DIOGO PINETTI MARQUEZONI

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE DA
BACTERIORODOPSINA EM *Cupriavidus necator***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração:
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

Versão Corrigida. A versão original encontra-se arquivada no setor de comunicação do ICB III.

São Paulo
2011

RESUMO

MARQUEZONI, D.P. **Clonagem e expressão do gene da bacteriorodopsina em *Cupriavidus necator***. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Polihidroxicanoatos (PHAs) são polímeros produzidos por diversas bactérias como material de reserva de carbono e energia, quando se encontram em condições de limitação de nutrientes. Os PHAs apresentam propriedades termoplásticas comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica, além de apresentarem a vantagem de ser totalmente biodegradáveis, em contraste aos plásticos convencionais, que podem permanecer no meio ambiente por várias centenas de anos. Entretanto, o preço de tais biopolímeros não é competitivo com o dos plásticos convencionais, sendo, portanto necessário reduzir os custos com a matéria-prima. A bactéria *Cupriavidus necator* DSMZ 545 é uma beta-proteobactéria não-patogênica, quimiolitotrófica facultativa e é considerada como organismo modelo para a produção de PHA. Embora haja, na literatura, estudos mostrando que esta bactéria é capaz de produzir PHA utilizando CO₂ como fonte de carbono, existem sérias limitações para o seu cultivo autotrófico. Visando otimizar a capacidade autotrófica desta bactéria, foi realizada neste trabalho a clonagem e expressão do gene da bacteriorodopsina (*bop*) em *C. necator*. A bacteriorodopsina é uma proteína de membrana, produzida por certas *Archaea* halofílicas, por ação da qual a energia luminosa é convertida em um gradiente de prótons, que pode ser utilizado pela célula para produzir ATP. Para garantir a expressão do gene heterólogo na linhagem recombinante, inicialmente procurou-se um promotor que atuasse de forma forte e constitutiva em *C. necator*. Para tanto, foram examinados dois plasmídeos, construídos anteriormente no nosso laboratório, pLEGFP e pBB-panEGFP, contendo, respectivamente, o promotor do operon da lactose de *Escherichia coli* (*lac*) ou um promotor derivado do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis* (*pan*), no comando do gene da proteína verde fluorescente (*egfp*). O promotor *pan* proporcionou alta expressão constitutiva do gene repórter em *C. necator*, verificada qualitativamente por microscopia de fluorescência e quantificada por citometria de fluxo. Por outro lado, o gene *bop* foi amplificado por PCR, a partir do DNA genômico de *Halobacterium salinarum* RI, e clonado em um vetor comercial. Em seguida, o gene *egfp* foi substituído pelo gene *bop* no plasmídeo pBB-panEGFP. Os plasmídeos de quatro clones, obtidos a partir da transformação de *C. necator* com esta construção, foram analisados por perfil de restrição, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA, confirmando o sucesso da construção. A expressão e correta localização da bacteriorodopsina num dos clones transformantes foi verificada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Por fim, foram analisados os efeitos biológicos da expressão da bacteriorodopsina neste clone recombinante de *C. necator*, tendo sido verificado que, sob iluminação, a bacteriorodopsina é capaz de promover maior produção de ATP, assim como produção aumentada de PHA, sem afetar o crescimento celular.

Palavras-chave: Bacteriorodopsina. *Cupriavidus necator*. Polihidroxicanoatos. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

MARQUEZONI, D.P. **Cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene in *Cupriavidus necator***. 2011. 85 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers produced by several bacteria as carbon and energy storage materials, under nutrient-limited conditions. PHAs show comparable thermoplastic properties with plastics from petrochemical origin and present the advantage of being completely biodegradable, in contrast to the conventional plastics, which persist in the environment for several hundred years. However, the price of such biopolymers is not competitive with that of conventional polymers, hence it is necessary to reduce the costs related to raw materials. *Cupriavidus necator* DSMZ 545 is a non-pathogenic, facultative chemolithoautotrophic beta-proteobacterium, which is considered as a model organism for PHA production. Although previous studies in the literature show that this bacterium is able to produce PHA utilizing CO₂ as the carbon source, there are severe limitations for its autotrophic cultivation. In the present work, with the purpose of optimizing the autotrophic capability of this bacterium, the cloning and expression of the bacteriorhodopsin gene (*bop*) was undertaken in *C. necator*. Bacteriorhodopsin is a membrane protein, produced by certain halophilic *Archaea*, which is able to convert light energy in a proton gradient that can be utilized by the cell for ATP production. In order to insure the expression of the heterologous gene in the recombinant strain, the first step consisted to find a promoter acting in a strong and constitutive mode in *C. necator*. To this end, we examined two plasmids, previously constructed in our laboratory, pLEGFP and pBB-panEGFP, which carry the promoter of the *Escherichia coli* lactose operon (*lac*), or a promoter deriving from the *Bacillus subtilis* *mrgA* gene (*pan*), respectively, to drive the expression of the gene encoding the green fluorescent protein (*egfp*). The *pan* promoter was found to provide high constitutive expression of the reporter gene in *C. necator*, as shown qualitatively by fluorescence microscopy and quantitatively by flow cytometry. On the other hand, using *Halobacterium salinarum* RI genomic DNA as the template, the *bop* gene was PCR amplified and cloned in a commercial vector. Thereafter, the *egfp* gene was replaced by the *bop* gene in the pBB-panEGFP plasmid. The plasmids of four clones resulting from transformation of *C. necator* with the new construct were analyzed by restriction profiles, PCR amplification, and DNA sequencing, and the results confirmed the success of the construct. The bacteriorhodopsin expression and correct location in one of the transformant clones was verified through SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, the biological effects of bacteriorhodopsin expression in this *C. necator* recombinant clone were examined, showing that, upon illumination, bacteriorhodopsin expression is able to promote an increase in ATP production, as well as an increase in PHA production, without affecting cell growth.

Key words: Bacteriorhodopsin. *Cupriavidus necator*. Polyhydroxyalkanoates. Heterologous expression.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Impacto ambiental dos plásticos derivados do petróleo

Há muitas décadas, polímeros provenientes do petróleo vêm sendo desenvolvidos para suprir as necessidades da sociedade moderna. Hoje, estima-se que a produção de termoplásticos seja da ordem de 180 milhões de toneladas/ano, sendo que mercados consumidores, como a Índia e a China, antecipam um potencial de crescimento em sua produção, da ordem de 5 a 6% ao ano. Esta elevada demanda é decorrente das inúmeras aplicações dos plásticos, que podem substituir matérias-primas convencionais, como metais, vidro e papel (PRADELLA, 2006).

No Brasil, o setor de plásticos ocupa uma posição de destaque econômico, respondendo por 1,45% do Produto Interno Bruto (PIB). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia (IBGE), cerca de 3% do total de indústrias instaladas no Brasil estão diretamente relacionadas com a produção de material plástico. Em 2010, o consumo de plásticos no país foi de 6,2 milhões de toneladas, sendo os segmentos de mercado que mais utilizam materiais plásticos, o alimentício (25,9%), seguido pela construção civil (14,6%), embalagens diversas (14,5%), utilidades domésticas (9,7%), higiene e limpeza (7,7%), agrícola (4,1%), eletrodomésticos (2,3%), cosmético e farmacêutico (2,2%), calçados (1,9%), automobilístico (1,4%) e brinquedos (0,1%) (Associação Brasileira da Indústria do Plástico, 2010).

Devido à grande produção e vasta difusão em diferentes segmentos do mercado, a quantidade de resíduos plásticos descartados anualmente tem aumentado exponencialmente, o que desperta preocupações quanto ao impacto no meio ambiente. Outro agravante deste problema é a forma com que os materiais plásticos se comportam quando descartados na natureza. De lenta degradabilidade, a estimativa é de que os plásticos provenientes da indústria petroquímica demorem até 400 anos para se decompor e, além disto, quando depositados em aterros sanitários, prejudicam a circulação de gases e a troca de líquidos resultantes do processo de decomposição da matéria orgânica (ISHIZAKI et al., 2001).

Diversos processos são empregados a fim de minimizar o impacto ambiental dos plásticos derivados de petróleo, como é o caso da incineração e da reciclagem. A incineração ainda é alvo de muitas críticas, já que, durante o processo, ocorre a produção de diversos gases tóxicos, principalmente de altas concentrações de CO₂. Embora esta técnica esteja sendo aprimorada, existindo incineradores com filtros acoplados que possuem a capacidade de controlar a emissão

desses gases, trata-se de um sistema complexo e caro, de difícil implementação no Brasil. A reciclagem também apresenta um custo elevado e existe uma limitação no número de ciclos do reaproveitamento: após sete ciclos de reciclagem, o material começa a perder suas propriedades e necessita ser descartado (Associação Brasileira da Indústria Química e de Produtos Derivados, 1997).

O desenvolvimento de novas estratégias sustentáveis é, portanto necessário, principalmente a busca por materiais plásticos com características menos agressivas ao meio ambiente. Neste cenário, os plásticos biodegradáveis representam a melhor solução como substitutos dos plásticos petroquímicos. Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em três principais categorias (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005):

- a) Polímeros sintetizados quimicamente: Estes polímeros são susceptíveis a ações enzimáticas e degradação por microrganismos, porém não apresentam todas as propriedades dos plásticos petroquímicos. Ex: ácido polilático.
- b) Polímeros biodegradáveis com base de amido: O amido é utilizado como complemento para a ligação da estrutura do composto, formando um misto de amido e plástico. Microrganismos, principalmente do solo, possuem a capacidade de degradar amido facilmente, levando ao enfraquecimento da matriz polimérica. Por apresentar grande parte de sua composição de plástico convencional, esta classe de polímero é apenas parcialmente biodegradável. Ex: polietileno-amido.
- c) Polímeros sintetizados por microrganismos - Polihidroxialcanoatos (PHAs): São 100% biodegradáveis e produzidos a partir de matérias primas renováveis. Tais polímeros são sintetizados como material de reserva energética em condições que exigem limitação de nutrientes e, quando o ambiente se torna propício para a utilização dessa reserva, são degradados nos monômeros correspondentes. Ex: polihidroxibutirato (PHB).

1.2 Polihidroxialcanoatos

PHA é o termo genérico aplicado à família de poliésteres produzidos e acumulados por diversos microrganismos na forma de grânulos intracelulares. Em geral, a síntese de PHA ocorre em meios de crescimento desbalanceados, apresentando excesso de carbono e limitação de, pelo menos, um nutriente necessário para a multiplicação celular (P, N, Mg, etc). Os PHAs apresentam propriedades termoplásticas comparáveis às dos plásticos de origem petroquímica,

sendo possível realizar o seu processamento industrial em equipamentos normalmente utilizados para os plásticos petroquímicos, tais como, moldes, fornos e equipamentos de extrusão. Além disso, os PHAs são extremamente versáteis, podendo apresentar propriedades físico-químicas inovadoras, possibilitando o surgimento de novos materiais no mercado (MADISON e HUISMAN, 1999).

Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono (REHM e STEINBÜCHEL, 1999) (Figura 1). Tal diversidade garante um vasto número de possíveis combinações que podem ser empregadas para a obtenção de diferentes polímeros (MADISON e HUISMAN, 1999). Os monômeros constituintes de PHA são classificados em dois grandes grupos: os de cadeia curta PHA_{scl} (*short chain length*), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e aqueles de cadeia média PHA_{mcl} (*medium chain length*), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. PHA_{mcl} são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e PHA_{scl} (principalmente P3HB) são produzidos por espécies pertencentes aos mais diversos grupos bacterianos (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Figura 1 - Estrutura dos Polihidroxialcanoatos (PHA).

FONTE: KHANNA e SRIVASTAVA, 2005.

Do ponto de vista ambiental, a biodegradabilidade pode ser considerada a característica mais importante dos PHAs. A natureza é rica em consórcios microbianos que são capazes de degradar tais polímeros através da secreção de PHA hidrolases e despolimerases. A atividade

dessas enzimas depende principalmente da composição do polímero, quantidade da amostra e condições ambientais, sendo que a velocidade de degradação dos PHAs pode variar entre alguns meses (cultivo em anaerobiose) (Figura 2) até anos (água do mar) (MADISON e HUISMAN, 1999).

Figura 2 - Degradação de P(3HB-3V).

Garrafas compostas de P(3HB-3V) foram incubadas a 20 °C em anaerobiose. O processo de decomposição foi observado durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 meses (esquerda para direita).

FONTE: MADISON e HUISMAN, 1999.

As aplicações destes biopolímeros não se restringem apenas à utilização como polímero convencional. A biocompatibilidade dos PHAs permite que sejam utilizados em aplicações médicas, como na fabricação de próteses, materiais de sutura, contraste para imagem médica, entre outros. Possuem também aplicações na indústria farmacêutica (carreador de drogas para a liberação controlada) e de alimentos (embalagens ativas) (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; ZINN et al., 2001; GRAGE et al., 2009).

Apesar desta grande possibilidade de aplicações, os PHAs ainda não são expressivos no mercado, em decorrência do seu alto custo de produção, quando comparado com os plásticos convencionais. Para que a utilização de PHAs seja economicamente viável, é necessário dispor-se de uma matéria-prima abundante e de baixo custo, sobre a qual possam ser cultivadas as bactérias produtoras de PHAs. Uma vez que a fonte de carbono representa um importante item nos custos de produção, podendo atingir até 40% do custo total, é evidente o interesse industrial em estratégias visando à diminuição do custo deste recurso (KIM, 2000).

Considerando os impasses econômicos em se produzir PHAs, o presente trabalho tem por objetivo diminuir os custos de produção de PHAs, mais precisamente PHB, utilizando a bactéria *Cupriavidus necator* DSMZ545, o microrganismo tido como referência na produção de PHB.

1.3 A bactéria *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator é uma beta-proteobactéria aeróbica, quimiolitotrófica facultativa, hidrogênio-oxidativa, que foi inicialmente descrita por Schlegel e Gottschalk em 1965 e teve recentemente o seu genoma sequenciado (POHLMANN et al., 2006). Anteriormente denominada *Hydrogenomonas eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *C. necator* apresenta grande interesse biotecnológico, por ser o melhor microrganismo produtor de PHAs que se conhece até o momento, podendo apresentar até 80% de sua massa seca na forma de PHB, dependendo das condições de cultivo (ANDERSON e DAWES, 1990; MADISON e HUISMAN, 1999).

O PHB é sintetizado em *C. necator* a partir da acetil-CoA, em condições desbalanceadas de excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, tal como oxigênio, nitrogênio ou fosfato. A limitação de cada um destes nutrientes desencadeia a formação de PHB por diferentes processos metabólicos (DALCATON, 2006).

A síntese de PHB ocorre por uma sequência de 3 reações, que envolvem as enzimas 3- β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase. Tais enzimas são codificadas pelo operon *phbC*, composto pelos genes *phbA* (3- β -cetotiolase), *phbB* (acetoacetil-CoA redutase) e *phbC* (PHA sintase) (Figura 3). A enzima 3- β -cetotiolase catalisa o primeiro passo na formação do PHA, condensando, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato em R-3-hidroxibutiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase. A enzima PHA sintase é a chave principal na biossíntese de PHAs, catalisando a formação de ligações ésteres entre as unidades D(-)3-hidroxiacil-CoAs. Em *C. necator*, esta enzima é capaz de polimerizar 3-hidroxi, 4-hidroxi e 5-hidroxiacil-CoAs a partir de D isômeros de 4 e 5 carbonos de hidroxiacil-CoA, substratos naturais para a PHA sintase (ANDERSON e DAWES, 1990; STEINBÜCHEL e LUTKE-EVERSLOH, 2003).

Figura 3 - Operon *phbCAB* de *C. necator*.

O PHB é sintetizado a partir da ação de 3 enzimas codificadas por este operon; *phbA* - 3-β-cetotiolase, *phbB* - acetoacetyl-CoA reductase, *phbC* - PHA sintase. Um promotor a montante do gene *phbC* dirige a transcrição do operon completo.

FONTE: Modificado de Madison e Huisman (1999).

Por ser um organismo quimiolitotrófico facultativo, *C. necator* possui a capacidade de utilizar compostos orgânicos ou inorgânicos como fonte de energia. Esta flexibilidade bioenergética permite que a bactéria alterne entre os modos de crescimento heterotrófico e autotrófico, neste último caso fixando CO₂ através do ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB) (POHLMANN et al., 2006). Tanto as proteobactérias quimiolitotróficas aeróbicas quanto as fototróficas anaeróbicas (bactérias púrpuras) utilizam o CBB, sendo a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) a enzima-chave desta via, que também é produzida por *C. necator* (BOWIEN e KUSIAN, 2002).

Em crescimento autotrófico, a energia necessária para a fixação do CO₂ é obtida por meio da oxidação do gás hidrogênio com oxigênio. Para tanto, *C. necator* produz 2 hidrogenases, uma ligada à membrana e outra, solúvel, citoplasmática. A enzima ligada à membrana está envolvida na geração de ATP, enquanto a enzima solúvel capta o H₂, reduzindo diretamente NAD⁺ a NADH para o Ciclo de Calvin, conforme esquematizado na figura 4 (MADIGAN et al., 2010).

Figura 4 - Bioenergética e função das duas hidrogenases de bactérias aeróbicas quimiolitotróficas.

Em *C. necator*, duas hidrogenases estão presentes, a hidrogenase ligada à membrana está relacionada à produção energética, enquanto a hidrogenase citoplasmática produz $NADH$ que será utilizado no Ciclo de Calvin. Pode-se notar que a hidrogenase de membrana começa o transporte de elétrons formando a força próton motiva. cyt: citocromo; Q: quinona.

FONTE: Extraída de Madigan et al., 2010.

1.4 Matérias-primas

Como citado anteriormente, um dos principais problemas da aplicação comercial dos PHAs é o seu alto custo de produção. Estudos sobre a possibilidade de utilização de substratos brutos, de baixo custo, visam produzir PHA de uma maneira mais vantajosa financeiramente. Dentre as matérias-primas empregadas, podemos citar o melaço de cana e beterraba (BEAULIEU et al., 1995), soro de leite (KOLLER et al., 2005), óleos vegetais (FUKUI e DOI, 1998), hidrolisados de amido (RUSENDI e SHEPPARD, 1995), entre outros. Porém, este tipo de matéria-prima geralmente resulta em uma produção baixa do polímero quando comparada a substratos de carbono purificados (KOLLER et al., 2005).

Outra estratégia promissora é o desenvolvimento de cepas recombinantes, que possibilitem melhorar a produção de PHA e/ou diminuir os custos de produção (LEE et al., 1999). Em trabalhos anteriores do nosso laboratório, foram construídas linhagens recombinantes da linhagem de *C. necator* DSMZ 545, com vistas a melhorar a sua capacidade em produzir plástico a partir de diferentes substratos, tais como a sacarose de cana de açúcar e o ácido

propiónico (FAVA, 1997; SARTORI, 1998). Naquela ocasião, esta estratégia apresentava-se interessante. Entretanto, na atual conjuntura econômica, a cana de açúcar passou a ter alta demanda como matéria-prima para biocombustíveis. Assim, hoje seria mais interessante, do ponto de vista da viabilidade econômica do processo, poder utilizar outras matérias-primas para a produção de PHAs e há vários trabalhos neste sentido atualmente em andamento no nosso Depto. Por outro lado, se esta bactéria pudesse ser geneticamente modificada, de modo a não depender de nenhuma matéria prima agrícola para produzir o plástico, seria evidentemente ainda mais vantajoso.

De fato, já foi demonstrado que *C. necator* pode produzir o plástico a partir de CO₂ por meio do seu metabolismo quimiolitotrófico. Entretanto, há vários problemas para o cultivo autotrófico desta bactéria, sendo difícil atingir uma alta concentração celular e/ou alta produtividade, uma vez que o substrato necessário para este tipo de cultivo consiste de uma mistura dos 3 gases, CO₂, H₂ e O₂, numa proporção que se situa na faixa de explosão gasosa e, conseqüentemente, pode facilmente explodir. Isto implica em que devem ser criadas condições bastante especiais de processo, que envolvem um circuito fechado de cultura (planta de fermentação à prova de explosão) e um controle rigoroso da concentração de O₂, que não pode ultrapassar 6,9%. Por outro lado, é preciso garantir uma fonte de H₂ e, atualmente, espera-se que o H₂ seja suprido a partir do processo de refinação da nafta ou gerado por dissociação elétrica da água por meio da energia de usinas nucleares. Além disto, os melhores resultados só foram obtidos ao empregar-se um sistema de cultura em 2 estágios, sendo o 1º, de crescimento heterotrófico, usando frutose, e o 2º, autotrófico, respeitando a limitação de O₂ (ISHIZAKI et al., 2001).

Visando aproveitar o potencial autotrófico desta bactéria, perguntâmo-nos então, o que seria necessário para torná-la fotoautotrófica. Considerando que ela já é capaz de produzir a enzima RuBisCO, necessária para a entrada do CO₂ no Ciclo de Calvin, aparentemente, o que lhe falta é apenas a capacidade de captar a energia luminosa. Optamos pela bacteriorodopsina para desempenhar este papel.

1.5 Rodopsinas

Opsinas são proteínas integrais de membrana, que, ao se ligarem ao cromóforo retinal (vitamina A aldeído), formam pigmentos capazes de absorver luz, chamados de rodopsinas (BÉJÀ et al., 2000). Atualmente, conhecem-se 4 famílias distintas de rodopsinas:

- a) As rodopsinas visuais, encontradas na retina dos olhos de todos os animais são pigmentos fotossensores (BALDWIN et al., 1997)
- b) As rodopsinas de *Archaea* funcionam como bombas de prótons controladas pela luz (bacteriorodopsinas), bombas de íons cloreto (halorodopsinas) ou receptores fotossensíveis (rodopsinas sensoriais) (OESTERHELT, 1998)
- c) Proteínas com alta similaridade de sequência com as rodopsinas sensoriais de *Archaea* foram encontradas no eucarioto *Neurospora crassa* (BIESZKE et al., 1999 a e b)
- d) A rodopsina bacteriana, ou proteorodopsina, foi descoberta num membro não-cultivado das γ -proteobactérias, por meio de análise metagenômica de bacterioplancton marinho (BÉJÀ et al., 2000). Hoje se sabe que a proteorodopsina está amplamente distribuída entre as bactérias marinhas (STEINDLER et al., 2011).

Embora nem todas as famílias de rodopsinas apresentem similaridade de sequência significativa e possam ter origens diferentes (como é o caso das famílias 1 e 2), as rodopsinas de todas as famílias compartilham topologias idênticas, caracterizadas por sete α -hélices transmembrana, que formam uma reentrância na qual o retinal se liga covalentemente, como uma base de Schiff protonada, a uma lisina na sétima hélice transmembrana (hélice G) (BÉJÀ et al., 2000).

1.6 A bacteriorodopsina

Certas espécies de *Archaea* halofílicas são capazes de realizar a síntese de ATP dirigida pela luz. Quando se encontra em condições de limitação de oxigênio, a *Archaea Halobacterium salinarum* e outros halófilos extremos sintetizam e inserem na sua membrana citoplasmática uma proteína chamada bacteriorodopsina (bR), à qual se conjuga uma molécula de retinal, capaz de absorver a energia luminosa e bombear um próton através da membrana. A translocação do próton catalizada pela bR aumenta a força próton-motora, consequentemente levando à síntese de ATP, à medida que os prótons reentram na célula, por meio da ação do complexo H⁺-ATPase

(STOECKENIUS e ROWEN, 1967; OESTERHELT e STOECKENIUS, 1973; DANON e STOECKENIUS, 1974; BROCK e PETERSEN, 1976; HARTMANN et al., 1980).

Quando reconstituída em vesículas, a bR bombeia prótons através da membrana da vesícula, criando um gradiente de prótons, que pode ser usado para gerar ATP. Assim, a bR pode servir como um substituto ou um suplemento à fosforilação oxidativa ou à fotossíntese mediada por clorofila, como um mecanismo para gerar energia (RACKER e STOECKENIUS, 1974).

A bacteriorodopsina de *H. salinarum* é codificada pelo gene *bop* de 789 pares de bases (GONZALEZ et al., 2008; CHEN et al., 2008; PFEIFFER et al., 2008; FALB et al., 2008), que já foi clonado em diversos organismos. A bR foi expressa em células eucarióticas, inclusive leveduras (HILDEBRANDT et al., 1993; HOFFMANN et al., 1994; LANG-HINRICHS et al., 1994) e ovócitos de *Xenopus laevis* (NAGEL et al., 1995). Também já foi expressa em *E. coli*, embora a ligação ao retinal não se tenha mostrado eficiente (KARNIK et al., 1990). A bacteriorodopsina (bR) é uma molécula de aproximadamente 27000 Da, altamente resistente a variações de temperatura, pH, concentração iônica, sendo relativamente fácil de ser isolada e purificada (CERCIGNAMI, 1998; HAUPTS et al., 1999; CHEN et al., 2008; FALB et al., 2008).

Estruturalmente, a bR é uma cadeia polipeptídica composta por 248 aminoácidos, sendo organizada em sete α -hélices transmembrana, que envolvem um cofator retinal fotossensível (LONDON e KHORANA, 1982; GOHON, 2008). Esta conformação da bR emite uma coloração avermelhada, por essa razão recebe o nome de “purple membrane” (OESTERHELT, 1998; HAUPTS et al., 1999; GOHON, 2008).

A função da bR é estritamente relacionada ao transporte de H^+ , convertendo a energia luminosa em um gradiente de prótons (HAUPTS et al., 1999). Este gradiente pode ser utilizado pela ATPase para a produção de ATP, como esquematizado na figura 5 (HAUPTS et al., 1999; CHEN et al., 2008).

Figura 5 - Modelo de mecanismo para a atividade da bacteriorodopsina.

Luz de 570 nm, converte a forma trans (Ret_T) protonada da proteína retinal para a forma *cis* (Ret_C), com a translocação de um próton para a superfície externa da membrana, estabelecendo a força próton motora. A atividade da ATPase, também presente na membrana, é dirigida pela força próton motora.

FONTE: Extraída de MADIGAN et al., 2010.

A bacteriorodopsina absorve a luz visível na região verde do espectro (570 nm). Em seguida à absorção, o retinal da bacteriorodopsina, que normalmente existe numa configuração *all-trans*, torna-se excitado e é convertido à forma *cis*. Esta transformação resulta na translocação de um próton para a superfície externa da membrana. A molécula de retinal então retorna ao seu isômero *all-trans*, mais estável, no escuro, com a tomada de um próton do citoplasma, fechando assim o ciclo. À medida que os prótons se acumulam na superfície externa da membrana, a força próton-motora vai aumentando, até que a membrana fique suficientemente “carregada” para dirigir a síntese de ATP por ação de uma ATPase translocadora de prótons. (MADIGAN et al., 2010).

O ciclo do próton no interior da célula ainda não foi completamente esclarecido, porém, sabe-se que o primeiro passo neste fotociclo é a isomerização do retinal induzida pela luz. O retinal acoplado à proteína bR absorve a luz de comprimento de onda de 570 nm, alterando sua conformação em um curto espaço de tempo (microssegundos), resultando em uma fase intermediária ($\lambda_{max} = 412$ nm) desprotonada. Passados alguns milissegundos, o retinal é novamente protonado ($\lambda_{max} = 570$ nm), caracterizando a bomba de prótons (SCHÄTZLER et al., 2003; CHEN et al., 2008).

2 CONCLUSÕES

- A análise da expressão da proteína verde fluorescente em *C. necator*, conferida pelos dois plasmídeos escolhidos para o presente trabalho, pLEGP e pBBpanEGFP, mostrou que o clone hospedando o vetor pBBpanEGFP apresentou intensidade de fluorescência 10,6 vezes maior do que o clone hospedando o vetor pLEGP. Além disso, foi verificado que a expressão da EGFP a partir do plasmídeo pBBpanEGFP pode ainda ser induzida pelos íons metálicos Fe^{2+} e Mn^{2+} ;
- O gene *bop*, que codifica a bacteriorodopsina, foi obtido por meio de PCR utilizando como molde o DNA total de *H. salinarum* R1;
- A análise *in silico* utilizando padrões de preferência de códons, mostrou que, em comparação com *B. subtilis* e *E. coli*, *C. necator* possui maior probabilidade de expressar a bacteriorodopsina, tendo alcançado um valor suficiente de índice adaptativo (2,6) para garantir uma boa expressão;
- Foi realizada com sucesso a clonagem do gene *bop* de *H. salinarum* RI no vetor pBBpanEGFP, sob o comando do promotor pan, originando o plasmídeo pBBpanbop;
- A análise das proteínas totais, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, revelou a presença de uma banda de 28 kDa, tamanho coincidente ao da bacteriorodopsina, no clone transformante *C. necator*/pBBpanbop, fato não observado na linhagem não transformada;
- A análise por SDS-PAGE das amostras fracionadas, confirmou a presença da banda de 28 kDa na membrana externa do clone recombinante de *C. necator*, confirmando a expressão e também a correta localização da proteína heteróloga;
- Foram analisadas diferentes condições de crescimento, entretanto não se verificou um efeito considerável da presença da bR sobre o crescimento celular na linhagem recombinante;
- Foi constatado que ambas as linhagens, selvagem e recombinante, possuem maior capacidade de acumular PHB quando cultivadas em presença de luz, embora a linhagem recombinante tenha apresentado uma melhor eficiência de produção.
- A análise da produção de ATP em presença de luz revelou um efeito considerável na linhagem recombinante relativamente à selvagem, demonstrando o efeito biológico da expressão da bR.

3 REFERÊNCIAS*

ABIPLAST – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO. **Análise estatística de 2010**: ABIPLAST, 2010 <http://www.abiplast.org.br/upload/File/2011/PERFIL_2010.pdf>; Acessado em 13/01/2012.

ABIQUIM – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA E DE PRODUTOS DERIVADOS. **Plásticos em foco**: ABIQUIM, 1997.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p.450-472, 1990.

BALDWIN, J. M.; SCHERTLER, G. F.; UNGER, V. M. An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. **J. Mol. Biol.**, v.272, p.144-164, 1997.

BEAULIEU, M.; GOULET, J.; BEAULIEU, Y.; MÉLINARD, J.; PANDIAN, S. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.165-169, 1995.

BÉJÀ, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SUZUKI, M. T.; HADD, A.; NGUYEN, L. P.; JOVANOVIĆ, S. B.; GATES, C. M.; FELDMAN, R. A.; SPUDICH, J. L.; SPUDICH, E. N.; DELONG, E. F. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. **Science.**, v.289, p.1902-1906, 2000.

BÉJÀ, O.; SPUDICH, E. N.; SPUDICH, J. L.; LECLERC, M.; DELONG, E. F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. **Nature.**, v.411, p.786-789, 2001.

BIESZKE, J. A.; BRAUN, E. L.; BEAN, L. E.; KANG, S.; NATVIG, D. O.; BORKOVICH, K. A. The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to Archaeal rhodopsins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.8034-8039, 1999a

BIESZKE, J. A.; SPUDICH, E. N.; SCOTT, K. L.; BORKOVICH, K. A.; SPUDICH, J. L. A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an Archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. **Biochemistry**, v.38, p.14138-14145, 1999b

BIONDO, R. **Engenharia genética de *Cupriavidus metallidurans* CH34 para a biorremediação de efluentes contendo metais pesados**. 2008. 206 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BOWIEN, B.; KUSIAN, B. Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. **Arch. Microbiol.**, v.178, p.85-93, 2002

BROCK, T. D.; PETERSEN, S. Some effects of light on the viability of rhodopsin-containing halobacteria. **Arch. Microbiol.**, v.109, p.199-200, 1976.

CERCIGNAMI, G.; LUCIA, S.; PETRACCHI, D. Photoresponses of *Halobacterium salinarum* to repetitive pulse stimuli. **Biophys. J.**, v.75, p.1466-1472, 1998.

CHECHETKIN, V. R. Genetic code from tRNA point of view. **J. Theor. Biol.**, v.242, p.922-934, 2006.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors, Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

CHEN, C. C., WEI, C. C., SUN, Y. C., CHEN, C.M. Packing of transmembrane helices in bacteriorhodopsin folding: Structure and thermodynamics. **J. Struct. Biol.**, v.162, p.237–247, 2008.

DALCATON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2006.

DANON, A.; STOECKENIUS, W. Photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.71, p.1234-1238, 1974.

FALB, M.; MÜLLER, K.; KÖNIGSMAIER, L.; OBERWINKLER, T.; HORN, P.; VON GRONAU, S.; GONZALEZ, O.; PFEIFFER, F.; BORNBERG-BAUER, E.; OESTERHELT, D. Metabolism of halophilic *Archaea*. **Extrem.**, v.12, p.177–196, 2008.

FAVA, A. L. B. **Clonagem e expressão do regulon-*scr* em *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de poli-hidroxibutirato a partir de sacarose.** 1997. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

FUGLSANG, A. The effective number of codons for individual amino acids: some codons are more optimal than others. **Gene**, v.320, p.185-190, 2003.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.49, p.333-336, 1998.

GIOVANNONI, S. J.; BIBBS, L.; CHO, J. C.; STAPELS, M. D.; DESIDERIO, R.; VERGIN, K. L.; RAPPE, M. S.; LANEY, S.; WILHELM, L. J.; TRIPP, H. J.; MATHUR, E. J.; BAROFSKY, D. F. Proteorhodopsin in the ubiquitous marine bacterium SAR11. **Nature**, v.438, p.82-85, 2005.

GOHON, Y. Bacteriorhodopsin/Amphipol Complexes: Structural and Functional Properties. **Biophys. J.**, v.94, p.3523–3537, 2008.

GÓMEZ-CONSARNAU, L.; GONZALEZ, J. M.; COLL-LLADO, M.; GOURDON, P.; PASCHER, T.; NEUTZE, R.; PEDROS-ALIO, C.; PINHASSI, J. Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. **Nature**, v.445, p.210-213, 2007.

GÓMEZ-CONSARNAU, L.; AKRAM, N.; LINDELL, K.; PEDERSEN, A.; NEUTZE, R.; MILTON, D. L.; GONZALEZ, J. M.; PINHASSI, J. Proteorhodopsin phototrophy promotes survival of marine bacteria during starvation. **PLoS. Biol.**, v.8, n.4, p.1-10, 2010.

GONZÁLEZ, J. M.; FERNÁNDEZ-GÓMEZ, B.; FERNÁNDEZ-GUERRA, A.; GÓMEZ-CONSARNAU, L.; SÁNCHEZ, O., et al. Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.105, p.8724–8729, 2008.

GONZALEZ, O.; GRONAU, S.; FALB, M.; PFEIFFER, F.; MENDOZA, E.; ZIMMER, R.; OESTERHELT, D. Reconstruction, modeling & analysis of *Halobacterium salinarum* R-1 metabolism. **Mol. Biosyst.**, v.4, p.148–159, 2008.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacro.**, v.10, p.660-669, 2009.

- GROTE, A.; KARSTEN, H.; SCHEER, M.; MÜNCH, R.; NÖRTEMANN, B.; HEMPEL, D.C.; JAHN, D. JCAT: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. **Nucleic. Acids. Res.**, v.33, p.526–531, 2005.
- HARTMANN, R.; OESTERHELT, D. Bacteriorhodopsin-mediated photophosphorylation in *Halobacterium halobium*. **Eur. J. Biochem.**, v.77, p.325–335, 1977.
- HAUPTS, U.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D. Closing on Bacteriorhodopsin: Progress in understanding the molecule. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v.28, p.367–399, 1999.
- HENRY, I.; SHARP, P. M. Predicting gene expression level from codon usage bias. **Mol. Biol. Evol.**, v.24, p.10–12, 2007.
- HILDEBRANDT, V.; FENDLER, K.; HEBERLE, J.; HOFFMANN, A.; BAMBERG, E.; BÜLDT, G. Bacteriorhodopsin expressed in *Schizosaccharomyces pombe* pumps protons through the plasma membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.3578–3582, 1993.
- HOFFMANN, A.; HILDEBRANDT, V.; HEBERLE, J.; BÜLDT, G. Photoactive mitochondria: *In vivo* transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.9367–9371, 1994.
- ISHIZAKI, A.; TANAKA, K.; TAGA, N. Microbial production of poly-D-3-hydroxybutyrate from CO₂. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.57, p.6–12, 2001.
- JOHNSON, E. T.; BARON, D. B.; NARANJO, B.; BOND, D. R.; SCHMIDT-DANNERT, C.; GRALNICK, J. A. Enhancement of survival and electricity production in an engineered bacterium by light-driven proton pumping. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.76, p.4123–4129, 2010.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 28, n.1, p.27–30, 2000.
- KAMO, N. T.; HASHIBA, T.; KIKUKAWA, T.; ARAISO, K.; IHARA, I.; NARA, T. A light-driven proton pump from *Haloterrigena turkmenica*: Functional expression in *Escherichia coli* membrane and coupling with a H⁺ co-transporter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.341, p.285–290, 2006.
- KARNIK, S.; DOI, T.; MOLDAY, R.; KHORANA, H. G. Expression of the archaeobacterial bacteriorhodopsin gene with and without signal sequences in *Escherichia coli*: The expressed proteins are located in the membrane but bind retinal poorly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.8955–8959, 1990.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Proc. Biochem.**, v.40, p.607–619, 2005.
- KIM, B. S. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enz. Micro. Tech.**, v.27, p.774–777, 2000.
- KOLLER M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacro.**, v.6, p.561–565, 2005.
- KOVACH, M.E.; PHILLIPS, R. W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotech.**, v.16, p.800, 1994.
- KREBS, M. P.; HAUSS, T.; HEYN, M. P.; RAJBHANDARY, U. L.; KHORANA, H. G. Expression of the bacteriorhodopsin gene in *Halobacterium halobium* using a multicopy plasmid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.859–863, 1991.

- LANG-HINRICHS, C.; QUECK, I.; BÜLDT, G.; STAHL, U.; HILDEBRANDT, V. The archaeobacterial membrane protein bacterio-opsin is expressed and N-terminally processed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v.244, n.2, p.183-188, 1994.
- LANYI, J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle. **Bioch. Bioph.**, v.1757, p.1012-1018, 2006.
- LEE, S. Y.; CHOI, J.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxybutyrate production by bacterial fermentation: mini-review. **Inter. J. Biol. Macro.**, v.25, p.31-36, 1999.
- LONDON, E.; KHORANA, H. G. Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.7003-7011, 1982.
- MADIGAN M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.
- MADISON, L. L.; HUISMAN G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biology. Rev.**, v.63, p.21-53, 1999.
- MAKKAR, N. S.; CASIDA, L. E. *Cupriavidus necator* en-nov, sp-nov – a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. **Int. J. Syst. Bac.**, v.47, p.323-326, 1987.
- MARTINEZ, A.; BRADLEY, A. S.; WALDBAUER, J. R.; SUMMONS, R. E.; DeLONG, E. F. Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v.104, n.13, p.5590-5595, 2007.
- MOORE, R. L., MCCARTHY, B. J. Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria. **J. Bacteriol.**, v.99, p.248-254, 1969.
- NAGEL, G.; MÖCKEL, B.; BÜLDT, G.; BAMBERG, E. Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. **FEBS Lett.**, v.377, p.263-266, 1995.
- OESTERHELT, D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic *Archaea*. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.8, p.489-500, 1998.
- OESTERHELT, D.; STOECKENIUS, W. Functions of a new photoreceptor membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.70, p.2853-2857, 1973.
- PFEIFFER, F.; SCHUSTER, S. C.; BROICHER, A.; FALB, M.; PALM, P.; RODEWALD, K.; RUEPP, A.; SOPPA, J.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D. Evolution in the laboratory: The genome of *Halobacterium salinarum* strain R1 compared to that of strain NRC-1. **Genomics**, v.91, p.335-346, 2008.
- POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOB, I.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotech.**, v.25, p.472-478, 2006.
- PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório Técnico: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, São Paulo, 2006.

QUADROS, O. F. **Construção de biossensor bacteriano para detecção de mercúrio**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

RACKER, E.; STOECKENIUS, W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. **J. Biol. Chem.**, v.249, p.662-663, 1974.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHEVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.56, p.2093-2098, 1990.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **J. Biol. Macromol.**, v.25, p.3-19, 1999.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G.; BIONDO, R.; QUADROS, O. F.; VICENTE, E. J.; SCHENBERG, A. C. G. A metal-repressed promoter from gram-positive *Bacillus subtilis* is highly active and metal-induced in gram-negative *Cupriavidus metallidurans*. **Biotech. Bioeng.**, v.107, p.469-477, 2010.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly-3-hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydroxychloric acid propanolysis. **J. Chromatog.**, v.445, p.285-289, 1988.

RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly-b-hydroxybutyrate. **Biores. Tech.**, v.54, p.191-196, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448p.

SARTORI, D. M. **Obtenção de um mutante de *Alcaligenes eutrophus* melhorado geneticamente para a produção do co-polímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV)**. 1998. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SCHÄTZLER, B.; DENCHER, N. A.; TITTOR, J.; OESTERHELT, D.; YANIV-CHECOVER, S.; NACHLIEL, E.; GUTMAN, M. Subsecond proton-hole propagation in bacteriorhodopsin. **Bioph. J.**, v.84, p.671-686, 2003.

SCHLEGEL, H. G.; GOTTSCHALK, G. Verwertung von Glucose durch eine Mutante von *Hydrogenomonas* H 16, **Biochem. Z.**, v.341, p.249-259, 1965.

SLAMOVITS, C.H.; OKAMOTO, N.; BURRI, L.; JAMES, E.R.; KEELING, P.J; A bacterial proteorhodopsin proton pump in marine eukaryotes. **Nature Comm.**, v.2, p.1-6, 2011.

STEINDLER, L.; SCHWALBACH, M. S.; SMITH, D. P.; CHAN, F.; GIOVANNONI, S. J. Energy Starved *Candidatus Pelagibacter Ubique* Substitutes Light-Mediated ATP Production for Endogenous Carbon Respiration. **PLoS ONE**, v.6, n.5, p.1-10, 2011.

STOECKENIUS, W.; ROWEN, R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. **J. Cell Biol.**, v. 34, p.365-393, 1967.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnol.**, v.16, p.419-27, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biotech. Eng. J.**, v.16, p.81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A; VALENTIN; H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Microbiol. Lett.**, v.128, p.219-228, 1995.

STINGL, U.; DESIDERIO, R. A.; CHO, J. C.; VERGIN, K. L.; GIOVANNONI, S. J. The SAR92clade: an abundant coastal clade of culturable marine bacteria possessing proteorhodopsin. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.73, p.2290–2296, 2007.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T4 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biol.**, v.79, p.237-248, 1973.

TAGHAVI, S.; VAN-DER-LELIE, D.; MERGEAY, M. Electroporation of *Alcaligenes eutrophus* with (mega) plasmids and genomic DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p.3585-3591, 1994.

VEIGA, E.; LORENZO, V.; FERNANDEZ, L. A. Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. **Mol. Microbiol.**, v.33, p.1232-1243, 1999.

WALTER, J. M.; GREENFIELD, D.; BUSTAMANTE, C.; LIPHARDT, J. Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, p.2408-2412, 2007.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v.53, p.5-21, 2001.