TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI

**Avaliação do efeito da expressão heteróloga da
proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na
otimização da produção de hidrogênio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2015

TAÍS MAYUMI KUNIYOSHI

**Avaliação do efeito da expressão heteróloga da
proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na
otimização da produção de hidrogênio**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Clara G. Schenberg
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Andrea Balan

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de teses e dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kuniyoshi, Taís Mayumi.

Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na otimização da produção de hidrogênio / Taís Mayumi Kuniyoshi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Genética de microrganismo e produção de hidrogênio.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effect of heterologous expression of the SAR86 proteorhodopsin in Gram-negative bacteria on hydrogen production optimization.

1. Combustíveis renováveis 2. Biohidrogênio 3. Proteorrodopsina 4. *Escherichia coli* 5. *Cupriavidus necator* 6. Hidrogenases de membrana I. Schenberg, Profa. Dra. Ana Clara Guerrini II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB044/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Taís Mayumi Kuniyoshi.

Título da Tese: Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na otimização da produção de hidrogênio.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091 7733- e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.0041/2015.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Protocolo de Isenção **CEP-ICB nº 599/13**, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na otimização da produção de hidrogênio*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 12 de março de 2015.

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

Dedico à minha amada família

AGRADECIMENTOS

Realmente é muito difícil conseguir lembrar de todos que contribuíram para que esta tese fosse realizada. Tenho um sentimento de imensa gratidão a Deus pelos encontros (e desencontros que também têm o seu valor) durante este processo.

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me dando amor e exemplo de tudo de mais precioso da vida. Às minhas irmãs Lia e Natalie que são minhas melhores amigas e torcedoras. Tenho certeza que sempre seremos uma pela outra. Aos meus amados sobrinhos Davi, Isa e Gugu que me dão uma alegria imensa e meus queridos cunhados Edy e Marcos.

Às minhas primas-amigas Camila (irmã caçula), Cristiane e Vanessa por todo suporte, risadas e carinho. Jú, Alex e Fefa meu agradecimento pelas conversas incríveis e jantares deliciosos. Aos meus avós maternos (in memoriam) Anésia e Paulo Nakama por todo o amor e carinho recebido na minha infância. “Bacthan”, “dichan” e tia Reiko: vocês são meu exemplo de luta, amor e perseverança.

À turminha da Yoga: Prof. Marcos Rojo, Prof. Collaço Veras, Dani (Mexerica), Rose, Sandrinha, Betinha, Alzira, Wilson, Marilze, João, Tereza, Moacir, Angela, Talita, Débora, Carla (SUP), Aninha, seu Manuel Um oásis dentro da USP e na minha vida.

Aos meus amigos do coração Rosa Aparecida Caraça e Marcos Alborguethi. Esses quatro anos vocês foram incríveis. Viagens, hospedagens, ajudas, conversas, risadas.. enfim amigos para vida inteira.

Ao professor Patrick C. Hallenbeck pela acolhida em seu laboratório em Montreal, paciência, dedicação e amor à ciência. Aos encontros, cafés, vinhos e cervejas (artesanais), queijo (goat), ou mesmo com comida da máquina.. tudo foi mais especial no Canadá com Débora, Fábio, Gustavo, Held, Khorcheska, Kiran, Yuan, Wang, Hanna, Hugues e Sumedha.

Aos amigos que fiz do ICB. Pessoas tão queridas que durante quatro anos convivemos horas e mais horas trabalhando, conversando, rindo, jogando vôlei, correndo ou melhor dizendo, trotando. Bruno Oishi (praticamente da família), Felipe (parceirão do lab 166), Karina (pelas ótimas conversas e corridas no finalzinho do dia), Jessi (pela confiança e amizade), Igor (pelas risadas nas aulas de inglês e amizade), Ciça (staff das festinhas), Ralph (por me incentivar e deixar o ambiente

sempre alegre), Bruno Moda (pelas ajudas nos experimentos e amizade), Felipe M. (pelas trilhas), Carlinha (por estar sempre pronta a ajudar). Além dos amigos: Diogo Robl, Diogo Marquezoni, Carol, Raquel, Fábio, Murilo, Bianca e Talita. Também, ao meu estagiário Arthur Umeda por toda dedicação e confiança.

Aos funcionários do ICB que sempre me trataram com muito carinho e que me ajudaram muito neste período: Norminha (você foi essencial), Tadeu, Kazui, Leninha, Zita, Iris, Aelson e Veridiana .

Ao pessoal da secretaria da Biotec: Fábria, Marcos e Eliane, meu agradecimento especial à vocês por todas as conversas e apoio.

Às funcionarias da biblioteca ICB/USP Teresa, Renata e Rosa por toda ajuda nas correções, apoio e carinho.

Ao meu orientador de Iniciação Científica Prof. Dr. Jörg Kobarg por acreditar em meu potencial e pelos ótimos conselhos acadêmicos e musicais (do clássico ao forró). Esse ambiente de discussão de artigos, resultados, protocolos tomando café da manhã e finalizando com música ou curiosidades do mundo me inspiram até hoje.

À minha orientadora de mestrado Profa. Dra Maria Luisa Peleato que me fez voltar para o meio acadêmico. Um ser humano diferenciado, com uma competência e simplicidade que definitivamente fizeram muita diferença na minha vida.

À Profa. Dra Irma Nelly Gutierrez Rivera (*in memoriam*) pelo carinho e todos os conselhos acadêmicos e extra-acadêmicos.

À professora Elisabete José Vicente pelo suporte e apoio.

À minha co-orientadora Profa. Dra Andrea Balan pelas ajudas de última hora.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Clara Schenberg pelos ensinamentos valiosos, dedicação e pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

" ...o real não está na saída e nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no
meio da travessia."

(João Guimarães Rosa, em *Grandes Sertões: Veredas*, p.52)

RESUMO

KUNIYOSHI, T. M. Avaliação do efeito da expressão heteróloga da proteorrodopsina de SAR86 em bactérias Gram-negativas na otimização da produção de hidrogênio. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

A utilização de bactérias que produzem hidrogênio (H_2) vem sendo objeto de muitos estudos, embora a produção do biohidrogênio ainda não seja economicamente viável, em comparação às tecnologias atualmente em vigor. O aproveitamento da energia solar para melhorar o processo de produção de biohidrogênio poderia constituir uma alternativa para ultrapassar o limite termodinâmico/metabólico das bactérias neste processo. A proteorrodopsina (PR) é uma fotoproteína bacteriana, que, ao ser iluminada, funciona como uma bomba de prótons, transferindo prótons do citoplasma para o exterior. O gradiente de prótons gerado pela PR pode ter dois efeitos: i) Estabelecer um aumento na força próton motora (fpm) na membrana plasmática, que, por sua vez, estimula a síntese de ATP por ação da F_0F_1 ATPase; ii) Aumentar a taxa de evolução do H_2 , uma vez que o excesso de H^+ poderia ser utilizado como substrato pelas hidrogenases de membrana (MBH). No presente trabalho, a expressão da PR do isolado metagenômico SAR86 foi obtida em células de *Cupriavidus necator* e *Escherichia coli*. A comparação entre células recombinantes de *C. necator*/pBB-panPR e sua respectiva linhagem selvagem, cultivadas na presença ou ausência de luz, não apresentou diferença nos seguintes parâmetros: velocidade de crescimento, produção de ATP intracelular, rendimento da produção de PHB, ou da síntese de H_2 . Além disso, a PR recombinante produzida em células de *C. necator* não apresentou o espectro de absorção característico dos intermediários da PR após a adição do cromóforo *all-trans* retinal. Em contraste, a funcionalidade da PR recombinante na fração de membrana interna de células de *E. coli*/pBB-panPR foi confirmada no mesmo ensaio. Assim como *C. necator*, *E. coli* produz várias hidrogenases, duas das quais, HYD-3 e HYD-4, são capazes de catalisar a produção de H_2 . Assim, optou-se por empregar a linhagem de *E. coli* JW135, na qual foram inativados os genes das demais hidrogenases endógenas. Como a HYD-4 não é normalmente expressa, foi possível estudar isoladamente a participação da HYD-3 na produção de H_2 pelas células de *E. coli* JW135/pBB-panPR, não tendo sido verificada diferença em relação à respectiva linhagem selvagem. Num passo seguinte, para garantir a expressão da hidrogenase HYD-4, o ativador HyfR foi expresso sob o comando do promotor heterólogo *trc* em células de *E. coli* JW135/pBB-panPR. Células da linhagem recombinante *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S, cultivadas sob condições de iluminação, e somente na presença do cromóforo, apresentaram um aumento da produção de H_2 de até 2,17 vezes em relação às células cultivadas no escuro, enquanto não houve diferença significativa na produção de H_2 entre células recombinantes e selvagens, quando o cultivo foi realizado no escuro. Embora a maioria das subunidades da HYD-4 sejam similares às da HYD-3, três delas, HyfB, HyfD e HyfF, são exclusivas da HYD-4. Estas subunidades pertencem à família de oxidoredutases NADH-ubiquinona translocadoras de prótons, o que poderia explicar a $[\Delta\mu_{H^+}]$ -dependência da HYD-4 e o seu efeito no aumento da produção de H_2 . Esta propriedade apresenta potencial para aplicações biotecnológicas, uma vez que, como demonstrado no presente trabalho, a co-expressão da HYD-4

e da PR proporciona um aumento da produção de hidrogênio a partir da energia luminosa.

Palavras-chave: Combustíveis renováveis. Biohidrogênio. Proteorrodopsina. *Escherichia coli*. *Cupriavidus necator*. Hidrogenases de membrana.

ABSTRACT

KUNIYOSHI, T. M. Evaluation of the effect of heterologous expression of the SAR86 proteorhodopsin in Gram-negative bacteria on hydrogen production optimization. 2015. 126 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The use of bacteria that produce hydrogen (H_2) is subject of intense investigation, although biohydrogen is not yet economically viable relative to other H_2 production technologies. The utilization of solar energy to enhance biohydrogen production could be an alternative to bypass the normal metabolic limits to substrate conversion to H_2 . Proteorhodopsin (PR) is a bacterial photoprotein containing the chromophore retinal, that, upon illumination, works as a proton pump, translocating H^+ from the cytoplasm to the outside of the cell. The proton gradient generated by PR can have two effects: i) To increase the proton motive force (pmf) in the plasma membrane, that, in turn, can drive ATP synthesis through F_0F_1 ATPase action ii) To enhance the hydrogen evolution rate, since the excess of protons can be used as a substrate for the membrane hydrogenases (MBH). In the present work, the expression of PR from the metagenomic isolate SAR86 was achieved in *Cupriavidus necator* and *Escherichia coli* cells. The comparison between recombinant *C. necator*/pBB-panPR cells and the corresponding wild type, cultivated either in the presence or absence of light, revealed no difference in the following parameters: growth rate, intracellular ATP concentration, polyhydroxybutyrate yield and H_2 production. Besides, the recombinant PR expressed in *C. necator* cells did not display the typical proteorhodopsin intermediates spectra upon addition of the *all-trans* retinal chromophore. In contrast, the functionality of the recombinant PR from the inner membrane fraction of *E. coli*/pBB-panPR cells was confirmed using the same assay. As *C. necator*, *E. coli* produces several hydrogenases, two of which, HYD-3 and HYD-4, are able to catalyze hydrogen production. Therefore, the *E. coli* JW135 strain, deleted for the remaining endogenous hydrogenase genes was chosen. Since HYD-4 is not normally expressed, the use of this strain made it possible to study separately the participation of HYD-3 in H_2 production, and no difference was observed relative to the corresponding wild type. As a next step, in order to assure HYD-4 expression, the transcriptional activator HyfR was expressed under control of the heterologous promoter *trc* in *E. coli* JW135/pBB-panPR cells. Under light condition, and only in the presence of the chromophore, *E. coli* JW135/ pBB-panPR+pWT35S cells exhibited up to 2.17 fold increase in hydrogen production relative to cells cultivated under darkness, whereas no significant difference in H_2 production was found between recombinant and wild type cells cultivated in the dark. Although most of HYD-4 and HYD-3 subunits are similar, three of them, HyfB, HyfD and HyfF, are exclusive of HYD-4. These subunits are related to proton-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase, what could explain the $\Delta\mu H^+$ dependence of HYD-4 and its effect on H_2 production increase. This property could be interesting for biotechnological applications since, as shown here, the co-expression of HYD-4 and PR led to an enhancement in hydrogen production from light energy.

Keywords: Renewable fuels. Biohydrogen. Proteorhodopsin. *Escherichia coli*. *Cupriavidus necator*. Membrane bound hydrogenases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Projeção da média da temperatura global até o ano 2100.....	24
Figura 2 - Célula de combustível.	26
Figura 3 - Produção de hidrogênio por fermentação no escuro seguida de fotofermentação.	29
Figura 4 - Esquema representativo dos operons <i>hyc</i> e <i>hyp</i> e genes <i>fhfA</i> e <i>fdhF</i> de <i>E. coli</i>	35
Figura 5 - Esquema representativo do complexo Formato Hidrogênio Liase 1 e <i>E.</i> <i>coli</i>	36
Figura 6 - [NiFe] Hidrogenases presentes em <i>C. necator</i>	37
Figura 7 - Esquema representativo da regulação da transcrição dos genes da MBH e SH hidrogenases pela presença de hidrogênio. Na ausência de H ₂ , a proteína kinase HoxJ fosforila o fator de transcrição HoxA deixando-o inativo. HoxC, em determinadas concentrações de H ₂ , transmite o sinal para HoxB, que por sua vez impede a ação da HoxJ. Assim, HoxA reconhece a região promotora dos operons <i>hox</i> e <i>hyp</i> e recruta a σ^{54} RNA polimerase para que se inicie a transcrição.	38
Figura 8 - Espectro de absorção das rodopsinas e outros pigmentos.	41
Figura 9 - Fotociclo de reações da bacteriorrodopsina.....	43
Figura 10 - Representação hipotética das alterações metabólicas resultantes da expressão da PR em <i>C. necator</i>	50
Figure 11 - Representação hipotética da expressão heteróloga da PR em <i>E. coli</i> JW135.....	52
Figura 12 - Sequência do fragmento de DNA contendo o gene da PR.	62
Figura 13 - Representação da clonagem do gene da PR do isolado SAR86 no vetor pBB-pan.	63
Figura 14 - Concentração de peso seco (Biomassa+PHB) em g/L de células de <i>C.</i> <i>necator</i>	74
Figura 15 - CMI de <i>all-trans</i> retinal para <i>C. necator</i> DSMZ 545.....	75
Figura 16 - CMI de Ni (II), Co (II), Mn (II) e Cu (II) para <i>C. necator</i> DSMZ 545....	77
Figura 17 - Visualização de células de <i>C. necator</i> DSMZ 545, linhagem selvagem ou recombinante, em microscopia de epifluorescência.	78
Figura 18 - Medida da intensidade de fluorescência da EGFP por citometria de fluxo.	79
Figura 19 - Medida da intensidade de fluorescência da EGFP por citometria de fluxo.	80
Figura 20 - Perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA em gel de agarose.	81
Figura 21 - Análise de proteínas das frações celulares de <i>C. necator</i> /pBB-panPR e de <i>E. coli</i> BL21/pBB-panPR , e de suas respectivas linhagens selvagens. 83	

Figura 22 - Curvas de crescimento de <i>C. necator</i> DSMZ545 e da linhagem recombinante portadora do plasmídeo pBB-panPR.	84
Figura 23 - Estabilidade do plasmídeo pBB-panPR em células de <i>C. necator</i> DSMZ 545 em função do número de gerações.	85
Figura 24 - Condições de cultivo sob iluminação.	86
Figura 25 - Curva de crescimento e porcentagem de PHB por peso seco de <i>C. necator</i> DSMZ 545 e da linhagem recombinante na presença ou ausência de luz.	87
Figura 26 - Curva de crescimento e porcentagem de PHB por peso seco de <i>C. necator</i> DSMZ 545 e da linhagem recombinante cultivadas em meio mineral contendo 10 μ M de <i>all-trans</i> retinal, na presença ou ausência de luz.	88
Figura 27 - Quantificação de ATP intracelular em células de <i>C. necator</i> DSMZ 545/pBB-panPR e da sua linhagem selvagem em presença ou ausência de luz.	89
Figura 28 - Curva de crescimento de <i>C. necator</i> /pBB-panPR em diferentes concentrações de oxigênio.	90
Figura 29 - Espectro de absorção da proteorrodopsina recombinante produzida em <i>E. coli</i> BL21/pBB-panPR.....	92
Figura 30 - Gel de SDS-PAGE e Western Blotting da purificação da proteorrodopsina produzida em <i>C. necator</i>	93
Figura 31 - Gel de SDS-PAGE das proteínas da fração de membrana interna e da proteorrodopsina produzida em <i>C. necator</i> DSMZ 545 em <i>E. coli</i> BL21, purificada por precipitação por tampão citrato.....	94
Figura 32 - Espectros de absorção <i>in vitro</i> da proteorrodopsina recombinante produzida em <i>E. coli</i> BL21 e <i>C. necator</i> DSMZ 545.	95
Figura 33 - Confirmação da expressão e atividade da proteorrodopsina em <i>E. coli</i> JW135/pBB-panPR.	96
Figura 34 - Fotos mostrando as condições de cultivo em anaerobiose de <i>E. coli</i> JW135.	98
Figura 35 - Produção de hidrogênio pelas linhagens <i>E. coli</i> JW135 e JW 135/pBB-panPR cultivadas na presença ou ausência de luz.	99
Figura 36 - Produção de hidrogênio pelas linhagens de <i>E. coli</i> JW135 e JW135/pBB-panPR+ pWT35S na presença ou ausência de luz.	100
Figura 37 - Produção de hidrogênio pela linhagem <i>E. coli</i> JW 135/ pBB-panPR+ pWT35S sob iluminação, na presença ou ausência de <i>all-trans</i> retinal.	101
Figura 38 - Produção de hidrogênio pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> JW135/ pBB-panPR+pWT35S na presença ou ausência de <i>all-trans</i> retinal no claro ou no escuro.	102
Figura 39 - Esquema representativo das etapas do enovelamento da bacteriorrodopsina.	107
Figura 40 - Vias metabólicas durante a fermentação de <i>E. coli</i>	111

Figura 41 - Modelo proposto neste trabalho para a produção de H ₂ pelas células de <i>E. coli</i> JW135/ pBB-panPR+pWT35S	114
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e limitações dos processos de produção do biohidrogênio. ...	27
Tabela 2 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.....	55
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	56
Tabela 4 - Influência do pH do meio para o cultivo de <i>C. necator</i> DSMZ 545.	75
Tabela 5 - Taxa de conversão substrato/PHB e porcentagem de PHB por massa seca em <i>C. necator</i> DSMZ 545 e da linhagem recombinante na presença ou ausência de luz.	87
Tabela 6 - Comparação de diferentes linhagens de <i>E. coli</i> rembinantes e selvagens quanto ao rendimento (mol H ₂ / mol glicose) e tipo de meio utilizado. ...	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BR	Bacteriorrodopsina
BPR	Blue Proteorrodopsina
BSA	Albumina de soro bovino
CoA	Coenzima A
CM	Cloranfenicol
CMI	Concentração mínima inibitória
DDM	<i>n</i> -Dodecil β -D-maltosídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DSMZ	Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen”
ED	Entner-Doudoroff
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
Fd _{oxi}	Ferredoxina oxidada
Fd _{red}	Ferredoxina reduzida
FdhF	Formato desidrogenase
FHL-1	Complexo enzimático Formato Hidrogênio Liase tipo I
FHL-2	Complexo enzimático formato hidrogênio liase tipo II
<i>fpm</i>	Força próton motora
GPR	Green Proteorrodopsina
h	Horas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HYD-1	Hidrogenase tipo I
HYD-2	Hidrogenase tipo II
HYD-3	Hidrogenase tipo III
HYD-4	Hidrogenase tipo IV
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change

IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosídeo
Km	Kanamicina
Kb	Quilobases
KDa	Quilodaltons
Kg	Quilograma
L	Litro
LB	Luria-Bertani
M	Molar
MBH	Hidrogenase de membrana
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NCBI	“National center of biotechnology information”
nm	Nanômetro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEM	Membrana eletrolítica Polimérica
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PFL	Piruvato Formato Liase
PFOR	Piruvato Oxiredutase
PR	Proteorrodopsina
p:v	Peso por volume
RH	Hidrogenase Regulatória
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH	Hidrogenase solúvel

U	Unidade
V	Volt
v/v	Volume por volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

ELEMENTOS QUÍMICOS

Co(II)	Íon cobalto bivalente
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CH ₄	Metano
Cu (II)	Íon cobre bivalente
Fe (II)	Íon ferro bivalente
Fe (III)	Íon ferro Trivalente
H ⁺	Próton
H ₂	Hidrogênio
H ₂ O	Água
Mg (II)	Íon magnésio bivalente
Mn(II)	Íon manganês bivalente
N	Nitrogênio
Ni (II)	Íon níquel bivalente
N ₂ O	Óxido nitroso
O ₂	Oxigênio
P	Fósforo
Zn (II)	Íon zinco bivalente

AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina

K	Lisina
L	Leucina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	23
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 - Hidrogênio	25
2.2 - Processos biológicos de produção de hidrogênio	28
2.3 - Fermentação no escuro para produção de biohidrogênio	30
2.4 Hidrogenases	32
2.4.1 - [NiFe] Hidrogenases produzidas por <i>E. coli</i> e <i>C. necator</i>	34
2.5 - Aproveitamento da energia luminosa para a produção de biohidrogênio	39
2.5.1 - Rodopsinas	39
2.5.2 - Proteorrodopsina	44
2.6 - Polihidroxicanoatos	47
2.7 - Organismos hospedeiros para a expressão da proteorrodopsina de SAR86 empregados neste trabalho	48
3 - OBJETIVOS	53
3.1 - Objetivo principal	53
3.2 - Objetivos parciais	53
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 - Linhagens bacterianas, plasmídeos e oligonucleotídeos	55
4.2 - Condições de cultivo das bactérias	56
4.3 - Determinação do consumo de glicose durante o crescimento de <i>C. necator</i> DSMZ 545	57
4.4 - Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de <i>C. necator</i> DSMZ 545 frente a diferentes metais e antibióticos	58
4.5 - Extração e purificação de plasmídeos	59
4.6 - Eletroforese de DNA em gel de agarose	60
4.7 - Preparação de células eletrocompetentes	60
4.8 - Transformação genética de bactérias por eletroporação	61
4.9 - Síntese <i>in vitro</i> do gene da proteorrodopsina	61
4.10 - Clonagem do fragmento contendo o gene da PR no vetor pBB-pan... ..	62
4.11 - Sequenciamento de DNA	63

4.12 - Análise da expressão da proteorrodopsina recombinante em <i>C. necator</i> DSMZ 545	64
4.12.1 - Caracterização do perfil proteico através de SDS-PAGE	64
4.12.1.1 - Fracionamento celular	64
4.12.1.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	65
4.12.1.3 - Coloração por prata	66
4.12.2 - Ensaio de Western-Blotting	66
4.13 - Determinação da estabilidade genética do plasmídeo pBB-panPR	67
4.14 - Medida da produção de PHB pelas linhagens de <i>C. necator</i>	68
4.15 - Citometria de fluxo	69
4.16 - Determinação do espectro de absorção da proteorrodopsina recombinante	70
4.17 - Purificação da proteorrodopsina recombinante	71
4.18 - Medida de ATP intracelular	71
4.19 - Determinação da produção de hidrogênio	72
4.20 - Análise estatística dos resultados	73
5 - RESULTADOS	74
5.1 - Caracterização fisiológica da linhagem <i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545	74
5.1.1 - Meio de cultivo e ótimo de pH	74
5.1.2 - Determinação do CMI de <i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545 para antibióticos, metais e <i>all-trans</i> retinal	75
5.2 - Escolha de um promotor forte para expressão heteróloga em <i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545	78
5.3 - Desenho e síntese do gene <i>prd</i> do clado SAR86 e clonagem no vetor de expressão pBB-pan	80
5.4 - Expressão heteróloga da proteorrodopsina (PR) em <i>E. coli</i> BL21 e <i>C. necator</i> DSMZ 545	82
5.5 - Análise do crescimento da linhagem recombinante <i>C. necator</i> DSMZ 545/pBB-panPR	84
5.6 - Estabilidade genética do plasmídeo pBB-panPR em <i>C. necator</i> DSMZ 545	85

5.7 - Montagem do sistema de iluminação em incubadores rotativos	85
5.8 - Avaliação da produção de PHB e taxa de conversão substrato/PHB pela linhagem recombinante de <i>C. necator</i>	86
5.9 - Quantificação de ATP intracelular em <i>C. necator</i> /pBB-panPR e sua respectiva linhagem selvagem na presença ou ausência de luz	88
5.10 - Avaliação do crescimento da linhagem recombinante <i>C. necator</i> DSMZ 545/pBB-panPR em diferentes concentrações de oxigênio e produção de hidrogênio na presença ou ausência de luz.....	89
5.11 - Espectros de absorção da fração de membrana interna contendo a PR recombinante de <i>E. coli</i> BL21/pBB-panPR e <i>C. necator</i> /pBB-panPR.....	91
5.12 - Purificação parcial da proteína PR recombinante	92
5.13 - Expressão da PR sob o comando do promotor <i>pan</i> em <i>E. coli</i> JW1135	95
5.14 - Quantificação de H ₂ em células de <i>E. coli</i> JW135 recombinante ou selvagem	97
6 - DISCUSSÃO.....	103
6.1 - Expressão da proteorrodopsina de SAR86 na bactéria <i>Cupriavidus necator</i>	103
6.2 - Expressão da proteorrodopsina da SAR86 na bactéria <i>Escherichia coli</i>	108
7 - CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS	117
ANEXO	127
A - Curva padrão de hidrogênio	
B - Curva padrão de glicerol	

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, 80% da energia mundial é obtida por meio da queima de combustíveis fósseis (BRENNER et al., 2006) Estima-se que em 2040 o consumo de petróleo aumente de 90 para 121 milhões de barris por dia. Os combustíveis não derivados do petróleo representam apenas 1,9% do consumo mundial atual. A projeção para os próximos 25 anos é de que este valor aumente apenas para 3,4% (EIA, 2014). Este cenário pessimista se deve principalmente aos altos custos envolvidos na instalação, operação e transporte da produção de combustíveis alternativos (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

Por outro lado, a busca de fontes alternativas de energia é de extrema importância do ponto de vista ambiental. De acordo com o relatório do IPCC- Intergovernmental Panel on Climate Change, o aumento de gases de efeito estufa entre 1970-2010 deveu-se em 78% à queima de combustíveis fósseis (IPCC, 2014).

Na Figura 1, apresenta-se a projeção do aumento da temperatura até o ano 2100, em função da quantidade de gases de efeito estufa emitida. Neste estudo, dois cenários foram hipotetizados de acordo com a emissão de CO₂, CH₄, N₂O por ação do homem durante este período, um cenário com menor emissão, representado na linha em azul e um cenário com alta produção destes gases, representado na linha em vermelho (Figura 1). Nesta projeção, o aumento da temperatura está intrinsecamente relacionado à quantidade de gases de efeito estufa emitidos com um aumento médio de 0,3 °C, 1 °C e 1 °C para o cenário de menor emissão e 0,7 °C, 2 °C e 3,7 °C, para o cenário de maior produção destes gases nos períodos de 2016-2035, 2046-2065 e 2081-2100, respectivamente. Apesar de não afirmar que os gases de efeito estufa têm um efeito direto no aumento de temperatura do planeta, este relatório ressalta que esta relação tem uma probabilidade extremamente alta de ser verdadeira. Além disso, é enfatizado que medidas mitigatórias devem ser adotadas com urgência para diminuir a emissão destes gases nos próximos anos (IPCC, 2014).

Neste contexto, o hidrogênio (H₂) está sendo considerado como uma das mais promissoras fontes de energia, principalmente por ser limpa, renovável e eficiente (FRIEDRICH; FRITSCH; LENZ, 2011)

Figura 1 - Projeção da média da temperatura global até o ano 2100.

Dois cenários foram hipotetizados para as próximas décadas para a emissão de gases de efeito estufa por ação antropogênica. A média da temperatura até o ano de 2100 está representada na linha vermelha para o cenário com alta emissão de CO₂, CH₄, N₂O e na linha azul para o cenário com baixa produção destes gases (IPCC, 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hidrogênio

O hidrogênio molecular é uma fonte de energia limpa e renovável que vem despertando grande interesse como alternativa aos combustíveis fósseis. Devido ao seu alto poder calorífico, a quantidade de energia liberada pelo H_2 é cerca de 2,75 vezes maior comparada àquela que se obtém por combustão de hidrocarbonetos (CHEN; LIN; CHANG, 2001). Além disso, sua utilização por combustão ou em células de combustível não libera CO_2 . Entretanto, o custo agregado para a produção de hidrogênio é muito elevado em comparação aos combustíveis fósseis.

Como o hidrogênio não está disponível na forma livre em nosso ambiente, para a sua síntese, é necessário gastar energia na dissociação de uma fonte primária, de modo que este combustível é considerado uma fonte intermediária de energia, um vetor energético (DAS; VEZIROGLU, 2008). A energia do H_2 pode ser obtida de duas maneiras: i) Diretamente pela queima do H_2 ii) Por sua oxidação (H_2) em células de combustível.

As células de combustível conseguem transformar energia química em energia elétrica e a indústria automobilística já começa a utilizar esta tecnologia em carros comerciais. De fato, a Toyota anunciou recentemente que lançará o primeiro sedã movido a células de combustível de hidrogênio em abril de 2015 (FRANCE-PRESSE, 2014). De uma maneira bastante simplificada, este dispositivo eletroquímico possui uma membrana eletrolítica polimérica (PEM) capaz de conduzir prótons entre o ânodo e o cátodo. Quando o gás hidrogênio entra em contato com o ânodo catalisador, ocorre a oxidação do $H_2 \rightarrow 2H^+$. Os prótons conduzidos ao cátodo pela membrana e os elétrons são forçados a percorrer um circuito externo dado que a PEM é isolada eletronicamente. Esta passagem de elétrons no circuito externo gera corrente elétrica que pode ser usada como energia. No cátodo, na presença de prótons e elétrons, o oxigênio é reduzido a água sendo o produto final do processo (Figura 2).

Figura 2 - Célula de combustível.

O gás hidrogênio (H_2) se oxida ao entrar em contato com o catalisador no polo negativo (ânodo -). Os prótons atravessam o eletrólito ou a PEM até o cátodo. Por outro lado, os elétrons passam por um circuito externo até o polo positivo (+) gerando corrente elétrica. No cátodo, na presença de prótons e elétrons providos pela reação anterior, o oxigênio é reduzido a H_2O .

Fonte: Modificado de SOLOVEICHIK (2014)

Apesar de não produzirem gases de efeito estufa, os processos para produção de hidrogênio são em sua maioria nocivos do ponto de vista ambiental. Atualmente, 40% do H_2 é produzido a partir do gás natural, 30% de óleos de baixa e de alta densidade, 18% do carvão, 4% da eletrólise da água (DAS; VEZIROGLU, 2008).

As desvantagens associadas à oxidação catalítica de hidrocarbonetos são i) o alto custo para implantação de um sistema de alta pressão e temperatura ii) a necessidade de utilizar um combustível fóssil que é uma fonte não renovável de energia iii) a liberação de dióxido de carbono durante o processo. Outro método empregado consiste na eletrólise da H_2O para formar H_2 e O_2 . Neste processo, a energia elétrica utilizada pode ser oriunda de hidroelétrica, eólica ou até mesmo fotovoltaica. Não há emissões de poluentes como produto da reação, sendo então

uma forma limpa de produção de H_2 . Entretanto, o grande consumo de eletricidade que este processo requer faz com que seja ainda economicamente inviável.

Tabela 1 - Vantagens e limitações dos processos de produção do biohidrogênio.

Processo	Vantagens	Limitações	Referencia
Biofotólise	Produz H_2 diretamente a partir da H_2O e luz	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da hidrogenase em determinadas concentrações de O_2. Este gás é produzido durante a fotossíntese • Alto preço dos fotobioreatores impermeáveis a H_2 • Requer alta intensidade de iluminação 	(RACHMAN et al., 1997; LEVIN; PITT; LOVE, 2004)
Fotofermentação	<ul style="list-style-type: none"> • Produção de H_2 utilizando resíduos, efluentes • Rendimento elevado • Utilização de um amplo espectro de luz 	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa eficiência de conversão da energia luminosa (1-5%) • Alta demanda energética (ATP) pela nitrogenase • Alto preço dos fotobioreatores impermeáveis a H_2 	(MIZUNO et al., 2000)
Fermentação (escuro)	<ul style="list-style-type: none"> • Não depende de luz • Elevada taxa de crescimento e taxa de evolução do H_2 • Utiliza diferentes fontes de carbono como substrato para a fermentação em produtos de valor agregado 	<ul style="list-style-type: none"> • Utilização de sistema anaeróbio de crescimento • Alguns subprodutos necessitam de tratamento • Presença de CO_2 na mistura de gases produzidos 	(LAY, 2000; HUSSY et al., 2003)

Como alternativas inovadoras, tecnologias baseadas em sistemas biológicos de fermentação de biomassa ou fotoprodução de biohidrogênio por microrganismos são consideradas bastante promissoras para a produção deste combustível (SILVA et al., 2009).

Basicamente, existem três processos de produção de biohidrogênio. i) Biofotólise da água utilizando algas ou cianobactérias. ii) Fotodecomposição de compostos orgânicos por bactérias fotossintetizantes (fotofermentação). iii) Fermentação no escuro por bactérias utilizando compostos orgânicos (HALLENBECK; GHOSH, 2009).

2.2 Processos biológicos de produção de hidrogênio

Na biofotólise direta durante a fotossíntese em algas, a água é oxidada a O_2 e a ferredoxina é reduzida. Em uma reação de oxirredução, a ferredoxina reduzida doa elétrons para a redução do hidrogênio por ação da hidrogenase ou da nitrogenase. No caso de biofotólise indireta, este processo ocorre em duas etapas: a primeira consiste na fixação de carbono durante a fotossíntese produzindo O_2 . Na segunda etapa, ocorre a fermentação dos compostos orgânicos armazenados e redução do hidrogênio (HALLENBECK et al., 2009).

Bactérias púrpuras não sulfurosas são capazes de produzir H_2 via nitrogenase por fotofermentação. Além de produzirem ATP via fotossíntese cíclica não oxigênica, estas bactérias produzem ferredoxina reduzida, via transporte de elétrons reversa. Nesta reação, compostos orgânicos são oxidados para doação de elétrons. Assim, a redução do hidrogênio é realizada pela nitrogenase utilizando ATP e ferredoxina reduzida (DAS; VEZIROGLU, 2008).

A fermentação no escuro que resulta na evolução do hidrogênio é realizada por diversas bactérias anaeróbias estritas (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio vulgaris*) ou facultativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*). A enzima hidrogenase é a responsável por catalisar a redução do hidrogênio. Apesar de utilizar somente energia química, muitos estudos vêm sendo realizados com substratos biodegradáveis de resíduos ou biomassa (ALZATE-GAVIRIA et al., 2007; WU; LIN; CHANG, 2003). Este método é bastante promissor por integrar princípios do desenvolvimento sustentável e ser considerado uma “tecnologia verde”.

Para confeccionar a Tabela 1, foi realizada uma revisão bibliográfica das vantagens e limitações dos processos descritos acima para produção de biohidrogênio.

Outras alternativas, relacionadas à combinação de dois bioprocessos, como fermentação no escuro seguida de fotofermentação, também vêm sendo estudadas. Na Figura 3, observa-se que, em uma primeira etapa, o substrato utilizado consistiria de rejeitos industriais para que, em anaerobiose, ocorra a evolução de hidrogênio durante a fermentação. Os produtos de fermentação servem como substrato para bactérias fotossintetizantes não sulfurosas na segunda etapa do processo. Como explicado anteriormente, pela fotossíntese e cadeia de transporte reversa, a enzima nitrogenase tem disponível Fd_{red} e ATP para catalisar a produção de H_2 . Entretanto, nos dois sistemas, o hidrogênio produzido deverá ser separado do CO_2 .

Figura 3 - Produção de hidrogênio por fermentação no escuro seguida de fotofermentação.

Na primeira etapa, células de *Lactobacillus* sp. produzem H_2 e ácidos orgânicos durante a fermentação no escuro utilizando como substrato subprodutos da indústria (xilose, glicerol). Na segunda etapa, bactérias fotossintetizantes não sulfurosas como *Rhodobacter sphaeroides*, são capazes de produzir H_2 via fotofermentação utilizando subprodutos da primeira etapa. Os gases produzidos em ambas as etapas são coletados e a seguir separados.

Fonte: HALLENBECK et al. (2009)

Em um estudo utilizando *Lactobacillus* sp na primeira etapa de fermentação no escuro e *Rhodobacter sphaeroides* na etapa seguinte para realizar fotofermentação, foi demonstrado que a taxa de conversão substrato- H_2 global aumentou consideravelmente (ASADA et al., 2006). Apesar deste dado promissor, o rendimento da produção do biohidrogênio ainda precisa ser

melhorado para tornar o processo economicamente viável. A taxa de conversão ($\text{luz} \rightarrow \text{H}_2$) de células fotovoltaicas/eletrólise é 10 vezes maior que as obtidas por microrganismos fotossintetizantes (HALLENBECK et al., 2009). Outros combustíveis, como bioetanol e biogás, obtidos como produto da fermentação de processos já bem estabelecidos apresentam uma conversão substrato orgânico/combustível mais eficiente do que as obtidas pela produção de H_2 (HALLENBECK et al., 2009).

O entendimento das vias metabólicas envolvidas durante a fermentação de bactérias anaeróbias estritas e facultativas que produzem H_2 é essencial para aumentar a eficácia deste bioprocesso. Sabe-se que, durante a primeira etapa de fermentação, algumas bactérias podem produzir acetato ou butirato que não são degradados na segunda etapa de fermentação. A utilização de engenharia metabólica para desativar estas vias poderia aumentar o rendimento na evolução do hidrogênio por substrato consumido. De fato, estudos utilizando linhagens nas quais foram deletados genes relacionados a vias que competem para produção de H_2 , demonstraram um aumento significativo na produção deste gás em *E. coli* (GHOSH; BISAILLON; HALLENBECK, 2013; MAEDA; SANCHEZ-TORRES; WOOD, 2007; REDWOOD et al., 2008; YOSHIDA et al., 2006).

2.3 Fermentação no escuro para produção de biohidrogênio

Dentre os processos para a produção de biohidrogênio, a fermentação no escuro vem se destacando por uma série de motivos: i) Rejeitos industriais podem ser empregados como substrato ii) Os biorreatores são relativamente simples comparados aos outros processos iii) As vias metabólicas de muitas bactérias que produzem H_2 já foram bastante estudadas.

A maior parte do biohidrogênio sintetizado por fermentação no escuro é um produto do metabolismo do piruvato em anaerobiose. Há duas enzimas envolvidas na oxidação do piruvato (HALLENBECK, 2009):

PIRUVATO FORMATO LIASE (PFL)

PIRUVATO FERREDOXINA OXIREDUCTASE (PFOR)

Em bactérias anaeróbias facultativas, o doador de elétrons para a redução do hidrogênio é o formato, com algumas exceções. Já em bactérias anaeróbias estritas, o agente redutor é a ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para a formação de H_2 . Além destes dois destinos, o piruvato pode ser metabolizado em vários outros compostos, como lactato, acetato, butanol, etanol, dependendo dos tipos de fermentação presentes no microrganismo.

A reação catalisada em bactérias anaeróbias facultativas tem como produto a formação do formato e acetilCoA. Reações subsequentes com acetilCoA podem gerar ATP ao ser convertido a acetato e oxidação do NADH a NAD^+ acoplado às reações de formação de acetaldeído, etanol, etc. A reoxidação de coenzimas é muito importante para que estas possam ser utilizadas novamente durante a glicólise. O formato, entretanto pode ser convertido a ácido fórmico levando a uma acidificação celular. A diminuição do pH intracelular desencadeia a via de fermentação do lactato, que, por sua vez, intensifica ainda mais a queda do pH nas células pela presença de ácido láctico. O complexo enzimático formato desidrogenase, presente em *E. coli*, catalisa a oxidação do formato a CO_2 e redução do hidrogênio. A produção de hidrogênio pelas células não resulta em nenhuma vantagem do ponto de vista energético, no entanto tem um papel de destoxificação na acidificação celular (HALLENBECK, 2009).

No caso das bactérias anaeróbias estritas, a reação catalisada pela PFOR como descrito acima gera como produto acetilCoA, CO_2 e Fd_{red} . Neste caso, a hidrogenase presente nestas bactérias recebe elétrons da Fd_{red} para a evolução do hidrogênio. A diferença é que estas bactérias também reoxidam NADH gerados na glicólise em uma outra reação que resulta na formação de Fd_{red} . Assim, o rendimento final na produção de H_2 é maior nestas bactérias.

De acordo com as reações descritas acima, o máximo teórico obtido por

bactérias anaeróbias facultativas é de 2 moles de H_2 a cada mol de glicose consumida e, no caso de *Clostridium* sp e outras bactérias anaeróbias estritas, este valor aumenta para 4 moles de H_2 /mol de glicose, uma vez que 2 moles de NADH produzidos na glicólise podem indiretamente doar elétrons para a redução de H_2 via ferredoxina. Este limite metabólico/termodinâmico do rendimento do processo para produção de H_2 considera um cenário em que somente as vias relacionadas à síntese de H_2 estejam atuando. Além da produção de H_2 durante a fermentação destas bactérias, outros metabólitos são sintetizados para suprir as necessidades fisiológicas da célula. A produção de acetato, por exemplo, leva à produção de ATP. Outros metabólitos, como etanol, butanol, ácido butírico, que são produtos reduzidos em outras vias de fermentação, são importantes na reoxidação/reciclagem de NADH que é utilizado na glicólise.

Uma opção para ultrapassar este limite metabólico, seria a inserção de novas vias para produção de hidrogênio nestas bactérias. De fato, foi demonstrado que, em *E. coli*, a expressão heteróloga da hidrogenase solúvel NADH dependente de *C. necator* leva a um aumento significativo na taxa de conversão substrato $\rightarrow H_2$ (GHOSH; BISAILLON; HALLENBECK, 2013). Neste trabalho, foram empregadas linhagens nas quais genes que expressam hidrogenases relacionadas à oxidação do H_2 e outros genes que competem com produção de H_2 durante a fermentação foram removidos.

Na produção de H_2 via fermentação de algumas bactérias, a enzima hidrogenase desempenha um papel crucial. Sabe-se que esta enzima é inibida na presença de O_2 , porém, no cultivo em anaerobiose, a divisão celular é inibida e há uma perda significativa de biomassa, que compromete o rendimento da produção de H_2 . Assim, o estudo de hidrogenases menos sensíveis a O_2 vem despertando grande interesse como uma alternativa para a produção de H_2 .

2.4 Hidrogenases

As hidrogenases são enzimas que catalisam a reação de oxidação do H_2 , gerando dois prótons e dois elétrons, podendo esta reação ser reversível em alguns casos. Estas enzimas possuem um sítio ativo complexo contendo um cofator metálico, que é adicionado por sete proteínas acessórias em uma

modificação pós-traducional (VIGNAIS; BILLOUD, 2007). As hidrogenases são classificadas de acordo com o metal presente na região catalítica, destacando-se a [FeFe] hidrogenase e a [NiFe] hidrogenase. A [FeFe] hidrogenase catalisa preferencialmente a síntese de H_2 , com uma frequência acima de $10.000\ s^{-1}$, entretanto, a presença de O_2 resulta na inativação do sítio catalítico de maneira irreversível (DE LACEY et al., 2007; GOLDET et al., 2009; STRIPP et al., 2009). A subclasse [NiFe] hidrogenase, por sua vez, é mais tolerante à presença de oxigênio, atuando principalmente na oxidação de H_2 , tanto em condições anaeróbias como aeróbias. Acredita-se que esta enzima exerça um importante papel no equilíbrio redox dos microrganismos aeróbios. Por outro lado, esta enzima possui uma baixa taxa de conversão de H_2 , em comparação à [FeFe] hidrogenase (SCHWARTZ; FRIEDRICH, 2007).

As [NiFe] hidrogenases são classificadas em quatro grupos, de acordo com a função que exercem nas células (VIGNAIS; BILLOUD, 2007). O grupo 1 está preferencialmente relacionado com a catálise da oxidação do H_2 . São hidrogenases de membrana (MBH), que utilizam H_2 para gerar energia nas células. Estas enzimas estão conectadas com elementos da cadeia transportadora de elétrons (quinonas), que transportam os elétrons doados até receptores como NO_3^- , SO_4^{2-} , fumarato, CO_2 na respiração anaeróbia, ou O_2 durante a respiração aeróbia. Durante este processo, é gerada uma força próton motora (*fpm*), que pode ser utilizada para síntese de ATP via F_0F_1 ATPase. Como exemplos, podemos citar as hidrogenases tipo I e II de *E. coli*, MBH de *Wolinella succinogenes* e MBH de *Cupriavidus necator* (BURGDORF et al., 2005).

O segundo grupo consiste das hidrogenases reguladoras presentes no citoplasma, que catalisam a oxidação do H_2 . Este tipo de isoenzima não atua diretamente na geração de energia. No entanto, as hidrogenases deste grupo detectam a presença de H_2 no ambiente e desencadeiam uma cascata de sinalização celular para expressão de outras hidrogenases do grupo I. Como exemplos, podemos citar as hidrogenases reguladoras de *Cupriavidus necator*, *Rhodobacter capsulatus*, *Anabaena variabilis* (DAS; VEZIROGLU, 2008; HALLENBECK; GHOSH, 2009).

As [NiFe] hidrogenases citoplasmáticas bidirecionais fazem parte do terceiro grupo. Estas hidrogenases estão associadas a outras subunidades, que são capazes de interagir com cofatores como NAD^+ , $NADP^+$ ou cofator 420. Estas

enzimas são ditas bidirecionais, pois catalisam tanto a oxidação do $H_2 \rightarrow H^+$ como também a reação reversa, dependendo do estado redox da célula. Muitos microrganismos produtores deste grupo de hidrogenases pertencem ao domínio *Archaea*, mas elas também são encontradas em bactérias como *Cupriavidus necator* (DAS; VEZIROGLU, 2008; HALLENBECK; GHOSH, 2009).

O quarto e último grupo de [NiFe] hidrogenases consiste de hidrogenases ligadas à membrana (MBH), relacionadas à redução do H_2 . Os doadores de elétrons para esta reação são produtos da fermentação, como CO ou formato. A bactéria *Rhodospirillum rubrum* possui uma hidrogenase deste grupo. A hidrogenase presente nesta proteobactéria forma um complexo com CO-desidrogenase que oxida CO a CO_2 e reduz hidrogênio (FOX et al., 1996). Um outro exemplo típico deste grupo é a hidrogenase tipo III (HYD-3) de *E. coli*, que será descrita detalhadamente mais adiante.

2.4.1 [NiFe] Hidrogenases produzidas por *E. coli* e *C. necator*

As hidrogenases presentes em *E. coli* e *C. necator* possuem níquel e ferro nos seus centros catalíticos, apresentando, portanto, maior tolerância à presença de O_2 . A possibilidade de produzir hidrogênio em aerobiose, mesmo que em baixas concentrações de oxigênio, é de grande interesse para a produção de H_2 , uma vez que o crescimento celular é mais rápido e a produção de H_2 mais eficaz em comparação à condição de anaerobiose. Neste ítem, iremos abordar com maior detalhe, as hidrogenases relacionadas com a evolução de hidrogênio destas duas bactérias.

A hidrogenase tipo III (HYD-3) de *E. coli*, junto com a enzima formato desidrogenase (FdhF), faz parte do complexo enzimático formato hidrogênio liase (FHL-1), que apresenta atividade de produção de H_2 , por meio da clivagem do formato em H_2 e CO_2 . Como já descrito anteriormente, durante a fermentação em células de *E. coli*, altas concentrações de formato desencadeiam a redução do hidrogênio via FHL-1. Os genes que codificam as subunidades estruturais e acessórias desta hidrogenase estão localizados no operon *hyc* (Figura 4) e, separado por uma região intergenética de apenas 210 pb, encontra-se o operon *hyp*, que codifica as enzimas necessárias às modificações pós traducionais de

todas as hidrogenases de *E. coli*. A jusante do operon *hyp*, está localizado o gene *fhIA*, que codifica o ativador FhlA (Figura 4). Na presença de molibdato e altas concentrações de formato, este regulador é expresso e por sua vez ativa a expressão coordenada do operon *hyc* e do gene *fdhF*, originando o complexo FHL-1 (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2001).

Figura 4 - Esquema representativo dos operons *hyc* e *hyp* e genes *fhIA* e *fdhF* de *E. coli*.

Genes estruturais e acessórios da HYD-3 estão agrupados no operon *hyc*. O operon *hyp* codifica enzimas responsáveis por modificações pós traducionais de todas as hidrogenases de *E. coli*. O gene *fhIA* codifica o ativador tanto do operon *hyc* como também do gene *fdhF*.

Fonte: Adaptado de PINSKE e SAWERS (2014)

Apenas seis genes do operon *hyc* expressam subunidades estruturais da HYD-3 (Figura 5). As subunidades HycB, HycF e HycG estão presentes na membrana citoplasmática, sendo HycB e HycF consideradas proteínas ferredoxinas. HycC e HycD estão fortemente ancoradas à membrana com uma porção voltada para o periplasma e a subunidade HycE e enzima FdhF estão localizadas perifericamente no citoplasma. HycH está envolvida no processamento das subunidades da hidrogenase e HycA atua como um repressor da expressão do operon *hyc* e do gene *fdhF*. A super expressão do repressor HycA em células de *E. coli* diminui drasticamente a expressão do complexo FHL-1 (SAUTER; BOHM; BOCK, 1992).

A hidrogenase tipo IV (HYD-4) de *E. coli* ainda não foi perfeitamente caracterizada, contudo, sete dos dez genes presentes no seu operon *hyf* são homólogos aos genes da HYD-3, sendo assim considerada como parte do grupo 4 de [NiFe] hidrogenases. As condições fisiológicas que desencadeiam a expressão deste operon ainda não foram elucidadas (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2004).

Figura 5 - Esquema representativo do complexo Formato Hidrogênio Liase 1 e *E. coli*.

Subunidades da HYD-3 em *E. coli*, HycB, HycC, HycD, HycE, HycF, HycG formam o complexo FHL-1 junto com a Formato desidrogenase FdhF. O formato (HCOO^-) é reduzido a CO_2 pela FdhF. O hidrogênio é reduzido a H_2 na subunidade HycE.

Fonte: Sauter; Bohm e Bock (1992)

Na bactéria *Cupriavidus necator*, existem três hidrogenases descritas até o momento (BURGDORF et al., 2005). Duas delas encontram-se no citoplasma: a SH- hidrogenase solúvel, que catalisa a redução de NAD^+ e a RH-hidrogenase regulatória, que atua no controle transcricional da própria hidrogenase (Figura 6 B,C). A 3ª hidrogenase fica ancorada na membrana plasmática (MBH) do lado periplasmático e está acoplada à cadeia respiratória (LENZ et al., 2005). A MBH [NiFe] hidrogenase possui três subunidades: HoxG (62 kDa) que contém o sítio ativo [NiFe], a subunidade HoxK (34,6 kDa) e a HoxZ (27,6 kDa) que é um citocromocromo *b* integrado à membrana plasmática (FRIELINGSDORF et al., 2011). As subunidades HoxG e HoxK estão voltadas para o periplasma e catalisam tanto a oxidação do $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+$, como também a reação reversa, reduzindo prótons a H_2 (Figura 6A).

A produção de H_2 por *C. necator* durante a fermentação utilizando gluconato ou frutose como fonte de carbono foi demonstrada (KUHN;

STEINBUCHEL; SCHLEGEL, 1984). Tanto a hidrogenase de membrana como a hidrogenase solúvel desta bactéria são expressas continuamente nas células, seja em anaerobiose ou aerobiose. No entanto, a atividade de ambas as enzimas é detectada somente na ausência de O_2 , sendo que, apenas a hidrogenase solúvel é responsável pela produção de H_2 . Células de *C. necator* que tiveram o gene da SH removido não produzem este gás e, ao se remover o gene da MBH, não foi verificada diferença na evolução de H_2 em comparação à linhagem selvagem (KUHN; STEINBUCHEL; SCHLEGEL, 1984). A MBH de *C. necator* é membro do grupo I de [NiFe] hidrogenases preferencialmente relacionadas com a oxidação do hidrogênio. No entanto, é de conhecimento que muitas enzimas deste grupo são capazes de catalisar a redução do hidrogênio dependendo do estado redox ou pH celular (VIGNAIS; BILLOUD, 2007).

Figura 6 - [NiFe] Hidrogenases presentes em *C. necator*.

A [NiFe] hidrogenase localizada na membrana interna de *C. necator* catalisa tanto a oxidação como a redução do hidrogênio (A). A hidrogenase reguladora (B) está presente no citoplasma e oxida o H_2 presente no meio. A terceira [NiFe] hidrogenase, SH, tem atividade bidirecional e está localizada no citoplasma (C).

Fonte: Burgdorf et al. (2005)

Foi demonstrado que a MBH [NiFe] hidrogenase purificada de *Cupriavidus necator* C81A, catalisa a redução de H^+ , apresentando um K_{cat} de $70s^{-1}$ na presença de O_2 . Esta constante enzimática não é considerada baixa comparada

a outras enzimas (GOLDET et al., 2008). No entanto, para atingir este valor, retirou-se o H_2 que foi produzido durante o experimento, uma vez que este gás inibe a atividade catalítica da enzima. É interessante notar que a presença de até 15% de O_2 não inibiu de maneira significativa a atividade enzimática (GOLDET et al., 2008).

Figura 7 - Esquema representativo da regulação da transcrição dos genes da MBH e SH hidrogenases pela presença de hidrogênio.

Na ausência de H_2 , a proteína kinase HoxJ fosforila o fator de transcrição HoxA deixando-o inativo. HoxC, em determinadas concentrações de H_2 , transmite o sinal para HoxB, que por sua vez impede a ação da HoxJ. Assim, HoxA reconhece a região promotora dos operons *hox* e *hyp* e recruta a σ^{54} RNA polimerase para que se inicie a transcrição.

Fonte: Lenz e Friedrich (1998)

A expressão constitutiva dos genes da hidrogenase em *C. necator* foi posteriormente confirmada em um estudo sobre esta regulação (LENZ; FRIEDRICH, 1998). Como mencionado anteriormente, a bactéria *C. necator* possui uma hidrogenase reguladora (HoxBC), que, ao oxidar o H_2 presente no ambiente, desencadeia um processo de sinalização celular para a expressão dos genes da SH e da MBH. Em determinadas concentrações de H_2 , a RH hidrogenase inibe a ação de HoxJ, deixando HoxA no estado desfosforilado ativo. Isto resulta na transcrição via σ^{54} RNA polimerase dos operons *hyp* e *hox* (agrupamento de genes estruturais e acessórios de ambas as SH e MBH (LENZ; FRIEDRICH, 1998). Por outro lado, na ausência de H_2 , a RH transmite o sinal para HoxJ, que por sua vez fosforila o fator de transcrição HoxA, deixando-o em sua forma inativa (Figura 7). Neste estudo, foi descoberto que no regulador HoxJ de *C. necator* H16 há uma substituição do resíduo de aminoácido de serina no

lugar da glicina na posição 422, impedindo sua autofosforilação. Assim, a HoxA de *C. necator* H16 sempre está no estado desfosforilado ativo, o que leva a uma expressão constitutiva dos operons *hyp* e *hox*, independentemente da presença de H₂ do meio (LENZ; FRIEDRICH, 1998).

2.5 Aproveitamento da energia luminosa para a produção de biohidrogênio

A utilização de energia solar para a produção de biocombustível é sem dúvida a abordagem mais promissora do ponto de vista ecológico (WALTER; GREENFIELD; LIPHARDT, 2010). De fato, muitos estudos já foram realizados com o objetivo de aumentar a atividade da Rubisco e outras proteínas relacionadas à fotossíntese. No entanto, devido à sua alta complexidade, apenas 10% de aumento na eficiência deste processo foi obtida até o momento (Brenner et al., 2006). Mais recentemente, foi descoberto um outro processo biológico de captação da energia luminosa, que é mediado por fotoproteínas produzidas por microrganismos, tais como a bacteriorrodopsina e a proteorrodopsina (BÉJÀ et al. 2000; OESTERHELT; STOECKENIUS 1971). O máximo teórico de energia luminosa absorvida por fotossíntese ou por via de proteorrodopsina (PR) é semelhante. Embora a eficiência de conversão de energia da fotossíntese (33%) seja superior à da PR (21%), a PR é capaz de absorver fótons numa faixa mais ampla do espectro, proporcionando maior captura de energia (50%) do que a fotossíntese (37%) (WALTER et al., 2010).

2.5.1 Rodopsinas

Na arqueia halofílica *Halobacterium salinarum*, foi descoberta a existência de uma fotoproteína simples, capaz de estabelecer um aumento na força próton motora. (*fpm*) na membrana plasmática em presença de luz (OESTERHELT; STOECKENIUS, 1971). Posteriormente, foi descoberta a presença do gene de uma rodopsina também em bactérias, denominada proteorrodopsina (PR) (Béjà et al. 2000). Análises subsequentes revelaram uma extensa família de proteorrodopsinas que variam seu espectro de absorção de acordo com a disponibilidade de luz na coluna d'água (Figura 8). Em plantas e cianobactérias,

existem inúmeros pigmentos acessórios com absorbância máxima em diferentes comprimentos de onda, que capturam a energia luminosa e a encaminham para o pigmento primário clorofila. No caso das rodopsinas, a lógica é diferente, o cromóforo retinal isolado tem a absorção máxima fixa, no entanto, sua interação com a apoproteína rodopsina varia uma vez que a sequência de aminoácidos destas fotoproteínas varia consideravelmente (FUHRMAN; SCHWALBACH; STINGL, 2008). Este fato faz com que ocorra uma mudança na absorção máxima de cada tipo de rodopsina. Bactérias contendo a variante PR, que absorve no azul (BPR), foram coletadas a 75-100 m, considerada como zona profunda do oceano, ao passo que em zonas mais próximas da superfície, são encontradas bactérias contendo a variante verde da PR (GPR). De fato, sabe-se que a luz verde alcança regiões mais superficiais do oceano e a luz azul chega em regiões mais profundas. Outro fato bastante interessante está relacionado com a duração do fotociclo destas variantes da PR. Em regiões mais profundas, as BPRs apresentam um fotociclo longo com duração de 150 ms, enquanto as GPRs fazem o mesmo ciclo dez vezes mais rápido (15ms), o que confere com a quantidade de fótons que chega a cada variante (FUHRMAN; SCHWALBACH; STINGL, 2008; MAN et al., 2003).

Não se conhece ainda a real relevância da energia provida por bactérias não fotossintetizantes no balanço energético. No entanto, em vista da abundância do gene da PR em diferentes grupos de bactérias e outros microrganismos, não há dúvida da importância que a PR representa neste balanço. A possibilidade de captação da energia luminosa por uma via diferente da fotossíntese apresenta grande relevância do ponto de vista biotecnológico.

O termo rodopsina origina-se do grego, onde *rodo* significa avermelhado e *opsina*, visão. O significado clássico desta palavra é pigmento vermelho dos olhos. De fato, são encontradas rodopsinas na retina dos olhos de todos os animais. As rodopsinas são proteínas integrais de membrana que são capazes de absorver luz. Estas proteínas fotorreceptoras possuem como cromóforo o retinal (vitamina A aldeído) e estão presentes nos três domínios da vida, *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Este cromóforo liga-se covalentemente à apoproteína (opsina) e tem a capacidade de absorver fótons, o que desencadeia um processo de sinalização inter- ou intracelular, como também pode gerar energia química. Toda rodopsina possui sete alfa-hélices transmembranas com a porção N-

controladas pela luz (bacteriorrodopsinas), bombas de íons cloreto (halorrodopsinas) ou receptores fotossensíveis (rodopsinas sensoriais) (OESTERHELT, 1998).

- c) Proteínas com alta similaridade de sequência com as rodopsinas sensoriais de arqueias foram encontradas no eucarioto *Neurospora crassa* (BIESZKE et al., 1999).
- d) A rodopsina bacteriana, ou proteorrodopsina, 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 proteorrodopsina está amplamente distribuída entre as bactérias marinhas (STEINDLER et al., 2011)

Como já mencionado, a primeira rodopsina encontrada em microrganismos foi a da arqueia *Halobacterium salinarum* em 1971, denominada de bacteriorrodopsina (BR) (OESTERHELT; STOECKENIUS, 1971). Esta fotoproteína também foi a primeira proteína de membrana a ter decifrada tanto a sua sequência de aminoácidos como também sua estrutura por microscopia eletrônica. O entendimento do mecanismo de ação da BR tem sido objeto de muitos estudos e, sem dúvida, é a base para o estudo de todos os tipos de rodopsina (ERNST et al., 2014).

Segundo Henderson et al. (1990), na BR a fotoisomerização de *all-trans* retinal para 13-*cis* faz com que a sua ligação via base de Schiff com a apoproteína se mova 2Å (Figura 9), o que resulta na transferência de próton desta ligação para o resíduo D85. Esta mudança de carga faz com que se inicie uma série de reações que resultam na transferência de H^+ no interior da proteína para o espaço periplasmático celular. Os resíduos E194 e E204 liberam um próton para o periplasma. Concomitantemente, ocorre uma mudança conformacional da proteína, fazendo com que o nitrogênio da base Schiff receba um próton do D96. Quando o 13- *cis* retinal isomeriza à sua forma *all-trans*, D96 readquire seu próton do citosol (Figura 9) e um novo fotociclo é iniciado. Na literatura está descrito que este processo é capaz de transportar até 100 prótons por segundo (LANYI; LUECKE 2001).

Este ciclo de reações da BR apresenta uma série de fotointermediários, que podem ser caracterizados por espectroscopia. Propriedades como

configuração isomérica, planaridade e protonação do retinal, assim como presença de água ou ions no interior da proteína definem cada intermediário. O estado intermediário K (λ_{max} 590 nm) *all-trans* retinal isomeriza para a forma 13-*cis*. O intermediário L (λ_{max} 550 nm) é o estado em que ocorre a transferência de protons do retinal para o resíduo D85. O intermediário seguinte é o M (λ_{max} 412 nm), que possui 13-*cis* retinal desprotonado e ocorre a liberação de H^+ para o periplasma. No estado N (λ_{max} 560 nm), o 13-*cis* retinal recebe um próton do resíduo D96 e somente no último intermediário O (λ_{max} 640 nm), 13-*cis* isomeriza novamente para a forma *all-trans* e o resíduo de D96 recebe um próton do citoplasma. Os fotointermediários de outras rodopsinas apresentam características diferentes. Rodopsinas do tipo bomba de Cl^- , por exemplo, não possuem o intermediário M, uma vez que não ocorre a desprotonação do 13-*cis*.

Figura 9 - Fotociclo de reações da bacteriorrodopsina.

Na presença de luz, o cromóforo retinal sofre isomerização da forma *all-trans* para a forma 13-*cis*, desencadeando um ciclo de reações na BR. Um próton é doado do grupo N da base Schiff para o resíduo D85 que o doará em seguida para os resíduos E194 e E204 após os mesmos terem liberados um próton no periplasma. Ao mesmo tempo, o grupo N da base Schiff recebe um próton do resíduo D96. Em seguida, o cromóforo volta à sua forma *all-trans* retinal e o resíduo D96 readquire um próton do citoplasma.

Fonte: Retirado de Inoue; Kato e Kandori (2014)

2.5.2 Proteorrodopsina

O gene que codifica a proteorrodopsina (*prd*) foi descoberto por meio de análise metagenômica de amostras de água do mar, coletadas em Monterey Bay, Califórnia (BÉJÀ et al., 2000). Ao sequenciar o gene do rRNA 16S da amostra, esta foi identificada como sendo do clado SAR86, o mais abundante grupo de gamabactérias não cultiváveis presentes em ambientes marinhos. Estudos mais recentes revelaram que, além do gene que codifica a proteorrodopsina, SAR86 contém vários outros genes que codificam enzimas da via glicolítica e ciclo de Krebs e da β -oxidação de lipídeos (DUPONT et al., 2012; RUSCH et al., 2013). Por outro lado, foi observada a ausência de muitos genes relacionados à síntese de vitaminas, aminoácidos e de enzimas tipicamente presentes na respiração anaeróbia. Os resultados sugerem que as bactérias pertencentes a este clado são heterotróficas com potencial fototrófico via proteorrodopsina com auxotrofia para vitaminas e aminoácidos (DUPONT et al., 2012; RUSCH et al., 2013). Nos últimos anos, foram descobertas rodopsinas em diferentes grupos de bactérias e outros microrganismos (BÉJÀ et al., 2001). Atualmente, é estimado que 50% dos microrganismos presentes na região fotossintética do oceano possuem o gene da PR (DELONG; BÉJÀ, 2010).

Apesar da sequência de aminoácidos da PR apresentar menos de 30% de identidade com a BR, alguns aminoácidos que desempenham um papel importante no fotociclo são conservados em ambas as moléculas, como por exemplo, D85 e T89 da BR e D97 e T101 da PR. No entanto, o doador de próton durante o ciclo de reações é o resíduo D96 na BR, ao passo que na proteorrodopsina quem realiza esse papel é E108 (BÉJÀ et al., 2000). Outra característica diferenciada na PR é a presença das variáveis azul (λ_{max} 490 nm), e verde (λ_{max} 525 nm), como mencionado anteriormente. Interessantemente, esta variação ocorre devido à substituição de apenas um resíduo de aminoácido na posição 105: a leucina presente na GPR é substituída pelo resíduo de glutamina na BPR. Embora a leucina tenha características hidrofóbicas e a glutamina características hidrofílicas, estudos indicam que a mudança de espectro da PR está mais relacionada ao tamanho dos resíduos de aminoácidos do que à hidrofobicidade dos mesmos (OZAKI et al., 2014).

O fotociclo da PR é semelhante ao da BR com algumas modificações.

Apesar de apresentar os mesmos estados intermediários K(λ_{max} 525 nm), M(λ_{max} 405 nm), N (λ_{max} 560 nm), e O (λ_{max} 525 nm) da BR. Durante o ciclo de reações da PR não ocorre a acumulação do intermediário L (FUHRMAN; SCHWALBACH; STINGL, 2008).

O primeiro isolado cultivável contendo o gene da PR foi a alfa-bactéria *Pelagibacter ubique* HTCC1062. A expressão da PR nesta bactéria é estimada em 10.000 moléculas por célula e sua expressão parece não depender da presença de luz. O cultivo desta linhagem em água esterilizada de seu ambiente natural não apresentou diferença na taxa de crescimento no claro ou no escuro (GIOVANNONI et al., 2005). Outras bactérias, como *Rhodobacterales bacterium* HTCC2255, *Candidatus Puniceispirillum marinum* ICM1322 e a linhagem HIMB114, *Dokdonia donghaensis* PRO95 tiveram a PR identificada, porém nenhuma função fisiológica foi atribuída a esta fotoproteína nestes trabalhos (OH et al., 2010).

O gene da PR também foi identificado na flavobactéria *Dokdonia* sp. MED134 (GOMEZ-CONSARNAU et al., 2007). Neste trabalho, foi demonstrado que a transcrição deste gene é aumentada na presença de luz e, além disso, esta condição promove um maior crescimento celular mesmo em meios ricos em nutrientes. Um trabalho posterior publicado pelo mesmo grupo de pesquisa identificou o gene da PR e outros genes associados à síntese do retinal na linhagem *Vibrio* sp AND4 (GOMEZ-CONSARNAU et al., 2010). Nesta linhagem, foi demonstrado que a PR garantiu a sobrevivência na ausência de nutrientes, apenas quando as células foram iluminadas. Elegantemente, este estudo confirmou a ação da PR sobre o crescimento, ao ser verificada a anulação deste efeito quando o gene da PR foi removido deste organismo (GOMEZ-CONSARNAU et al., 2010).

Novos estudos foram realizados com *P. ubique* HTCC1062 em condições de limitação de fonte de carbono (STEINDLER et al., 2011). Células desta linhagem iluminadas mantiveram sua morfologia e ainda, aumentaram sua concentração de ATP diminuindo a taxa de respiração. Contudo, não foi verificada diferença na taxa de crescimento.

Foi demonstrado que a proteorrodopsina de SAR86, quando expressada em *E. coli*, conserva sua estrutura nativa, absorvendo luz na faixa do azul e verde, atingindo um máximo a 520 nm (BÉJÀ et al., 2000). Além disto, na presença de

luz e retinal exógeno, a proteorrodopsina recombinante exibiu um ciclo de reação fotoquímica com cinética e intermediários semelhantes ao da bacteriorrodopsina, gerando um aumento na *fpm* da membrana (BÉJÀ et al., 2000). A seguir, Walter et al. (2007) detectaram aumento de movimento flagelar em células de *E. coli* portadoras do gene da PR do SAR86. Neste trabalho, demonstrou-se também que, mesmo inibindo a cadeia respiratória com azida, as células recombinantes foram capazes de sobreviver usando a energia gerada pela PR ao serem iluminadas a 525 nm (WALTER et al., 2007). A *fpm* gerada pela ação da PR é estimada em -0,2 V, que é similar ao valor obtido durante a respiração aeróbia.

A análise de fragmentos adjacentes ao gene *prd* encontrado por metagenoma de amostras coletadas da fração superficial do oceano, identificou cinco genes que codificam enzimas da via de síntese do retinal. Células de *E. coli* transformadas com este fragmento expressam a PR funcional sem a adição de retinal exógeno. Além disso, células recombinantes cultivadas na presença de luz apresentam maior quantidade de ATP intracelular em comparação à respectiva linhagem selvagem (MARTINEZ et al., 2007).

Em *Shewanella oneidensis* MR1, a expressão da PR recombinante resultou no aumento de corrente elétrica na membrana e da *fpm*, o que promove maior entrada de moléculas como lactato no citoplasma via transporte simporte (lactato e H⁺) (JOHNSON et al., 2010).

Várias aplicações biotecnológicas da PR vêm sendo propostas: Desde dispositivos fotoeletrônicos providos de energia por células solares biomiméticas (RANAGHAN et al., 2011) como também, pela expressão heteróloga da proteorrodopsina em bactérias de interesse industrial. Na presença de luz, o aumento da *fpm* por ação da PR poderia ter um efeito em inúmeros processos celulares, como transporte simporte, produção de ATP via F₀F₁ATPase, como também na produção de H₂. Num estudo recente, Kim et al. (2012) co-expressaram duas proteínas heterólogas em *E. coli* BL21, a proteorrodopsina do clado SAR86 e a hidrogenase de *Hydrogenovibrio marinus*, com o objetivo de aumentar a produção de H₂ na presença de luz. O aumento do gradiente de prótons na face externa da membrana plasmática gerado por ação da PR poderia aumentar o sentido da reação $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ para a redução do H⁺ com maior eficiência. Como já descrito na literatura, os prótons presentes na face externa da membrana plasmática migram sem dispersão em meio aquoso (HEBERLE et al.,

1994) e, conseqüentemente, estariam disponíveis como substrato para a enzima hidrogenase para a geração de H_2 . De fato, observou-se que a expressão destas duas proteínas recombinantes em *E. coli*, na presença de luz, levou ao aumento da produção de H_2 (1,3 vezes), em comparação a células transformadas apenas com o gene da [NiFe] hidrogenase. Ao aumentar a intensidade da luz de 70 $\mu\text{moles fóton/m}^2.\text{s}$ para 130 $\mu\text{moles fóton/m}^2.\text{s}$, verificou-se um incremento de mais 1,8 vezes na produção de H_2 (KIM et al., 2012). Apesar de ser um estudo em nível laboratorial, este trabalho mostra-se bastante promissor no sentido de viabilizar o processo de produção de hidrogênio molecular utilizando a energia luminosa.

A compreensão da importância desta proteína no fluxo energético na complexa rede microbiana ainda é um dos grandes desafios da comunidade científica (DELONG; BÉJÀ, 2010). A possibilidade de expressar a PR funcional em bactérias de interesse biotecnológico é sem dúvida um campo extremamente promissor uma vez que a energia luminosa poderia ser utilizada por bactérias não fotossintetizantes. Como já discutido anteriormente, muitos estudos vêm sendo realizados para aumentar a eficiência da produção de biohidrogênio, entretanto, há uma barreira metabólica/termodinâmica limitante nas células bacterianas. A possibilidade de introduzir uma nova via para captação de energia luminosa pela expressão heteróloga de apenas uma proteína em células de bactérias produtoras de H_2 é, sem dúvida, bastante instigante.

2.6 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) constituem um grupo de poliésteres, que certas bactérias acumulam como material de reserva, sob a forma de grânulos, quando há abundância de fonte de carbono e limitação de pelo menos um nutriente (N, P, Mg, Fe, etc). Os PHAs são conhecidos como bioplásticos por possuírem propriedades termoplásticas com desempenho semelhante às dos plásticos de origem petroquímica, como polipropileno ou polietileno. Há duas grandes vantagens do ponto de vista ambiental da utilização do PHAs a serem destacadas. A primeira é que, por ser produzida por microrganismos, a matéria prima utilizada no processo é uma fonte natural renovável e a segunda, é que

estes poliésteres são totalmente biodegradáveis (MADISON; HUISMAN, 1999), podendo ser descartados juntamente com matéria orgânica para produção de fertilizantes (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001).

Segundo Steinbüchel e Valentin (1995), os PHAs são classificados em três grandes grupos, de acordo com a quantidade de carbonos presentes na cadeia principal do monômero. Os de cadeia curta contêm de 3 a 5 átomos de carbono, os de cadeia média, de 6 a 16 átomos de carbono, e os de cadeia longa ≥ 17 átomos de carbono na cadeia principal. O polihidroxibutirato (PHB) foi o primeiro bioplástico a ser descoberto e utilizado como produto biotecnológico. A bactéria *Cupriavidus necator* é considerada o organismo modelo para a produção de PHB. Nesta bactéria, a síntese deste poliéster de cadeia curta ocorre a partir do acetil CoA. A β -cetolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetilCoA, formando acetoacetil-CoA, sendo a seguir, reduzida a D(-)-3-hidroxibutiril-CoA por ação de uma redutase NADPH dependente (3-cetoacil-CoA redutase). A enzima PHA sintase catalisa a polimerização de D(-)-3-hidroxibutiril-CoA a um polímero de crescimento.

A regulação desta via metabólica está relacionada à disponibilidade de nutrientes para o crescimento bacteriano. Em condições balanceadas de nutrientes, os grupos acetil são constantemente utilizados no ciclo de Krebs para geração de ATP e coenzimas reduzidas para multiplicação celular. Com isso, há um acúmulo de CoA livre, que, por sua vez, inibe a ação da enzima β -cetolase. Na falta de algum nutriente essencial para o crescimento bacteriano, ocorre o acúmulo de acetil-CoA, diminuindo os níveis de CoA livre e, conseqüentemente, a enzima β -cetolase permanece ativa para desencadear a produção de PHB (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; OEDING; SCHLEGEL, 1973).

2.7 Organismos hospedeiros para a expressão da proteorrodopsina de SAR86 empregados neste trabalho

No presente trabalho, foram escolhidas duas bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *C. necator*, que apresentam capacidade de produzir H_2 , para hospedar o gene da proteorrodopsina (*prd*) do isolado SAR86.

O primeiro microrganismo empregado neste projeto foi a bactéria Gram-negativa *C. necator*. *Cupriavidus necator* é uma beta-proteobactéria aeróbica,

quimiolitotrófica facultativa, hidrogênio-oxidativa, não-patogênica, que foi inicialmente descrita por Schlegel e Gottschalk em 1965 e, mais recentemente, teve o seu genoma sequenciado (POHLMANN et al., 2006). Anteriormente denominada *Hydrogenomonas eutropha*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *C. necator* apresenta grande interesse uma vez que produz duas hidrogenases capazes de catalisar a evolução de H_2 , a hidrogenase ligada à membrana (MBH) e a hidrogenase citoplasmática (SH), ambas pertencentes ao grupo de [NiFe] hidrogenases, que são mais tolerantes à presença de O_2 (BURGDORF et al., 2005). Outra característica que faz esta bactéria ser considerada uma importante ferramenta para uso biotecnológico é sua capacidade de produzir bioplásticos. De fato, *C. necator* é considerado como organismo modelo para a produção de polihidroxibutirato (PHB), atingindo até 80% de sua massa seca na forma deste polímero (ANDERSON; DAWES, 1990; MADISON; HUISMAN, 1999).

Como hipóteses iniciais do projeto, a expressão heteróloga da PR em células de *C. necator* poderia resultar nos cenários apresentados na Figura 10. Em aerobiose, na presença de luz, *C. necator* DSM 545 transformada com o gene da proteorrodopsina (A), terá sua *fpm* aumentada. O excesso de prótons (B) poderá aumentar a redução de $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ por ação da MBH hidrogenase endógena (C), como também poderá gerar ATP por ação de uma ATPase translocadora de prótons (D). A condição de cultivo será de baixa concentração de O_2 com alta concentração de glicose e baixa concentração de fonte de nitrogênio, condições, que, como descrito na literatura, desencadeiam a produção de PHB por esta bactéria (E). A produção deste polímero ocorre por uma sequência de reações a partir da acetilCoA (ANDERSON; DAWES, 1990), oriunda da descarboxilação oxidativa da glicose. O processo de oxidação da glicólise pela via de Entner-Doudoroff (ED) em células de *C. necator* resulta na produção de ATP e coenzimas reduzidas (NADH, NADPH) (F). Estas últimas podem ser reoxidadas nas reações de síntese de PHB ou na evolução do hidrogênio pela hidrogenase solúvel.

Figura 10 - Representação hipotética das alterações metabólicas resultantes da expressão da PR em *C. necator*.

Células de *C. necator* cultivadas em aerobiose, em meio mineral com excesso de glicose e ausência de fonte de nitrogênio. Na presença de luz, a PR (A) aumentará a força protón motriz. Este gradiente de prótons (B) poderá aumentar a redução de $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ por ação da MBH hidrogenase endógena (C), como também poderá gerar ATP por ação de uma ATPase translocadora de prótons (D). Durante a quebra da glicose via ED, ATP, NADH e NADPH são produzidos (F). A coenzima reduzida NADPH pode ser utilizada durante a síntese de PHB (E) e NADH pode ser reoxidado via SH- hidrogenase reduzindo H_2 .

Fonte: Modificado de DELONG e BÉJÀ (2010).

A bactéria Gram-negativa *E. coli* foi o segundo microrganismo escolhido para estudar os efeitos da expressão heteróloga da PR. Além de estar descrita na literatura a produção de H_2 por células de *E. coli*, muitos estudos recentes vêm utilizando engenharia metabólica para otimizar o rendimento da produção de H_2 nesta bactéria (BISAILLON; TURCOT; HALLENBECK, 2006; GHOSH; BISAILLON; HALLENBECK, 2013; VARDAR-SCHARA; MAEDA; WOOD, 2008). A expressão da PR funcional em células de *E. coli* foi outro fator importante para a escolha deste microrganismo.

E. coli produz 4 diferentes hidrogenases de membrana: HYD-1, HYD-2, HYD-3 e HYD-4, codificadas pelos operons *hya*, *hyb*, *hyc* e *hyf*, respectivamente. HYD-1 catalisa a oxidação de H₂ sob condições fermentativas. HYD-2 catalisa a oxidação do H₂ durante a respiração anaeróbica, utilizando o fumarato como aceptor de elétrons. HYD-3 faz parte do complexo enzimático formato hidrogênio liase FHL-1, que tem atividade de produção de H₂, por meio da clivagem do formato em H₂ + CO₂. Este complexo enzimático também contém a enzima formato desidrogenase (FdhF), codificada pelo gene *fdhF*. Sob condição fermentativa e presença de formato, o ativador transcricional FhIA induz a expressão coordenada dos operons *hyc* e *fdhF*.

A hidrogenase HYD-4 foi a última a ser descoberta, porque acreditava-se inicialmente que o operon *hyf* fosse silencioso (Andrews et al. 1997). Entretanto, ao se clonar o gene do ativador transcricional deste operon (HyfR) sob controle do promotor heterólogo *trc*, verificou-se ocorrer expressão do operon *hyf*, sem, entretanto, acarretar evolução de H₂ (SELF et al. 2004, SKIBINSKI et al. 2002). Ao contrário de *C. necator*, *E. coli* só expressa os genes de hidrogenase em condições de anaerobiose. Existem quatro hidrogenases de membrana em *E. coli*, sendo duas delas, HYD-3 e HYD-4, descritas na literatura por catalisarem preferencialmente a redução do H₂ durante a fermentação. Em nosso modelo inicial, serão utilizadas células de *E. coli* JW135, que não produzem hidrogenase tipo I (HYD-1) e tipo II (HYD-2), descritas por participarem preferencialmente na oxidação do hidrogênio. Células de *E. coli* JW135 expressando o gene da PR serão cultivadas em meio mineral contendo glicose e formato como fonte de carbono na ausência de O₂ e aceptores finais de elétrons, portanto estarão em condições de fermentação. Na presença de luz, estas células terão a *fpm* aumentada pela ação da PR. O aumento no gradiente de prótons pode deslocar a reação $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ no sentido da evolução do hidrogênio pela HYD-3 e/ou HYD-4. Durante a fermentação, alguns estudos descrevem que F₀F₁ATPase não catalisa a síntese de ATP (TRCHOUNIAN et al., 2011). Assim, o excesso de prótons gerado pela PR não resultaria no aumento da produção de ATP intracelular nestas condições (Figura 11).

Fonte: Adaptado de ANDREWS et al. (1997) por Cristiane Yuri Honna.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Obter uma linhagem bacteriana recombinante que tenha adquirido a capacidade de expressar o gene da proteorrodopsina do clado SAR86, de modo a produzir hidrogênio com maior eficiência em relação à cepa selvagem a partir da energia luminosa.

3.2 Objetivos parciais

- Desenho e síntese do gene da proteorrodopsina do clado SAR 86, adicionado de sítios de restrição específicos e da sequência que codifica o epítipo V5-tag.
- Avaliação da atividade do promotor *pan* na bactéria *Cupriavidus necator*.
- Definição do metal a ser utilizado para induzir o promotor *pan* em *C. necator*.
- Construção do plasmídeo pBB-panPR, contendo o gene da proteorrodopsina (PR) sob controle do promotor *pan*.
- Avaliação da estabilidade genética do plasmídeo pBB-panPR em função do número de gerações.
- Análise da expressão da proteorrodopsina heteróloga nas diferentes frações celulares de *C. necator* e *E. coli* transformadas com o plasmídeo pBB-panPR.
- Avaliação da cinética de crescimento, capacidade de produção de ATP e capacidade de produção de PHB da linhagem recombinante *C. necator*/pBB-panPR em relação à linhagem selvagem correspondente, na presença ou ausência de luz e retinal.

- Análise *in vitro* da presença dos intermediários da proteorrodopsina recombinante produzida em *C. necator* e em *E. coli*.
- Avaliação da produção de H₂ pelas cepas recombinantes de *C. necator* e *E. coli* em relação às cepas selvagens, na presença ou ausência de luz e retinal.
- Transformação das células de *E. coli* JW135/pBB-panPR com o gene *hyfR* sob comando do promotor heterólogo *trc* para garantir a expressão do operon *hyf*, que codifica os genes estruturais e acessórios da HYD-4.
- Avaliação da capacidade de produção de H₂ pela cepa de *E. coli* JW135 co-expressando a HYD-4 endógena e a PR heteróloga na presença ou ausência de luz e retinal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos e oligonucleotídeos

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens bacterianas e plasmídeos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44</i> : D <i>lacU169</i> (f80 <i>lacZ</i> DM15); <i>hsdR17 recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>relA1</i>	(MESELSON ;YUAN, 1968)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	(JEONG et al., 2009)
<i>Escherichia coli</i> JW135	Δ <i>hya</i> -Km Δ <i>hyb</i> -Km derivada da linhagem BW545 Δ <i>lacU169</i> , <i>rpsL</i>	(MENON et al., 1991; MENON et al., 1994)
<i>Cupriavidus necator</i> DSMZ 545	P3HB-co-HV ⁺ , PHB-HV ⁺ , Glc ⁺ , Sac ⁻ , Fru ⁺ , Gro ⁺	(MAKKAR ;CASIDA, 1987)

Plasmídeos	Características	Referência
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Vetor de clonagem comercial, <i>lacZ</i> , Ampicilina ^R , Kanamicina ^R	Invitrogen [™] , Grand Island, N.Y., United States.
pCR 2.1-PR	Portador do fragmento contendo o gene da PR clonado em pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Este trabalho
pBBR1MCS	Vetor de amplo espectro para Gram-negativas, Cloranfenicol ^R , Mob ⁺ , múltiplo sítio de clonagem do Bluescript®II KS- <i>lacZ</i>	(KOVACH et al., 1994)
pLEGFP	Gene <i>egfp</i> sob o comando do promotor <i>lac</i> clonado no vetor pBBR1MCS	(RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010)
pBB-panEGFP	Gene <i>egfp</i> sob o comando do promotor <i>pan</i> clonado no vetor pBBR1MCS	(RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010)
pBB-panPR	Gene <i>prd</i> clonado sob o comando do promotor <i>pan</i> no vetor pBBR1MCS	Este trabalho
pWTS35	Gene <i>hyfR</i> clonado sob o comando do promotor <i>trc</i> no vetor pTrc99A	(SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2004)

Os oligonucleotídeos iniciadores empregados nas reações de PCR ou nas reações de sequenciamento deste estudo encontram-se descritos na Tabela 3. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen™.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Finalidade	Sequência 5'→3'
M13 Forward	Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do inserto clonado no pCR 2.1 TOPO TA Cloning®	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse		CAGGAAACAGCTATGAC
PR- Forward	Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do vetor final pBB-panPR.	GAGAGGGGTATGGATTGAAACTGG
PR- Reverse		CCTACAGGATAAATCGCCCAACCA
Seqbop01		CTTGGTCTGCGTGGGGAGTCTAT

4.2 Condições de cultivo das bactérias

As linhagens *E.coli* DH5α, *E. coli* BL21, *E. coli* JW135 e *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em incubadores rotativos Innova 4300 (New Brunswick Scientific, Enfield, C.T., United States) a 180 rpm, à temperatura de 37 °C para as linhagens de *E.coli* e 28 °C para *C. necator* DSMZ 545. Foram utilizados os meios de cultura descritos a seguir:

- Luria-Bertani (LB) (BERTANI, 1951) triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L.
- Meio mineral M9 (DAVIS et al., 1980) Na₂HPO₄ 6,78 g/L; KH₂PO₄ 3,0 g/L; NaCl 0,5 g/L; (NH₄)Cl 1 g/L. Após esterilização, foram adicionados (concentração final) MgSO₄ x 7H₂O 2 mM; CaCl₂ x

2H₂O 0,2 mM; FeCl₃ 100 µM; NiSO₄ 25 µM; Na₂MoO₄ 100 µM; Formato de sodio 15 mM; Tiamina 0.02 mg/mL e glicose 0,4%.

- Meio mineral descrito por Ramsay (1990). Na₂HPO₄ 3,5 g/L; KH₂PO₄ 1,5 g/L; (NH₄)₂SO₄ 1 g/L; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g/L; CaCl₂ x 2H₂O 0,01g/L; Citrato de Ferro Amoniacal 0,06 g/L e 1 mL para cada 1 litro de meio de solução de elementos traços (H₂BO₃ 0,3 g/L; CoCl₂ x 6H₂O 0,2 g/L; ZnSO₄ x 7H₂O 0,1 g/L; MnCl₂ x 4H₂O 0,03 g/L; NaMoO₄ x 2H₂O 0,03 g/L; NiCl₂ x 6H₂O 0,02 g/L; CuSO₄ x 5H₂O 0,01 g/L). Como fonte de carbono, foi utilizada glicose a uma concentração final de 1- 2%.
- Meio mineral descrito por DU et al. (2001). Na₂HPO₄ 5,25 g/L; KH₂PO₄ 0,83 g/L; (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/L; MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g/L; CaCl₂ x 2H₂O 0,01 g/L; Citrato de Ferro Amoniacal (Fe(III)(NH₄)C₆H₈O₇(II)) 0,06 g/L e 1 mL para cada litro de meio de solução elementos traços de composição semelhante à descrita por Ramsay et al. (1990). Como fonte de carbono, foi utilizada glicose a uma concentração final de 1% a 2%.

A seleção de transformantes foi realizada em meios suplementados com 25 µg/mL de cloranfenicol e/ou 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich St. Louis, M.O, United States). Para as células de *E. coli* crescidas em meio M9, foram adicionados apenas 12,5 µg/mL de cloranfenicol e 50 µg/mL de ampicilina (concentração final).

4.3 Determinação do consumo de glicose durante o crescimento de *C. necator* DSMZ 545

Células de *C. necator* crescidas em meio mineral (DU et al., 2001) durante 48 h, a 180 rpm a 28 °C, foram diluídas 100 vezes no mesmo meio de cultivo

com diferentes pHs, variando de 6,5 a 8,0. O crescimento foi monitorado pela absorbância a 600 nm.

A concentração da biomassa foi determinada por liofilização por meio do aparelho Labconco (Kansas City, M.O., United States) de um volume conhecido de suspensão celular. As amostras foram mantidas a -40 °C durante 3 horas e em seguida submetidas a 0,0080 mBar, 0 °C durante 16h. Após este período as amostras foram incubadas a uma temperatura de 30 °C, a 0,0080 mBar por 3 h. Após tirar o vácuo, a massa seca celular de cada amostra foi determinada por gravimetria.

O consumo de glicose pelas células foi medido por meio de análise espectrofotométrica utilizando “Kit comercial Glicose Oxidase Peroxidase” BioSystems® (BioSystems S.A.– Reagents & Instruments, Barcelona, Espanha). Neste kit a glicose presente na amostra é quantificada indiretamente pela presença de quinonaimina detectada por espectrometria segundo as reações descritas abaixo:

Para a quantificação de glicose na amostra, também é realizado o ensaio com uma concentração conhecida de glicose (1 g/L) fornecida pelo Kit. A produtividade e a taxa de conversão substrato/ biomassa foi calculada pela medida inicial e final do ensaio de peso seco e concentração de glicose.

4.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de *C. necator* DSMZ 545 frente a diferentes metais e antibióticos

Após atingirem a fase estacionária de crescimento, células de *C. necator* DSMZ 545 foram diluídas 100 vezes em meio mineral (DU et al., 2001) contendo

diferentes concentrações de CuCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , MnCl_2 e Citrato de Ferro Amoniacal) (Merck, Darmstadt, H.E., Alemanha). O cultivo foi incubado a 28 °C, sob agitação (180 rpm), durante 48 h. O crescimento bacteriano de cada condição foi medido por unidades de absorbância a 600 nm, em espectrofotômetro (Micronal B582, São Paulo, S.P., Brasil).

Para avaliar o CMI dos antibióticos cloranfenicol e ampicilina para *C. necator*, células desse microrganismo foram cultivadas durante 48 horas em meio LB, 180 rpm, a 28 °C. Este cultivo foi utilizado para ser semeado em placas contendo diferentes concentrações de antibiótico 7,5-50 µg/mL para cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, M.O., United States) e 250-2000 µg/mL para ampicilina (Sigma-Aldrich). Em cada placa foram aplicados 20 µL do cultivo diluído 10^5 vezes.

Todas as soluções de metais e antibióticos foram esterilizadas por filtração em membrana com poros de 0,22 µm (Millipore, Billerica, M.A., United States).

4.5 Extração e purificação de plasmídeos

A extração e a purificação de plasmídeos foram realizadas de acordo com Sambrook e Russell (2006) com algumas modificações.

Células recombinantes de *E.coli* DH5α, *E. coli* BL21, *E. coli* JW135 e *C. necator* DSMZ 545 foram crescidas em 5 mL de meio LB suplementado com o antibiótico de seleção adequado até atingirem a fase estacionária de crescimento. A cultura foi centrifugada a 8000 x g, a 4 °C, por 2 min em centrífuga refrigerada de bancada MR 18 22 (Jouan Inc., Winchester, V.A., United States) e ressuspensa em 300 µL de solução 1 (EDTA 0,5 M pH 8.0, Tris-HCl 0,5 M pH 8.0, dextrose 0,5 M). Em seguida, foram adicionados 300 µL de solução 2 (NaOH 1 M, SDS 1%). A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 5 min. A seguir, foram adicionados 300 µL de solução 3 (11,5 mL de ácido acético glacial, 60 mL de acetato de potássio 5 M, pH: 4,8) e mantidas durante 15 min no gelo. As amostras foram centrifugadas a 13.000 x g, 4 °C, por 15 min. O sobrenadante foi recuperado e em seguida, adicionaram-se 500 µL de isopropanol para precipitação do ácido nucleico presente na amostra. Após centrifugação a 13.000 x g, 4 °C, por 15 min, o DNA precipitado foi ressuspensão em água ultrapura estéril

(Milli-Q) e tratado com RNase (Ribonuclease A – Sigma-Alrich) durante 1 hora a 37 °C. Em alguns casos, as amostras foram submetidas a limpeza com clorofórmio:álcool isoamílico (Merck) (24:1, v:v) para a obtenção de DNA com maior grau de pureza.

As digestões dos plasmídeos e dos fragmentos de DNA com enzimas de restrição foram realizadas seguindo-se as instruções do fabricante. Todas as enzimas de restrição utilizadas foram da marca Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Auburn, A.L., United States.

4.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose

O gel de 0,8% (p:v) agarose foi preparado em TBE (Tris-HCl 90 mM; Ácido Bórico 90 mM, EDTA-pH 8,0 20 mM) com a presença de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo (Sigma-Alrich). As amostras contendo DNA foram aplicadas no gel contendo o tampão de corrida (azul de bromofenol 0,5%; glicerol 50% e EDTA 100 mM, pH 8,0) e submetidas a 90 V ou 5 V/cm do gel na cuba Mini-Sub[®] Cell GT (Bio-Rad, Hercules, C.A., United States). Após corrida de 2 horas, o gel foi visualizado e fotodocumentado no sistema Gel Doc-It[®] Imager UVP Upland, C.A., United States.

A quantificação do DNA presente nas amostras foi realizada por comparação com 50, 100 e 200 ng de λDNA. Como padrão de tamanho molecular, foi utilizado o “Gene O’ruler DNA Ladder” 100-1000 pb (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.). Os fragmentos contendo DNA de interesse presente no gel foram cortados e purificados com o Kit NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co, Bethlehem, P.A., United States), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Preparação de células eletrocompetentes

Células competentes de *E. coli* DH5α foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2006). O protocolo para preparação de *C. necator* DSMZ 545 foi adaptado a partir de Taghavi et al.

(1994). Um pré-inóculo preparado a partir de uma colônia isolada em placa foi incubado em meio LB durante 48 h, 180 rpm, a 28 °C. Foi realizada uma diluição de 100 vezes deste pré-inóculo em 200 mL de meio LB e a nova cultura foi incubada a 180 rpm, a 28 °C até atingir absorbância a 600 nm de 0,8. A cultura foi mantida em gelo durante 15 min e em seguida as células foram coletadas a 6.000 x g, a 4 °C durante 15 min na centrífuga Himac CF7D2 (Niagara Falls, O.N., Canada) no rotor RPR12-2. Em seguida, as células foram lavadas com 200 mL água destilada estéril contendo 10% de glicerol e novamente centrifugadas como descrito anteriormente. Este procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido mais uma vez. Para finalizar, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%, aliqüotadas em 40 µL em microtubos e estocadas a -80 °C.

4.8 Transformação genética de bactérias por eletroporação

Células competentes previamente preparadas foram descongeladas em gelo e incubadas com 50-100 ng de plasmídeo ou 1 µL de mistura de ligação em cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad). O pulso elétrico foi realizado no eletroporador Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad) com os seguintes ajustes: voltagem de 2,43 V, 200 Ohms de resistência e 25 µF de capacitância. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio LB e incubadas sob agitação a 180 rpm, a 28 °C, por 1 h se *C. necator* ou a 37 °C, se *E. coli* DH5α. Alíquotas de 100-500 µL do cultivo foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado para seleção.

4.9 Síntese *in vitro* do gene da proteorrodopsina

O gene *prd* do clado SAR86 (Nº acesso **AF279106.2** (região 50866...51615), **clone BAC EBAC31A08, GI:9971913**) foi sintetizado (Eurofins MWG operon, Huntsville, A.L., Estados Unidos), adicionado de sítios de restrição específicos e da sequência codificadora de um epítipo V5-tag (Figura 12). Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pCR 2.1 TOPO, originando o plasmídeo pCR 2.1-PR

Figura 12 - Sequência do fragmento de DNA contendo o gene da PR.

CATATGAAATTATTACTGATATTAGGTAGTGTTATTGCACTTCCTACATTTGCTGCAGGTGGTGGT
 GACCTTGATGCTAGTGATTACACTGGTGTTCCTTTTGGTTAGTTACTGCTGCTTTATTAGCATCTA
 CTGATTTTTCTTTGTTGAAAGAGATAGAGTTTCTGCAAAATGGAAAACATCATTAACTGTATCTG
 GTCTTGTTACTGGTATTGCTTTCTGGCATTACATGTACATGAGAGGGGTATGGATTGAAACTGGT
 GATTCGCCAACTGTATTTAGATACATTGATTGGTTACTAACAGTTCCTCTATTAATATGTGAATTCT
 ACTTAATTCTTGCTGCTGCAACTAATGTTGCTGGATCATTATTTAAGAAATTACTAGTTGGTTCTCT
 TGTTATGCTTGTGTTTGGTTACATGGGTGAAGCAGGAATCATGGCTGCATGGCCTGCATTATTAT
 TGGGTGTTTAGCTTGGGTATACATGATTTATGAATTATGGGCTGGAGAAGGAAAATCTGCATGTA
 ATACTGCAAGTCCTGCTGTGCAATCAGCTTACAACACAATGATGTATATTATCATCTTTGGTTGGG
 CGATTTATCCTGTAGGTTATTTACAGGTTACCTGATGGGTGACGGTGGATCAGCTCTTAACTTAA
 ACCTTATCTATAACCTTGCTGACTTTGTTAACAAGATTCTATTTGTTTAATTATATGGAATGTTGC
 TGTTAAAGAATCTTCTAATGCTAAGGGCGAGCTTGAA**GGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGG**
TCTCGATTCTACGCGTACCGGT**TGAGTTTAACTCGAGCCTGGGCC**

NdeI

Sequência do gene da PR (GI: 9971913 (região: 50866...51615))

Epítipo V5

XhoI e *ApaI*

Codons de terminação

Da direção 5' para a direção 3', foram desenhados os seguintes elementos: Sítio de restrição *NdeI* (azul marinho), gene da proteorodopsina em cinza (GI: 9971913 (região: 50866...51615)) sequência que codifica o epítipo V5 (amarelo), códon de terminação (verde) e sítios de restrição *XhoI* e *ApaI* (azul claro).

4.10 Clonagem do fragmento contendo o gene da PR no vetor pBB-pan

Os plasmídeos pCR 2.1-PR e pBB-panEGFP foram submetidos a dupla digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc), de acordo com as recomendações do fabricante. O inserto de 840 pb e o vetor de 5000 pb foram purificados e quantificados como descrito anteriormente. Para calcular a quantidade necessária de inserto para ligação, foi utilizada a seguinte fórmula:

Quantidade de =	150 ng de vetor x Tamanho do inserto (kb) x Relação inserto
inserto (ng)	Tamanho do vetor (kb) vetor

Figura 13 - Representação da clonagem do gene da PR do isolado SAR86 no vetor pBB-pan.

O plasmídeo pCR 2.1PR e o vetor de expressão pBB-panEGFP foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.). Os produtos de digestão foram purificados e ligados entre eles por ação da enzima T4 ligase resultando no plasmídeo pBB-panPR

Foram realizadas 3 misturas de ligação distintas, variando apenas a proporção de inserto/vetor 3:1, 5:1 ou 7:1. A enzima utilizada para catalisar a ligação fosfodiéster entre a terminação 5'-fosfato e a terminação 3'-hidroxi das fitas de DNA foi a T4 DNA Ligase 1 U/ μ L (InvitrogenTM). A mistura de ligação foi mantida a 24 °C durante 1 h seguindo as recomendações do fabricante. Apenas 1 μ L da mistura de ligação foi utilizado para transformar a linhagem *E. coli* DH5 α (Figura 13).

4.11 Sequenciamento de DNA

Os fragmentos de DNA da região 16S rRNA foram sequenciados com ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, C.A., United States) no Departamento de Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP. O resultado do sequenciamento foi analisado com o auxílio do programa computacional *Codon Code* para verificação da qualidade das bases. A análise de similaridade foi realizada através do programa Clustal W 2.0 (LARKIN et al., 2007).

4.12 Análise da expressão da proteorrodopsina recombinante em *C. necator* DSMZ 545

4.12.1 Caracterização do perfil proteico através de SDS-PAGE

4.12.1.1 Fracionamento celular

A análise de proteínas expressas nas fração citoplasmática, na membrana interna e na membrana externa das células de *C. necator* DSMZ 545 da linhagem selvagem ou contendo o plasmídeo pBB-panPR foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Tanto a linhagem recombinante como a selvagem foram cultivadas em 200 mL de meio LB, a 180 rpm, a 28 °C, até atingirem absorbância a 600 nm: 1,0. Foi então

adicionado ao cultivo *all-trans* retinal (Sigma-Aldrich) à concentração final de 10 μ M. O cultivo foi mantido nas mesmas condições de temperatura e agitação por mais 5 horas. Terminado o tempo de incubação, as células foram recuperadas por centrifugação (Himac CF7D2), a 10.000 x g, 4 °C por 15 min e o sedimento resultante armazenado a -20 °C até a próxima etapa de extração. As amostras foram ressuspensas em 10 mL tampão contendo 50 mM MOPS (pH 7,2) e 1 mM EDTA e sonicadas no aparelho MA-103 (Marconi, Piracicaba, S.P., Brasil) com 10 pulsos de 30 segundos (60 mA) e intervalo de 2 min no gelo. Após esta lise, as amostras foram centrifugadas (Himac CF7D2) a 12.000 x g a 4 °C durante 30 min. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 100.000 x g (Sorvall MX 150/MX 120, Newport Pagnell, B.U., England), 4°C durante 1 hora com o objetivo de separar a fração citoplasmática da fração de membranas (interna e externa). O sobrenadante resultante foi considerado a fração citoplasmática e o sedimento foi ressuspenso em 10 mL de solução A (MOPS- pH 7,2 50 mM; EDTA 1 mM, NaCl 200 mM e *n*-Dodecyl- β -D- maltosídeo– (DDM) 1,5%) conforme descrito por Hohenfeld; Wegener e Engelhard (1999). As amostras foram mantidas sob leve agitação a 4 °C durante 90 min e, em seguida, submetidas a uma nova ultracentrifugação a 120.000 x g (Sorvall MX 150/MX 120), 4 °C durante 1 hora. O sobrenadante obtido foi considerado a fração de membrana interna e o sedimento a fração de membrana externa. Todas as frações celulares da amostra recombinante e selvagem foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

4.12.1.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

Para a análise de proteínas das diferentes frações celulares, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 250 mM; SDS 0,8%, β -mercaptoetanol 200 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%), aquecidas durante 5 min a 95 °C para as proteínas citoplasmáticas e a 65°C para as frações de membrana (interna e externa). Os géis de poliacrilamida com SDS de 12% ou 15% foram preparados segundo Laemmli (1970). Os padrões de massa molecular utilizados foram o “Prestained Protein Weight Marker” (20-120 kDa) e “PageRuler Unstained Protein Ladder” (10-200 kDa) (Fermentas, Thermo

Fisher Scientific Inc). As corridas foram desenvolvidas a temperatura ambiente, a 100 V, com duração de aproximadamente 2,5 h em tampão de corrida (Tris 0,025 M; glicina 0,18 M e SDS 0,1%). Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi retirado do suporte e submetido à coloração por prata.

4.12.1.3 Coloração por prata

A coloração por prata foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Ansorge (1985) com modificações. Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi incubado em uma solução fixadora (metanol 50% (v:v); ácido acético 12,5% (v:v); formaldeído 37% 500 µL/L) durante 15 min sob leve agitação a temperatura ambiente. Na segunda etapa, a solução fixadora foi removida e uma nova solução de 50% (v:v) de etanol foi adicionado ao gel. Nesta etapa foram realizadas 3 lavagens de 5 min, entre cada lavagem o excesso da solução foi removido com água destilada. Em seguida, foi preparada uma solução de pré tratamento de 0,02% (w:v) de tiosulfato de sódio no momento do ensaio para ser usada na terceira etapa. O gel foi incubado com esta solução de prétratamento durante 20 segundos e após sua remoção, o gel foi lavado com água destilada por mais 20 segundos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. A quarta etapa consistiu na submersão dos géis em solução de coloração (nitrato de prata 0,2% e formaldeído 37% 700 µL/L) durante 20 min. A revelação do gel foi realizada na quinta etapa utilizando a solução de 6% de carbonato de sódio, 2 mg/L tiosulfato de sódio e 500 µL/L de formaldeído 37% . A amostra foi agitada suavemente até o momento em que as bandas estivessem definidas. Para parar a revelação, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e incubado com uma solução de parada (metanol 50% (v:v) e ácido acético 12,5% (v:v)) durante 10 min. Para finalizar, a sétima etapa consistiu na lavagem do gel em metanol a 50% por 10 min.

4.12.2 Ensaio de Western-Blotting

Os fragmentos protéicos do gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (HybondTM-C Extra- Amersham Bioscience- GE, Fairfield, C.T.,

United States) usando sistema de transferência semi-úmida (Bio-Rad). Filtros, membrana e gel de acrilamida foram mantidos no tampão de transferência (metanol 20%, Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,037%) durante o processo. A amperagem empregada foi de 30 mA durante 1 hora. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 3% de leite em pó Molico dissolvido em tampão PBS (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM) sob leve agitação, a 4 °C, durante 18 horas. A membrana foi lavada por 3 vezes com 0,05% de Tween-20 em PBS. Para a detecção da proteína de interesse, a membrana foi incubada com 1:2500 (v:v) anticorpo: solução bloqueadora a temperatura ambiente, sob moderada agitação, por 2 horas. O anticorpo primário utilizado foi anti-V5 mouse (Invitrogen™) com concentração de 1,18 mg/mL e a solução bloqueadora (0,05% Tween, 3% leite em pó Molico em PBS). Novamente, a membrana foi submetida a três lavagens 0,05% de Tween-20 em PBS de 5 min cada. Foi adicionado o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com a peroxidase na concentração de 0,03 µg/mL, incubando a membrana a temperatura ambiente, por 60 min. O excesso de anticorpo foi retirado com novo ciclo de três lavagens com 5% de Tween-20 em PBS. Para a visualização da quimioluminescência, utilizou-se o kit Super Signal®West Pico Chemiluminescent (Pierce, Products, Rockford, I.L., United States) contendo luminol e peróxido de hidrogênio como substrato da reação. A membrana foi exposta a filme radiográfico Kodak (X-OMAT®; Kodak, São Paulo, S.P., Brasil), sendo este revelado empregando-se a solução reveladora (Kodak).

4.13 Determinação da estabilidade genética do plasmídeo pBB-panPR

Células de *C. necator* DSMZ 545 hospedando o plasmídeo pBB-panPR foram selecionadas em meio LB com 25 µg/mL do antibiótico cloranfenicol durante 48 h, a 28 °C e agitação a 180 rpm. Este cultivo foi diluído 100 vezes em meio LB sem a adição de antibiótico, a fim de verificar a estabilidade genética do plasmídeo ao longo das gerações celulares.

A cada 24h de incubação, foi utilizada uma alíquota para ser semeada em placas de LB sólido com 25 µg/mL de cloranfenicol ou sem antibiótico, após

diluição seriada da cultura. Uma nova diluição de 100 vezes foi realizada deste mesmo cultivo para posterior análise após 24 h.

O crescimento microbiano foi monitorado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) após 48 horas de incubação a 28 °C em estufa. A razão entre UFC/mL crescidas em meio na presença ou ausência de antibiótico.

O tempo de geração de *C. necator*/pBB-panPR foi determinado durante a fase logarítmica de crescimento em cultivo líquido em LB contendo 25 µg/mL do antibiótico cloranfenicol, a 180 rpm, a 28 °C . Pontos em um intervalo de tempo conhecido nesta fase de crescimento foram aliquotados, submetidos a uma diluição seriada e semeados em placa contendo antibiótico de seleção adequado. A quantidade de UFC/mL dos pontos foi analisada e o número de gerações foi calculado pela fórmula:

$$\text{UFC/mL}_f = \text{UFC/mL}_i \times 2^n$$

UFC/mL_f = Unidades formadoras de colônia mL⁻¹ final, ponto 2

UFC/mL_i = Unidades formadoras de colônia inicial mL⁻¹, ponto 1

n = Número de gerações

4.14 Medida da produção de PHB pelas linhagens de *C. necator*

Células de *C. necator* selvagem ou portando o plasmídeo pBB-panPR foram crescidas em meio mineral com 2% de glicose como fonte de carbono durante 48 h, 180 rpm, a 28 °C. As culturas foram diluídas 100 vezes no mesmo meio e incubadas nas mesmas condições de temperatura e agitação. Ambas as linhagens foram crescidas na presença ou ausência de luz. Para isto, foi instalado um sistema de cultivo em batelada em nível laboratorial na presença de luz a 1 mJs⁻¹ abrangendo toda a faixa de luz visível dentro dos incubadores rotativos Innova (New Brunswick Scientific). Após 48 horas de incubação, as células foram centrifugadas, lavadas com solução salina 0,9% e ressuspensas em um novo meio mineral com 2% de glicose e nenhuma fonte de nitrogênio. Esta condição desbalanceada de excesso de fonte de carbono e limitação de nitrogênio

desencadeia a produção de PHB em *C. necator* (DU et al., 2001). Dez mililitros da cultura de cada condição foram retirados para quantificar o bioplástico após 24 h e 48 h de incubação. O crescimento celular foi monitorado pela absorbância a 600 nm durante todo o ensaio. A biomassa e a glicose consumida também foram analisadas como já descrito anteriormente.

A medida da produção de PHB foi realizada por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Células liofilizadas (de 10-15 mg) foram ressuspensas em 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v:v) e 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de 40 g/L de ácido benzóico como padrão interno (Sigma-Aldrich). As amostras foram submetidas à propanólise por 3 horas a 100 °C. Após os primeiros 30 min de incubação, as amostras foram agitadas vigorosamente e durante todo o restante do processo verificou-se a vedação dos tubos. Terminado o período da propanólise, as amostras foram retiradas do banho e foram adicionados 4 mL de água destilada com a finalidade de separar a fase orgânica (inferior do tubo) e a fase solúvel (superior). Para garantir a retirada completa de água, foi utilizado pipeta Pasteur para a remoção da fase solúvel e em seguida, adicionou-se sulfato de sódio à amostra até tornar-se translúcida. A fração orgânica foi transferida para vial (Agilent Technologies, Santa Clara, C.A., United States) e um volume de 1-2 µL foi analisado em cromatografia gasosa HP7890 Series GC System (Agilent Technologies) com uma coluna HP-5 (Agilent Technologies). As condições foram: gás Hélio de arraste (0,8 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção; ionização de chama (FID); Programa de temperatura do forno: 100 °C por 1 min, elevação até 210 °C a 8 °C/min e 210 °C por 15 min.

4.15 Citometria de fluxo

Células de *Cupriavidus necator* DSMZ 545 transformadas pelos plasmídeos pBB-panEGFP, pLEGFP ou pBBR1MCS foram cultivadas em meio líquido na presença 25 µg/mL de cloranfenicol. Os clones *C. necator*/pBBR1MCS e *C. necator*/pLEGFP foram cultivados em meio LB e, ao atingirem absorbância a 600 nm de 2,0, foram induzidos com 1 mM de IPTG (Sigma-Aldrich) ou reprimidos

com 1% glicose durante 3 horas a 180 rpm, a 28 °C. Como utilizamos diferentes metais para induzir o promotor *pan* presente na construção pBB-panEGFP, optou-se por cultivar *C. necator* portando este plasmídeo no meio mineral descrito por (DU et al., 2001), visto que meios completos podem quelar metais. Ao atingirem a absorbância de 2,0 a 600 nm, as células de *C. necator*/pBB-panEGFP foram induzidas com CuCl₂, CoCl₂, MnCl₂ ou citrato de ferro amoniacal (Merck ou Sigma-Aldrich) variando a concentração dos mesmos. O cultivo foi mantido durante 3 horas de incubação nas mesmas condições descritas anteriormente. A intensidade de fluorescência da proteína EGFP foi quantificada em citômetro de fluxo (Guava EasyCyte Plus System- GE, Fairfield, C.T., United States). Foram analisados 30.000 eventos a uma concentração celular de 500 cel/ μ L. A quantificação foi estimada pela intensidade média de fluorescência.

A fluorescência dos diferentes clones de *C. necator* DSMZ545 portadores dos plasmídeos descritos anteriormente também foi analisada por microscopia de epifluorescência EVOS[®]FL Cell Imaging System (Invitrogen[™]).

4.16 Determinação do espectro de absorção da proteorrodopsina recombinante

As linhagens *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR e *E. coli* JW135/pBB-panPR foram cultivadas em 200 mL de meio LB até atingirem absorbância a 600 nm: 0,8-1,0. Apenas para *C. necator* recombinante, foram adicionados FeCl₃ e NiSO₄ à concentração final de 100 mM e 25 mM, respectivamente. As células foram cultivadas por 5 horas sob agitação de 180 rpm a 28 °C no caso de *C. necator* ou a 37 °C no caso de *E. coli*. A extração de proteínas de membrana interna foi realizada como descrito anteriormente na seção 4.12.1.1.

O espectro de absorção (700-350 nm) da amostra foi medido em um espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu, Kyoto, K.Y., Japão), antes e após a adição de 20 μ M de *all-trans*-retinal (Sigma Aldrich), como descrito por BIESZKE et al. (1999). Foram utilizadas cubetas descartáveis de poliestireno para um volume de 1 mL.

4.17 Purificação da proteorrodopsina recombinante

A proteorrodopsina recombinante foi purificada utilizando antiV5-tag beads (MBL International Corporation, Woburn, M.A., Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante, ou por precipitação em tampão citrato como descrito por SYED (2011) com modificações. A fração de membrana interna das linhagens recombinantes foi extraída como já descrito anteriormente na seção 4.12.1.1 e diluída em 10 volumes de tampão A (Hepes pH 7,1 10 mM, PMSF 1mM, DDM 1.5%). Tampão citrato pH 5.5 a uma concentração final de 33 mM foi adicionado à amostra que foi incubada por 15 min no gelo. Após este período de incubação, a amostra foi centrifugada a 3.000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e foi adicionado tampão citrato pH 5.5 a uma concentração final de 40 mM. As etapas de incubação e centrifugação foram realizadas novamente nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi submetido à última etapa de precipitação com tampão citrato pH 5.5 a uma concentração final de 50 mM. Após centrifugação a 3.000 g por 15 min a 4 °C, a proteorrodopsina foi ressuspensa do pellet com 50 mM de Tris- HCl pH 9,0 e 1.5% de DDM.

4.18 Medida de ATP intracelular

C. necator /pBB-panPR e sua linhagem selvagem foram cultivadas em meio mineral utilizando glicose ou glicerol como fonte de carbono na presença ou ausência de luz. A concentração de ATP intracelular foi determinada por meio do kit comercial baseado na atividade da luciferase (BactTiter Glo, Promega, Madison, W. I., United States). A reação de oxigenação da D-luciferina é catalisada pela luciferase.

Para cada condição, 20 mL de amostra foram incubados com 100 mL de reagente em placas de 96 poços de fundo branco, de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi quantificada em luminômetro de placa Synergy HT Multi- Mode (Biotek, Winooski, V.T., Estados Unidos). Para cada condição foram realizadas triplicatas.

As concentrações de glicose e glicerol foram medidas no início e no final do experimento. A concentração de glicose foi medida como descrito anteriormente e a quantificação de glicerol foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Neste caso, foi utilizada uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (Bio-rad) a 60 °C e 2 mM de ácido sulfúrico como eluente em um fluxo de 0.6 mL/min. A detecção foi realizada pelo índice de refração a 410 nm e a concentração de glicerol nas amostras foi calculada utilizando a curva padrão (ANEXO B).

4.19 Determinação da produção de hidrogênio

Células recombinantes ou selvagens de *E. coli* JW135 foram cultivadas a 0,1-0,13 unidades de absorbância a 600 nm em meio M9 (DAVIS et al., 1980) suplementado com uma concentração final de 0,4% de glucose, 100 µM FeCl₃, 25 µM NiSO₄, 100 µM Na₂MoO₄, 15 mM formato de sódio, 12.5 µg/mL cloranfenicol. O cultivo foi realizado em frascos de 27,5 mL vedados com tampa de borracha e lacrados com selo de alumínio. A condição de anaerobiose foi obtida por meio de fluxo contínuo de argônio livre de oxigênio por 15 min. Lâmpadas tipo LED foram utilizadas a uma intensidade de 150 µmol photon m⁻² s⁻¹ em cada amostra. As amostras foram mantidas a 37 °C sob agitação de 150 rpm.

A quantidade de hidrogênio produzida na porção gasosa de cada cultivo foi mensurada em cromatografia gasosa modelo GC-8A (Shimadzu, Kyoto, K.Y., Japan) equipado com detector de condutividade térmica (TCD). Foi utilizada uma coluna capilar de 1 m (diâmetro interno de 5 Å). Argônio foi utilizado como gás de arraste e as temperaturas de injeção, forno e detector foram 60 °C, 110 °C, 110 °C respectivamente. A quantidade de hidrogênio foi calculada utilizando a curva padrão de hidrogênio (ANEXO A). Para realizar esta curva, volumes variando de

10 a 50 mL de hidrogênio (> 99,9%) foram analisados nas condições descritas anteriormente. A relação entre a altura em mm dos picos e a quantidade de moles de hidrogênio foi verificada (ANEXO A).

4.20 Análise estatística dos resultados

Os dados relativos à produção de hidrogênio e PHB foram realizados em triplicata e a análise de variância (ANOVA) foi calculada no software Graph Prism version 3. Em seguida, foi realizado o pós teste Bonferroni para comparação entre grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização fisiológica da linhagem *Cupriavidus necator* DSMZ 545

5.1.1 Meio de cultivo e ótimo de pH

Na literatura estão descritos dois meios minerais de cultivo para *C. necator* para produção de bioplástico (RAMSAY et al., 1990; DU et al., 2001). Células de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas nos dois meios minerais em pH 6,4 e 7,0 sob agitação (180 rpm) a 28 °C. Foram utilizados os mesmos tipos de frascos e a mesma concentração de glicose inicial (2%). Após 48 h de cultivo, o meio descrito por DU et al. (2001) (meio 2), proporcionou maior acúmulo de biomassa e PHB em comparação ao meio publicado por RAMSAY et al. (1990) (meio 1), sendo que o melhor resultado foi obtido em pH 7,0. (Figura 14).

Figura 14 - Concentração de peso seco (Biomassa+PHB) em g/L de células de *C. necator*.

Células de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em meio mineral nos pH 6,4 ou 7,0 sob agitação de 180 rpm a 28 °C durante 2 dias. Após este período de incubação, a concentração de peso seco (biomassa+PHB) foi avaliada gravimetricamente nas culturas liofilizadas.

Para avaliar a influência do pH no crescimento de *C. necator*, foi analisado o crescimento pela medida da absorbância a 600 nm, biomassa e consumo de glicose nos pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 no meio mineral descrito por DU et al. (2001)

Células de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas sob agitação (180 rpm) a 28 °C. Após 48 horas de cultivo, foi observado que tanto a absorbância a 600 nm como a biomassa produzida por *C. necator* foram semelhantes para as condições de pH 7 e 7,5. A taxa de conversão substrato/biomassa+PHB também foi similar para ambas as condições de pH (Tabela 4). Como alguns metais precipitam em pH mais alcalinos, foi escolhido o meio descrito por DU et al. (2001) em pH 7 para o cultivo de *C. necator* nos experimentos subsequentes.

Tabela 4 - Influência do pH do meio para o cultivo de *C. necator* DSMZ 545.

pH	Unidades de absorbância (600 nm)	Biomassa + PHB (g/L)	Glicose consumida (g/L)	g de biomassa+PHB/ g de glicose
6,4	8,3	2,7	12,65	0,23
7,0	31,0	8,45	16,89	0,5
7,5	30,8	8,4	16,77	0,5
8,0	28,0	7,6	15,42	0,49

5.1.2 Determinação do CMI de *Cupriavidus necator* DSMZ 545 para antibióticos, metais e *all-trans* retinal

Inicialmente, avaliamos a CMI de *C. necator* DSMZ 545 frente aos antibióticos cloranfenicol e ampicilina em meio sólido. Observou-se que esta bactéria é muito resistente a ampicilina, sendo capaz de crescer em concentrações superiores a 2000 µg/mL. Por outro lado, a concentração mínima inibitória de cloranfenicol foi de 15 µg/mL (dados não mostrados).

Também foi averiguada a CMI do cromóforo *all-trans* retinal em células de *C. necator*. O retinal, um derivado da vitamina A, é um cromóforo polieno que se liga covalentemente à apoproteína proteorrodopsina, tornando-a funcional. Como se pode observar na Figura 15, concentrações de até 10 µM de retinal não influenciaram no crescimento de *C. necator*, enquanto valores mais elevados deste cromóforo inibiram gradativamente a multiplicação bacteriana. Em dados publicados sobre expressão heteróloga da proteorrodopsina em *E. coli*, este cromóforo foi empregado em concentrações entre 5-20 µM (BÉJÀ et al., 2000; WALTER et al., 2007), assim optou-se por utilizar a concentração de 10 µM de *all-trans* retinal nos ensaios seguintes.

Figura 15 - CMI de *all-trans* retinal para *C. necator* DSMZ 545.

Células de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em meio mineral sob agitação (180 rpm), a 28 °C durante 48 horas na presença de diferentes concentrações de *all-trans* retinal. Em A, foto da técnica de diluição em tubos com concentrações crescentes do cromóforo. A percentagem de inibição do crescimento de *C. necator* foi determinada pela relação entre unidades de absorbância (600 nm) de células cultivadas no mesmo meio sem a adição de retinal (0% de inibição) ou na presença de diferentes concentrações de *all-trans* retinal (B).

Para avaliar a influência da presença de metais no cultivo de *C. necator* DSMZ 545, foi empregada a técnica de diluição em tubos com concentrações crescentes de diferentes metais (NiCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 e Citrato de ferro amoniacal) inoculados com uma mesma concentração inicial de células de *C. necator*.

Como se pode observar na Figura 16, as células de *C. necator* apresentaram valores de CMI $\geq 100\mu\text{M}$ para todos os metais testados. Como iremos utilizar estes metais na indução do promotor *pan* em células de *C. necator*, tornou-se importante verificar não somente a CMI de cada metal, mas uma concentração em que não ocorresse a inibição no crescimento desta bactéria. As concentrações de metais que não inibiram o crescimento de *C. necator* foram 12,5 μM para Co (II), 75 μM para Ni (II) e 10 mM para Mn (II). Mesmo utilizando concentrações decrescentes de CuCl_2 , este metal continuou inibindo a multiplicação celular. A presença de citrato de ferro amoniacal, no entanto, não afetou no crescimento de *C. necator*, mesmo em concentrações elevadas, de até 20 mM (dado não mostrado).

Figura 16 - CMI de Ni (II), Co (II), Mn (II) e Cu (II) para *C. necator* DSMZ 545.

Células de *C. necator* DSMZ 545 foram cultivadas em meio mineral sob agitação (180 rpm), a 28 °C durante 48 horas na presença de NiCl₂ (A), CoCl₂ (B), MnCl₂ (C) ou CuCl₂ (D). Foto da técnica de diluição em tubos com concentrações crescentes de metais indicadas em cada foto. A percentagem de inibição de cada metal no crescimento de *C. necator* foi determinada pela relação entre asunidades de absorbância (600 nm) de células cultivadas no mesmo meio sem a adição de metais (0% de inibição) e na presença de diferentes concentrações do metal, como indicado em cada gráfico.

5.2 Escolha de um promotor forte para expressão heteróloga em *Cupriavidus necator* DSMZ 545

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa haviam demonstrado que o promotor sintético *pan* apresenta forte atividade constitutiva em *Cupriavidus metallidurans*. Ribeiro-dos-Santos et al. (2010), verificaram que o promotor *pan* expressa constitutivamente o gene repórter da EGFP em *C. metallidurans* apresentando uma intensidade de fluorescência da GFP muito elevada em comparação ao promotor *lac*. Além disto, a presença de 1 mM de Co (II), Cd (II), Mn (II), Zn (II), Cu (II) ou Ni (II), intensifica os níveis de expressão do gene da EGFP em células de *C. metallidurans* transformadas com o plasmídeo pBB-panEGFP.

Figura 17 - Visualização de células de *C. necator* DSMZ 545, linhagem selvagem ou recombinante, em microscopia de epifluorescência.

Fotomicrografias de Células de *C. necator* DSMZ 545, da linhagem selvagem e de diferentes linhagens recombinantes, foram cultivadas em meio mineral sob agitação (180 rpm), a 28 °C até a cultura atingir 1,0 unidades de absorvância a 600 nm. Fotos no microscópio de epifluorescência linhagem selvagem de *C. necator* DSMZ 545 (A) ou hospedando pBBRIMCS(B), pBBlacEGFP(C) ou pBB-panEGFP(D).

Considerando que *C. metallidurans* é filogeneticamente muito próxima de *C. necator*, foi examinada nesta última a expressão heteróloga da EGFP sob o comando do promotor *pan* ou *lac*, com o objetivo de averiguar a eficácia do promotor *pan* nesta bactéria. Para isto, foram utilizados três diferentes

plasmídeos, pBBRIMCS, pBB-lacEGFP, pBB-panEGFP, construídos anteriormente no nosso grupo de pesquisa (Ribeiro-dos-Santos et al. 2010), para transformar células de *C. necator* DSMZ 545. Os clones transformantes foram observados em microscópio de epifluorescência EVOS®FL Cell Imaging System (Figura 17). A intensidade de fluorescência detectada no comprimento de onda verde foi consideravelmente maior para as células de *C. necator*/pBB-panEGFP em relação às células de *C. necator*/pBB-lacEGFP. Como controles negativos, foram utilizadas a linhagem selvagem e a linhagem *C. necator*/pBBRIMCS, que contém o plasmídeo sem o cassete de expressão da EGFP.

Figura 18 - Medida da intensidade de fluorescência da EGFP por citometria de fluxo.

Células de *C. necator* DSMZ 545 hospedando os plasmídeos pBB-EGFP, pBB-lacEGFP, pBBR1MCS1 ou pBB-panEGFP foram cultivadas sob agitação (180 rpm), a 28 °C, em meio mineral, até as culturas atingirem 1,5 unidades de absorbância a 600 nm. Células de *C. necator*/pBB-lacEGFP, *C. necator*/pBBR1MCS1 foram induzidas com 1 mM de IPTG ou reprimidas com 1% de glicose. Células de *C. necator*/pBB-panEGFP foram induzidas com 0,1 mM de CuCl₂ (Cu(II)), CoCl₂ (Co(II)), MnCl₂ (Mn(II)), ou citrato de ferro amoniacal (Fe(III)). Após 3 horas de indução, a intensidade de fluorescência da proteína EGFP foi quantificada em citometria de fluxo (30.000 eventos a uma concentração de células de 500 células/μL).

Os resultados de intensidade de fluorescência, obtidos por citometria de fluxo estão apresentados na Figura 18, se pode observar que as células de *C. necator* hospedando o vetor pBB-panEGFP, apresentaram uma intensidade de

fluorescência 13,3 vezes maior em relação às células hospedando o vetor pBBlacEGFP (promotor *lac*). Além disso, apenas os metais Fe (III) ou Co (II) aumentaram a expressão da EGFP em 25% em *C. necator*/pBB-panEGFP. Concentrações mais altas destes metais não resultaram em maior expressão da EGFP (Figura 19).

Figura 19 - Medida da intensidade de fluorescência da EGFP por citometria de fluxo.

Células de *C. necator* DSMZ 545 transformadas com o plasmídeo pBB-panPR foram cultivadas a 180 rpm a 28 °C, em meio mineral, até as culturas atingirem 1,5 unidades de absorvância a 600 nm. Para indução do promotor *pan*, foram adicionadas diferentes concentrações de CuCl₂ (Cu(II)), CoCl₂ (Co(II)), MnCl₂ (Mn(II)) ou citrato de ferro amoniacal (Fe(III)), como indicado nos gráficos A,B,C e D. Após 3 horas de indução, a intensidade de fluorescência da proteína EGFP foi quantificada em citometria de fluxo (30.000 eventos a uma concentração de células de 500 células/mL).

5.3 Desenho e síntese do gene *prd* do clado SAR86 e clonagem no vetor de expressão pBB-pan

A sequência do gene *prd*, adicionada de sítios de restrição específicos e da sequência codificadora de um epítipo (V5-tag), foi sintetizada (Eurofins MWG operon) e inicialmente clonada no vetor pCR 2.1 TOPO, originando o plasmídeo

pCR 2.1-PR. A integridade do gene foi confirmada por meio de sequenciamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

O plasmídeo pCR 2.1-PR foi submetido a dupla digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI*, assim como o vetor de expressão pBB-panEGFP. Após tal procedimento, o vetor de expressão apresentou os sítios necessários para a clonagem do gene da proteorrodopsina a jusante do promotor *pan*. As amostras resultantes da digestão foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (Figura 20A) e, em seguida, os fragmentos de interesse foram purificados e realizou-se uma mistura de ligação entre vetor e inserto, na proporção de 1:3, 1:5 e 1:7.

Figura 20 - Perfis de migração eletroforética dos fragmentos de DNA em gel de agarose.

Em A, fragmento contendo o gene da proteorrodopsina (5,6) e do vetor pBB-panEGFP (7) após digestão e eluição do gel; 1: Padrão de massa molecular 1kb Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.; 2-4: λ DNA (50,100, 200 ng, respectivamente). Em B, produtos da digestão dos plasmídeos dos clones transformantes com a enzima de restrição *EcoRI* (2-14); em 1: Padrão de tamanho molecular 1kb Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.

Células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com a mistura de ligação e selecionadas por meio de semeadura em meio contendo cloranfenicol. Foram obtidos 13 clones transformantes apenas na condição de 1:7 vetor:inserto, demonstrando que esta relação é determinante para ocorrer a ligação.

Para a confirmação do sucesso da ligação, os DNAs plasmidiais foram extraídos dos clones transformantes e submetidos à análise de restrição (Figura 20B). Apenas 6 dos 13 transformantes apresentaram o padrão esperado (canaletas 4, 5, 7, 8, 9 e 12 da Figura 20B). A seguir, a construção gênica foi confirmada por sequenciamento.

5.4 Expressão heteróloga da proteorrodopsina (PR) em *E. coli* BL21 e *C. necator* DSMZ 545

A expressão heteróloga da proteína PR foi avaliada nas linhagens *E. coli* BL21 (DE3) e *C. necator* DSMZ 545, selvagens ou hospedando o plasmídeo pBB-panPR pela comparação dos perfis dos extratos celulares de cada linhagem em SDS-PAGE e em seguida por ensaio de Western Blotting. Tanto a expressão da PR recombinante na membrana interna (MI), como a comprovação de sua atividade funcional já haviam sido demonstradas em *E. coli* em estudos anteriores (BÉJÀ et al., 2000; HOHENFELD; WEGENER; ENGELHARD, 1999; MARTINEZ et al., 2007; WALTER et al., 2007). Assim, este microrganismo foi utilizado como controle positivo do experimento.

Primeiramente, para detecção das proteínas expressas na membrana interna, foi realizado o fracionamento celular utilizando o detergente Triton X para solubilizar as proteínas de membrana. Não foi possível observar a expressão da PR recombinante na fração de membrana interna nas amostras de *C. necator*/pBB-panPR e tampouco nas amostras controle de *E. coli* BL21/pBB-panPR em gel SDS-PAGE e Western Blotting com o anticorpo Anti-V5 (dados não mostrados). A dificuldade da extração de proteínas de membrana ocorre devido aos domínios transmembrana hidrofóbicos presentes nas mesmas (ALBERTS; WILSON; HUNT, 2008). Os detergentes são agentes capazes de solubilizar as proteínas de membrana por ser uma molécula anfifílica. Estes agentes rompem a bicamada lipídica e se ligam às regiões hidrofóbicas da proteína, formando um complexo detergente-proteína. A porção polar do detergente tende a colocar as proteínas de membrana em solução e em uma determinada condição, denominada concentração micelar crítica (CMC), os monômeros de detergente se agregam formando micelas. Como a CMC de cada detergente é específica, a escolha de um detergente adequado é essencial para que a proteína não precipite

(ALBERTS; WILSON; HUNT, 2008). De fato, verificou-se na literatura que a solubilização da PR ocorre na presença de detergentes com extremidades polares não-carregadas ou não-iônicas como DDM (HOHENFELD; WEGENER; ENGELHARD, 1999) ou β octil-glucosídeo (GOURDON et al., 2008). Assim, utilizou-se o detergente DDM no processo de extração de proteínas de membrana. Na Figura 21A, pode ser vista uma banda adicional de aproximadamente 25 kDa na fração da MI nas linhagens recombinantes *C. necator*/pBB-panPR e *E. coli* BL21/pBB-panPR.

Figura 21 - Análise de proteínas das frações celulares de *C. necator*/pBB-panPR e de *E. coli* BL21/pBB-panPR, e de suas respectivas linhagens selvagens.

Análise eletroforética de proteínas de frações celulares. Em A, Gel de SDS-PAGE do fracionamento celular de *C. necator* DSMZ 545 e *E. coli* BL21(DE3), quer hospedando ou não o plasmídeo pBB-panPR e (B) ensaio de Western Blotting utilizando anti-V5 como sonda. Em A e B, as amostras correspondem a 1: Fração citoplasmática de *C. necator*, 2: Fração citoplasmática de *C. necator*/pBB-panPR, 3: Proteínas da membrana interna de *C. necator*, 4: Proteínas da membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR, 5: Proteínas da membrana externa de *C. necator*, 6: Proteínas da membrana externa de *C. necator*/pBBpanPR, 7: Proteínas da membrana interna de *E. coli* BL21, 8: Proteínas da membrana interna de *E. coli* BL21/pBB-panPR. PM: padrão de massa molecular "PageRuler Prestained Protein Ladder".

Para confirmar a presença da PR, realizou-se um ensaio de Western Blotting utilizando como sonda o anticorpo primário anti-V5 de camundongo, que reconhece o epítipo de 14 aminoácidos presente na região C-terminal da PR recombinante. Os resultados estão apresentados na Figura 21B, onde se pode verificar que a expressão heteróloga da PR na membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR foi obtida com sucesso (canaleta 4), assim como na fração da membrana interna do controle positivo *E. coli* BL21/pBB-panPR, (canaleta 8).

Uma tênue banda também foi observada na fração citoplasmática da linhagem recombinante de *C. necator* (canaleta 2). Isto indica que o transporte da proteína recém-traduzida do citoplasma para a membrana plasmática foi incompleto: como o promotor utilizado é muito forte, talvez a célula não consiga processar toda a proteína sintetizada.

5.5 Análise do crescimento da linhagem recombinante *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR

Com o objetivo de avaliar se a presença do plasmídeo pBB-panPR provocava algum prejuízo sobre o comportamento de *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR em relação à linhagem selvagem, foi analisado o crescimento destas linhagens medido pelas unidades de absorbância a 600 nm ao longo do tempo de incubação em meio mineral. Na Figura 22A, observa-se que não houve diferença na cinética de crescimento entre as duas linhagens. Ao avaliar a quantidade de UFC/mL, nota-se que o número de colônias por mL formadas ao longo do tempo também se manteve similar entre as duas linhagens, mostrando uma correlação linear com os dados de absorbância (Figura 22B).

Figura 22 - Curvas de crescimento de *C. necator* DSMZ545 e da linhagem recombinante portadora do plasmídeo pBB-panPR.

Células de *C. necator* DSMZ545 e da linhagem recombinante foram cultivadas em meio mineral sob agitação (180 rpm), a 28 °C. Em A, unidades de absorbância a 600 nm das culturas de *C. necator*/pBB-panPR e da linhagem selvagem cultivadas em meio mineral na presença de 2% de glicose. Em B, relação da absorbância a 600 nm e Log[UFC/mL] de ambas as linhagens.

5.6 Estabilidade genética do plasmídeo pBB-panPR em *C. necator* DSMZ 545

A estabilidade da informação genética introduzida em linhagens recombinantes é de extrema importância em termos de biossegurança e da sua aplicação em escala industrial. Como se pode observar na Figura 23, o plasmídeo pBB-panPR apresentou estabilidade nas células de *C. necator* DSMZ 545 até 22 gerações em meio não seletivo. Considerando que o tempo de geração das células de *C. necator* DSMZ 545 foi de 4,3 horas, o plasmídeo manteve-se estável durante 4 dias. A presença do plasmídeo pBB-panPR foi confirmada por mini-preparação seguida de análise de restrição (dados não mostrados). Este experimento foi realizado duas vezes.

Figura 23 - Estabilidade do plasmídeo pBB-panPR em células de *C. necator* DSMZ 545 em função do número de gerações em meio não seletivo.

Células transformantes de *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR foram crescidas sob agitação (180 rpm) a 28 °C, em meio LB. A cada 24 horas, uma amostra foi semeada em meio sólido LB, na presença ou ausência de 25 mM/mL de cloranfenicol. Após cada coleta, as células foram repicadas a uma diluição de 1:100 em um novo meio LB sem a adição de antibiótico.

5.7 Montagem do sistema de iluminação em incubadores rotativos

Visando garantir as condições ideais para o cultivo celular sob iluminação, foi instalado um sistema de cultivo em batelada em nível laboratorial (New

Brunswick Scientific) na presença de luz LED (light-emitting diode) a $2,4 \text{ mW/cm}^2$, abrangendo toda a faixa de luz visível (Figura 24 A e B). Nestas condições, observou-se que não houve emissão de luz nem na faixa do ultravioleta ($<400 \text{ nm}$), nem do infravermelho ($>800 \text{ nm}$) (Figura 24A). Tendo em vista que o cromóforo *all-trans*-retinal seria utilizado em nossos ensaios, a irradiação com luz UV poderia resultar na degradação deste composto. A ausência de luz na faixa do infravermelho também é importante para a manutenção da temperatura do sistema. Verificou-se também a homogeneidade de irradiação no espaço onde foram realizados os experimentos (Figura 24B).

Figura 24 - Condições de cultivo sob iluminação.

Espectro emitido pela luz LED (A). Foto da montagem do sistema de iluminação em incubador rotativo (B).

5.8 Avaliação da produção de PHB e taxa de conversão substrato/PHB pela linhagem recombinante de *C. necator*

Para avaliar os efeitos da expressão heteróloga da proteorrodopsina em *C. necator* na produção de PHB, foi realizado o cultivo desta bactéria na ausência ou na presença de luz, como descrito no seção 4.14. Neste ensaio, verificou-se que a cinética de crescimento de *C. necator* /pBB-panPR e da linhagem selvagem, tanto em presença como em ausência de iluminação, foi aproximadamente a mesma (Figura 25A).

Também foi avaliada em paralelo a produção de PHB e o consumo de glicose (Figura 25B e Tabela 5). Estes resultados apontaram um pequeno aumento na produção de PHB por massa seca celular com a melhor taxa de

conversão glicose/PHB em *C. necator*/pBB-panPR apenas na presença de luz. No entanto, esta variação não é significativa, podendo estar dentro da faixa de erro da quantificação de PHB.

Figura 25 - Curva de crescimento e porcentagem de PHB por peso seco de *C. necator* DSMZ 545 e da linhagem recombinante na presença ou ausência de luz.

Células de *C. necator* DSMZ 545 transformadas com pBB-panPR e da respectiva linhagem selvagem foram cultivadas sob agitação (180 rpm) a 28 °C durante 48 horas em meio mineral contendo 2% de glicose e NH_4SO_4 , na presença ou ausência de luz. Após este período de incubação, as células foram recuperadas e cultivadas em um novo meio mineral contendo 2% de glicose sem a presença de fonte de nitrogênio. Durante todo o ensaio, o crescimento foi analisado a cada 24 horas por unidade de absorbância a 600 nm (A). A porcentagem de PHB por peso seco foi analisada após 72 e 96 horas de ensaio por propanólise seguida de CG-FID (B). Todos os valores foram representados pela média da triplicata biológica (n= 3).

Tabela 5 - Taxa de conversão substrato/PHB e porcentagem de PHB por massa seca em *C. necator* DSMZ 545 e da linhagem recombinante na presença ou ausência de luz.

Condição de cultivo	Linhagem	Porcentagem de PHB por massa seca	g polímero/g glicose
Ausência de iluminação	<i>C. necator</i> selvagem	64,63%	0,29
	<i>C. necator</i> /pBB-panPR	66,29%	0,27
Presença de iluminação	<i>C. necator</i> selvagem	67,43%	0,29
	<i>C. necator</i> /pBB-panPR	69,06%	0,31

Neste experimento, não foi adicionado o cromóforo *all-trans* retinal devido ao fato de que *C. necator* DSMZ 545 possui todos os genes envolvidos na biossíntese deste derivado da vitamina A. Com o objetivo de aumentar a atividade da proteorrodopsina em *C. necator*, foram realizados novos experimentos na

presença de 10 μM de *all-trans* retinal. Como se pode observar na Figura 26A, o perfil de crescimento se manteve semelhante na presença ou ausência de luz para ambas as linhagens. Tanto a produção de PHB por massa seca celular como a taxa de conversão glicose/PHB também se manteve similar em ambas as condições (Figura 26B). Conclui-se que nestas condições de meio de cultivo em aerobiose, a expressão heteróloga da proteorrodopsina em *C. necator* DSMZ 545 não influenciou na produção de PHB.

Figura 26 - Curva de crescimento e porcentagem de PHB por peso seco de *C. necator* DSMZ 545 e da linhagem recombinante cultivadas em meio mineral contendo 10 μM de *all-trans* retinal, na presença ou ausência de luz.

Células de *C. necator* DSMZ 545 transformadas com o plasmídeo pBB-panPR e da respectiva linhagem selvagem foram cultivadas sob agitação (180rpm) a 28 °C durante 48 horas em meio mineral contendo 10 μM de *all-trans* retinal, 2% de glicose e NH_4SO_4 na presença ou ausência de luz. Após este período de incubação, as células foram recuperadas e cultivadas em um novo meio mineral contendo 2% de glicose sem a presença de fonte de nitrogênio. Durante todo o ensaio, o crescimento foi analisado por unidade de absorbância a 600 nm (A). A porcentagem de PHB por peso seco foi analisada após 72 e 96 horas de ensaio por propanólise seguida de CG-FID (B). Todos os valores foram representados pela média da triplicata biológica (n= 3).

5.9 Quantificação de ATP intracelular em *C. necator*/pBB-panPR e sua respectiva linhagem selvagem na presença ou ausência de luz

Um dos efeitos fisiológicos detectados em decorrência da expressão heteróloga da PR em *E. coli* é o aumento da concentração de ATP intracelular apenas na presença de luz e retinal (Martinez et al. 2007). Assim, células de *C. necator*/ pBB-panPR e de sua respectiva linhagem selvagem foram cultivadas em

meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono, sob agitação (180 rpm), a 28 °C. Como se pode observar na Figura 27, a quantidade em pmoles de ATP foi similar entre a linhagem selvagem e recombinante utilizando-se tanto glicose (A) ou glicerol (B) como fonte de carbono. Dados normalizados pelo UFC e fonte de carbono consumido também demonstraram que não houve diferença da concentração de ATP intracelular nas condições empregadas.

Figura 27 - Quantificação de ATP intracelular em células de *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR e da sua linhagem selvagem em presença ou ausência de luz.

Células de *C. necator* DSMZ 545 transformadas com o plasmídeo pBB-panPR e da respectiva linhagem selvagem foram cultivadas sob agitação (180 rpm) a 28 °C em meio mineral contendo 10 μ M de *all-trans* retinal e glicose (A) ou glicerol (B), na presença ou ausência de luz. Após 5 horas de cultivo, as amostras foram coletadas e o ATP intracelular foi quantificado por meio do kit BactTiter Glo (Promega). Foi realizado ANOVA “two way” seguido do pós teste Bonferroni nos dados pmoles ATP/pmoles glicose*UFC(10^{-3}) e ATP/pmoles glicerol*UFC(10^{-3}) entre a linhagem recombinante e selvagem cultivadas no claro.

5.10 Avaliação do crescimento da linhagem recombinante *C. necator* DSMZ 545/pBB-panPR em diferentes concentrações de oxigênio e produção de hidrogênio na presença ou ausência de luz

Com o objetivo de averiguar algum efeito fisiológico na linhagem recombinante, células de *C. necator*/pBB-panPR foram cultivadas em meio mineral contendo 10 μ M de *all-trans* retinal e 0.5% de glicose em diferentes concentrações de oxigênio (1-15%). Pela análise da Figura 28, pode ser observado que não houve diferença no crescimento medido por unidade de absorbância a 600 nm entre a linhagem recombinante cultivada no claro ou no

escuro para todas as condições. Também foi possível observar que a disponibilidade de oxigênio afetou diretamente o crescimento da bactéria. Após 160 horas de experimento, células de *C. necator*/pBB-panPR cultivadas com 15% de oxigênio na presença ou ausência de luz apresentaram os maiores valores de absorbância a 600 nm. Estes valores de crescimento foram decrescendo à medida que a concentração de oxigênio inicial foi diminuindo.

Figura 28 - Curva de crescimento de *C. necator*/pBB-panPR em diferentes concentrações de oxigênio.

Células de *C. necator*/ DSMZ545/pBB-panPR foram cultivadas a 28°C sem agitação, em meio mineral 0,5% de glicose em diferentes concentrações de oxigênio inicial. O cultivo foi realizado no claro ou no escuro. Em A, foram utilizadas concentrações iniciais de O₂ de 1, 2 e 5%. Em B, foram utilizadas concentrações de O₂ mais elevadas: 10 e 15 % de oxigênio.

Para verificar se a presença da PR influiria na capacidade de produção de hidrogênio das células, foi analisada a produção de hidrogênio por células recombinantes crescidas no claro ou no escuro. Células de *C. necator*/pBB-panPR foram cultivadas em anaerobiose em meio mineral suplementado com 10 µM de *all-trans* retinal sob agitação (180 rpm) a 28 °C, durante 6 dias. Não houve diferença na produção de hidrogênio quando as células foram iluminadas ou cultivadas no escuro. A partir do terceiro dia até o sexto dia, foram obtidos 7,53 µmoles de hidrogênio em ambas as condições (dados não mostrados).

5.11 Espectros de absorção da fração de membrana interna contendo a PR recombinante de *E. coli* BL21/pBB-panPR e *C. necator*/pBB-panPR

Com o objetivo de verificar a atividade da PR recombinante na bactéria *Cupriavidus necator*, foi analisado o espectro de absorção de 350 a 600 nm da fração de proteínas de membrana interna. A expressão da proteorrodopsina recombinante foi realizada sem a presença do cromóforo *all-trans* retinal tanto em *C. necator*/pBB-panPR como também em *E. Coli* BL21/pBB-panPR. Dados da literatura demonstraram que a apoproteína proteorrodopsina muda seu espectro de absorção apenas na presença do cromóforo *all-trans* retinal (BÉJÀ et al., 2000; DIOUMAEV et al., 2002; LENZ et al., 2006; WALTER et al., 2007; KIM et al., 2012). A apoproteína PR se liga covalentemente ao retinal e, na presença de luz, o cromóforo se isomeriza desencadeando uma série de reações na PR, que resultam no bombeamento de prótons do meio citoplasmático para o periplasma e na restauração do estado inicial da PR. Assim como outras rodopsinas, durante este ciclo de reações, a PR sofre mudanças conformacionais, resultando em diferentes estados intermediários (inicial, K, M, N e O) (DIOUMAEV et al., 2002; LENZ et al., 2006). Os diferentes estados conformacionais da PR absorvem na faixa de luz verde, apresentando um pico a 520 nm, o que demonstra que a proteína está funcional.

Utilizada como controle positivo do experimento, a fração de membrana interna de *E. coli*/pBB-panPR apresentou o espectro de absorção característico da PR com um pico em 520 nm (Figura 29). No tempo zero, sem a presença do cromóforo (0 min), não foi possível observar absorção na faixa do verde. Ao adicionar *all-trans* retinal na amostra, foi verificado o espectro de absorção esperado para a PR funcional (BÉJÀ et al., 2000, KIM et al., 2012). Medidas realizadas após 10, 20 e 30 minutos apresentaram valores de absorção mais elevados na faixa do verde, corroborando os dados da literatura (BÉJÀ et al., 2000, KIM et al., 2012). Entretanto, a fração de proteínas de membrana interna de *C. necator* não apresentou o perfil característico de absorção da PR ao se adicionar o cromóforo (dados não mostrados). Frielingsdorf et al. (2011) demonstraram que o citocromo b₅₆₂ presente na membrana interna de *C. necator* absorve de 532 a 562 nm. Como foi utilizada no experimento de espectroscopia a

fração de proteínas de membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR, a presença deste citocromo pode ter interferido na análise dos espectros de absorção.

Figura 29 - Espectro de absorção da proteorrodopsina recombinante produzida em *E. coli* BL21/pBB-panPR

Espectros de absorção (600-350 nm) da fração celular de membrana interna de *E. coli* BL21/pBB-panPR na ausência (0 min.) de *all-trans* retinal ou após a adição de 20 μ M do cromóforo (10, 20, 30 min).

5.12 Purificação parcial da proteína PR recombinante

Para obter a proteorrodopsina recombinante mais concentrada e purificada, foi utilizado um kit contendo “beads” associados ao anticorpo Anti-V5 (MBL International Corporation). A fração total de membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR foi extraída conforme a seção 4.12.1.1. Para a purificação da PR contendo o epítipo V5 na porção C-terminal da proteína, foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante.

Figura 30 - Gel de SDS-PAGE e Western Blotting da purificação da proteorrodopsina produzida em *C. necator*.

Em A: Gel de SDS-PAGE. Canaleta 1: Fração total de proteína de membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR, canaleta 2: fração de proteínas que não interagiram com “beads”, canaleta 3: proteínas que eluíram após solução de lavagem, canaleta 4: padrão de massa molecular “PageRuler Prestained Protein Ladder” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.), canaleta 5: proteínas recuperadas após solução de eluição contendo o epítipo V5, canaleta 6: proteína eluída na presença de 0,5% de DDM, canaleta 7: proteínas recuperadas dos grânulos anti-V5 após fervura. Em B, Western blotting utilizando anticorpo anti-V5.

Na Figura 30A, estão apresentados os resultados obtidos com as amostras das etapas de purificação analisadas em gel de SDS-PAGE. Na canaleta 1, foi adicionada a fração de proteínas que não interagiram com os “beads” associados ao Anti-V5. As duas etapas de lavagem correspondem às canaletas 2 e 3 e o marcador de massa molecular à canaleta 4. A amostra foi eluída com uma solução do kit contendo o peptídeo V5 (5) ou suplementado com 0,5% de DDM (6). Como não foi possível observar bandas de proteína em nenhuma das amostras eluídas, os grânulos foram fervidos em tampão de amostra descrito na seção 4.12.1.2, para análise subsequente em gel de SDS-PAGE. Na canaleta 7, foi detectada uma banda de aproximadamente 25 kDa e outra, de 55 kDa, possivelmente um dímero da PR. Apesar de não ter sido possível realizar análises funcionais com as proteínas que interagiram com anti-V5, foi realizado um Western Blotting com anticorpo primário anti-V5 para comprovar a presença da PR recombinante (Figura 30B). Ambas as bandas foram detectadas por esta técnica. Mesmo sendo a SDS-PAGE considerada uma técnica para analisar proteínas no estado desnaturado, é possível verificar dímeros e oligômeros em

alguns casos. Neste experimento, foi possível comprovar por duas vezes a presença da PR recombinante em *C. necator*/pBB-panPR. A primeira, pela interação da proteína recombinante com os “beads” contendo Anti-V5 e, a seguir, por sua detecção por Western Blotting utilizando anticorpo anti-V5 como sonda.

Figura 31 - Gel de SDS-PAGE das proteínas da fração de membrana interna e da proteorrodopsina produzida em *C. necator* DSMZ 545 em *E. coli* BL21, purificada por precipitação por tampão citrato.

Gel de SDS-PAGE. Canaleta 1: Padrão de massa molecular “PageRuler Prestained Protein Ladder” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.), canaleta 2: Fração total de proteínas de membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR, canaleta 3: PR produzida em *E. coli* BL21 purificada por precipitação por tampão citrato, canaleta 4: PR produzida em *C. necator* DSMZ 545 purificada por precipitação por tampão citrato. A seta azul indica a possível banda da PR recombinante.

Syed (2012) desenvolveu um protocolo de purificação da PR para precipitação salina com tampão citrato. Como descrito na seção 4.17, a fração total de proteínas da membrana interna de *C. necator*/pBB-panPR e de *E. coli*/pBB-panPR foram extraídas e submetidas à precipitação salina com tampão citrato em diferentes concentrações. Após serem precipitadas, amostras contendo a PR recombinante foram eluídas em tampão Tris pH 9,0 contendo DDM 1,5%. Na Figura 31, é possível observar bandas de aproximadamente 25 kDa nas canaletas 3 e 4, correspondentes à PR purificada de *E. coli* e *C. necator*, respectivamente. A maior quantidade de PR recombinante foi obtida em células

de *C. necator*/pBB-panPR dado que o promotor *pan* é um promotor forte em *C. necator*, enquanto em *E. coli* este promotor apresenta menor força de expressão.

A proteorrodospina expressada em *E. coli* apresentou novamente o espectro de absorção esperado ao adicionar-se o cromóforo retinal (Figura 32). Com o pico em 520 nm, os estados intermediários da PR indicam que a apoproteína interagiu corretamente com o cromóforo. Entretanto, mesmo em uma concentração mais elevada, não foi possível verificar atividade da PR purificada de *C. necator*/pBB-panPR na presença do cromóforo. Mesmo adicionando-se concentrações mais elevadas de *all-trans* retinal (20-100 μ M), não foi possível verificar a absorção dos intermediários da PR.

Figura 32 - Espectros de absorção *in vitro* da proteorrodopsina recombinante produzida em *E. coli* BL21 e *C. necator* DSMZ 545.

Espectros de absorção (600-400nm) da PR recombinante produzida em *E. coli* BL21 (A) ou em *C. necator* DSMZ 545(B) na ausência (0 min) de *all-trans* retinal ou aos 10, 20, ou 30 minutos após a adição de 20 μ M do cromóforo.

5.13 Expressão da PR sob o comando do promotor *pan* em *E. coli* JW1135

Visando aprofundar a análise de um possível efeito da PR sobre a capacidade de produção de biohidrogênio, a linhagem de *E. coli* JW135 foi escolhida por não conter os operons *hya* e *hyb*. Como descrito na literatura, as hidrogenases HYD-1 e HYD-2 de *E. coli* catalizam preferencialmente a oxidação de hidrogênio, de modo que poderiam interferir nos resultados. De fato, foi

demonstrado que, em condições de anaerobiose, a linhagem *E. coli* $\Delta hya \Delta hyb$ aumentou em 37% a produção de H_2 em comparação à linhagem selvagem (Bisaillon et al. 2006). Assim, optou-se por utilizar esta linhagem como hospedeira do plasmídeo pBB-panPR para verificar o efeito da proteorrodopsina heteróloga na evolução de hidrogênio.

Figura 33 - Confirmação da expressão e atividade da proteorrodopsina em *E. coli* JW135/pBB-panPR.

Em A: Western Blotting das frações celulares de *E. coli* JW135/pBB-panPR, utilizando como sonda o anticorpo anti-V5 1- Fração citoplasmática 2- Fração total de membrana interna 3- Fração total de membrana externa. Em B, foto de células de *E. coli* JW135/pBB-panPR (2) e de sua respectiva linhagem selvagem (1) cultivadas em meio LB na presença de 20 μM de *all-trans* retinal. Em C, espectros de absorção da fração de membrana interna de *E. coli* JW135/pBB-panPR na ausência do cromóforo (0 min) ou após a adição de 20 μM de *all-trans* retinal (0 min+ret, 10 min, 20 min e 30 min).

Células de *E. coli* JW135 foram transformadas com o plasmídeo pBB-panPR e a expressão heteróloga da PR foi confirmada por Western Blotting (Figura 33A). Frações celulares da linhagem *E. coli* JW135/pBB-panPR foram obtidas de acordo com o protocolo descrito na seção 4.12.1.1. A expressão da

proteína PR recombinante foi confirmada apenas na fração de membrana interna da linhagem recombinante, utilizando como sonda o anticorpo primário anti-V5. A expressão da PR também pode ser confirmada pelo cultivo da linhagem recombinante e de sua respectiva linhagem selvagem na presença de 20 μM de *all-trans* retinal. Após as culturas atingirem 1,0 unidade de absorbância a 600 nm, o cromóforo foi adicionado e as amostras foram incubadas a 37 °C, sob agitação (180 rpm), durante 5 h. As células foram recuperadas por centrifugação e foi observada a coloração avermelhada (Figura 33B) apenas na linhagem *E. coli* JW135/pBB-panPR, demonstrando que a apoproteína proteorrodopsina recombinante interagiu com o retinal. Este fenótipo corrobora os dados publicados anteriormente na literatura (BÉJÀ et al., 2000; KIM et al., 2012).

Para avaliar o funcionamento da proteorrodopsina recombinante na linhagem *E. coli*/pBB-panPR, foi realizada a extração das proteínas totais de membrana interna como descrito anteriormente. Na Figura 33C, estão apresentados os espectros de absorção da apoproteína PR, antes e após adição de *all-trans* retinal em diferentes concentrações. É possível observar que, após a adição do cromóforo, houve absorção dos intermediários (inicial, K, M, N, O) da PR com pico em 525 nm. A presença destes intermediários indica que o fotociclo da PR na presença de luz está ativo, como descrito em outros trabalhos (BÉJÀ et al., 2000; KIM et al., 2012).

5.14 Quantificação de H₂ em células de *E. coli* JW135 recombinante ou selvagem

Após verificar a correta expressão e atividade da PR na membrana citoplasmática de *E. coli* JW135/pBB-panPR, foram realizados experimentos para averiguar a produção de hidrogênio pelas linhagens selvagem e recombinante, na presença ou ausência de luz. O sistema de iluminação foi montado com luz LED, de modo a proporcionar uma intensidade de 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas amostras e o cultivo foi realizado em anaerobiose em tubos de 27,5 mL como descrito no item 4.19 (Figura 34).

Figura 34 - Fotos mostrando as condições de cultivo em anaerobiose de *E. coli* JW135.

A

B

Em A, cultivo das linhagens selvagem e recombinante de *E. coli* JW135 em frascos de 27,5 mL vedados com tampa de borracha e lacrados com alumínio. Em B, sistema de iluminação do tipo LED em incubadores rotativos.

Para a verificação de produção de hidrogênio, foram coletadas amostras ao longo do tempo de cultivo de *E. coli* JW135/pBB-panPR e de sua respectiva linhagem selvagem, iluminadas ou não. Como se pode observar pelos resultados apresentados na Figura 35, não foi verificada diferença significativa na produção de hidrogênio em nenhuma das condições e linhagens empregadas até 6 dias de experimento. Nestas condições de meio, pH e anaerobiose, sabe-se que a hidrogenase HYD-3 é a responsável pela redução do hidrogênio. Portanto, estes resultados demonstram que a expressão da PR recombinante em *E. coli* JW135 não resultou em maior produção de H₂ por ação da HYD-3, uma vez que, nas condições empregadas, apenas a HYD-3 estava sendo expressa, como explicaremos melhor mais abaixo.

Figura 35 - Produção de hidrogênio pelas linhagens *E. coli* JW135 e JW 135/pBB-panPR cultivadas na presença ou ausência de luz.

Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR e da sua respectiva linhagem selvagem foram cultivadas em meio M9 suplementado com 20 μM de *all-trans* retinal, NiSO_4 25 μM ; Na_2MoO_4 100 μM ; formato de sódio 15 mM; tiamina 0.02 mg/mL e glicose 0,4 %. As amostras foram incubadas sob agitação (150 rpm) a 37 °C durante 6 dias. As amostras cultivadas no claro foram irradiadas com 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A quantidade de hidrogênio de cada amostra foi medida diariamente por CG-TCD. Todos os valores foram representados pela média da triplicata biológica (n= 3).

Ainda não estão estabelecidas as condições fisiológicas em que ocorre a expressão do operon *hyf* de *E. coli* (SELF et al. 2004). Embora este operon contenha todos os genes estruturais, acessórios e de regulação da HYD-4, ele permanece silencioso em condições normais. Para garantir a expressão deste operon, foi introduzido o gene *hyfR* (que codifica o ativador transcricional do operon *hyf*) sob o comando de um promotor heterólogo na linhagem *E. coli* JW135/pBB-panPR. Este gene codifica o ativador HyfR, que promove a expressão significativa do operon *hyf*. Com a co-expressão da PR e do ativador HyfR, células de *E. coli* JW135 apresentaram maior produção de H_2 ao longo do tempo, apenas na presença de luz (Figura 36). Por outro lado, não houve diferença significativa na síntese de H_2 entre as linhagens selvagem e recombinante cultivadas no escuro.

Figura 36 - Produção de hidrogênio pelas linhagens de *E. coli* JW135 e JW135/pBB-panPR+ pWT35S na presença ou ausência de luz.

Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+ pWT35S e da sua respectiva linhagem selvagem foram cultivadas em meio M9 suplementado com 20 μM de *all-trans* retinal, NiSO_4 25 μM ; Na_2MoO_4 100 μM ; formato de sódio 15 mM; tiamina 0.02 mg/mL e glicose 0,4%. As amostras foram incubadas sob agitação (150 rpm) a 37 °C durante 6 dias. As amostras cultivadas no claro foram irradiadas com 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A quantidade de hidrogênio de cada amostra foi medida diariamente por CG-TCD. Todos os valores foram representados pela média da triplicata biológica (n= 3). Foi realizado ANOVA “two way” seguido do pós teste Bonferroni sendo * $p > 0.05$, *** $p > 0.001$ a diferença entre células recombinantes cultivadas no claro ou escuro.

Tanto a linhagem recombinante como a linhagem selvagem foram cultivadas nas mesmas condições de meio, substrato, pH, unidades de absorbância (600 nm) inicial, IPTG e retinal nas concentrações descritas na seção 4.19. O aumento na produção de hidrogênio após 4 dias de cultivo foi de 2,17 vezes entre a linhagem recombinante cultivada na presença de luz e no escuro. Esta diferença diminuiu para 1,35 vezes em 6 dias de cultivo (Figura 36).

A condição essencial para que a proteorrodopsina funcione como uma bomba de prótons é a presença e a interação correta com o cromóforo retinal. Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+ pWT35S foram cultivadas no claro, na presença ou ausência de 20 μM de *all-trans* retinal. Na Figura 37 pode ser observada maior produção de hidrogênio ao longo do tempo (11 dias) pelas células cultivadas na presença do cromóforo, em comparação às células cultivadas sem o retinal. Esta diferença foi altamente significativa ($0,001 > p$) nos

últimos quatro dias, chegando a ser 1,24 vezes maior a produção de H₂ pela linhagem cultivada com o cromóforo.

Figura 37 - Produção de hidrogênio pela linhagem *E. coli* JW 135/ pBB-panPR+ pWT35S sob iluminação, na presença ou ausência de *all-trans* retinal.

Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S foram cultivadas em meio M9 na presença ou ausência de 20 μM de *all-trans* retinal. O meio também foi suplementado com NiSO₄ 25 μM; Na₂MoO₄ 100 μM; formato de sódio 15 mM; tiamina 0.02 mg/mL e glicose 0,4 %. As amostras foram incubadas sob agitação (150 rpm) a 37 °C e irradiadas com 150 μmol photon m⁻² s⁻¹ durante 11 dias. A quantidade de hidrogênio de cada amostra foi medida diariamente por CG-TCD. Todos os valores foram representados pela média da triplicata biológica (n= 3). Foi realizado ANOVA “two way” seguido do pós teste Bonterroni sendo * p >0.05, *** and p >0.001 a diferença entre células recombinantes cultivadas na presença ou ausência do cromóforo.

Este efeito foi também confirmado em células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S cultivadas no claro na presença ou ausência de retinal e no escuro com a adição do cromóforo (Figura 38). Neste experimento a concentração inicial de células recombinantes foi padronizada pelas unidades de absorbância a 600nm e a mesma quantidade de etanol foi adicionada em cada condição uma vez que a solução estoque do cromóforo estava diluída a 50% com etanol. A maior produção de H₂ de 8 a 10 dias de cultivo ocorreu quando as células recombinantes foram cultivadas na presença de luz e *all-trans* retinal exógeno, demonstrando que a PR aumenta a evolução de H₂ quando células de *E. coli* JW135/ pBB-panPR+pWT35S são cultivadas no claro com a adição do

cromóforo. Células recombinantes cultivadas no escuro ou na ausência do retinal apresentaram valores similares de produção de H_2 (Figura 38).

Figura 38 - Produção de hidrogênio pela linhagem recombinante *E. coli* JW135/ pBB-panPR+pWT35S na presença ou ausência de *all-trans* retinal no claro ou no escuro.

Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S foram cultivadas em meio M9 na presença ou ausência de 20 μM de *all-trans* retinal. O meio também foi suplementado com $NiSO_4$ 25 μM ; Na_2MoO_4 100 μM ; formato de sódio 15 mM; tiamina 0,02 mg/mL e glicose 0,4 %. As amostras foram incubadas sob agitação (150 rpm) a 37 °C e, seja irradiadas com 150 $\mu mol\ photon\ m^{-2}\ s^{-1}$, seja no escuro, durante 10 dias. A quantidade de hidrogênio de cada amostra foi medida diariamente por CG-TCD.

6 DISCUSSÃO

6.1 Expressão da proteorrodopsina de SAR86 na bactéria *Cupriavidus necator*

Em virtude da sua capacidade de produzir hidrogenases resistentes ao oxigênio e ser considerada uma bactéria com características interessantes para uso biotecnológico, a bactéria *Cupriavidus necator* foi escolhida inicialmente neste projeto como microrganismo hospedeiro para a expressão da proteorrodopsina de SAR86.

Visando obter níveis significativos de expressão da PR heteróloga em *C. necator*, foi avaliada a força de expressão do promotor sintético *pan* nesta bactéria. Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisas, foi construído o vetor de expressão pBB-*pan*, que mostrou ser capaz de aumentar significativamente a expressão heteróloga em *Cupriavidus metallidurans* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). O promotor *pan* deriva do promotor do gene *mrgA* de *Bacillus subtilis*, bactéria Gram-positiva na qual este promotor controla a expressão de uma proteína relacionada à homeostase de ferro (CHEN; JAMES; HELMANN, 1993). Ao utilizarem o gene repórter *lacZ* sob o comando do promotor de *mrgA*, CHEN; KERAMATI e HELMANN (1995) verificaram que a presença de Mn (II), Fe (II), Co (II) ou Cu (II) reprime a expressão de *lacZ*. A sequência operadora de *mrg*, conhecida como Per Box, está localizada a montante da região -35 e é reconhecida pela proteína reguladora PerR, que utiliza Fe(II) ou Mn(II) para co-repressão (CHEN; KERAMATI; HELMANN, 1995). Entretanto, ao contrário do que acontece em *B. subtilis*, Ribeiro-dos-Santos et al. (2010), verificaram que, sob o comando do promotor *pan*, o gene repórter da EGFP é expresso constitutivamente em *C. metallidurans*, conferindo uma intensidade de fluorescência da GFP muito elevada em comparação ao promotor *lac* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). Além disso, a presença de metais como Co (II), Cd (II), Mn (II), Zn (II), Cu (II) ou Ni (II), ao invés de reprimir, intensifica os níveis de expressão do gene da EGFP em células de *C. metallidurans* transformadas com o plasmídeo pBB-*pan*EGFP. Uma possível explicação para a forte e constitutiva atividade do promotor *pan* em *C. metallidurans* é que em bactérias Gram-negativas o repressor PerR está

ausente. De fato, células de *B. subtilis* com o gene *perR* mutado, apresentaram uma superexpressão do gene *mrgA* na presença de Mn (II) e Fe (II) (BSAT et al., 1998; CHEN; KERAMATI; HELMANN, 1995).

No presente trabalho, foi verificado por análise de citometria de fluxo, que, em *C. necator*, a expressão da EGFP sob o comando do promotor *pan* foi significativamente maior (13,3 vezes) em comparação ao promotor *lac*. Este resultado demonstrou que *pan* é um promotor constitutivo forte também em *C. necator*, assim como ocorre na bactéria *C. metallidurans* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010). Além disto, a adição de 100 μ M de Co (II) e Fe (II) aumentou esta diferença em mais 25% em *C. necator*/pBB-panEGFP. Entretanto, outros metais, como Cu (II) e Mn (II), não incrementaram a expressão da EGFP e concentrações mais elevadas de todos os metais também não resultaram na indução do promotor *pan*. Estes resultados diferem daqueles encontrados para *C. metallidurans*, para a qual foi verificado que a adição de concentrações mais elevadas (1 mM) de Co (II), Fe (II) e de outros metais como Cu (II) e Mn (II) proporciona forte ativação do promotor *pan* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2010).

Após transformar células de *C. necator* DSMZ 545 com o gene da PR sob o comando do promotor *pan* e confirmar a expressão da PR na membrana interna das células transformantes, foram analisadas a sua cinética de crescimento e capacidade de produção de PHB, na presença ou ausência de luz.

A proposta inicial do presente estudo visava a otimização da produção de PHB em *C. necator*/pBB-panPR, por ação de luz no comprimento de onda que é absorvido pela proteorrodopsina. O aumento de H⁺ gerado pela PR, na presença de luz, poderia gerar ATP via ATP sintase, podendo diminuir o consumo de glicose ou aumentar o crescimento de *C. necator* recombinante, assim como a produção de PHB. Este racional se baseou em trabalhos recentes da literatura (KIM et al., 2012) e em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, sobre a expressão da bacteriorrodopsina em *C. necator* (MARQUEZONI, 2012). No presente trabalho, células de *C. necator*, da linhagem recombinante ou da selvagem correspondente, foram cultivadas em meio mineral completo para a obtenção de um alto valor de biomassa. Em seguida, as células foram lavadas e cultivadas em um novo meio mineral na ausência de fonte de nitrogênio e excesso de fonte de carbono (2% de glicose), condições necessárias para

desencadear a produção de PHB, como descrito na literatura (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; OEDING; SCHLEGEL, 1973) . Entretanto, os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas na produção de PHB, e tampouco na taxa de conversão substrato→polímero entre as linhagens recombinante e selvagem. Diante destes resultados, foi questionado se o efeito gerado pela PR recombinante em *C. necator* poderia resultar em aumento de ATP intracelular.

De fato, a expressão heteróloga da PR em *E. coli* aumenta a concentração de ATP intracelular quando as células são iluminadas (MARTINEZ et al., 2007). Células de *C. necator*/pBB-panPR e da sua respectiva linhagem selvagem foram cultivadas em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fonte de carbono, porém não apresentaram maiores concentrações de ATP intracelular, quando iluminadas. Estes resultados indicavam que, apesar da proteorrodopsina recombinante estar sendo expressa na membrana interna de *C. necator*, esta fotoproteína poderia não estar funcionando como bomba de prótons na presença de luz.

Foi então realizado um experimento utilizando a fração de membrana interna de células de *C. necator*/pBB-panPR para verificar a atividade da PR, porém não foi possível detectar o espectro de absorção característico da proteorrodopsina na presença de *all-trans* retinal. Como descrito anteriormente, o cromóforo retinal se liga covalentemente à a proteína proteorrodopsina. Na presença de luz, o *all-trans* retinal se isomeriza, desencadeando um ciclo de reações que ao final retorna ao seu estado conformacional inicial. Os diferentes estados conformacionais durante este ciclo são os intermediários denominados K, M, N e O, que absorvem na faixa de luz verde, apresentando um pico a 520 nm (DIOUMAIEV et al., 2002; LENZ et al., 2010).

Frielingsdorf et al. (2011) demonstraram que o citocromo b₅₆₂, presente na membrana interna de *C. necator*, absorve na faixa entre 532 a 562 nm, dependendo do estado de oxidação desta proteína. Esta proteína de membrana poderia interferir no perfil característico de absorção da PR complexada com retinal. No entanto, mesmo após a purificação da proteorrodopsina, não foi observado o espectro de absorção dos intermediários na faixa da luz verde. Como controle positivo do experimento, a PR produzida em *E. coli* também foi purificada pelo mesmo método, tendo apresentado o perfil característico de absorção na presença do cromóforo. Na literatura, há relatos de que a expressão funcional de

rodopsinas heterólogas nem sempre é obtida com sucesso (DELONG; BÉJÀ, 2010; KARNIK et al., 1990) .

A bacteriorrodopsina (BR) é uma rodopsina produzida por algumas arqueias e foi a primeira rodopsina microbiana a ter sua estrutura resolvida. Entretanto, não se obteve expressão da BR funcional em *E. coli* (KARNIK et al., 1990). Foi verificado que a expressão heteróloga da bacteriorrodopsina em *E. coli* ocorre tanto na membrana interna como na membrana externa, porém a sua interação com o retinal é extremamente baixa 1-2% (BRAIMAN et al., 1987). Num outro estudo, a sequência sinal N-terminal da BR de *H. salinarum* foi removida e em seu lugar foi adicionada a sequência sinal da lipoproteína Lpp de *E. coli*. Quando a sequência sinal da Lpp-BR foi processada (50% da expressão total da Lpp-BR), a BR recombinante foi localizada na membrana citoplasmática de *E. coli*. Assim, tanto o reconhecimento da sequência de peptídeo sinal como o processamento desta região pela maquinaria celular do organismo hospedeiro são essenciais para a correta localização das proteínas de membrana recombinantes. Mesmo assim, a BR recombinante presente na membrana citoplasmática interagiu apenas 20% com o cromóforo retinal (KARNIK et al., 1990).

Estudos posteriores revelaram a importância da composição lipídica da membrana para o correto enovelamento da BR (JOSHI et al., 1998). A proporção correta de glicerolfosfatos e outros lipídeos parece ser importante para que a apoproteína bacteriorrodopsina apresente o sitio de interação com o retinal. A pressão lateral exercida pelos componentes da membrana parece ser essencial para as primeiras etapas de enovelamento da BR (Figura 39B), principalmente na aproximação das 7 alfa hélices integrais de membrana quando o retinal ainda não está presente (Figura 39A). O cromóforo interage inicialmente por interações hidrofóbicas (IR) e somente depois se liga covalentemente ao resíduo de lisina 216, via base de Schiff (Figura 24A) (BOOTH et al., 1995; BOOTH, 1997).

Figura 39 - Esquema representativo das etapas do enovelamento da bacteriorrodopsina.

Em A, esquema mostrando que a bacteriorrodopsina possui 7 domínios transmembrana (I_O). O cromóforo retinal interage por interações hidrofóbicas com a apoproteína BR (I_R). O retinal se liga covalentemente à BR no resíduo 216 de lisina via base de Schiff. Em B, importância da pressão lateral exercida pelos lipídeos presentes na membrana citoplasmática para o enovelamento da BR.

Fonte: Booth et al. (1995); Booth (1997).

De maneira análoga, a expressão da proteorrodopsina heteróloga em *Cupriavidus necator* pode não ter resultado em uma proteína ativa, devido à composição de lipídeos diferenciada da membrana citoplasmática. O gene da PR utilizado neste trabalho provém do clado metagenômico SAR86, que pertence ao grupo das gama-bactérias, assim como *E. coli*, já descrita na literatura como sendo capaz de expressar a PR recombinante funcional. *C. necator*, por sua vez, pertence ao grupo das beta-proteobactérias, o que talvez possa explicar porque a expressão da PR funcional tenha sido encontrada apenas na bactéria *E. coli*. Em vista da ausência de funcionalidade da PR heteróloga em *C. necator*, decidimos concentrar esforços no sentido de detectar efeitos ainda não descritos da PR heteróloga em *E. coli*.

6.2 Expressão da proteorrodopsina da SAR86 na bactéria *Escherichia coli*

No presente trabalho, foi estudada a expressão da PR heteróloga de SAR86 em *E. coli* sob o comando do promotor *pan*. Diferentemente do que verificamos para *C. necator*, a força de expressão do promotor *pan* em *E. coli* é menor comparada à do promotor *lac* em presença do indutor IPTG. Além disso, a adição de metais não afeta a expressão do gene repórter *egfp* (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. 2010). Na verdade, com o objetivo de otimizar um determinado processo metabólico, nem sempre a super-expressão ou supressão total de um gene é considerada a situação ideal, de modo que, promotores de fraca expressão e constitutivos vêm sendo bastante utilizados (JENSEN; HAMMER, 1998).

Diferentes linhagens de *E. coli* foram aqui utilizadas como hospedeiras do plasmídeo portador do gene da PR sob o comando do promotor *pan*. Embora a PR tenha sido expressa em todas essas linhagens, para aprofundar o estudo do efeito da expressão da PR sobre a produção de hidrogênio, foi escolhida a linhagem *E. coli* JW135, na qual os genes das hidrogenases HYD-1 e HYD-2 estão ausentes. Isto porque, das quatro hidrogenases que *E. coli* produz, HYD-1 e HYD-2 são conhecidas por catalisarem preferencialmente a oxidação do H₂.

O primeiro estudo com células de *E. coli* JW135/pBB-panPR foi realizado em meio mineral M9 suplementado com formato, em anaerobiose. Nestas condições, já está descrito na literatura que apenas a HYD-3 está ativa (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2001; 2004). Entretanto, não foi possível observar maior produção de H₂ na linhagem recombinante em comparação à linhagem selvagem, seja no claro, seja no escuro. Estes resultados indicam que o gradiente de prótons gerado pela ação da PR na presença de luz não causa um efeito de produção de H₂ pela HYD-3. Como a linhagem *E. coli* JW135 não produz HYD-1 nem HYD-2, o próximo passo do projeto teve como objetivo averiguar se a produção de H₂ pela HYD-4 seria aumentada pela ação da PR.

A HYD-4 só foi identificada quando o genoma completo de *E. coli* foi sequenciado (BLATTNER et al., 1997). Durante a anotação, foi verificada a presença de um operon contendo genes com alta identidade aos genes do operon *hyc* (que codifica a HYD-3), que foi denominado *hyf*. Entretanto, como não se conheciam as condições fisiológicas que desencadeiam a sua expressão, o

operon *hyf* vinha sendo considerado como um operon silencioso. Há indicações que a HYD-4 faz parte do segundo complexo formato hidrogenolase FHL-2 em *E. coli*. No entanto, excesso de formato tanto em condições aeróbias como anaeróbias não induz a expressão do operon *hyf*. Estudos utilizando células de *E. coli* transformadas com a construção *hyf-lacZ* avaliaram diferentes condições para a expressão do operon *hyf* pela atividade da β -galactosidase (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2004; SKIBINSKI et al., 2002). Tanto em condições alcalinas como ácidas, a expressão de *hyf-lacZ* é bastante baixa (15 unidades) e a adição de formato gera um pequeno incremento nesta expressão (50 unidades). A expressão elevada de *hyfA-lacZ* só foi obtida pela expressão do ativador transcricional HyfR sob controle de um promotor heterólogo. O gene deste ativador, *hyfR*, está presente no operon *hyf*, entretanto, como descrito anteriormente, não se conhecem ainda as condições fisiológicas nas quais a sua expressão ocorre. A presença do HyfR em células de *E. coli* *hyfA-lacZ* aumenta para 8.100 unidades a atividade da β -galactosidase. É interessante notar que a presença deste ativador não induz a expressão do operon *hyc* nas células de *E. coli* hospedando a fusão *hyc-lacZ* mesmo na presença de formato (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2004). Apesar de apresentar 44% de identidade e 54% de similaridade com o ativador FhlA, HyfR não possui a região N-terminal de FhlA. Esta região é responsável pela modulação da atividade transcricional e de interação com formato (SELF; HASONA; SHANMUGAM, 2001).

Para garantir a expressão do operon *hyf*, células de *E. coli* JW135/pBB-panPR foram transformadas com o plasmídeo pWTS35 (gentilmente cedido por William T. Self). Como descrito anteriormente nos trabalhos publicados por este grupo, a superexpressão do ativador HyfR sob o comando do promotor heterólogo *trc*, induz a expressão do operon *hyf*. Com efeito, verificamos que as células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S cultivadas sob iluminação apresentaram um aumento significativo na produção de H₂ em comparação às células recombinantes cultivadas no escuro.

Sete dos dez genes presentes no operon *hyf* possuem uma alta identidade com genes do operon *hyc*. No entanto, três genes do *hyf* codificam HyfB, HyfD e HyfF, que são subunidades exclusivas da HYD-4 que pertencem à família de proteínas transmembrana translocadoras de prótons NADH-ubiquinona (ANDREWS et al., 1997). Esta diferença de composição de subunidades entre

HYD-3 e HYD-4 poderia explicar o aumento de produção de H_2 pela HYD-4. O excesso de prótons produzido pela PR ao se iluminar células de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S resultaria em um maior $[\Delta\mu_{H^+}]$ e incremento na produção de H_2 .

Kim et al. (2012) também obtiveram maior produção de H_2 na presença de luz, ao co-expressar a PR e a hidrogenase de *Hydrogeniomarinus marinus* em *E. coli*. A hidrogenase recombinante utilizada pertence ao tipo I MBHs. Apesar de serem mais conhecidas por catalisarem a oxidação do hidrogênio, sob certas condições, as hidrogenases deste grupo já foram descritas por reduzirem hidrogênio. A própria HYD-1 de *E. coli*, que também pertence ao tipo I, apresenta uma alta taxa redução/oxidação de H_2 em meio ácido (FRANCIS et al., 1990). Já está estabelecido na literatura que estas hidrogenases são $\Delta\mu_{H^+}$ dependentes e que algumas subunidades deste grupo de MBH são da família de proteínas transmembrana translocadoras de prótons. Isto vai ao encontro dos resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que o gradiente de prótons gerado pela PR pode ser utilizado por uma hidrogenase $\Delta\mu_{H^+}$ dependente.

Alguns estudos descrevem que em *E. coli* durante a fermentação, ou seja, na ausência de respiração aeróbia e anaeróbia e fosforilação oxidativa, a F_0F_1 ATPase inverte sua atividade, bombeando prótons para o espaço periplasmático associado à passagem de compostos secundários (TRCHOUNIAN et al., 2011). Bagramyan et al. (2002) demonstraram que a inibição da F_0F_1 ATPase por N,N-dicyclohexylcarbodiimida (DCCD) ou por *atpB-D* mutantes defectivos em células de *E. coli* reduz completamente a produção de H_2 pela HYD-4. Por outro lado, a redução de H_2 pela HYD-3 não é afetada pela presença de DCCD, o que sugere que esta hidrogenase não é $\Delta\mu_{H^+}$ dependente. Apesar de que, neste mesmo estudo, células de *E. coli* sem *atpB-D* tiveram a produção de H_2 diminuída em 50%.

Ao utilizar glicose como fonte de carbono em condições de anaerobiose, duas moléculas de piruvato são formadas no final da glicólise. O piruvato pode ser fermentado a lactato (pela lactato desidrogenase), acetato (piruvato oxidase) ou reduzido a acetilCoA por ação da enzima piruvato formato liase (PFL), gerando também 2 moléculas de formato. A acetilCoA poderá ser fermentada a etanol ou acetato. O formato poderá ser oxidado a CO_2 via FHL-1, gerando como subproduto duas moléculas de H_2 (Figura 40). Assim, o máximo teórico obtido a

cada 1 mol de glicose seria 2 moles de H_2 . Neste caso, a fermentação do piruvato a lactato e piruvato a acetato via piruvato oxidase não ocorreriam.

Figura 40 - Vias metabólicas durante a fermentação de *E. coli*.

Via metabólica de assimilação de glicose durante a fermentação de *E. coli*. Ao final da glicólise, o piruvato pode ser reduzido a lactato pela lactato desidrogenase (LdhA), convertido a acetato via piruvato oxidase (PoxB). O piruvato também pode ser oxidado a acetilCoA e formiato pela piruvato formiato liase (PFL). A acetilCoA pode ser convertida a etanol pela enzima álcool desidrogenase (AdhE). O formiato é oxidado a CO_2 pelo complexo Fdh-1 (complexo HYD-3 e formiato desidrogenase). Acoplado a esta reação, o hidrogênio é reduzido a H_2 .

Fonte: HALLENBECK (2009)

Na Tabela 6, está apresentada a comparação de rendimento em moles de substrato/ H_2 entre diversas linhagens recombinantes de *E. coli*. Entretanto, tal comparação fica dificultada, uma vez que os dados presentes na literatura variam muito com relação ao tipo de meio utilizado, assim como modo de cultivo, quantidade inicial de células no cultivo, etc. Os dados apresentados por Chittibabu; Nath e Das (2006); Yoshida et Al. (2006); Maeda; Sanchez-Torres e Wood (2007) apresentam altos valores de rendimento glicose $\rightarrow H_2$, entretanto, os meios de cultivo utilizados foram completos (ricos em peptídeos, extrato de levedura), o que torna a comparação com o rendimento em células cultivadas em meio mineral inviável. Além disso, nos dois primeiros trabalhos citados, o hidrogênio produzido foi sendo constantemente retirado do sistema, mantendo baixa a pressão parcial do H_2 . Esta condição é relevante, uma vez que

concentrações mais elevadas de hidrogênio inibem a ação da hidrogenase para catalisar a redução de H_2 .

Tabela 6 - Comparação entre diferentes linhagens de *E. coli* rembinantes e selvagens quanto ao rendimento (mol H_2 / mol glicose) e tipo de meio utilizado.

Linhagem	Super-expressão	Genes removidos	Rendimento mol H_2 /mol glicose	Tipo de meio	Referência
<i>E. coli</i> BW25113	<i>fhlA</i> endógena	$\Delta hyaB$ $\Delta hybC$ $\Delta hycA$ $\Delta fdoG$ $\Delta frdC$ $\Delta ldhA$ $\Delta aceE$	1,3	Completo/completo	Maeda et al (2007)
<i>E. coli</i> SR15		$\Delta ldhA$, $\Delta rdbC$	1,8	Mineral / completo	Yoshida et al. (2006)
<i>E. coli</i> BL21	<i>hydA</i> de <i>E. cloacae</i>		3,1	Completo/completo	Chittibabu et al. (2006)
<i>E. coli</i> MC4100			0,764	Completo/mineral	Redwood et al. (2006)
<i>E. coli</i> FTD67		$\Delta hybC$	1,024	Completo/mineral	Redwood et al.(2006)
<i>E. coli</i> FTD22		$\Delta hyaB$	0,8	Completo/mineral	Redwood et al. (2006)
<i>E. coli</i> JW135	<i>hoxFUYHWI</i> <i>hypA2B2F2</i> de <i>C. necator</i>	$\Delta hyaB$ $\Delta hybC$ $\Delta adhE$, $\Delta ldhA$, $\Delta arcA$	2,1	Mineral	Ghosh et al. (2013)
<i>E. coli</i> JW135		$\Delta hyaB$ $\Delta hybC$	0,57	Mineral	Este trabalho
<i>E. coli</i> JW135	<i>prd</i> <i>hyfR</i>	$\Delta hyaB$ $\Delta hybC$	0,83	Mineral	Este trabalho

No trabalho de Redwood et al. (2008), células de *E. coli*, do tipo selvagem ou mutantes deficientes para *hyaB* ou *hybC* cultivadas em meio mineral, apresentaram 0,764-1,024 mol H_2 /mol glicose, respectivamente. No presente trabalho, o rendimento foi de 0,83 mol H_2 /mol glicose, para a linhagem de *E. coli* JW135/pBB-panPR+pWT35S e 0,57 mol H_2 /mol glicose para a respectiva linhagem selvagem. Uma possível explicação para esta diferença é a concentração inicial de células. Em nossos experimentos, utilizamos culturas com Abs_{600nm} inicial de 0,1 a 0,13, enquanto no trabalho de Redwood et al. (2008), as células foram crescidas em meio completo, lavadas e cultivadas em meio mineral com Abs_{600nm} inicial de 1,0.

No caso do trabalho de Ghosh et al. (2013), foram empregadas células de *E. coli* que tiveram diversos genes essenciais na fermentação do lactato (*ldhA*), álcool (*adhE*) e para a expressão de genes do ciclo de Krebs ou TCA (*araC*) inativados. Todas essas modificações resultam em maior concentração de NADH, que por sua vez, pode ser utilizado como agente redutor para a produção de H₂ pela expressão heteróloga da hidrogenase solúvel de *Ralstonia eutropha*, a SH hidrogenase. Neste trabalho, o máximo teórico de 2 mol H₂/mol glicose pode ser ultrapassado devido a modificações genéticas introduzidas nas células de *E. coli*. A expressão heteróloga da SH hidrogenase dependente de NADH possibilitou a redução de H₂ por uma via não encontrada em *E. coli*.

Devido às diferenças experimentais citadas acima, a avaliação da eficácia de produção de H₂ pela linhagem construída no presente trabalho em relação aos dados da literatura é inconclusiva. Entretanto, o que se pode concluir neste trabalho é que células de *E. coli* JW 135 expressando simultaneamente a PR de SAR86 e a hidrogenase endógena HYD-4 (ativador HyfR sob o controle do promotor heterólogo *trc*) apresentam maior produção de H₂ em relação à respectiva linhagem selvagem, apenas quando iluminadas, o que evidencia a importância da presença da proteorrodopsina na produção de H₂ por ação da HYD-4.

Na Figura 41, apresenta-se um esquema ilustrativo do processo que possivelmente esteja ocorrendo nas células da linhagem de *E. coli* JW135/ pBB-panPR+pWT35S. Nesta linhagem, as duas hidrogenases relacionadas preferencialmente com oxidação de H₂ foram removidas HYD-1 (E) e HYD-2 (D). Na presença de luz, a proteorrodopsina (A) bombeia prótons do citoplasma para o periplasma. O excesso de prótons aumenta a produção de H₂ via HYD-4 (B), entretanto, isso não ocorre com a HYD-3 (C). Na ilustração inferior, as subunidades de ambas as isoenzimas foram identificadas. Três subunidades, HyfB, HyfD e HyfF, que estão presentes apenas na HYD-4, fazem parte da família de proteínas translocadoras de prótons NADH ubiquinona oxiredutase. Estas subunidades poderiam promover o acesso de prótons gerados pela PR, do periplasma ao sítio catalítico da HYD-4, que está voltado para o citoplasma.

Figura 41 - Modelo proposto neste trabalho para a produção de H_2 pelas células de *E. coli* JW135/ pBB-panPR+pWT35S .

Células de *E. coli* JW135 expressando a PR do isolado SAR86 cultivadas em anaerobiose em meio mineral contendo glicose e formato. Nesta linhagem, HYD-1(E) e HYD-2(D) foram removidas. Na presença de luz, o gradiente de prótons na face externa da membrana plasmática é aumentado por ação da PR (Figura superior). Este excesso de prótons pode aumentar a evolução do H_2 apenas pela HYD-4 (B) durante a fermentação uma vez que as subunidades exclusivas da HYD-4, HyfBDF, permitiriam o acesso dos prótons presentes no periplasma ao sítio catalítico da enzima (Figura inferior). A HYD-3 (C) possui o sítio catalítico voltado para o citoplasma (Figura inferior) e não possuem acesso ao gradiente de prótons presentes no periplasma.

Fonte: Adaptado de Andrews et al. (1997). Ilustrado por Cristiane Yuri Honna.

7 CONCLUSÕES

Frente aos objetivos propostos, os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- O promotor sintético *pan* apresenta uma expressão forte e constitutiva em células de *C. necator* DSMZ 545, quantificada pela expressão do gene repórter da *egfp*. Células expressando a EGFP sob o comando do promotor *pan* apresentam uma intensidade de fluorescência 13,3 vezes maior em relação às células hospedando o vetor pBBlacEGFP (promotor *lac*).
- Os metais Fe (III) ou Co (II), quando presentes a uma concentração final de 100 mM, aumentam a expressão da EGFP em 25% em células de *C. necator*/pBB-*pan*EGFP. Concentrações mais altas destes metais não resultam em maior expressão do gene repórter. Por outro lado, diferentemente do que fora observado em trabalhos anteriores para *C. metallidurans*, Cu (II) ou Mn (II) não aumentam a intensidade de fluorescência da EGFP em *C. necator*/pBB-*pan*EGFP.
- O plasmídeo pBB-*pan*PR foi construído a partir da inserção do gene *prd* que codifica a proteorrodopsina (PR) do isolado SAR86, adicionado de sítios de restrição específicos e de uma sequência que codifica o epítipo V5-tag, no vetor de expressão pBB-*pan*. A expressão da PR na membrana interna de células de *C. necator* DSMZ 545 e *E. coli* JW135 transformadas com o plasmídeo pBB-*pan*PR foi confirmada por Western Blotting, utilizando como sonda o anticorpo primário V5.
- O plasmídeo apresenta estabilidade nas células transformantes, mantendo-se por até 22 gerações em meio não seletivo.
- Células de *C. necator* DSMZ 545/pBB-*pan*PR e da respectiva linhagem selvagem não apresentam diferenças significativas quanto a cinética de crescimento, produção de ATP intracelular, produção de PHB por peso seco, taxa de conversão substrato/PHB+Biomassa e síntese de H₂ na presença ou ausência de luz e retinal.
- A proteorrodopsina recombinante produzida em células de *C. necator* DSMZ 545 não apresenta os intermediários da PR na presença de *all-trans* retinal, enquanto a PR presente na fração de membrana interna de células de *E. coli* JW135 apresenta o espectro de absorção característico dos intermediários da PR, com um pico em 520 nm após a adição do cromóforo.

- Células de *E. coli* JW135/pBB-panPR e sua respectiva linhagem selvagem, cultivadas em meio mineral M9 contendo glicose e formato em anaerobiose, apresentam produção semelhante de H₂ por ação da HYD-3 endógena na presença ou ausência de luz e retinal.
- A expressão da hidrogenase endógena HYD-4 nas células de *E. coli* JW135/pBB-panPR foi obtida por meio da expressão do ativador HyfR sob comando do promotor heterólogo *trc*. Células da linhagem recombinante JW135/pBB-panPR+pWT35S apresentam um aumento da produção de H₂ de até 2,17 vezes na presença de luz, em comparação às células cultivadas no escuro. Não há diferença significativa na síntese de H₂ entre as linhagens, selvagem e recombinante, cultivadas no escuro. Além disso, as células recombinantes cultivadas no claro produzem mais H₂ na presença do cromóforo.
- A utilização da energia luminosa, por meio da ação da proteorrodopsina, aumenta a eficiência da produção de hidrogênio em bactérias produtoras de hidrogenases, constituindo uma abordagem promissora, com potencial de contribuir para a viabilidade econômica da utilização do H₂ como combustível alternativo e renovável.

REFERÊNCIAS*

ANSORGE, W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.11, p. 13-20, 1985.

ALBERTS, B.; WILSON, J. H.; HUNT, T. Estrutura da membrana. In:___ (eds.) 5. ed. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2008. cap. 10, p. 629-650.

ALZATE-GAVIRIA, L. M.; SEBASTIAN, P. J.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, A.; EAPEN, D. Comparison of two anaerobic systems for hydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste and synthetic wastewater. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 32, p. 3141-3146, 2007.

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

ANDREWS, S. C.; BERKS, B. C.; MCCLAY, J.; AMBLER, A.; QUAIL, M. A.; GOLBY, P.; GUEST, J. R. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. **Microbiology**, v. 143, p. 3633-3647, 1997.

ASADA, Y.; TOKUMOTO, M.; AIHARA, Y.; OKU, M.; ISHIMI, K.; WAKAYAMA, T.; MIYAKE, J.; TOMIYAMA, M.; KOHNO, H. Hydrogen production by co-cultures of *Lactobacillus* and a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* RV. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1509-1513, 2006.

BAGRAMYAN, K.; MNATSAKANYAN, N.; POLADIAN, A.; VASSILIAN, A.; TRCHOUNIAN, A. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F0F1-ATPase, in H₂ production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. **FEBS Letters**, v. 516, p. 172-178, 2002.

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. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, p. 144-164, 1997.

BÉJÀ, O.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; SUZUKI, M. T.; HADD, A.; NGUYEN, L. P.; JOVANOVICH, 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.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 293-300, 1951.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 8034-8039, 1999

BISAILLON, A.; TURCOT, J.; HALLENBECK, P. C. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 1504-1508, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G., 3RD; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, p. 1453-1462, 1997.

BOOTH, P. J. Folding alpha-helical membrane proteins: kinetic studies on bacteriorhodopsin. **Folding and Design**, v. 2, p. 85-92, 1997.

BOOTH, P. J.; FLITSCH, S. L.; STERN, L. J.; GREENHALGH, D. A.; KIM, P. S.; KHORANA, H. G. Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 2, p. 139-143, 1995.

BRAIMAN, M. S.; STERN, L. J.; CHAO, B. H.; KHORANA, H. G. Purification and renaturation of bacterio-opsin polypeptide expressed in *Escherichia coli* (IV). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 9271-9276.

BRENNER, M.; BILDSTEN, L.; DYSON, F.; FORTSON, N.; GARWIN, R.; GROBER, R.; HEMLEY, R.; HWA, T.; JOYCE, G.; KATZ, J. **Engineering Microorganisms for Energy Production**. Department of Energy. Washington. 2006. p. 83.

BSAT, N.; HERBIG, A.; CASILLAS-MARTINEZ, L.; SETLOW, P.; HELMANN, J. D. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 189-198, 1998.

BURGDORF, T.; LENZ, O.; BUHRKE, T.; VAN DER LINDEN, E.; JONES, A. K.; ALBRACHT, S. P.; FRIEDRICH, B. [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 181-196, 2005.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CHEN, C. C.; LIN, C. Y.; CHANG, J. S. Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 56-64, 2001.

CHEN, L.; JAMES, L. P.; HELMANN, J. D. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 5428-5437, 1993.

CHEN, L.; KERAMATI, L.; HELMANN, J. D. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 8190-8194, 1995.

CHITTIBABU, G.; NATH, K.; DAS, D. Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 682-688, 2006.

DAS, D.; VEZIROGLU, T. N. Advances in biological hydrogen production processes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DAVIS, R. W.; BOTSTEIN, D.; ROTH, J. R.; LABORATORY, C. S. H. **Advanced bacterial genetics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.

DE LACEY, A. L.; FERNANDEZ, V. M.; ROUSSET, M.; CAMMACK, R. Activation and inactivation of hydrogenase function and the catalytic cycle: spectroelectrochemical studies. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 4304-4330, 2007.

DELONG, E. F.; BÉJÀ, O. The light-driven proton pump proteorhodopsin enhances bacterial survival during tough times. **PLoS Biology**, v. 8, p. e1000359, 2010.

DIOUMAEV, A. K.; BROWN, L. S.; SHIH, J.; SPUDICH, E. N.; SPUDICH, J. L.; LANYI, J. K. Proton transfers in the photochemical reaction cycle of proteorhodopsin. **Biochemistry**, v. 41, p. 5348-5358, 2002.

DU, G.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 59-65, 2001.

DUPONT, C. L.; RUSCH, D. B.; YOOSEPH, S.; LOMBARDO, M. J.; RICHTER, R. A.; VALAS, R.; NOVOTNY, M.; YEE-GREENBAUM, J.; SELENGUT, J. D.; HAFT, D. H.; HALPERN, A. L.; LASKEN, R. S.; NEALSON, K.; FRIEDMAN, R.; VENTER, J. C. Genomic insights to SAR86, an abundant and uncultivated marine bacterial lineage. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1186-1199, 2012.

ERNST, O. P.; LODOWSKI, D. T.; ELSTNER, M.; HEGEMANN, P.; BROWN, L. S.; KANDORI, H. Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 126-163, 2014.

FANG, H. H. P.; ZHU, H.; ZHANG, T. Phototrophic hydrogen production from glucose by pure and co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2223-2230, 2006.

FOX, J. D.; KERBY, R. L.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1515-1524, 1996.

FRANCE-PRESSE, A. **Toyota anuncia lançamento de carro a hidrogênio em 2015**. Folha de São Paulo. São Paulo 26/06/2014.

FRANCIS, K.; PATEL, P.; WENDT, J. C.; SHANMUGAM, K. T. Purification and characterization of two forms of hydrogenase isoenzyme 1 from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 5750-5757, 1990.

FRIEDRICH, B.; FRITSCH, J.; LENZ, O. Oxygen-tolerant hydrogenases in hydrogen-based technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 358-364, 2011.

FRIELINGS DORF, S.; SCHUBERT, T.; POHLMANN, A.; LENZ, O.; FRIEDRICH, B. A Trimeric Supercomplex of the Oxygen-Tolerant Membrane-Bound [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. **Biochemistry**, v. 50, p. 10836-10843, 2011.

FUHRMAN, J. A.; SCHWALBACH, M. S.; STINGL, U. Proteorhodopsins: an array of physiological roles? **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 488-494, 2008.

GHOSH, D.; BISAILLON, A.; HALLENBECK, P. C. Increasing the metabolic capacity of *Escherichia coli* for hydrogen production through heterologous expression of the *Ralstonia eutropha* SH operon. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 122-132, 2013.

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.

GOLDET, G.; BRANDMAYR, C.; STRIPP, S. T.; HAPPE, T.; CAVAZZA, C.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.; ARMSTRONG, F. A. Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 14979-14989, 2009.

GOLDET, G.; WAIT, A. F.; CRACKNELL, J. A.; VINCENT, K. A.; LUDWIG, M.; LENZ, O.; FRIEDRICH, B.; ARMSTRONG, F. A. Hydrogen production under aerobic conditions by membrane-bound hydrogenases from *Ralstonia* species. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 11106-11113, 2008.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Producao de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (eds.). **Biotecnologia industrial - Volume III- Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, cap. 10, p. 219-248.

GOMEZ-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 Biology**, v. 8, p. e1000358, 2010.

GOMEZ-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.

GOURDON, P.; ALFREDSSON, A.; PEDERSEN, A.; MALMERBERG, E.; NYBLOM, M.; WIDELL, M.; BERNTSSON, R.; PINHASSI, J.; BRAIMAN, M.; HANSSON, O.; BONANDER, N.; KARLSSON, G.; NEUTZE, R. Optimized in vitro and in vivo expression of proteorhodopsin: a seven-transmembrane proton pump. **Protein Expression and Purification**, v. 58, p. 103-113, 2008.

HALLENBECK, P. C. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 7379-7389, 2009.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 287-297, 2009.

HALLENBECK, P. C.; GHOSH, D.; SKONIECZNY, M. T.; YARGEAU, V. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 48-59, 2009.

HEBERLE, J.; RIESLE, J.; THIEDEMANN, G.; OESTERHELT, D.; DENCHER, N. A. Proton migration along the membrane surface and retarded surface to bulk transfer. **Nature**, v. 370, p. 379-382, 1994.

HENDERSON, R.; BALDWIN, J. M.; CESKA, T. A.; ZEMLIN, F.; BECKMANN, E.; DOWNING, K. H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v. 213, p. 899-929, 1990.

HOHENFELD, I. P.; WEGENER, A. A.; ENGELHARD, M. Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 442, p. 198-202, 1999.

HUSSY, I.; HAWKES, F. R.; DINSDALE, R.; HAWKES, D. L. Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 619-626, 2003.

INOUE, K.; KATO, Y.; KANDORI, H. Light-driven ion-translocating rhodopsins in marine bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, p. 91-98. 2015.

IPCC. **CLIMATE CHANGE 2014**. Cambridge, United Kingdom e New York: Cambridge University Press, 2014. p.132.

JENSEN, P. R.; HAMMER, K. The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 82-87, 1998.

JEONG, H.; BARBE, V.; LEE, C. H.; VALLENET, D.; YU, D. S.; CHOI, S.-H.; COULOUX, A.; LEE, S.-W.; YOON, S. H.; CATTOLICO, L.; HUR, C.-G.; PARK, H.-S.; SÉGURENS, B.; KIM, S. C.; OH, T. K.; LENSKE, R. E.; STODIER, F. W.; DAEGELE, P.; KIM, J. F. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 394, p. 644-652, 2009.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4123-4129, 2010.

JOSHI, M. K.; DRACHEVA, S.; MUKHOPADHYAY, A. K.; BOSE, S.; HENDLER, R. W. Importance of specific native lipids in controlling the photocycle of bacteriorhodopsin. **Biochemistry**, v. 37, p. 14463-14470, 1998.

KARNIK, S.; DOI, T.; MOLDAY, R.; KHORANA, H. G. Expression of the archaeobacterial bacterio-opsin gene with and without signal sequences in *Escherichia coli*: the expressed proteins are located in the membrane but bind retinal poorly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 8955-8959, 1990.

KIM, J. Y.; JO, B. H.; JO, Y.; CHA, H. J. Improved production of biohydrogen in light-powered *Escherichia coli* by co-expression of proteorhodopsin and heterologous hydrogenase. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 2-7, 2012.

KOVACH, M. E.; PHILLIPS, R. W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M., 2ND; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, p. 800-802, 1994.

KUHN, M.; STEINBUCH, A.; SCHLEGEL, H. G. Hydrogen evolution by strictly aerobic hydrogen bacteria under anaerobic conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 159, p. 633-639, 1984.

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

LANYI, J. K.; LUECKE, H. Bacteriorhodopsin. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, p. 415-419, 2001.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, A.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GINSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LAY, J.-J. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 269-278, 2000.

LENZ, M. O.; HUBER, R.; SCHMIDT, B.; GILCH, P.; KALMBACH, R.; ENGELHARD, M.; WACHTVEITL, J. First Steps of Retinal Photoisomerization in Proteorhodopsin. **Biophysical Journal**, v. 91, p. 255-262, 2006.

LENZ, O.; FRIEDRICH, B. A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 12474-12479, 1998.

LENZ, O.; GLEICHE, A.; STRACK, A.; FRIEDRICH, B. Requirements for heterologous production of a complex metalloenzyme: the membrane-bound [NiFe] hydrogenase. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6590-6595, 2005.

LENZ, O.; LUDWIG, M.; SCHUBERT, T.; BURSTEL, I.; GANSKOW, S.; GORIS, T.; SCHWARZE, A.; FRIEDRICH, B. H₂ conversion in the presence of O₂ as performed by the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. **Chemphyschem**, v. 11, p. 1107-1119, 2010.

LEVIN, D. B.; PITT, L.; LOVE, M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 29, p. 173-185, 2004.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MAEDA, T.; SANCHEZ-TORRES, V.; WOOD, T. K. Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 879-890, 2007.

MAKKAR, N. S.; CASIDA, L. E. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil†. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 323-326, 1987.

MAN, D.; WANG, W.; SABEHI, G.; ARAVIND, L.; POST, A. F.; MASSANA, R.; SPUDICH, E. N.; SPUDICH, J. L.; BÉJÀ, O. Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. **Embo Journal**, v. 22, p. 1725-1731, 2003.

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

MARTINEZ, A.; BRADLEY, A. S.; WALDBAUER, J. R.; SUMMONS, R. E.; DELONG, E. F. Proteorhodopsin photosystem gene expression enables photophosphorylation in a heterologous host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 5590-5595, 2007.

MENON, N. K.; CHATELUS, C. Y.; DERVARTANIAN, M.; WENDT, J. C.; SHANMUGAM, K. T.; PECK, H. D.; PRZYBYLA, A. E. Cloning, sequencing, and mutational analysis of the *hyb* operon encoding *Escherichia coli* hydrogenase 2. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 4416-4423, 1994.

MENON, N. K.; ROBBINS, J.; WENDT, J. C.; SHANMUGAM, K. T.; PRZYBYLA, A. E. Mutational analysis and characterization of the *Escherichia coli* *hya* operon, which encodes [NiFe] hydrogenase 1. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4851-4861, 1991.

MESELSON, M.; YUAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.

MIZUNO, O.; DINSDALE, R.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; NOIKE, T. Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 59-65, 2000.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism. **Biochemistry Journal**, v. 134, p. 239-248, 1973.

OESTERHELT, D. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 489-500, 1998.

OESTERHELT, D.; STOECKENIUS, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. **Nature**, v. 233, p. 149-152, 1971.

OH, H.-M.; KWON, K. K.; KANG, I.; KANG, S. G.; LEE, J.-H.; KIM, S.-J.; CHO, J.-C. Complete Genome Sequence of "*Candidatus Puniceispirillum marinum*" IMCC1322, a Representative of the SAR116 Clade in the Alphaproteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 3240-3241, 2010.

OZAKI, Y.; KAWASHIMA, T.; ABE-YOSHIKUNI, R.; KANDORI, H. A Color-Determining Amino Acid Residue of Proteorhodopsin. **Biochemistry**, v. 53, p. 6032-6040, 2014.

PINSKE, C.; SAWERS, R. G. The importance of iron in the biosynthesis and assembly of [NiFe]-hydrogenases. **Biomolecular Concepts**, v. 5, p. 55-70, 2014.

RACHMAN, M. A.; FURUTANI, Y.; NAKASHIMADA, Y.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N. Enhanced hydrogen production in altered mixed acid fermentation of glucose by *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 358-363, 1997.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

RANAGHAN, M. J.; SCHWALL, C. T.; ALDER, N. N.; BIRGE, R. R. Green Proteorhodopsin Reconstituted into Nanoscale Phospholipid Bilayers (Nanodiscs) as Photoactive Monomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 18318-18327, 2011.

REDWOOD, M. D.; MIKHEENKO, I. P.; SARGENT, F.; MACASKIE, L. E. **Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production**, v. 278, p. 48-55, 2008.

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*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 469-477, 2010.

RIIS, V.; MAI, W. Gas-Chromatographic Determination of Poly-Beta-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass after Hydrochloric-Acid Propanolysis. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 285-289, 1988.

RUSCH, D. B.; LOMBARDO, M. J.; YEE-GREENBAUM, J.; NOVOTNY, M.; BRINKAC, L. M.; LASKEN, R. S.; DUPONT, C. L. Draft Genome Sequence of a Single Cell of SAR86 Clade Subgroup IIIa. **Genome Announcements**, v. 1, p. e00030-12, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. New York.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SAUTER, M.; BOHM, R.; BOCK, A. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 1523-1532, 1992.

SCHWARTZ, E.; FRIEDRICH, B. The H₂-Metabolizing Prokaryotes. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.(eds.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2007. cap. 10, p. 496-563.

SELF, W. T.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. T. N-terminal truncations in the FhlA protein result in formate- and MoeA-independent expression of the *hyc* (formate hydrogenlyase) operon of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 147, p. 3093-3104, 2001.

SELF, W. T.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 580-587, 2004.

SILVA, G. M.; MELO DA SILVA, L. G.; OIKNINE, L.; DASSOLER, T. S. **Produção biotecnológica de hidrogênio**. 2009. Departamento de Engenharia Química e Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SKIBINSKI, D. A.; GOLBY, P.; CHANG, Y. S.; SARGENT, F.; HOFFMAN, R.; HARPER, R.; GUEST, J. R.; ATTWOOD, M. M.; BERKS, B. C.; ANDREWS, S. C. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6642-6653, 2002.

SOLOVEICHIK, G. L. Liquid fuel cells. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, p. 1399-1418, 2014.

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

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, p. e19725, 2011.

STRIPP, S. T.; GOLDET, G.; BRANDMAYR, C.; SANGANAS, O.; VINCENT, K. A.; HAUMANN, M.; ARMSTRONG, F. A.; HAPPE, T. How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 17331-17336, 2009.

SYED, F. **Citrate-Binding to the membrane protein proteorhodopsin**. 2011. 174 p. [dissertation] - Syracuse University, New York, 2011.

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

TRCHOUNIAN, K.; PINSKE, C.; SAWERS, R. G.; TRCHOUNIAN, A. Dependence on the F₀F₁-ATP synthase for the activities of the hydrogen-oxidizing hydrogenases 1 and 2 during glucose and glycerol fermentation at high and low pH in *Escherichia coli*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 645-650, 2011.

VARDAR-SCHARA, G.; MAEDA, T.; WOOD, T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. **Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 107-125, 2008.

VIGNAIS, P. M.; BILLOUD, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. **Chemistry Reviews**, v. 107, p. 4206-4272, 2007.

WALTER, J. M.; GREENFIELD, D.; BUSTAMANTE, C.; LIPHARDT, J. Light-powering *Escherichia coli* with proteorhodopsin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 2408-2412, 2007.

WALTER, J. M.; GREENFIELD, D.; LIPHARDT, J. Potential of light-harvesting proton pumps for bioenergy applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 265-270, 2010.

WU, S.-Y.; LIN, C.-N.; CHANG, J.-S. Hydrogen Production with Immobilized Sewage Sludge in Three-Phase Fluidized-Bed Bioreactors. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 828-832, 2003.

YOSHIDA, A.; NISHIMURA, T.; KAWAGUCHI, H.; INUI, M.; YUKAWA, H. Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 67-72, 2006.

ANEXO A
Curva padrão de hidrogênio

Figura. Curva padrão de hidrogênio. Relação entre a altura em mm dos picos e a quantidade de moles de hidrogênio injetados.

ANEXO B

Curva padrão de glicerol

Figura. Curva padrão de glicerol. Relação entre as unidades de IR dos picos e a concentração de glicerol em g/L.