - Resultados

4.1 – Análise da resposta de *Z. mobilis* à presença de AI-2 em diferentes concentrações.

Para verificar a resposta de *Z. mobilis* a diferentes concentrações de AI-2, culturas líquidas da bactéria foram estabelecidas em meio mínimo (MM), como descrito nos Métodos. Assim que as células atingiram fase exponencial de crescimento, AI-2 foi adicionado, em diferentes concentrações (0, 18, 36 e 45 μ M) e o crescimento celular continuou a ser monitorado pela leitura da OD₆₀₀, até que as culturas atingissem fase estacionária. Como verificado na Figura 5, as células crescidas em MM apresentaram um longo período de crescimento *lag*, atingindo a fase exponencial apenas após 12-14h de incubação. Na ausência de AI-2, a cultura começa a apresentar diminuição em sua taxa de crescimento a partir das 16h sendo que a fase estacionária só se estabelece após 19h de cultivo. No entanto, a diminuição na taxa de crescimento e o consequente estabelecimento de fase estacionária são claramente induzidas, de maneira concentração-dependente, em função da presença de AI-2. Culturas submetidas a uma concentração de 45 μ M AI-2, por exemplo, apresentam uma redução muito mais intensa no ritmo de crescimento, quando comparadas às células não tratadas, já na primeira hora de incubação com AI-2, assumindo um padrão compatível com o início de fase estacionária já no momento $t = 16h$, que se manteve inalterado até o fim do experimento, no momento $t = 20h$ (Figura 5).

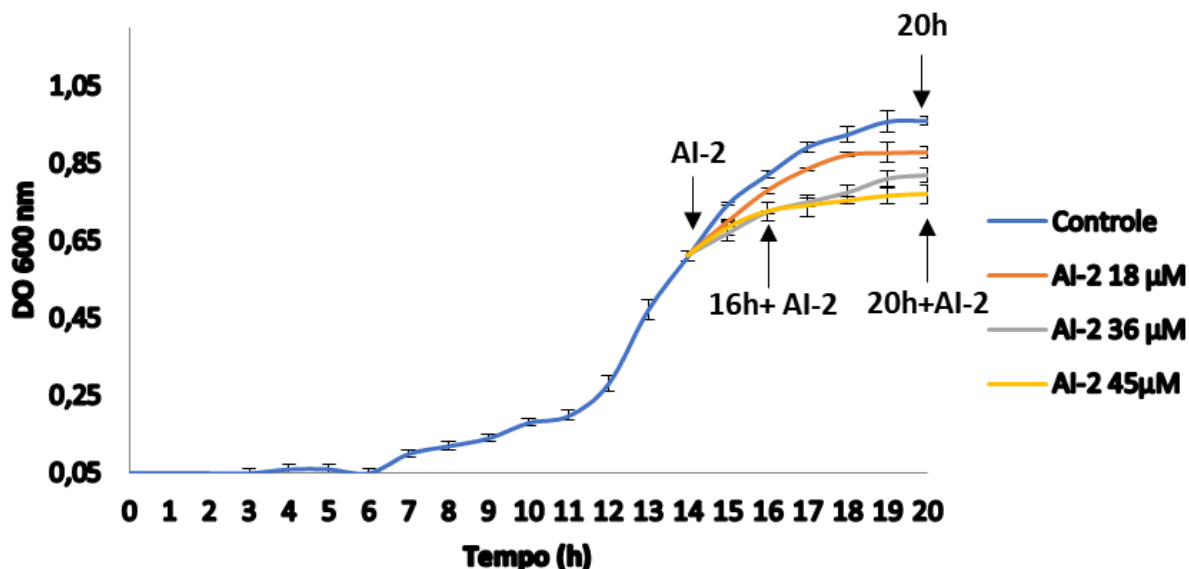


Figura 5 - Uma cultura inicial de *Z. mobilis* foi estabelecida, em 5 ml de meio MM líquido, a partir de uma colônia isolada, crescida em meio MM sólido. Após crescimento em estufa (sem agitação) a 30°C por 24h, alíquotas desta cultura foram usadas para inocular um frasco contendo 80 ml de meio líquido (MM), a uma OD₆₀₀ = 0,05. Esta cultura foi incubada nas mesmas condições descritas acima e o crescimento celular foi monitorado através de leitura da OD₆₀₀. Após 14 horas de incubação, a cultura atingiu fase exponencial de crescimento (OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8), sendo subdividida em quatro frascos de 20 ml cada. AI-2 foi então adicionado a estas culturas, em diferentes concentrações (0, 18, 36 e 45 µM). Em seguida, as culturas voltaram a ser incubadas como descrito acima e a OD₆₀₀ continuou a ser monitorada, até que as todas atingissem a fase estacionária de crescimento. Os valores de leitura mostrados no gráfico representam as médias e os respectivos desvios-padrão obtidos de 3 experimentos independentes. Alíquotas (2 ml) foram retiradas para extração de RNA nos momentos indicados pelas setas, ou seja: 14h (antes da adição de AI-2) e nos momentos 16h e 20h, para as culturas mantidas em 45 µM AI-2, assim como no momento 20h, das culturas não tratadas com AI-2 (veja texto para detalhes).

4.2 – Quantificação da produção de etanol em *Z. mobilis* na presença de AI-2

Como mencionado anteriormente, Yang *et al.* (2011) sugeriram que AI-2 poderia induzir um aumento na produção de etanol em *Z. mobilis*, sendo que duas patentes internacionais foram concedidas visando à exploração comercial deste fenômeno. No entanto, a quantificação de etanol feita por Yang *et al.* (2011) foi realizada com o auxílio de um ensaio baseado na redução de íons cromato (Bennet, 1971; Pilore, 1985), cuja especificidade é questionável (veja Discussão). Dessa forma, optamos por utilizar uma abordagem alternativa para confirmar se AI-2 é realmente capaz de elevar a produção de etanol por esta bactéria, utilizando um ensaio especificamente desenvolvido para a detecção de etanol, baseado em um kit comercial, conhecido como *Enzychrom™ ethanol assay kit*, produzido e comercializado pela empresa *Bioassay Systems*. Dessa forma, alíquotas de células

em cultura, tratadas com as diferentes concentrações de AI-2 testadas anteriormente, foram retiradas em quatro tempos diferentes (veja Figura 5, setas) e o etanol presente no sobrenadante dessas alíquotas foi mensurado.

Os resultados destas quantificações são mostrados na Figura 6 e mostram que a produção total de etanol não sofre variação significativa ao longo de 20 horas de incubação, independente da presença ou ausência de AI-2, em diferentes concentrações (Figura 6). No entanto, uma vez que a biomassa de células presentes nas culturas crescidas na presença de AI-2 é menor do que a verificada nas culturas controle (Figura 5), a quantidade de moléculas de etanol produzidas por célula é mais elevada na presença de AI-2, sugerindo que as células tratadas com este sinalizador apresentam maior rendimento na produção desta substância (Figura 6).

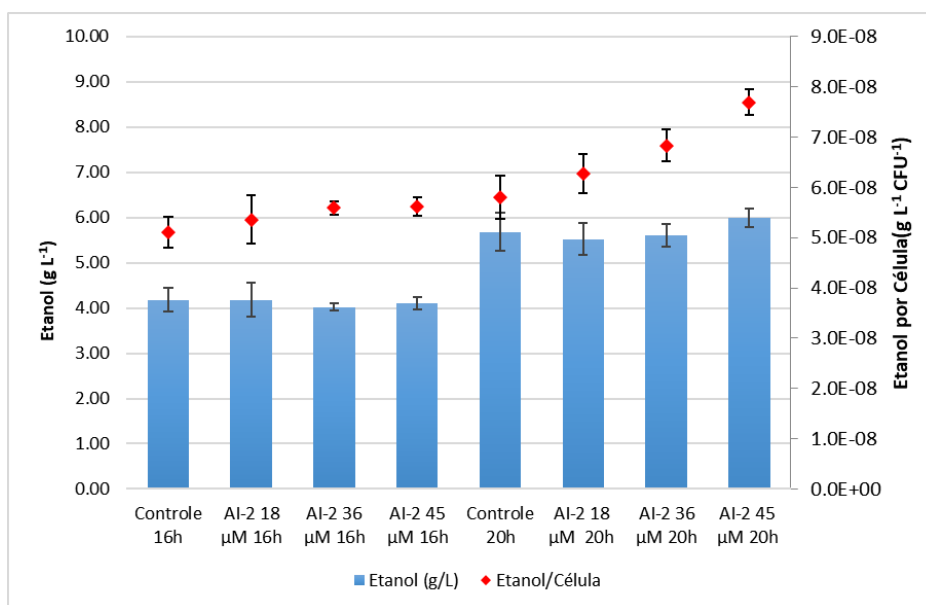


Figura 6 – Produção de etanol por *Z. mobilis* em resposta à presença de AI-2. Culturas de *Z. mobilis* foram estabelecidas, como descrito na Figura 1 e crescidas por 14 horas, até atingirem fase estacionária de crescimento. Neste momento, AI-2 foi adicionado em diferentes concentrações (0, 18, 36 e 45 µM) e as culturas foram incubadas por mais seis horas, até que todas atingissem fase estacionária de crescimento. Alíquotas foram retiradas a cada hora para monitoramento da OD₆₀₀ e para o cálculo de unidades formadoras de colônia (CFU), através de diluição seriada e semeadura em meio MM sólido. Além disso, alíquotas (2 ml) foram coletadas nos momentos t = 16h e t = 20h para quantificação do etanol produzido pelas culturas nestes dois momentos. Para tanto, as células foram centrifugadas a 8.000 X g por dois minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,22 µm. A seguir, alíquotas dos sobrenadantes purificados foram analisadas com o auxílio do *EnzychromTM ethanol assay kit*, de maneira a detectar e quantificar o etanol produzido. As barras azuis mostram a concentração absoluta de etanol presente em cada amostra (barra à esquerda), enquanto os pontos vermelhos mostram a concentração relativa de etanol nestas mesmas amostras, após normalização pelo número de células (CFU) presentes em cada uma (barra à direita). O gráfico mostra os resultados médios e seus respectivos desvios-padrão, obtidos para três experimentos independentes.

4.3 – Análise da modulação da expressão de genes envolvidos com a produção de etanol em *Z. mobilis*.

Os resultados obtidos inicialmente por Yang *et al.* (2011) sugeriam que algumas enzimas diretamente envolvidas com a produção de etanol em *Z. mobilis* poderiam estar presentes em maior concentração no interior de células tratadas com AI-2. Dentre estas enzimas, destacavam-se a piruvato decarboxilase, ou *pdc* (codificada pelo gene ZMO1360) e a fosfopiruvato hidratase (ou enolase), codificada pelo gene ZMO1608. Dessa forma, decidimos verificar se AI-2 era capaz de aumentar os níveis de transcrição destes dois genes. Estes experimentos envolveram a análise de dados derivados de uma análise transcriptômica global, utilizando RNAs de bactérias crescidas na presença, ou ausência de 45 μ M AI-2, que foram submetidos a experimentos de RNA-seq, como parte do projeto da Dr.a Valquíria C. Alencar, Pós-Doutoranda do nosso laboratório. Para estes experimentos, culturas de *Z. mobilis* foram estabelecidas em MM e crescidas até metade da fase exponencial de crescimento (como mostrado na Figura 5). Nesse momento, uma alíquota foi retirada da cultura (Controle 14h) e RNA total das bactérias foi extraído. A seguir, a cultura foi dividida em duas, sendo que uma delas foi induzida com 45 μ M AI-2, enquanto a outra não recebeu este sinalizador. Estas culturas foram então crescidas até a fase estacionária ($t = 20$ h), quando células foram colhidas para extração de RNA total e construção de bibliotecas de RNA-seq e mensuração da expressão gênica global nestas condições. Para o presente relatório, tomamos os dados de expressão relativa dos genes ZMO1360 e ZMO1608, citados acima, de maneira a confirmar os resultados de Yang *et al.* (2011). Estes resultados são mostrados na Figura 7 e evidenciam que, na verdade, tanto o gene ZMO1360 (*pdc*), como ZMO1608 (enolase), têm sua transcrição inibida, em resposta à presença de AI-2 (veja barras vermelhas, na Figura 8).

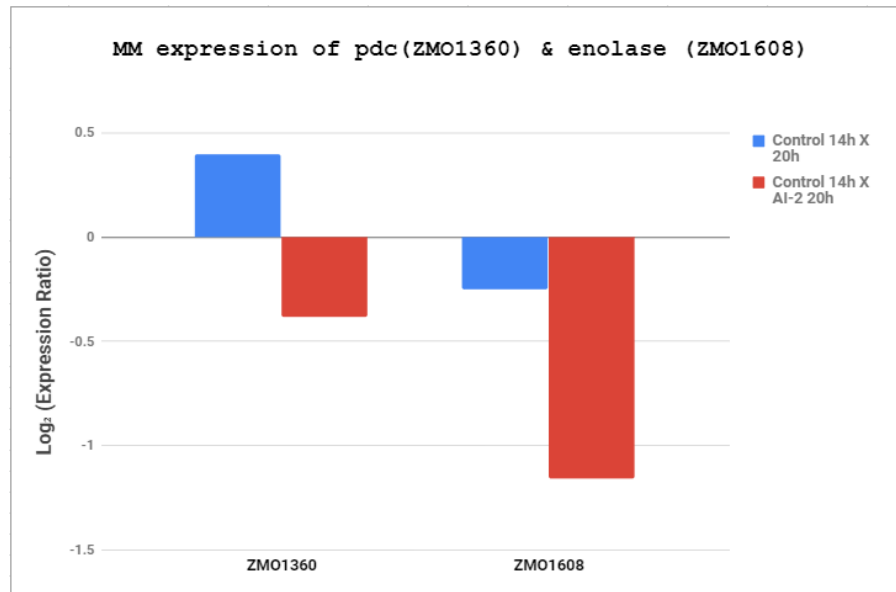


Figura 8. Análise da expressão relativa dos genes ZMO1360 (*pdc*) e ZMO1608 (*enolase*) de *Z. mobilis* em resposta à presença de AI-2. Culturas de *Z. mobilis* foram estabelecidas em MM e crescidas até metade da fase exponencial de crescimento (como mostrado na Figura 5). Nesse momento, uma alíquota foi retirada da cultura (Controle 14h) e RNA total das bactérias foi extraído. A seguir, a cultura foi dividida em duas, sendo que uma delas foi induzida com 45 μ M AI-2, enquanto a outra não recebeu este sinalizador. Estas culturas foram então crescidas até a fase estacionária ($t = 20$ h), quando células foram colhidas para extração de RNA total e construção de bibliotecas de RNA-seq. Os valores de expressão gênica (em RPKM) foram, então, obtidos para células Controle (sem AI-2, nos tempos 14h e 20h) e tratadas com AI-2 (no momento 20h). Os valores de expressão relativa são mostrados através dos valores de $\log_2$ (RPKM Controle 20h/Controle 14h) e $\log_2$ (RPKM AI-2 20h/RPKM 14h). Cada barra mostrada no gráfico representa o valor médio obtido de três réplicas experimentais, com significância estatística de $q < 0.01$.

5 – Discussão

Como mencionado anteriormente, Yang e colaboradores (2011) foram os primeiros a conduzir experimentos com o objetivo de mostrar, de maneira indireta, a sensibilidade de *Z. mobilis* ao AI-2. Para tanto, utilizaram, amostras de meio de cultura previamente utilizado para crescer células de *E. coli* até a fase estacionária como fonte deste sinalizador. Nesse sentido, o meio de cultura utilizado para seu crescimento possui elevada concentração desse sinalizador, já que *E. coli* é uma bactéria capaz de produzir AI-2 (Surette, 1999; DeLisa, 2001). De fato, quando alíquotas provenientes desse meio foram inoculadas em culturas de *Z. mobilis*, verificou-se alteração nos níveis de expressão de algumas proteínas, sendo que esse fenômeno não se repetia quando as culturas de *Z. mobilis* eram tratadas com meio proveniente de culturas de uma linhagem *luxS*- de *E. coli*, que é incapaz de produzir AI-2. No entanto, a elevada complexidade dos meios de cultura utilizados nestes experimentos torna difícil concluir com exatidão se era realmente o AI-2 a molécula responsável pela expressão gênica diferencial observada em *Z. mobilis*. Ao utilizar alíquotas de AI-2 sintético, livre de eventuais contaminantes provenientes de meios de cultura complexos, os experimentos descritos neste trabalho fornecem resultados muito mais conclusivos a respeito da sensibilidade de *Z. mobilis* a este sinalizador, sobretudo ao demonstrar que AI-2 parece induzir (de maneira concentração-dependente) o estabelecimento de uma fase estacionária prematura em culturas de *Z. mobilis*, caracterizada a diminuição no ritmo de crescimento das bactérias. Estes experimentos confirmam que *Z. mobilis* é sensível ao sinalizador AI-2, ainda que não seja capaz de sintetizá-lo, já que não possui os genes *luxS* e *psf*, necessários para sua produção (Duan *et al.*, 2003). Tal fenômeno já foi observado em outras bactérias incapazes de produzir AI-2, como *Mycobacterium avium* (Geier *et al.*, 2008) e *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria filogeneticamente próxima à *Z. mobilis*, na qual verifica-se indução na produção de biofilme e de fatores de virulência em resposta a AI-2 (Li *et al.*, 2015).

Curiosamente, no entanto, AI-2 não parece induzir aumento na produção absoluta de etanol em culturas de *Z. mobilis*, contrariando os resultados originais obtidos por Yang (2011). De fato, estes estudos sugeriam que culturas desta bactéria poderiam produzir etanol a concentrações próximas a 16% (v/v), o que equivaleria a 120 g de etanol por litro, enquanto culturas não tratadas produziriam apenas 85 g/L (11% v/v) de etanol. Embora estudos anteriores já tenham demonstrado ser possível atingir tais valores de produção de etanol com culturas de *Z. mobilis*, crescidas em sistemas contínuos, ou em batelada (Carreón-Rodríguez *et al.*, 2019), tais valores não poderiam ser alcançados nas condições experimentais descritas por Yang (2011), já que o meio RM (utilizado para crescer as bactérias nestas análises) possui um máximo de 30 g/L em potenciais fontes de carbono (20 g/L de

glicose e 10 g/L de extrato de levedura) (Yang *et al.*, 2011). Estes resultados sugerem que o ensaio de redução de cromato utilizado neste trabalho apresenta problemas relacionados à falta de especificidade na detecção de etanol, sobretudo quando as amostras provêm de um meio complexo, como o meio RM.

Nesse sentido, os experimentos aqui descritos procuraram avaliar a produção de etanol em condições capazes de evitar tais problemas, utilizando um ensaio mais apropriado para a detecção de etanol (*EnzychromTM*) e um meio de cultura mínimo, desprovido de componentes complexos, com potencial para interferir na detecção precisa deste álcool. Como esperado, estes ensaios resultaram em mensurações de etanol que apresentaram valores cujas concentrações eram compatíveis com a quantidade de glicose presente no meio MM (20 g/L), variando entre 4 e 6 g/L, após 20 horas de cultivo. Além disso, o uso de AI-2 sintético eliminou a presença de metabólitos desconhecidos, provenientes do sobrenadante de culturas de *E. coli*, que poderiam interferir na resposta de *Z. mobilis* a AI-2. Sob tais condições, foi possível verificar que, AI-2 leva a uma diminuição na expressão dos genes que codificam as enzimas Pdc e Enolase, contrariando, mais uma vez, os resultados originais obtidos por Yang (2011).

No entanto, a sub-regulação destes genes, verificada na presença de AI-2 não parece resultar em redução na produção absoluta de etanol, como mostrado na Figura 5. Estes resultados estão em acordo com observações anteriores, que destacam o funcionamento constitutivo da via ED em *Z. mobilis*, por tratar-se da peça central do metabolismo energético desta bactéria, já que representa a única alternativa metabólica que as células têm à disposição para a produção de ATP (Conway, 1992). Recentemente, Tatli *et al.* (2019) analisaram o fosfoproteoma de *Z. mobilis*, identificando a existência de fosforilação diferencial em diversas enzimas da via ED, mas experimentos adicionais ainda são necessários para averiguar se estas fosforilações poderiam constituir um mecanismo de controle pós-transcricional, capaz de modular o funcionamento da via ED nesta bactéria.

Assumindo-se, desta forma, que os genes envolvidos com a via ED e com a conversão de piruvato a etanol apresentam funcionamento inalterado na presença de AI-2, o aumento de rendimento na produção de etanol/célula poderia ser explicado por maior disponibilidade de glicose para abastecer este processo, o que poderia ser garantido por um incremento no processo de captação e internalização deste monossacarídeo. Nesse sentido, os dados de transcriptoma obtidos pela Dr.^a Valquíria confirmam que as células tratadas com AI-2 apresentam aumento na expressão de duas porinas específicas para carboidratos, localizadas na membrana externa das células (ZMO_RS00270 e ZMO_RS08390), bem como do principal transportador de glicose caracterizado nesta bactéria

(ZMO_RS01265), uma permease pertencente à superfamília MFS (*Major Facillitator Superfamily*), localizado na membrana interna (Weisser *et al.*, 1995)

6 – Conclusões

Os experimentos conduzidos ao longo deste projeto confirmam, de maneira direta, que *Z. mobilis* é sensível ao indutor de QS AI-2, embora seja incapaz de produzir esta molécula. Porém, ao contrário do que foi reportado por Yang *et al.* (2011), AI-2 não é capaz de promover aumento na quantidade absoluta de etanol produzido por culturas desta bactéria, de forma que os resultados prévios obtidos por estes autores derivam, provavelmente, de reações não-específicas inerentes ao método de redução de cromato, utilizados por estes autores para quantificar etanol. No entanto, os resultados aqui descritos indicam que AI-2 é capaz de aumentar o rendimento produção de etanol em *Z. mobilis*, já que as células tratadas com AI-2 apresentam uma maior taxa de etanol produzido por célula. Da mesma forma, não foi possível confirmar a existência de superexpressão de genes da via ED em *Z. mobilis*, quando esta bactéria é submetida a tratamento com AI-2. Dessa forma, os efeitos verificados por estes autores derivam, provavelmente, da ação de algum outro metabólito presente nos meios de cultura de *E. coli*, utilizados nestes experimentos como fonte de AI-2. Portanto, os resultados derivados do presente trabalho trazem profundas repercussões, uma vez que comprometem as bases experimentais que sustentam duas patentes internacionais, derivadas do trabalho de Yang (2011).

7 - Referências Bibliográficas

- Ahmer, B.M. (2004). Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Mol Microbiol.** **52**, 933.
- Asad, S. e Opal, S.M. (2008). Bench-to-bedside review: *Quorum sensing* and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. **Crit Care.**; **12**(6), 236. doi: 10.1186/cc7101.
- Bassler, B.L. and Losick, R. (2006). Bacterially speaking. **Cell** **125**, 237.
- Bennett, C. Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. *Am. J. Med. Technol.* **37**, 217–220 (1971)
- Biddy, J. *et al.* (2016). Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential. **National Renewable Energy Laboratory Technical Report** NREL/TP-5100-65509. Available at <http://www.nrel.gov/docs/fy16osti/65509.pdf> (accessed on Jun/08/2017).
- Borges-Walmsley, M.I. *et al.* (2009). Ethanol production. **European Patent Office**. EP2092070A2.
- Brestic-Goachet, N. *et al.* (1989). Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. **J. Gen. Microbiol.** **135**, 893.
- Carreón-Rodríguez, O.E. *et al* (2019). Phenotypic and genomic analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 mutants with enhanced ethanol tolerance. **Biotechnology Reports** **23**, 328.
- Conway T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS microbiology reviews**, **9**(1), 1–27. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05822.x.
- Deanda, K. *et al.* (1996). Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. **Appl. Environ. Microbiol.** **62**, 4465.
- DeLisa, M. P. *et al.* (2001). Mapping stress-induced changes in autoinducer AI-2 production in chemostat-cultivated *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** **183**, 2918–2928
- Duan K. *et al.* (2003). Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. **Mol. Microbiol.** **50**(5), 1477.
- Erzinger, G.S. e Vitolo, M. (2006). *Zymomonas mobilis* as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. **Appl Biochem Biotechnol** **131**, 787.

- Geier H. *et al* (2008). Autoinducer-2 triggers the oxidative stress response in *Mycobacterium avium*, leading to biofilm formation. **Appl Environ Microbiol.** **74**(6), 1798
- He M.X. *et al.* (2014) *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries. **Biotechnol Biofuels.** **7**, 101. doi: 10.1186/1754-6834-7-101.
- Himmel, M.E. *et al.* (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science** **315**, 804.
- Jeffries, T.W. (2005). Ethanol fermentation on the move. **Nat Biotechnol.** **23**, 40.
- Kim, J.Y. *et al.* (2014). Transformant for production of lactic acid of high optical purity and method for producing lactic acid using the same. **USPTO**, US20140128635A1.
- Lai, W.J., and Chen, G.Q. (2006). Polyhydroxybutyrate synthesis in recombinant *Zymomonas mobilis* affected ethanol production. **China Biotechnol** **26**, 52.
- Lee, K.Y. *et al.* (2010). The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. **Microb Cell Fact** **9**, 94.
- Lejeune, A. *et al.* (1988). Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. **FEMS Microbiol. Lett.** **49**, 363.
- Li H. *et al* (2015). Autoinducer-2 regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation and virulence production in a dose-dependent manner. **BMC Microbiol.** **15**, 192
- Linger J.G. *et al.* (2010). Heterologous Expression and Extracellular Secretion of Cellulolytic Enzymes by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Environ. Microbiol.** **76**, 6360.
- Miller, M.B. *et al.* (2002). Parallel *quorum sensing* systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholera*. **Cell** **110**, 303.
- Misawa, N. *et al.* (1988). Expression of a cellulose gene in *Zymomonas mobilis*. **J. Biotechnol.** **7**, 167.
- Panesar, P.S. *et al.* (2006). *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. **J Chem Technol Biotechnol** **81**, 623. doi: 10.1002/jctb.1448.

- Papenfort, K. e Bassler, B.L. (2016). *Quorum sensing* signal–response systems in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol.** **14**(9), 576. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89.
- Pereira C.S. *et al.* (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. **FEMS Microbiol Rev.** **37**(2), 156 doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x.
- Pilone, G.J. Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**(2), 188–190 (1985).
- Rogers, P.L. *et al.* (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** **108**, 263.
- Savvides, A.L. *et al.* (2001). Enzymes of the Entner–Doudoroff and pyruvate decarboxylation pathways in *Zymomonas mobilis* wild-type CP4 and mutant strains grown in continuous culture. **Antonie van Leeuwenhoek** **80**, 287.
- Seo J.S. *et al.* (2005). The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. **Nat Biotechnol.** **23**(1), 63.
- Shakirova, L. *et al.* (2008). Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria *Zymomonas mobilis* after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying. **J Ind Microbiol Biotechnol** **35**, 1175.
- Silbir, S. *et al.* (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydr Polym** **99**, 454.
- Silveira, M.M. *et al.* (1999). Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. **J Biotechnol** **75**, 99.
- Somerville, C. (2007). Biofuels. **Curr. Biol.** **17**, R115.
- Sun, J. *et al.* (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. **BMC Evol Biol** **4**, 36.
- Surette, M. G. *et al.* (1999). *Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio* **Proc. Natl. Acad. Sci.** **96**, 1639–1644.
- Taga, M.E. *et al.* (2001). The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. **Mol. Microbiol.** **42**, 777.

- Tatli, M., Hebert, A. S., Coon, J. J., & Amador-Noguez, D. (2019). Genome Wide Phosphoproteome Analysis of *Zymomonas mobilis* Under Anaerobic, Aerobic, and N₂-Fixing Conditions. **Frontiers in microbiology**, **10**, 1986. doi: 10.3389/fmicb.2019.01986
- Walmsley, A.R. *et al.* (2012). Ethanol production. **USPTO** US8163526B2.
- Waters, C.M. and Bassler B.L. (2005). *Quorum sensing*: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu Rev Cell Dev Biol.** **21**, 319.
- Xavier, K.B. and Bassler, B.L. (2005). Regulation of uptake and processing of the quorum-sensing autoinducer AI-2 in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **187**, 238.
- Yanase, H. *et al.* (2005). Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. **Biotechnol Lett.** **27**, 259.
- Yang S. *et al.* (2016). *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. **Microb Biotechnol.** **9**(6), 699-717. doi: 10.1111/1751-7915.12408
- Yang, J.W. (2011). Enhanced bioethanol production by *Zymomonas mobilis* in response to the *quorum sensing* molecules AI-2 Ph.D. Thesis). **Durham theses**, Durham University. Available at Durham E-Theses Online: <http://etheses.dur.ac.uk/3231/> (acessado em 08/06/2017)
- Yoon, K.H. *et al.* (1988). Transfer of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase gene into *Zymomonas anaerobia*. **Biotechnol. Lett.** **10**, 213.
- Zhang, M. *et al.* (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science** **267**, 240.
- Zhang, M. *et al.* (2007). *Zymomonas* pentose-fermenting strains and uses thereof. **USPTO**, US7223575B2.