ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DE α -AMILASE DE
B. SUBTILIS EM BACTÉRIAS RECOMBINANTES

ELZA TERESINHA GRAEL
FARMACÊUTICA

ORIENTADOR: PROF. DR. FLÁVIO C.A. TAVARES

*Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de MESTRE em Agronomia. Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.*

PIRACICABA
ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL
MARÇO 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

G734a Graef, Elza Teresinha
Análise da expressão do gene de α -Amilase de B. subtilis em bactérias recombinante. Piracicaba,
1989.

81p. illus.

LA Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Alfa-amilase - Gene - Expressão 2. Bactéria -
Bioquímica 3. Bactéria - Gene - Expressão 4. Bacté-
ria - Recombinação genética 5. Enzima microbiana I.
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pira-
cicaba

CDD 589.95

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DE α -AMILASE DE *B. subtilis* EM
BACTÉRIAS RECOMBINANTES

ELZA TERESINHA GRAEL

APROVADA EM: 26 de abril de 1989

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Dra. Alda Luiza Santos Lerayer

ESALQ-USP
ESALQ-USP
ITAL

Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares
Orientador

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq.

Aos meus pais

PEDRO e ELZA

Aos meus irmãos

ANA, PEDRO e PAULA

Ao Professor e Orientador

Dr. Spartaco Astolfi Filho

Todo meu carinho, respeito
e homenagem

AGRADECIMENTOS

● Ao Prof. Dr. *Flávio C.A. Tavares* pela orientação e incentivo.

● Ao Prof. Dr. *Spartaco Astolfi Filho* pela orientação, amizade e oportunidade de realização deste trabalho.

● Aos Prof. do Laboratório de Biologia Molecular. Dr. *Cesar Martins de Sá*, *Maria Sueli Felipe*, *Maristela de Azevedo*, *Fernando Fortes de Valência*, Dr. *Joseph Thieman*, Dr. *Amílcar Tanuri* e Dra. *Maria C. Bastos*, pela amizade e colaboração.

● Aos Prof. Dr. *Carlos R. Felix*, Dr. *Ruy A. Caldas*, Dr. *Waldenor Cruz*, Dr. *Lauro Morthy*, pela amizade e acesso aos Laboratórios de Enzimologia e Bioquímica.

● À *Susi Vasconcelos* pela amizade e inestimável apoio durante a realização deste trabalho.

● Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular *Lídia*, *Márcia*, *Regina*, *Thânia*, *Bia Dolabela*, *Letícia*, *Tereza*, *Bia Nunes*, *Oswaldo*, *Elita*, *Fernando Araripe*, *Luiz Artur*, *Martha*, *Lucilia*, *Cláudio Cunha*, *Regina*, *Armando*, *Patrícia*, *Jane*, *Pedro*, *Consuelo* e *Manuel*, pela amizade, convivência e tão valiosa "força".

- À *Marlene Souza* pela amizade e colaboração.
- Ao *Fernando, Landoaldo, Maria de Fátima, Celso, Henriqueta, Marlene, Lindomar, Antonio, Marisa e Margarete*, pela colaboração.
- Aos prof. da ESALQ/USP *Dr. João Lúcio de Azevedo, Dra. Aline Pizirani Kleiner e Dra. Elke J. Cardoso*, pelo incentivo.
- Aos amigos de turma *Eleonora, Dimas, Tânia, Ivana, Magali, Eduardo, Ana Maria*.
- Ao *Paulo, Beto, Ana Maria e Dna. Edilma e Dna. Dirse*.
- Aos técnicos do Instituto de Tecnologia de Alimentos *Dr. Tobias José Barreto de Menezes, Dr. Renato Sérgio Papini, Dr. Takuo Hashizume, Dra. Teresinha de Jesus Garcia Salva*, pela colaboração recebida durante a redação da tese.
- À *Dra. Alda Luiza Santos Lerayer* pela amizade e colaboração na revisão do trabalho.
- À *Carmen Silvia Barros Penteado e Márcia Ortiz da Silva*, pelos serviços de datilografia.
- À *Maria José, Jurandir, João e Antonio*.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
SUMMARY	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Vetores de clonagem	5
3.2. Transformação genética em bactérias	12
3.3. Expressão gênica e secreção de proteínas..	19
3.4. Substrato-amido	21
3.5. α -amilases	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Microrganismos e manutenção	29
4.2. Plasmídios	29
4.3. Meios de cultura	30

	Página
4.4. Enzimas, soluções e tampões	35
4.5. Purificação de plasmídios	44
4.6. Eletroforese em gel de agarose	49
4.7. Digestão do DNA com enzimas de restrição ...	49
4.8. Extração da enzima de restrição	50
4.9. Tratamento com a enzima DNA polimerase I	50
4.10. Ligação de fragmentos de DNA	51
4.11. Detecção da presença de endonucleases de restrição	51
4.12. Transformação de <i>E. coli</i>	52
4.13. Transformação de <i>Bacillus</i>	54
4.14. Determinação da atividade de α -amilase	56
4.15. Dosagem de proteína total	57
4.16. Seleção e análise de recombinantes	57
5. RESULTADOS	59
5.1. Construção do vetor de clonagem molecular bifuncional para <i>E. coli</i> e <i>Bacillus</i>	59
5.2. Inativação do sítio de <u>Bam</u> HI do plasmídio pHVA4	61
5.3. Transformação de <i>E. coli</i> com os vetores pHVA4, pHV33 e pHVB7	62
5.4. Transformação de <i>Bacillus</i> com o vetor pHVA4.	63
5.5. Estudo da produção da α -amilase	65

	Página
6. DISCUSSÃO	83.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1.	Representação esquemática do plasmídeo pHV33	10
FIGURA 2.	Representação esquemática do plasmídeo pABC1	11
FIGURA 3.	Representação esquemática da construção do plasmídeo pHV4	67
FIGURA 4.	Representação esquemática do plasmídeo pHV4	68
FIGURA 5.	Análise de restrição dos plasmídios pABC1, pHV33 e pHVA4 com a enzima <i>E. coli</i>	69
FIGURA 6.	Análise de restrição do plasmídeo pHVA4 com as enzimas <u>Pst</u> I e <u>Bst</u> EII	70
FIGURA 7.	Representação esquemática da construção do plasmídeo pHVB7	71
FIGURA 8.	Representação esquemática do plasmídeo pHVB7	72
FIGURA 9.	Análise de restrição dos plasmídios pHVB7 e pHVA4 com as enzimas <u>Eco</u> RI e <u>Bam</u> HI ...	73

FIGURA 10. Análise de restrição dos plasmídios pHVA ⁴ e pHV33 com a enzima <u>EcoRI</u>	74
FIGURA 11. Análise de restrição dos plasmídios pHVA ⁴ e pHV33 com as enzimas <u>EcoRI</u> e <u>BamHI</u>	75
FIGURA 12. Análise de restrição do plasmídio pHVA ⁴ proveniente de um recombinante de <i>B. subtilis</i> SB202 com a enzima <u>EcoRI</u>	76
FIGURA 13. Análise de restrição do plasmídio pHVA ⁴ proveniente de um recombinante do <i>B. amyloliquefaciens</i> PZ26 com a enzima <u>EcoRI</u>	77
FIGURA 14. Análise de restrição do DNA do bacteriófago λ em presença do lisado de células de <i>B. amyloliquefaciens</i> PZ26	78
FIGURA 15. Hidrólise do amido em placa produzida por clones recombinantes de <i>Bacillus</i> ...	79
FIGURA 16. Hidrólise do amido em placa produzida por clones recombinantes de <i>E. coli</i> HB101 e <i>Bacillus</i>	80
FIGURA 17. Análise comparativa da atividade específica de α -amilase de cepas de <i>E. coli</i>	81

FIGURA 18. Análise comparativa da atividade específica de α -amilase de cepas recombinantes de <i>Bacillus</i>

82

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Vetores com origem de replicação para <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i>	9
TABELA 2. Propriedades da α -amilase de <i>Bacillus</i> ..	26

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	-	absorbância
α	-	alfa
ami	-	seqüência que codifica gene de α -amílase
Ap	-	ampicilina
ATP	-	adenosina trifosfato
β	-	beta
Cm	-	cloranfenicol
DMSO	-	dimetilsulfóxido
DNA	-	ácido desoxiribonucléico
DNase	-	desoxiribonuclease
DTT	-	ditiotreitol
EGTA	-	ácido etilenoglicoltetracético
EDTA	-	ácido etilenodiamenotetracético
EtBr	-	Brometo de etídio
g	-	aceleração gravitacional
Kb	-	kilobases
Kd	-	kilodaltons
Km	-	canamicina
λ	-	lambda
M	-	molar

mA	-	miliampere
mℓ	-	mililitro
mM	-	milimolar
mRNA	-	ácido ribonucléico mansageiro
η	-	índice de refração
ng	-	nanograma
nm	-	nanometro
Pb	-	pares de bases
PEG	-	polietilenoglicol
PMSF	-	sulfonil sulfóxido
p/v	-	peso/volume
r	-	resistência
rpm	-	rotações por minuto
RNA	-	ácido ribonucléico
RNase	-	ribonuclease
SDS	-	dodecil sulfato de sódio
TRIS	-	tris (hidroximetil) aminometano
U	-	unidade de atividade enzimática
μg	-	micrograma
μℓ	-	microlitro
UV	-	ultravioleta
v/v	-	volume/volume
Tc	-	tetraciclina
β-Me	-	β-mercapto etanol
K-mes	-	ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DE α -AMILASE DE *B. subtilis* em
BACTÉRIAS RECOMBINANTES

Autora: Elza Teresinha Grael

Orientador Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares

RESUMO

O gene da α -amilase de *B. subtilis* do plasmídio pABCl (Ap^r , Km^r , Ami^+) foi clonado no sítio de EcoRI do plasmídio pHV33 (Cm^r , Ap^r , Tc^r), dando origem ao vetor bifuncional (*E. coli* e *Bacillus*) denominado de pHVA4.

A análise da expressão gênica foi feita medindo-se da atividade específica de α -amilase de clones recombinantes. Os resultados obtidos demonstraram que a α -amilase permanece, em sua maior parte, retida no espaço periplasmático no caso das cepas de *E. coli* estudadas. Uma secreção mais significativa foi obtida com o *B. subtilis* SB202, para o qual observou-se um aumento da atividade, enquanto que para o *B. amyloliquefaciens* PZ26 houve um decréscimo.

EXPRESSION ANALYSIS OF α -AMYLASE GENE FROM *B. subtilis* in
RECOMBINANTS BACTERIAS

Author - Elza Teresinha Graef
Adviser Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares

SUMMARY

The α -amylase gene of the *Bacillus subtilis* plasmid pABC1 (Ap^R , Km^R , Ami^+) was cloned at the EcoRI site of plasmid PHV33 (Cm^R , Ap^R , Tc^R) giving rise to the shuttle vector (*E. coli* and *Bacillus*) named pHVA4.

The gene expression analysis was undertaken the α -amylase specific activity of the recombinant clones. The results showed that the majority of the α -amylase of the *E. coli* strains was retained in the periplasmatic space. A greater secretion of α -amylase from *B. subtilis* SB202 was observed, while *Bacillus amyloliquefaciens* PZ26 showed a decrease in activity.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas de origem microbiana vem conquistando um espaço muito importante na indústria mundial, havendo, portanto, grande interesse em se pesquisar novas enzimas e aumentar a produção daquelas já existentes. Tal objetivo pode ser alcançado através do melhoramento genético do microrganismo, como também pela otimização do processo de produção.

O melhoramento genético de microrganismos, até bem pouco tempo atrás, consistia na seleção de linhagens altamente produtoras que eram obtidas pela utilização das técnicas disponíveis da genética clássica, ou seja, indução de mutação e recombinação.

Nesta última década, entretanto, tem se verificado, na área de melhoramento genético, um desenvolvimento muito rápido com as perspectivas oferecidas pela Tecnologia do DNA Recombinante (TDR) e a fusão de protoplastos. Estas técnicas, aliadas às da genética clássica, vêm permitindo a manipulação direta do genoma microbiano, programando-se, assim, rotas metabólicas em favor de um produto desejado.

A construção de moléculas híbridas de DNA com capacidade para expressar a mensagem em uma ou mais células hospedeiras, tem possibilitado o estudo dos mecanismos de expressão e secreção de proteínas de forma mais eficiente.

A clonagem molecular de genes iniciou-se tendo como célula hospedeira a *Escherichia coli* devido, principalmente, ao amplo conhecimento de sua genética (à alta eficiência de transformação) e à facilidade de expressar genes heterólogos. Apesar destas vantagens, a *E. coli* não apresenta um mecanismo apropriado de secreção de proteínas para o meio de cultura.

Estudos posteriores apontaram o *B. subtilis* como boa célula hospedeira, pois é capaz de secretar altos níveis de proteína, além de produzir enzimas de interesse industrial, como, por exemplo, a α -amilase.

Devido ao valor econômico da α -amilase, diversos trabalhos têm sido realizados no sentido de se obter vetores capazes de carrear genes heterólogos com o intuito de aumentar os níveis de produção desta enzima.

Um exemplo bastante ilustrativo foi o resultado obtido por PALVA (1981a), que clonou o gene da α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* em *Bacillus subtilis*, utilizando o vetor pUB110, verificando um aumento de 2.500 vezes na produção da enzima.

Além do interesse comercial, o gene da α -amilase pode ser utilizado como marcador genético para estudos de clonagem molecular, possibilitando a seleção direta de clones recombinantes, conforme foi demonstrado por IKUTA *et alii* (1987), os quais clonaram no sítio de BstEII do gene de α -amilase, fragmentos do bacteriófago λ .

Considerando tais aspectos, no presente trabalho procurou-se obter vetores bifuncionais contendo o gene da α -amilase de *Bacillus subtilis*, com o propósito de se obter clones recombinantes com maior produtividade.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivos:

- Transferência do gene de α -amilase de *B. subtilis* para um vetor capaz de transformar *E. coli* e diversas linhagens de bactérias Gram positivas.
- Estudo da expressão do gene clonado de α -amilase em *E. coli*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Vetores de clonagem

Os vetores de clonagem são veículos por meio dos quais são introduzidos DNAs exógenos em células hospedeiras. Estes veículos podem ser integrativos ou replicativos. Os veículos integrativos são aqueles em que a manutenção do gene exógeno ocorre por sua integração no genoma da célula hospedeira, enquanto que os duplicativos contêm uma origem de replicação funcional na célula receptora, sendo estes os mais utilizados.

Um vetor deve apresentar como características principais a capacidade de duplicação em células hospedeiras (caso seja replicativo) e marcas genéticas seletivas como sítios de restrição únicos localizados dentro dos genes, que facilitem a inserção do DNA exógeno e posterior seleção dos clones recombinantes.

Com o propósito de clonar fragmentos de DNA exógeno e ampliá-los em células de *E. coli*, são utilizados como

vetores: os plasmídios, o bacteriófago lambda, o bacteriófago M13 de fita simples e os cosmídios.

A escolha de um vetor é igualmente determinada considerando os seguintes aspectos:

- tamanho do DNA a ser clonado;
- estabilidade do fragmento clonado;
- metodologia usada para análise do DNA inserido;
- propósito da clonagem.

O bacteriófago lambda é um vírus de DNA de fita dupla e com genoma de aproximadamente 49Kb (SHOROEDER & BLATNER, 1978), sendo as extremidades 5' formadas de fita simples complementares e ao infectar a célula podem replicar-se em ciclo lítico ou lisogênico (BENTON & DAVIS, 1977).

Os bacteriófagos de fita simples mais utilizados são derivados do fago M13. Este fago pode ser absorvido somente pelas linhagens de *E. coli* que contenham o plasmídio F (Fator F). Após a infecção o DNA do fago passa para uma forma replicativa (DENHARD *et alii*, 1978).

Os cosmídios são plasmídios que contêm uma sequência de fago lambda (o sítio COS), que é requerida para o empacotamento em um capsídio, sendo construídos para clonagem de grandes fragmentos de DNA eucariótico (COLLINS & HOHN, 1979; COLLINS & BRÜNING, 1978).

Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos presentes em quase todos os grupos bacterianos (LEDERBERG, 1952). São moléculas de DNA circular e que variam de 1Kb a 200Kb de tamanho e são capazes de replicação autônoma, embora alguns deles possam também se integrar covalentemente ao cromossomo bacteriano, passando, então, a se duplicar junto com ele.

3.1.1. Plasmídios

Os plasmídios podem conferir características fenotípicas adicionais às células hospedeiras. Estas características genéticas adquiridas podem ser a resistência a antibióticos e a metais pesados, a produção de enterotoxinas, bacteriocinas e enzimas de restrição, a degradação de compostos aromáticos, indução de tumores em plantas, entre outras.

Como vetor de clonagem, um plasmídio deve possuir as seguintes características (BRODA, 1979; SOUZA, 1987):

- baixo peso molecular, o que permite uma melhor purificação e uma maior eficiência de transformação;
- replicação na forma relaxada, possibilitando, assim, a produção de maior número de cópias do DNA inserido;
- marcas genéticas permitindo a seleção, identificação e manutenção dos clones transformantes e

- sítio único de reconhecimento para uma ou mais enzimas de restrição, possibilitando a inserção do fragmento de DNA a ser clonado.

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de se obter plasmídios capazes de expressarem a informação genética neles contida em dois ou mais hospedeiros diferentes. Estes são designados de vetores bifuncionais, como é o caso dos plasmídios pHV33 e pABC1. Outros exemplos são citados na Tabela 1.

O plasmídio pHV33 (PRIMROSE & EHRLICH, 1981), foi construído através da ligação do plasmídio pBR322 (BOLIVAR *et alii*, 1977) e do pC194 (HORINOUCI & WEISBLUM, 1980) (Figura 1). O pBR322 é capaz de replicar em *E. coli* e confere resistência à ampicilina e tetraciclina, enquanto que o plasmídio pC194, originário de *Staphylococcus aureus* se replica tanto em *Bacillus subtilis* como em *Saccharomyces cerevisiae*, além de conferir resistência ao cloranfenicol.

O plasmídio pABC1 é um plasmídio recombinante que possui o gene da α -amilase de *B. subtilis* e é capaz de expressá-lo em *E. coli* e *Bacillus* (SOUZA, 1986) (Figura 2).

O uso de vetores bifuncionais aliado às técnicas de transformação bacteriana, têm contribuído para que o gene da α -amilase de diversos *Bacillus* possa ser estudado em vários tipos de células hospedeiras, fornecendo, assim, maiores conhecimentos sobre a expressão do gene e a secreção da enzima.

TABELA 1. Vetores com origem de replicação para *E. coli* e *B. subtilis* (HARDY, K.G., 1985).

Plasmídeo	Peso molecular (Kd)	Plasmídeo Origem	Marcas de resistência a antibióticos	
			<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
pHV14	4,6	pC194 e pBR322	Ap, Cm	Cm
pHV33	4,6	pC194 e pB1322	Ap, Tc, Cm	Cm
pHV23	6,1	pC194, pB1322, pT127	Ap, Cm	Tc, Cm
pIK3	5,0	pBS161-1, pBR322	Tc, Ap	Tc
pCPP3	3,7	pBR322, pUB110	Km	Km

Figura 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDIO pHV33 (Primose e Ehrlich, 1981)

□ - pBR322 - DNA originário do pBR322 (Bolivar et alii, 1977)

▨ - pCI94 - DNA originário do pCI94 (Ehrlich, 1977)

Ori₁ - origem de replicação do pCI94 (funcional em *B. subtilis*).

Ori₂ - origem de replicação do pBR322 (funcional em *E. coli*)

Figura 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDIO pABC₁ (Souza, 1986)

- - gene da α -amilase de *B. subtilis*
- - DNA originário do pUB110 (Keggins et alii, 1978)
- - DNA originário do pAT153 (Twigg e Sherratt, 1980)
- B/S - junção BamHI/Sau 3A
- Ori₁ - origem de replicação do pUB110 (funcional em *B. subtilis*)
- Ori₂ - origem de replicação do pBR322 (funcional em *E. coli*)

Os genes da α -amilase de *B. amyloliquefaciens* (LEHTOVAARA *et alii*, 1984; PALVA *et alii*, 1982b), *B. licheniformis* (PIGGOTT *et alii*, 1984; ORTLEPP *et alii*, 1983), *B. stearothermophilus* (AIBA *et alii*, 1983) e *B. subtilis* (YAMAZAKI *et alii*, 1983), foram clonados preferencialmente em *B. subtilis*.

A clonagem dos genes da α -amilase em outro tipo de célula hospedeira como a *Escherichia coli*, apresenta dificuldades para os estudos da secreção e da expressão. A maior parte da enzima fica retida no espaço periplasmático, sendo que apenas uma pequena quantidade é exportada da célula (SI-BAKOV & PALVA, 1984).

As técnicas de clonagem molecular têm possibilitado, também, o seqüenciamento dos genes de α -amilase como do *B. amyloliquefaciens* (TAKKINEM *et alii*, 1983; PALVA *et alii*, 1981; CHUNG & FRIEDBERG, 1980) bem como o *B. subtilis* (YAMAZAKI *et alii*, 1983; YANG *et alii*, 1983; OHMURA *et alii*, 1983, entre outros).

3.2. Transformação genética em bactérias

O processo da transformação genética em bactérias foi identificado por GRIFFITH, em 1928. Este observou que linhagens avirulentas de *Pneumococcus* podiam ser transformadas em virulentas após contato com células virulentas mortas

pelo calor. Estes estudos permitiram que AVERY *et alii*, em 1944, viesse a descobrir a natureza química do material genético, o DNA.

A transformação pode, então, ser definida como um processo através do qual uma célula "absorve" fragmentos de DNA do meio e o incorpora de maneira estável ao seu genoma (SMITH *et alii*, 1981).

3.2.1. Transformação de células competentes de *B. subtilis* e *E. coli*

A transformação de células competentes compreende de cinco etapas descritas a seguir, conforme sugere SMITH *et alii*, 1981:

- (a) desenvolvimento do estado de competência celular;
- (b) ligação do DNA à membrana celular;
- (c) absorção do DNA;
- (d) formação do complexo pré-integrativo; e
- (e) integração do DNA no cromossomo da célula receptora.

As etapas da transformação são semelhantes para *E. coli* e *B. subtilis*, embora algumas diferenças fundamentais ocorram, provavelmente, devido às variações estruturais do envoltório celular de cada uma.

Uma das diferenças fundamentais é que em microrganismos gram-positivos, apenas uma fita do DNA exógeno vai para o interior da célula receptora, enquanto que em gram-negativos a transferência é feita em fita dupla.

(a) Desenvolvimento do estado de competência celular

A competência é a propriedade que uma bactéria possui de ser capaz de absorver e incorporar DNA livre em seu patrimônio genético.

Em *B. subtilis*, durante a fase de crescimento celular, quando é atingido o valor de 10^7 a 10^8 células por mililitro, as células transformáveis tornam-se rapidamente competentes. Isto é devido à secreção de uma proteína chamada Fator de Competência (FC), que é liberada no meio de cultura e pode ser coletada do sobrenadante AKRIGG e AYAD, 1970.

A fase de pré-competência se inicia de 1,5 a 3 horas antes de haver transformação e está associada com a diminuição na taxa de síntese de DNA e RNA. Estas alterações levam a uma diminuição na densidade (celular) e a competência

se dá em 10 a 20% da população celular. Uma vez atingida a competência, ela é mantida por cerca de 3 horas, período durante o qual não há multiplicação celular e nem replicação do DNA.

Em *E. coli* não foi descrita a presença de um fator de competência extracelular. HANAHAN (1983) propõe que células de *E. coli* competentes possam ser obtidas em culturas em fase exponencial de crescimento e que a baixa temperatura, cátions bivalentes e DMSO podem, juntos, induzir alterações na membrana, facilitando a captação do DNA.

(b) Ligação do DNA ao envoltório da célula receptora difere em células de *E. coli* e *Bacillus*

Em *E. coli* não é exigida especificidade, bastando que o DNA seja apenas homólogo, o que não acontece com os *Bacillus*, que requerem grande especificidade do DNA.

A ligação do DNA à célula é feita em receptores específicos do envoltório que variam conforme a célula, sendo que em *Bacillus* foram encontrados de 20 a 50 sítios receptores na parede TICHY e LANDMAN, 1969.

A massa de DNA ligado é proporcional ao seu peso molecular e a fragmentação origina segmentos de dupla cadeia, que são sensíveis a DNA polimerase I (DUBNAU, 1976).

(c) Absorção do DNA

Nesta fase ocorre a conversão do DNA para uma conformação resistente à DNase. Isto implica na entrada do DNA para um compartimento intracelular de uma vesícula, do espaço periplasmático ou do citoplasma na forma de fita simples em *Bacillus* (DUBNAU, 1976; DUBNAU e CIRIGLIANO, 1972). Em *E. coli* a absorção é feita na forma original de dupla fita.

O processo em *Bacillus* se inicia com a quebra da dupla cadeia, pela Endonuclease I, nas moléculas ligadas aos sítios receptores do envoltório. O processo é dependente da atividade endonucleásica e do íon Ca^{++} , e a conversão em fita simples se dá durante a absorção.

(d) Formação do complexo pré-integrativo (eclipse)

No *B. subtilis* a cadeia simples de DNA é encontrada em associação com uma proteína que é sintetizada durante a fase de competência. Este complexo confere ação protetora ao DNA contra o ataque de nucleases.

Três funções têm sido sugeridas para este complexo sendo MORRISON, 1977.

- a diminuição na energia livre associada ao complexo facilita a transferência de uma fita de DNA para dentro da célula (ou espaço periplasmático);

- proteção do DNA da ação de nucleases celulares;

- promoção da integração mantendo as bases em posição aberta para o pareamento.

Em células gram-negativas foi observado que o DNA é absorvido intacto na forma de dupla cadeia. Este não é atacado por exonucleases ou endonucleases, embora seja sensível à atividade de ligação que atua sobre seus extremos coesivos e abruptos.

Foi verificado em *Haemophilus* a existência de uma proteína periplasmática relacionada com a ligação do DNA, como também a existência de estruturas de superfície semelhantes a pequenas vesículas que transportariam o DNA para dentro da células (MORRISON e MANNARELLI, 1979).

(e) Integração do DNA no cromossomo da célula receptora

O fragmento de DNA de fita simples, no caso do *B. subtilis*, é integrado ao cromossomo da célula receptora por

um evento de recombinação. A cadeia simples do DNA do doador substitui fisicamente a cadeia homóloga do cromossomo da receptora, formando um segmento heteroduplex. A cadeia substituída é degradada.

No caso de cadeia dupla, como em *E. coli*, qualquer das duas fitas no DNA doador pode ser integrada, enquanto que a outra fita é degradada.

A fase de integração pode ser dividida em quatro etapas:

- transladação do complexo pré-integrativo para as proximidades do cromossomo;
- formação de um complexo instável doador-receptor;
- formação de um complexo estável não covalente doador-receptor; e
- formação de um complexo covalentemente fechado (separado) (SMITH *et alii*, 1981; SOUZA & COSTA, 1987).

3.2.2. Transformação de protoplastos de *Bacillus*

A transformação de protoplastos de *Bacillus* foi inicialmente descrita por CHANG & COHEN em 1979. Algumas das vantagens da utilização de protoplastos são que estes transformam moléculas monoméricas de DNA plasmidial e permitem que

uma variedade de espécies, para os quais não havia metodologia de preparo de células competentes, fossem transformadas.

O mecanismo de transformação envolve a ligação do DNA monomérico através do polietileno glicol (PEG) em condições hipertônicas. Em seguida, os protoplastos são cultivados em um meio de cultura que permita a regeneração da parede bacteriana.

3.3. Expressão gênica e secreção de proteínas

A expressão de uma proteína codificada por um gene está inicialmente relacionada ao nível transcricional, com a ligação da RNA polimerase ao DNA e ao nível traducional, com a ligação do ribossomo ao RNA mensageiro.

Através da análise de seqüência de nucleotídeos de várias regiões promotoras de *E. coli*, observou-se a existência de duas seqüências responsáveis pelo reconhecimento da RNA polimerase (ROSEMBERG & COURT, 1979), sendo uma TIGACA e outra TATAAT, denominada "TATA Box" (PRIBNOW, 1975).

A nível de tradução, há uma outra seqüência importante para a expressão gênica, que é denominada de Shine-Dalgarno. Esta seqüência corresponde ao sítio de ligação do ribossomo, apresentando grande complementariedade com a

região 3' do RNA ribossomal 16S (SHINE-DALGARNO, 1975).

Dois fatores podem interferir na ligação do ribossomo ao mRNA; a distância entre esta sequência e o codon iniciador (AUG) e o grau de complementariedade desta região (ISERENTANT & FIER, 1980).

Uma vez sintetizada, a proteína deve ser transportada de seus sítios, de síntese, no citoplasma, para os diversos tipos de membranas e organelas, ou através destas para o meio extracelular (MORAN *et alii*, 1982).

No caso das proteínas que são destinadas à secreção extracelular, a síntese é feita inicialmente na forma de precursores maiores, tendo um sinal aminoterminal que varia de 13 a 36 aminoácidos e que, de alguma forma, inicia a translocação da cadeia polipeptídica crescente através da membrana.

A "Hipótese Sinal" foi desenvolvida por BLOBEL & DOBBERSTEIN (1975) para explicar o processo de translocação que consiste em várias etapas:

- ligação do ribossomo ao mRNA que codifica a proteína;
- Síntese da proteína pelo ribossomo;
- ligação de uma sequência sintetizada de aproximadamente 80 aminoácidos à membrana do Retículo Endoplasmático (interrupção da tradução);

- ligação do complexo de tradução à membrana do retículo e receptores, ocorrendo a liberação da tradução;
- estabilização da ligação do ribossomo à membrana por outras proteínas;
- formação do poro através do qual a proteína nascente passa para o interior do retículo;
- remoção proteolítica do peptídeo sinal, durante ou após a translocação por proteínas associadas à membrana;
- desligamento do ribossomo da membrana do retículo, provocada pela liberação da proteína completa, do mRNA e fechamento do poro.

3.4. Substrato - amido

O amido representa a maior reserva de carboidratos em plantas superiores. É insolúvel em água; em suspensão aquosa, quando aquecido a aproximadamente 70°C ou, em condições alcalinas, os grânulos de amido gelatinizam fornecendo pseudo-solução viscosa.

O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto de duas moléculas de alto peso molecular, a amilose e a

amilopectina. Estas diferem entre si tanto em suas propriedades químicas como físicas.

A amilose é uma glucosana linear constituída de 200 a 250 resíduos de D-glucose ligados entre si através de ligações α -1,4. Em água, se dispersa na forma coloidal produzindo pseudo-solução altamente viscosa que assume várias formas, dentre elas a helicoidal, que tende a fixar substância ou complexos corados irsolúveis, como o iodo, dando uma coloração azul-violeta. Está presente, geralmente, na proporção de 20 a 30% do amido, dependendo da fonte do polímero. Possui uma extremidade redutora e uma não redutora (FORGATY & KELLY, 1980; MALHER & CORDES, 1971).

A amilopectina é um polímero ramificado através das ligações α -1,6. É menos viscosa em suspensão aquosa e menos estável que a amilose. Seus segmentos lineares encerram de 19 a 26 unidades de D-glucose. É uma D-glucosana e, em presença de iodo, cora-se de vermelho.

A estrutura exata do amido ainda não foi completamente elucidada, existindo evidências de que ocorre variabilidade entre o amido de diferentes espécies de plantas (ROLLINGS & THOMPSON, 1984; HOPKINS, 1946).

3.5. Amilases

Enzimas que degradam o amido são amplamente distribuídas entre plantas, animais e microrganismos. Elas degradam o amido em produtos característicos da ação de cada enzima amilolítica.

As amilases de origem microbiana podem ser subdivididas em:

- exoamilases

1. amiloglucosidase - hidrolisa ligação α -1,4, α -1,6 e α -1,3 do polímero de amido levando à formação de D-glucose. É produzida por *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*.
2. α -amilase - hidrolisa ligação α -1,4 formando maltose, α -dextrinas e oligossacarídeos menores. É produzida por *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*.
3. outras enzimas exoativas - hidrolisam ligações α -1,4 mas não ultrapassam α -1,6 formando maltose. *Pseudomonas stutzeri* e *Aerobacter aerogenes*.

● endoamilases

1. α -amilase - hidrolisa ligações α -1,4, levando à formação de maltose, dextrinas limites e oligossacarídeos. É produzida por *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *A. oryzae* e *A. niger*.
2. enzimas desramificantes - hidrolisam ligações α -1,6. A pululunase é produzida por *B. cereus*, *B. aerobacter aerogenes*, *B. macerans* e a isoamilase por *B. amyloliquefaciens*, *E. coli*, *Pseudomonas* Sp Sb 15.
3. Enzimas produtoras de ciclodextrinas - hidrolisam o amido em uma série de compostos cíclicos de D-glucose não reduzidos e chamados de β -ciclodextrinas são produzidos por *B. macerans* (FOGARTY & KELLY, 1980).

3.5.1. α -amilases

A α -amilase (E.C. 3.2.1.1., α -1,4 - glucan 4-glucanohidrolase) é produzida por diversos microrganismos e hidrolisa as ligações α -1,4 glicosídicas em amilose, amilopectina e glicogênio (Tabela 2).

As propriedades e o mecanismo de ação dependem da origem da enzima. Todas elas têm endoatividade e causam rápida diminuição da viscosidade da suspensão do amido. A amilose é hidrolisada pela enzima, havendo uma rápida conversão em maltose e maltotriose e mais lentamente, algumas moléculas de glicose são formadas. A amilopectina é convertida também em algumas moléculas de glucose, em maltose e em dextrinas limites. Estas dextrinas de quatro ou mais resíduos de glucose contêm todas as ligações α -1,6 da estrutura original.

O mecanismo de ação da α -amilase ainda não é bem conhecido, e três hipóteses foram formuladas com o intuito de explicá-lo (ROBYT & FRENCH, 1967), sendo que após a formação do complexo ativo enzima-substrato, pode ocorrer:

- hipótese da cadeia única - hidrólise do substrato, feita ordenadamente ao longo da cadeia até degradação total do substrato;
- hipótese da multicadeia - hidrólise de uma única ligação da cadeia de substrato em cada complexo formado, sendo o ataque da enzima aleatório;
- hipótese do ataque múltiplo - hidrólise de várias ligações da cadeia de substrato em cada complexo formado e a integração enzima-substrato aleatória.

TABELA 2. Propriedades da α -amilase de *Bacillus*.

	Peso molecular	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referências
<i>B. amyloliquefaciens</i>	49.000	5,9	65	WELKER & CAMPBELL (1967)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	60.000	5,5	50-70	FOGARTY (1983)
	58.000	-	-	FOGARTY (1983)
<i>B. coagulans</i>	-	7,5-8,5	85	MEDDA & CHANDRA (1980)
<i>B. licheniformis</i>	22.500	5,0-8,0	76	SAITO (1973)
<i>B. stearothermophilus</i>	49.000	5,4-6,1	70	FOGARTY & KELLY (1980)
<i>B. subtilis</i>	47.000	5,3-6,3	50	FOGARTY & KELLY (1980)
	100.000	-	-	FOGARTY & KELLY (1980)
<i>B. subtilis</i> NRRL B 3411	48.000	6,0	60	MOSELEY & KEAY (1970)

Todas as α -amilases são cálcio-metaloenzimas (FISCHER & STEIN, 1971) havendo, no mínimo, um átomo deste metal por molécula de enzima. O metal é requerido para a atividade catabólica da enzima. Em presença de cálcio, as α -amilases são mais resistentes aos extremos valores de pH, à temperatura, ao tratamento com uréia, ou ao ataque de algumas enzimas proteolíticas (STEIN *et alii*, 1964).

Diversos microrganismos produzem α -amilase, como os fungos *A. niger*, *A. awamory*, *A. oryzae* (BHELLA & ALTOSAR, 1985) e as bactérias do gênero *Bacillus*. Estas se destacam pelas altas quantidades de enzima produzidas e também pela sua termoestabilidade. Considerando-se estas características, algumas cepas são preferencialmente utilizadas na indústria como, por exemplo: *B. stearothermophilus* (SAITO, 1973), *B. licheniformis* (KRISHNANE & CHANDRA, 1983) e *B. coagulans* (WILLEMOT & CORNELIS, 1983), além das já conhecidas hiperprodutoras como o *B. amyloliquefaciens* (WALKER & CAMPBELL, 1967a, b).

As α -amilases produzidas pelos *Bacillus* podem ser divididas em dois grupos: as liqueficientes e as sacarificantes.

As α -amilases liqueficientes atuam sobre a cadeia toda, ao passo que as sacarificantes atuam preferencialmente sobre as dextrinas, produzindo açúcares redutores em maior velocidade que as liqueficientes (PRIEST, 1977).

Dentre os *Bacillus* que conhecidamente produzem α -amilase sacarificante estão o *B. subtilis* var. *amylossa-chariticus*, *B. natto*, *B. subtilis* Marburg e *B. stearothermophilus* e dentre os liqueficientes estão o *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* e *B. subtilis* NRRL 3414 (YONEDA & MARUO, 1975; MATSUZAKI *et alii*, 1974; MOSELEY & KEAYY, 1970; WELKER & CAMPBELL, 1967 a, b).

A α -amilase destaca-se pelo seu valor comercial sendo utilizada, por exemplo, nas indústrias de produção de xarope de glucose, de panificação, têxtil, farmacêutica, de papel e de bebidas alcoólicas e álcool combustível e em qualquer outro processo que necessite uma hidrólise prévia do amido.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microorganismos e manutenção

Os microrganismos utilizados neste trabalho, como hospedeiros foram:

- *Escherichia coli* 5K (HUBACEK & GLOVER, 1970).
- *Escherichia coli* HB 101 (BOYER & ROULLAND-DUSSOIX, 1969)
- *Bacillus subtilis* SB 202 (EHRLICH, 1978).
- *Bacillus amyloliquefaciens* PZ 26 -Gentilmente cedido para estes estudos pela Biobrás (Montes Claros, MG).

As linhagens foram criopreservadas em glicerol a 40% a -20°C e também repicadas em ágar LB, sendo mantidas sob refrigeração a 4°C . Os pré-inóculos foram feitos em meio LB a partir de clones isolados, antes de cada experimento e a temperatura de incubação usada para crescimento das culturas foi de 37°C .

4.2. Plasmídios

- pHV33 - recombinante do pCl94 (EHRLICH, 1977)

e do pBR322 (BOLIVAR, 1977). Possui marcadores de resistência aos antibióticos: cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina e duas origens de replicação, sendo uma para *E. coli* e outra para *Bacillus*.

- pABC1 - recombinante derivado dos plasmídios pUB110 (KEGGINS *et alii*, 1978) e pAT153 (TWIGG & SHERRATT, 1980). Possui, também, marcadores de resistência aos antibióticos canamicina, ampicilina e tetraciclina, e duas origens de replicação, uma funcional em *E. coli* e outra em *Bacillus*.

O pABC1 contém o gene da α -amilase de *Bacillus subtilis*, podendo conferir a capacidade de secreção tanto em *E. coli* como em *Bacillus* (SOUZA, 1986).

4.3. Meios de cultura

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavação a 121°C, 1 atm, por 15 a 20 minutos, exceto o tampão SMM e solução de PEG 40%, que foram esterilizadas a 121°C, 1 atm, por 8 minutos.

As soluções de sais e os carboidratos adicionados aos meios de cultura foram esterilizados por filtração.

● *Meio Complexo LB* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Peptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	1%

pH 7,2

Quando necessário, foi suplementado de ágar a 2% e amido solúvel a 0,5%. Este meio foi utilizado para cultivo das células.

● *Meio M9CA* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Na ₂ HPO ₄	0,6%
KP ₂ PO ₄	0,3%
NaCl	0,05%
NH ₄ Cl	0,1%
Casaminoácidos	0,2%

pH 7,2

Acrescido de 0,5% de extrato de levedura quando necessário.

Adicionar as soluções previamente esterilizadas por filtração.

MgSO ₄	2mM
Glucose	1%
CaCl ₂	0,1mM

Este meio foi utilizado para cultivo de células destinadas à extração de plasmídios em grande escala e para as dosagens de atividade específica de α -amilase.

● *Meio SPI* (SPIZIZEN, 1958)

A	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02%
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
B	K ₂ HPO ₄	1,4%
	KH ₂ PO ₄	0,6%
	Na-Citrato	0,1%
C	Caseína hidrolisada	0,2%
	Extrato de levedura	0,1%

pH 7,2

Foram misturados A + B + C lentamente sob forte agitação. Este meio foi utilizado para indução do estado de competência celular em *Bacillus*.

● *Meio SPII* (SPIZIZEN, 1958)

Meio SPI, ao qual se adiciona a 4°C:

Glucose	0,5mM
CaCl ₂	2,5mM
MgCl ₂	1mM

Manter a 37°C. Este meio foi utilizado para indução do estado de competência celular em *Bacillus*.

● *Meio Super L* (SOUZA, 1986)

Peptona	2%
Extrato de levedura	1%
Cloreto de sódio	1%

pH 7,2

Este meio de cultura foi utilizado para regenerar e cultivar as células após a indução do estado de competência celular.

● *Meio Penassay (P)* (CHANG & COHEN, 1979)

Bacto extrato de carne	0,15%
Bacto extrato de levedura	0,15%
Bacto peptona	0,5%
Bacto dextrose	0,1%
NaCl	0,35%
K ₂ HPO ₄	0,368%
KH ₂ PO ₄	0,132%

pH 7,0

Este meio foi utilizado para o cultivo de células de *Bacillus* que seriam submetidos a protoplastização.

● *Meio de regeneração de protoplastos* DM3)

(CHANG & COHEN, 1979)

A	Ágar	10,0g/l
	Peptona	5,0g/l
	Extrato de levedura	5,0g/l
	H ₂ O destilada	350ml
B	Succinato de sódio	0,5M
	H ₂ O destilada	500ml

pH 7,3

	K_2HPO_4	3,48g/l
C	KH_2PO_4	1,48g/l
	H_2O destilada	100ml

A. B e C foram esterilizados por autoclavação e misturados ainda quentes.

À temperatura de aproximadamente $56^{\circ}C$ foram acrescentados ao meio as soluções D. E e F que foram esterilizadas separadamente por filtração.

D	Glucose 20%	25m
E	$MgCl$ 1M	20m
F	Albumina Sérica bovina 2% ..	10m

O DM3 foi utilizado para regeneração das células protoplastizadas de *Bacillus*.

● *Meio SMMP* (CHANG & COHEN, 1979)

SMM (duas vezes concentrado)	1V
Meio P (quatro vezes concentrado) ..	1V

O meio SMMP foi utilizado durante todo o processo de protoplastização das células devido à sua alta osmolaridade.

● *Meio SOB* (HANAHAN, 1983)

Bacto peptona	2%
Extrato de levedura	0,5%

NaCl 1M 10mM
 KCl 1M 2,5mM
 MgCl 10mM
 MgSO 10mM

● *Meio SOC* (HANAHAN, 1983)

Meio SOB

Glucose 20mM

Os meios de cultura SOB e SOC foram utilizados para cultivo das células e indução do estado de competência celular em *E. coli*. Os antibióticos foram adicionados aos meios de cultura nas seguintes concentrações: ampicilina a 100µg/ml, tetraciclina a 20µg/ml, cloranfenicol a 10µg/ml e canamicina a 10µg/ml.

4.4. Enzimas, soluções e tampões

● *Enzimas*

As enzimas utilizadas nos experimentos de clonagem molecular eram provenientes da New England Nuclear (USA), New England Biolabs (USA) ou Research Laboratories (USA).

● Enzimas de restrição - BamHI, EcoRI, HindIII, PvuII, PstII, BstEII.

● Enzima para tratamento de extremidades do DNA-DNA polimerase I (Klenow).

● Enzima para ligação de fragmentos de DNA: T_4 DNA ligase.

● Enzimas para extração de DNA: RNase (Sigma) e lisozima, sendo esta última, produzida a partir de clara de ovo no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, segundo método descrito por ALDERSON *et alii*, 1945. A lisozima apresenta-se na forma liofilizada, sendo mantida a -20°C e preparada no momento do uso.

● *Soluções e tampões*

Os reagentes utilizados para preparo das soluções e tampões foram todos de grau analítico.

● *Solução I* (BIRBOIM & DOLY, 1979)

Tris - HCl	25mM pH 8,0
EDTA	10mM
Glucose	50mM

● *Solução II* (BIRBOIM & DOLY, 1979)

NaOH	0,2N
SDS	1% (p/v)

● *Solução III* (BIRBOIM & DOLY, 1979)

Acetato de sódio	3M
Ácido Acético	2M pH 4,8

● *Solução IV* (GARGER *et alii*, 1983)

Cloreto de césio	5g
Tampão TE	7ml
Índice de refração ajustado para	= 1,3780

● *Solução V* (GARGER *et alii*, 1983)

DNA (em Te)	2,4ml
CsCl	4,2g
EtBr	0,4g

● *Solução de RNase A* (Sigma)

RNase A	10mg/ml
Acetato de sódio	50mM

Ajustou-se o pH para 4,8 e aqueceu-se até fervu
ra em banho-maria por 10 minutos.

● *Solução de PEG* (BIRBOIM & DOLY, 1979)

PEG 6000	30% (p/v)
NaCl	1,5M

● *Tampão para protoplasto* (GASSOM & DAVIES, 1984)

Acetato de amônio	40mM
Acetato de Magnésio	1mM
Sacarose	0,5mM

pH 7,0

● *Tampão SMM* (CHANG & COHEN, 1979)

Sacarose	0,5M
Maleato de sódio	0,02mM

MgCl₂ 0,02mM

Ajustou-se o pH para 6,5 com NaOH, preparou-se tampão duas vezes concentrado.

● *Solução de PEG 40%* (CHANG & COHEN, 1979)

PEG 6000 20g

SMM 2x 25ml

H₂O qsp 50ml

● *Tampão de extração de endonucleases* (PIRROTA & BICKLE, 1980)

Tris HCl pH 7,5 10mM

EDTA 1mM

β-Me 10mM

● *Clorofane* (CASTRO, 1988)

Clorofórmio: fenol v/v

8-hidroxiquinolina 0,05% (p/v)

β-Me 0,5% (p/v)

Solução equilibrada sob agitação, com: Tris-HCl 50mM (pH 7,5); EDTA 2mM; NaCl 100mM.

● *Clorofil* (CASTRO, 1988)

Clorofórmio 24v

Álcool isoamílico 1v

A Solução foi equilibrada com o mesmo tampão descrito para o clorofane.

● *Fenol saturado* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Fenol 1v

Tris-HCl 15v

8-hidroxiquinolina 0,05% (p/v)

β -Me 0,2% (p/v)

Solução equilibrada com Tris-HCl 100mM (pH 8,0);
EDTA 1,0mM; NaCl 200mM.

● *Solução de Tris-Cálcio* (DARGET & EHRLICH, 1979)

Tris-HCl 100mM pH 7,0

CaCl₂ 50mM

Esterilizado por filtração.

● *Solução DMSO/DTT (DnD)* (HANAHAM, 1983)

DTT 1M
 DMSO 90% (v/v)
 Acetato de potássio 10mM

O DMSO foi tratado com N_2 durante uma hora, evitando-se o seu contato com O_2 . A solução DND foi estocada a $-50^\circ C$.

● *T.F.B.* (HANAHAM, 1983)

HCl 100mM
 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 45mM
 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10mM
 $HACoCl_3$ 3mM
 K-Mes pH 6,3 10mM

Foram adicionados ao K-Mes os demais reagentes como sólidos. O tampão foi esterilizado por filtração e estocado a $-20^\circ C$.

● *Solução de amido tamponado* (CARAWAY, 1959)

Tampão fosfato de sódio pH 7,35.. 202,27mM
 Amido solúvel 0,04%

Fervido por 2 a 5 minutos até dissolução.

● *Solução estoque de iodo 0,1N* (CARAWAY, 1959)

Tartarato de potássio	3,567g
KI	45g
H ₂ O qsp	1000ml

Os componentes foram dissolvidos em 800ml de água destilada e foram adicionados 9ml de ácido clorídrico concentrado. Acondicionado em frasco âmbar.

● *Solução estoque de iodo 0,01N* (CARAWAY, 1959)

Fluoreto de potássio	25g
Solução estoque de iodo 0,1N	50ml
H ₂ O qsp	500ml

Acondicionado em frasco ambar.

● *Reativo de Coomassie Blue* (BRADFORD, 1976)

Coomassie Blue v 250	0,01%
Etanol 95%	4,7%
Ácido fosfórico 85%	8,5%

A solução foi filtrada.

● *Solução de soro albumina bovina* (BRADFORD, 1976)

Soro albumina bovina liofilizada.. 500mg

H₂O destilada qsp 10ml

A solução foi homogeneizada e centrifugada.

● *Tampão TE* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-HCl 25mM pH 8,0

EDTA 20mM

● *Tampão TR* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-HCl 20mM pH 7,5

EDTA 0,1mM

● *Tampão de eletroforese (TEB 10x)* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-Base 0,89M

Ácido bórico 0,89M

EDTA 0,08M

pH 8,4

● *Tampão de amostra de eletroforese* (MANIATIS *et alii*, 1982)

TEB 3x

Ficoll 20% (p/v)

Azul de bromofenol 0,1%

● *Tampão de ligação 10x* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-HCl	500mM pH 7,4
MgCl ₂	100mM
DDT	100mM
Espermidina	10mM
ATP	10mM

● *Tampão HIN 10x* (MANIATIS *et alii*, 1982)

Tris-HCl	70mM pH 7,5
MgCl ₂	70mM
NaCl	500mM

● *Tampões de enzima de restrição* (Catálogo Biolabs, 1988)

- Tampão de reação 2 (HindIII, PvuII, BstEII)

Tris-HCl	50mM pH 8,0
MgCl ₂	10mM
NaCl	50mM

- Tampão de reação 3 (BamHI, EcoRI, PstI)

Tris-HCl 50mM pH 8,0

MgCl₂ 10mM

NaCl100mM

4.5. Purificação de plasmídios

O DNA plasmidial foi purificado a partir de cultura de bactérias, sendo utilizada a técnica de extração alcalina, descrita por BIRBOIM & DOLY (1979). A mesma técnica foi adaptada a pequenas quantidades para isolamento rápido de plasmídios, e quando se fazia necessária uma maior pureza, o material era submetido a uma ultracentrifugação em gradiente de cloreto de césio - brometo de etílio, conforme procedimento descrito por GARGER *et alii*, 1983.

As preparações de DNA foram mantidas a -20°C.

- *Técnica de extração através de lise alcalina (maxi-preparação)*

As células foram cultivadas em 200ml de meio LB,

com antibiótico adequado e incubadas sob agitação (150 rpm), até atingir a fase estacionária de crescimento. As células foram coletadas por centrifugação a 5000g por 10 minutos e o sedimento ressuspendido em 10ml de salina 0,9% (p/v), e novamente centrifugado a 3000g por 10 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspendido em 2,5ml de solução I e, depois de agitado vigorosamente por alguns segundos, foram adicionados mais 2,5ml da mesma solução, contendo 4mg/ml de lisozima. O material foi incubado a aproximadamente 0°C por 30 minutos mantendo-se a incubação a aproximadamente 0°C pelos tempos de 10 e 40 minutos, sendo adicionados, respectivamente, 10ml de solução II e 7,5ml de solução III. A homogeneização do material foi feita suavemente por inversão do tubo.

Para separação do DNA cromossomal do DNA plasmidial, foi feita uma centrifugação (em rotor HB-4 ou SS-34) a 12000g por 20 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol, mantendo-se à temperatura ambiente por 5 minutos e coletando-se o precipitado por centrifugação a 12000g por 10 minutos a 4°C. Após secagem do sedimento a vácuo, por aproximadamente 10 minutos, o mesmo foi ressuspendido em 3ml de Tampão TE, sendo, em seguida, adicionados 30µl de RNase A e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos.

Para desagregação e remoção de complexos núcleo protéico do material, foi feito ajuste para 100mM de cloreto

de sódio ou acetato de sódio (pH 7,5) e 0,5% de sarcosil, sendo agitado vigorosamente por alguns segundos. Seguiu-se duas extrações com clorofane e uma com clorofil (v/v). À fase aquosa, foram adicionados 1/2v de acetato de amônio 7,5M (pH 7,5) ou ajustada para 200mM com cloreto de sódio e 2,5v de etanol 100% a -20°C, deixando-a a 0°C por 30 minutos para precipitação do DNA (12 horas a -20°C). O precipitado foi coletado através de centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C e lavado duas vezes com etanol 70% a -20°C, sem ressuspender o sedimento. Após cada lavagem, o material foi centrifugado a 12.000g, por 2 minutos a 4°C. O sedimento, secado a vácuo, foi ressuspendido em 150µl de tampão R e a concentração de DNA foi estimada através da espectrofotometria, medindo-se a absorbância a 260nm (uma unidade de absorbância a 260nm equivale a 50µg de DNA (DUGAICZYK *et alii*, 1975)).

● *Isolamento rápido de plasmídios (mini-preparação)*

As células foram cultivadas em 5ml de meio de cultura, com o antibiótico adequado até a fase estacionária. As células de 1,4ml da cultura foram coletadas a 12.000g por 2 minutos (micro-centrífuga Spin) ou a 3.000g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 50ml da mesma solução com 2mg/ml de lisozima. O material foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo, em seguida, adicionado: 200µl de

solução II e 150µl de solução III que foram incubadas em gelo/água, respectivamente, por 5 e 10 minutos. A cada passo, a homogeneização foi feita suavemente por inversão do Eppendorf. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000g por 2 minutos a 4°C.

Ao sobrenadante foi adicionado 0,5ml de isopropanol e incubou-se à temperatura ambiente por 20 minutos. O precipitado foi coletado através de centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4°C, sendo, então, lavado, sem ressuspender, com 1ml de etanol a 70% e então secado a vácuo e ressuspendido em 50µl de TR.

Para remoção do RNA, foi adicionado ao material 1µl de RNase A e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Após duas extrações, uma com clorofane e outra com clorofil, foi feita a precipitação do DNA nas mesmas condições já citadas no item 4.5. O sedimento coletado foi ressuspendido em 50µl de tampão R.

- *Preparo de plasmídios por ultracentrifugação em gradiente de densidade de cloreto de césio-brometo de etídio (maxi-preparação)*

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito no item 4.5. incluindo a etapa de centrifugação do material contendo as soluções I, II e III.

Ao sobrenadante obtido adicionou-se sarcosil para uma concentração de 1%. Em seguida, foi feita a desproteí-nização pela adição de clorofane e centrifugação a 2.000g por

10 minutos para separação das fases fenólica e aquosa. À fase aquosa, foi adicionado igual volume de isopropanol, mantendo-se o material à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo, em seguida, o precipitado coletado por centrifugação a 10.000g por 10 minutos. O sedimento foi secado a vácuo e ressuspendido em 1,5ml de tampão E.

O material para ultracentrifugação foi colocado em dois tubos de nitrato de celulose, sendo adicionados, em cada tubo: 3ml da solução IV ($\eta = 1,3780$) e 2ml da solução V contendo DNA ($\eta = 1,4080$), sendo que esta última foi colocada no fundo do tubo com seringa hipodérmica procurando-se não misturar as soluções; esta centrifugação foi efetuada a 36.000g por 15 horas a 4°C e tem por finalidade a separação do DNA plasmidial das proteínas, RNA e DNA cromossomal.

A banda contendo DNA plasmidial foi visualizada com auxílio de lâmpada UV (300nm) e coletada com uma seringa. Para remoção do brometo de etídio foram realizadas três extrações com igual volume de álcool isoamílico.

Para diluição do CsCl, foram adicionados 3 volumes de água destilada e 2 volumes de etanol 100% para precipitação, o material foi centrifugado a 10.000g por 30 minutos a 4°C e o precipitado secado a vácuo e ressuspendido em 250 μ l de tampão R. Uma nova precipitação foi feita sob as mesmas condições descritas no item 4.5. O material foi ressuspendido em 100 μ l de tampão R.

4.6. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada com a finalidade de separar, identificar e purificar fragmentos de DNA (MANIATIS *et alii*, 1982).

O gel foi preparado utilizando-se de 0,6 a 1% (p/v) de agarose tipo II em tampão TEB 1x, aquecendo-se até completa dissolução. A geleificação foi feita em placas de vidro, formando uma camada de aproximadamente 0,5cm de espessura, contendo os poços para aplicação das amostras em tampão amostra (TA 3x). As corridas foram realizadas de 10 a 50 mA, não sendo, porém, ultrapassado 150v.

Após a corrida à temperatura ambiente, os géis foram corados com brometo de etídio (1,0µg/ml) por 15 minutos e descorados no próprio tampão por 30 minutos. O DNA foi visualizado com auxílio de transiluminador tipo GT 300-8 da Germetec Ltda, e fotografado.

4.7. Digestão do DNA com enzimas de restrição

A digestão do DNA foi feita em sistemas que variavam de volume de acordo com a necessidade, sendo que o volume final geralmente era de 10µl.

O sistema continha tampão adequado e a proporção de enzima/DNA seguiu o critério sugerido pelo catálogo da New England Biolabs (USA). O volume final dos

sistemas foi completado com água bidestilada, sendo 10 vezes maior que o volume de enzima adicionado.

A incubação dos sistemas foi feita a 37°C por 2 a 3 horas.

4.8. Extração da enzima de restrição

A extração da enzima de restrição usada para a digestão do DNA foi feita uma vez com clorofane e outra com clorofil v/v.

A precipitação do DNA foi feita conforme descrito no item 5.1.

4.9. Tratamento com a enzima DNA polimerase I (DNA Pol I)

O fragmento Klenow do DNA polimerase I apresenta atividade polimerásica, isto é, catalisa a adição de unidades de mononucleotídeos de deoxinucleosídeos no sentido 5' - 3' da fita em formação a partir da extremidade 3' OH da cadeia "primer". Para que a reação ocorresse, se fez necessária a adição de deoxinucleosídeos (dATP, dCTP, dATP e dTTP).

O sistema preparado para cada plasmídeo continha, aproximadamente, 450ng de DNA, 2nmoles de cada deoxinucleosídeo, tampão Hin 10x e 0,5 unidade de Klenow. Incubou-se à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foi feita a precipitação do DNA.

4.10. Ligação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA foram ligados pela enzima T_4 DNA ligase (40U) em presença do tampão de ligação para um volume final de aproximadamente 10 μ l. O sistema foi incubado a 16°C por cerca de 12 horas, sendo, então, utilizado para transformar células de *E. coli* pelo método HANAHAM.

4.11. Deteção da presença de endonucleases de restrição

Para detecção de endonucleases de restrição produzida pelos *Bacillus* foi utilizada a técnica descrita por PIRROTA & BICKLE (1980).

As células foram cultivadas em 100ml de meio LB e incubadas sob agitação até atingir aproximadamente 10⁸ células por ml (60nm, DO = 0,6-0,7). As células contidas em 30ml desta cultura foram coletadas a 3.000g por 10 minutos a 4°C, sendo ressuspensas em 15ml de tampão de extração de endonuclease e novamente centrifugadas.

As células coletadas foram ressuspensas em 1 a 2ml do mesmo tampão contendo 4mg/ml de lisozima e inibidor de proteases (PMSF) para uma concentração final de 0,05mM. A suspensão foi mantida em gelo/água por 60 minutos. Após este período, foram submetidas a ultrasom até completar lise das células.

A suspensão obtida foi então centrifugada a

3.000g por 10 minutos a 4°C e alíquotas do sobrenadante foram incubadas a 37°C com DNA e tampões de reação 1, 2 e 3, quando, então, foi adicionado imediatamente tampão-amostra (Ta 3x) para interromper a digestão do DNA.

4.12. Transformação de E. coli

As células de *E. coli* foram transformadas pelo método do Tris-Cálcio, descrito por DARGET & EHRLICH (1979). Quando o propósito era uma alta eficiência de transformação foi utilizado o método descrito por HANAHAM (1983).

● *Transformação pelo método do Tris-Cálcio*

As células foram cultivadas em 50ml de meio LB e incubadas sob agitação até alcançarem, aproximadamente, $2 \cdot 10^7$ células/ml (0,2-0,3 OD, 650nm). Células de 30ml da cultura foram coletadas por centrifugação a 3.000g por 10 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspensionado em 15ml de solução Tris-Cálcio (Tris HCl 100mM, pH 7,5 e cloreto de cálcio 20mM) esterilizada e gelada. A suspensão foi incubada a 0°C por 20 minutos. O material foi novamente centrifugado nas mesmas condições já citadas anteriormente e ressuspensionado em 1ml da solução Tris-Cálcio. As células, desde que mantidas a aproximadamente 0°C, podem ser utilizadas imediatamente ou até 24 horas depois.

Para a transformação das células competentes,

foi adicionado o DNA numa proporção de 100µl de suspensão de células para 100 a 300ng de DNA. A mistura foi incubada a 0°C por 30 minutos e após um choque de 37°C por 5 minutos foi, então, adicionado 1ml de meio L para cada 100µl de células. Em seguida, foram incubadas por mais 60 minutos a 37°C e plaqueadas em meio seletivo por 12 a 15 horas.

Os clones transformados foram analisados para verificar a presença de plasmídios recombinantes.

● *Método de Hanaham*

As células de *E. coli* a serem transformadas foram cultivadas em placas de Petri em meio SOB-ágar por 16-20 horas. Após este período de tempo, duas colônias com aproximadamente 3mm de diâmetro foram inoculadas em 20ml de meio SOC e cultivadas neste meio sob agitação até alcançarem 0,35 a 0,4 unidades de absorbância a 600nm.

As células foram transferidas para tubos tipo "corex" gelados e mantidas em gelo/água por 10-15 minutos e, então, coletadas por centrifugação a 750-1.000g por 15 minutos a 4°C, sendo que o sedimento foi ressuspendido em 3,5ml de TFB gelado e incubado por 10-15 minutos a 0°C, recuperando-se, em seguida, as células por centrifugação. O material foi ressuspendido em 800µl de TFB e, em seguida, adicionaram-se 28µl de DnD, incubando-se nas mesmas condições por 10 a 20 minutos. Seguiu-se outro tratamento com DnD, conforme citado.

O material foi transferido para tubos de hemólise gelados, em alíquotas de 210µl cada, sendo, então, adicionado o DNA (em um volume sempre menor que 20µl) e incubado a 0°C por 20 a 40 minutos.

O choque térmico aplicado às células foi a 42°C por 1 minuto e imediatamente retornando para o gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 800µl de meio SOC e o material foi incubado a 37°C por 60 minutos sob agitação moderada, sendo, então, plaqueado em meio de cultura seletivo. Seguiu-se a análise dos plasmídios recombinantes.

4.13. Transformação de *Bacillus*

■ Transformação de *Bacillus subtilis*

A transformação de *Bacillus* foi baseada nas técnicas descritas por ANAGNOSTOPOULOS & SPIZIZEN (1961); CONTENTE & DUBNAU (1979); DUBNAU & DAVIDOFF (1971) e SPIZIZEN (1958).

As células foram cultivadas em 200ml de meio L e incubadas sob agitação até início da fase estacionária quando, então, 1ml da cultura foi transferido para um tubo de ensaio e diluído 5x em meio SpII (37°C). Em seguida incubou-se a cultura sob agitação suave por 75 minutos e após ajuste de EGTA para 1mM (esterilizado), incubou-se por mais 5 minutos. De 1 a 5µg de DNA foi então adicionado às células competentes que foram incubadas por mais 30 minutos. A seguir adicionou-se

10ml de meio Super L e a incubação a 37°C prosseguiu por mais 30 minutos.

O plaqueamento do material foi feito na proporção de 50 a 100µl por placa e em meio seletivo. Seguiu-se a análise dos plasmídios recombinantes.

■ Transformação de protoplasto de *Bacillus*

A transformação de protoplasto de *Bacillus* foi baseada na técnica descrita por CHANG & COHEN (1979).

Os bacilos foram cultivados em 50ml de caldo Penassay sob vigorosa agitação (150 rpm) até que atingissem aproximadamente de 1 a 2×10^8 células/ml (600nm, DO = 0,4).

As células foram coletadas por centrifugação a 3.000g por 10 minutos e ressuspensas em 1/10 do volume inicial da cultura, em SMMP. Adicionou-se lisozima dissolvida em SMMP e filtrada para uma concentração final de 2mg/ml e incubou-se a 37°C por 30 minutos. A protoplastização foi acompanhada ao microscópio, assim como as duas etapas que se seguiram.

Após este período, os protoplastos foram centrifugados a 1.000g por 10 minutos e ressuspensas suavemente em 1/10 do volume inicial em SMMP. Esta etapa foi repetida.

Em tubo "corex" de vidro foi colocado de 1 a 5µg de DNA em 30µl de tampão T.E. e 30µl de tampão SMM duas

vezes concentrado. A este, juntou-se 0,5ml da suspensão de protoplastos e 1,5ml de PEG 40%. Os tubos foram agitados suavemente por 2 minutos e, em seguida, mais 1/10 do volume de SMMP foi colocado.

Centrifugou-se a 1.000g por 10 minutos e os protoplastos foram ressuspensos em 1ml de SMMP, sendo, então, incubados por 90 minutos a 30°C e plaqueadas juntamente com tampão de protoplastos no meio de regeneração (DM3), com agente seletivo.

Após incubação por 2 a 3 dias, os clones recombinantes foram transferidos para meio L ágar amido com antibióticos seletivos.

4.14. Determinação da atividade de α -amilase

O método de CARAWAY (1959) utilizado para as dosagens de α -amilase foi otimizado para α -amilase produzida pelo *B. subtilis* HVS (SOUZA¹, 1988), de acordo com o método simplex, descrito por LONG em 1969.

Os fatores otimizados foram pH e concentração do tampão fosfato de sódio, além da temperatura de incubação da reação. Para a enzima produzida pelo *Bacillus* descrito acima, estes tiveram os seguintes valores: temperatura: 38,06°C, tempo de incubação: 7:30 minutos, sendo que o pH da suspensão

¹SOUZA, M. Comunicação Pessoal.

de amido tamponando foi de 7,35. O tempo de incubação da reação foi estendido para 15 minutos, uma vez que a maior parte dos microrganismos não são bons produtores. As linhagens foram cultivadas em meio M9CA acrescidas de cloranfenicol para os clones transformantes de *Bacillus* e ampicilina para os clones de *E. coli*. As amostras foram coletadas durante a curva de crescimento das células e centrifugadas a 3.000g por 10 minutos, sendo, então, o sobrenadante mantido sob refrigeração a 0°C até o momento da dosagem da atividade amilolítica da enzima.

4.15. Dosagem de proteína total

A concentração total de proteínas foi determinada utilizando-se o método descrito por BRADFORD (1976). As amostras foram coletadas nas mesmas condições citadas anteriormente, sendo usado para as dosagens 0,5ml do sobrenadante.

4.16. Seleção e análise de recombinantes

Os clones recombinantes foram inicialmente selecionados quanto às marcas de resistência aos antibióticos Cm e Tc e à capacidade de produzir halo de hidrólise do amido, visível em placa, após exposição ao vapor de iodo.

Estes clones foram submetidos a um isolamento rápido de plasmídios e posterior digestão com enzimas de restrição, para uma análise do perfil de restrição do DNA. Uma vez conferido o perfil, o plasmídio foi purificado (maxi-preparação) e quantificado, sendo usado, então, para outras transformadas.

5. RESULTADOS

5.1. Construção do vetor de clonagem molecular bifuncional para *E. coli* e *Bacillus*

O gene de α -amilase de *B. subtilis* do plasmídio pABC1 (SOUZA, 1986) foi transferido para o plasmídio pHV33 (EHRlich, 1977; BOLIVAR, 1977), dando origem ao pHVA4. Este plasmídio carrega a marca de resistência para o antibiótico cloranfenicol, proveniente do pCl94, que por sua vez é um marcador seletivo mais estável que a kanamicina do pABC1 (proveniente do pUB110) para seleção de clones transformantes de *E. coli* e *Bacillus*.

Para a construção do plasmídio pHVA4, foi feita a digestão do plasmídio pABC1 com as enzimas de restrição EcoRI e PvuII e posterior extração da enzima conforme citado no item 4.8.

A digestão do plasmídio pABC1 com a EcoRI liberou um fragmento contendo o gene de α -amilase, cujo peso

molecular aproximado foi de 2,4 Kb, determinado mediante o cálculo ao tamanho dos fragmentos produzidos a partir da mobilidade eletroforética, utilizando como padrão, o DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII.

A digestão do pABC1, com a enzima PvuII teve por finalidade diminuir a probabilidade de remontagens deste plasmídeo após a digestão e ligação ao pHV33.

Após a ligação dos fragmentos dos plasmídios pela enzima DNA ligase, células de *E. coli* HB101 e *E. coli* 5k foram transformadas.

Os clones recombinantes foram inicialmente selecionados quanto a resistência ao antibiótico marcador, ampicilina, e hidrólise do amido em placa de Petri.

Em seguida outras marcas de resistência foram verificadas, sendo então os clones transformantes preparados para mini extração de plasmídios e digestão com EcoRI para análise do perfil eletroforético.

A representação esquemática da construção e o mapa de restrição do plasmídeo pHVA4 encontram-se, respectivamente, nas figuras 3 e 4.

O perfil de restrição dos plasmídios pABC1, pHV33 e pHVA4 com a enzima de restrição EcoRI, encontra-se na figura 5. Pode-se observar que a enzima EcoRI clivou os

plasmídios pABC1 e pHVA4 em dois sítios, havendo a liberação do fragmento que contém o gene de α -amilase, enquanto que o pHV33 foi apenas linearizado devido ao sítio da enzima EcoRI no plasmídio.

Com o intuito de se verificar a orientação do fragmento que contém o gene de α -amilase, que foi inserido no pHVA4, foi feita a digestão dupla do DNA com as enzimas BstEII e PstI (Figura 6) sendo verificado, após corrida eletroforética e a partir da estimativa do tamanho dos fragmentos gerados, que o fragmento inserido se encontrava em posição invertida em relação ao pABC1, devido à distância das bandas.

5.2. Destruição do sítio de BamHI do plasmídio pHVA4

Devido a dificuldade encontrada em se obter clones recombinantes, com frequência significativa, com o pHVA4 e a hipótese de que o *B. amyloliquefaciens* estaria produzindo uma enzima de restrição capaz de clivar este plasmídio no sítio de BamHI, tentou-se destruir o referido sítio do plasmídio pHVA4.

A destruição do sítio de BamHI, no gene de TC do plasmídio pHVA4, deu origem a outro plasmídio bifuncional, denominado pHVB7.

A construção do plasmídio pHVB7 iniciou-se com a digestão do pHVA4 com a enzima BamHI. Após a digestão,

extraiu-se a enzima conforme foi descrito no item 4.8. Em seguida as extremidades do plasmídeo linearizado foram tratadas com o fragmento Klenow da DNA Polimerase I, conforme item 4.9., e após a extração da Polimerase, o plasmídeo foi tratado com a enzima DNA T4 ligase, para a ligação das extremidades.

Células de *E. coli* HB101 e *E. coli* 5k foram transformadas e os clones recombinantes foram selecionados quanto a resistência à ampicilina e formação do halo de hidrólise do amido. Seguiu-se teste quanto a resistência ao antibiótico tetraciclina, sendo que somente as sensíveis ao antibiótico poderiam estar carregando o pHVB7.

As figuras 7 e 8 representam esquematicamente a construção do plasmídeo e o mapa de restrição.

A digestão dos plasmídios pHVB7 e pHVA4 com a enzima EcoRI, evidencia a liberação do mesmo fragmento contendo o gene de α -amilase, enquanto que a digestão com a BamHI, mostrou que somente o pHVA4 foi linearizado, indicando a presença deste sítio e ausência do mesmo no vetor pHVB7, pois este se mantém intacto, como demonstra a figura 9.

5.3. Transformação de Escherichia coli com os vetores pHVA4, pHV33 e pHVB7

Duas cepas de *E. coli* foram preferencialmente

utilizadas para os estudos da expressão e secreção da α -amilase, como também para amplificação dos plasmídios utilizados para as análises: *E. coli* HB101 e *E. coli* 5K.

A análise de restrição dos plasmídios, tanto provenientes de *E. coli* 5K como *E. coli* HB101, demonstram que não há diferenças em relação ao material que foi amplificado, como pode ser observado nas Figuras 10 e 11. Estas Figuras mostram a análise dos clones de *E. coli* que foram utilizados para as análises comparativas da secreção da α -amilase.

Nos experimentos foram obtidas frequências de transformação da ordem de 10^4 células por micrograma de DNA. Estes transformantes foram previamente selecionados quanto à habilidade de hidrólise do amido, em placa de Petri e capacidade de conferir resistência aos antibióticos marcadores.

5.4. Transformação de *Bacillus* com o vetor pHVA1

Diversos experimentos de transformação, tanto de células competentes como de protoplastos, foram realizados com o intuito de introduzir o plasmídio dentro da célula hospedeira. Nestes experimentos utilizou-se, como controle, a linhagem *B. subtilis* SB202 devido à eficiência de transformação (10^4 células/ μ g DNA).

Considerando a dificuldade em se obter transformantes da linhagem PZ26 do *B. amyloliquefaciens*, através

da indução do estado de competência celular, modificou-se a técnica, passando-se a obter os protoplastos e em seguida transformá-los.

A eficiência de transformação dos protoplastos de *B. subtilis* se manteve na ordem de 10^4 células por micrograma de DNA, enquanto que, após diversas tentativas, foram obtidos apenas treze transformantes por micrograma de DNA para cepa de *B. amyloliquefaciens* PZ26.

As Figuras 12 e 13 mostram a análise do perfil de restrição com a enzima EcoRI de clones transformantes e selecionados seguindo o critério de produção do halo de hidrólise do amido e resistência aos antibióticos marcadores. Estes clones são de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, respectivamente, e foram, posteriormente, utilizados para as dosagens de atividades específica da enzima.

A baixa eficiência obtida para o *B. amyloliquefaciens* comparada à obtida pelo *B. subtilis* sugeriu presença de enzimas de restrição que são produzidas pelo próprio *Bacillus*. A Figura 14 ilustra uma corrida eletroforética em que se observa a digestão do DNA de fago λ por endonucleases presentes no lisado de células do *B. amyloliquefaciens*.

O perfil eletroforético apresentou bandas definidas semelhantes àsquelas produzidas pela digestão de DNA de fago λ com a enzima BamHI, sugerindo a existência desta endonuclease de restrição.

5.5. Estudo da produção da α -amilase

Com o propósito de ilustração e também como método preliminar de seleção foram feitos cultivos em placas de Petri, com meio de cultura LB ágar e amido, podendo ser visualizado o halo de hidrólise do amido pela enzima produzida por clones recombinantes e selvagens. A visualização do halo foi possível através da exposição das placas ao vapor de iodo (Figuras 15 e 16).

Diversos fatores influem no tamanho do halo de hidrólise produzido pelos microrganismos, como, por exemplo, a concentração do ágar-ágar, a quantidade do inóculo e o tempo de incubação. Apesar destas limitações, os resultados obtidos em placa se mostraram de acordo com as dosagens da enzima.

A determinação da atividade enzimática, bem como a dosagem de proteína total foram feitas diretamente no sobrenadante do meio de cultivo das cepas selecionadas para o ensaio.

O meio de cultura utilizado foi o M9CA, que é livre de amido e proteínas, que poderiam atuar como possíveis interferentes nas análises.

Os resultados obtidos estão representados graficamente nas Figuras 17 e 18 e representam o conjunto das

observações feitas do crescimento celular, a partir de seis horas de incubação, e atividade específica da α -amilase (atividade da α -amilase por mg de proteína total) em função do tempo.

Analisando-se os resultados como um todo, observa-se que a atividade específica da α -amilase é comparativamente menor nas cepas de *E. coli* que nas cepas de *Bacillus*.

Alguma atividade enzimática é detectada apenas em clones transformantes de *E. coli* 5K e mesmo assim, depois de um longo período de crescimento, demonstrando que a secreção da enzima é dificultada.

No caso das cepas de *Bacillus*, o sistema de transporte da α -amilase para o meio extra-celular é muito mais eficiente resultando em níveis mais altos de produção. Para as condições do ensaio, os melhores níveis de produção foram para a cepa recombinante do *B. subtilis* conforme o esperado. Contudo, o mesmo resultado não foi observado para a cepa de *B. amyloliquefaciens* em que a melhor atividade foi obtida pela cepa não transformada.

Figura 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO pHVA 4

Figura 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDIO pHVA4

- gene da α -amilase de B. subtilis originário do pABC₁ - (Souza, 1986)
 - - pC194
 - - pBR322
-] DNA originário do pHV33 (Primose e Ehrlich, 1981)
- Ori₁ - origem de replicação do pC194 (funcional em B. subtilis)
- Ori₂ - origem de replicação do pBR322 (funcional em E. coli)

FIGURA 5. Análise de restrição dos plasmídios pABC1, pHV33 e pHVA4, com a enzima EcoRI (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 = pABC1 intacto; 2 = pHV33 intacto; 3 = pHVA4 intacto; 4 e 8 = DNA digerido com EcoRI e HindIII; 5 = pABC1 digerido com EcoRI; 6 = pHV33 digerido com EcoRI; 7 = pHVA4 digerido com EcoRI.

FIGURA 6. Análise de restrição do plasmídeo pHVA4 com as enzimas PstI e BstEII (eletroforese em gel de agarose a 1%). 1 e 5 = DNA do fago λ digerido com EcoRI e HindIII; 2 = pHVA4 intacto; 3 = pHVA4 digerido com PstI; 4 = pHVA4 digerido com PstI e BstEII

Figura 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO pHVB 7

Figura 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDIO pHVB 7

gene da α -amilase de *B. subtilis* originário do pABC₁
 - (Souza, 1986)
 - pC194
 - pBR322] DNA originário do pHV33 (Primose e Ehrlich, 1981)

Ori₁ - origem de replicação do pC194 (funcional em *B. subtilis*).

Ori₂ - origem de replicação do pBR322 (funcional em *E. coli*)

FIGURA 9. Análise de restrição dos plasmídios pHVB7 e pHVA4 com as enzimas EcoRI e BamHI (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 e 5 = DNA. de fago λ digerido com EcoRI e HindIII; 2 = pHVB7 intacto; 3 = pHVB7 digerido com EcoRI; 4 = pHVB7 digerido com BamHI; 6 = pHVA4 intacto; 7 = pHVA4 digerido com EcoRI; 8 = pHVA4 digerido com BamHI.

FIGURA 10. Análise de restrição dos plasmídios pHVA4 e pHV33 provenientes de *E. coli* HB101 e *E. coli* 5K, respectivamente, com a enzima EcoRI (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 e 3 = pHVA4 intacto; 2 e 4 = pHVA4 digerido com EcoRI;
5 = DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII; 6 e 8 =
= pHV33 intacto; 7 e 9 = pHV33 digerido com EcoRI.

FIGURA 11. Análise de restrição do plasmídeo pHVB7 proveniente de *E. coli* HB101 e *E. coli* 5K, respectivamente, com a enzima EcoRI e BamHI (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 e 3 = pHVB7 intacto; 2 e 4 = pHVB7 digerido com EcoRI;
5 e 7 = pHVB7 intacto; 6 e 8 = pHVB7 digerido com BamHI.

FIGURA 12. Análise de restrição do plasmídeo pHVA4 proveniente de *B. subtilis* SB202, com a enzima EcoRI (eletroforese e em gel de agarose a 1%).

1 = DNA plasmidial intacto extraído de cepa transformada com pHVA4; 2 = DNA (pHVA4) digerido com EcoRI; 3 = DNA extraído da cepa selvagem intacto; 4 = DNA da cepa selvagem digerido com EcoRI; 5 = pHVA4 intacto; 6 = pHVA4 digerido com EcoRI; 7 = DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII.

FIGURA 13. Análise de restrição do plasmídeo pHVA4 proveniente de *B. amyloliquefaciens* PZ26, com a enzima EcoRI (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 e 3 = DNA intacto de clones recombinantes; 2 e 4 = DNA digerido com EcoRI dos clones recombinantes; 5 = DNA cepa selvagem intacto; 6 = DNA da cepa selvagem digerido com EcoRI; 7 = pHVA4 intacto; 8 = pHVA4 digerido com EcoRI; 9 = DNA de fago λ digerido com EcoRI e HindIII.

FIGURA 14. Análise de restrição do DNA do fago λ em presença do lisado de células de *B. amyloliquefaciens* PZ26 (eletroforese em gel de agarose a 1%).

1 = DNA de fago λ intacto; 2 = lisado de células de *B. amyloliquefaciens*; 3, 4 e 5 = DNA de fago λ digerido com endonucleases de restrição produzidas pelo *Bacillus*.

FIGURA 15. Hidrólise do amido em placa produzida por clones recombinantes de *Bacillus*.

A.1 = *B. subtilis* SB202 receptor.

2 = *B. subtilis* SB202 com plasmídeo pHVA4.

B.1 = *B. amyloliquefaciens* PZ26 receptor.

2 = *B. amyloliquefaciens* PZ26 com plasmídeo pHVA4.

FIGURA 16. Hidrólise do amido em placa produzida por clones recombinantes de *E. coli* HB101 e *Bacillus*.

- A.1 = *B. subtilis* SB202 com plasmídeo pHVA4.
- 2 = *E. coli* HB101 com plasmídeo pHVA4.
- B.1 = *B. subtilis* SB202 com plasmídeo pHV33.
- 2 = *B. subtilis* SB202 com plasmídeo pHVA4.
- 3 = *B. amyloliquefaciens* com plasmídeo pHVA4.

FIGURA 17. Análise comparativa de atividade específica de α -amilase de cepas de *E. coli*.

A = *E. coli* HB101 receptora; B = *E. coli* HB101 transformada com plasmídeo pHVA4; C = *E. coli* 5K receptora; D = *E. coli* 5K transformada com plasmídeo pHVA4; F = medida de absorvância em 660nm; G = atividade de α -amilase (U/mg $\times 10^{-1}$).

FIGURA 18. Análise comparativa de atividade específica de α -amilase de cepas de *Bacillus*.

A = *B. subtilis* SB202 receptora; B = *B. subtilis* SB202 transformada com plasmídeo pHVA4; C = *B. amyloliquefaciens* PZ26 receptora; D = *B. amyloliquefaciens* PZ26 transformado com plasmídeo pHVA4; F = medida de absorvância em 660nm; G = atividade de α -amilase (U/mg $\times 10^{-1}$).

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento das técnicas de clonagem molecular, abriram-se grandes perspectivas para construção de moléculas híbridas de DNA, contribuindo significativamente para a obtenção da expressão de vários genes em organismos heterólogos. Estes vetores permitem que a proteína expressa, codificada pelos genes clonados, seja facilmente detectada, além de possibilitar que proteínas de interesse biotecnológico sejam produzidas em grande escala.

O presente trabalho teve por objetivos a clonagem molecular do gene da α -amilase de *B. subtilis* em um determinado vetor e o estudo da produção da enzima em *E. coli* e *Bacillus*.

O vetor foi construído a partir dos plasmídios pABC1 e pHV33 (Figuras 1 e 2). O plasmídio híbrido, o pHVA4, GRAEL *et alii* (1988a) foi capaz de se duplicar em *E. coli* conferindo resistência aos antibióticos Ap, Tc e Cm e de se duplicar em *Bacillus* conferindo resistência Cm e Tc.

O fragmento de DNA, com o gene de α -amilase de *Bacillus subtilis* do plasmídeo pABC1 que foi inserido no sítio de EcoRI do plasmídeo pHV33, continha um promotor funcional somente para *Bacillus* (SOUZA, 1986).

Células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pHVA4 apresentaram também halo de hidrólise do amido, sugerindo que a expressão do gene de α -amilase estivesse sob a "ação" de um outro promotor que não o da α -amilase.

Observou-se, também, que alguns clones de *E. coli* transformados com o mesmo plasmídeo apresentaram resistência aos antibióticos, mas não produziam halos de hidrólise do amido, sugerindo que o fragmento de DNA inserido no plasmídeo pHV33 poderia estar invertido, não havendo a expressão e a secreção da α -amilase. Resultados semelhantes foram obtidos por ALEIXANDRE & BLANCO (1987), que clonaram no sítio de EcoRI do plasmídeo pBR322, uma sequência de 900pb e verificaram níveis diferentes de resistência ao antibiótico Ap em células de *E. coli* transformadas. Uma análise detalhada da sequência de nucleotídeos inserida, revelou que os diferentes níveis de resistência eram devido à orientação do fragmento, obtendo-se, assim, dois plasmídios diferentes.

CASTRO (1988) utilizando-se das técnicas de fusão gênica, estabeleceu a orientação do gene da α -amilase do plasmídeo pABC1 e baseando-se nestes resultados, foi feita uma

análise de restrição do plasmídeo pHVA4, verificando-se que o gene de α -amilase se encontrava em posição invertida em relação ao plasmídeo pABC1 (Figuras 2 e 4). Estes resultados foram constatados pela análise eletroforética em gel de agarose a 1% em que a dupla digestão com PstI e BstEII liberou um fragmento de aproximadamente 1Kb, enquanto que o fragmento liberado pela digestão do pABC1 com as mesmas enzimas seria de maior peso molecular (Figura 6).

Uma vez que estes parâmetros foram estabelecidos, trabalhou-se no sentido de se obter clones transformados das cepas de *E. coli* e *Bacillus*, com o plasmídeo bifuncional pHVA4.

A obtenção de clones transformantes por indução do estado de competência celular tanto para *E. coli* 5K como para *E. coli* HB101, não apresentou dificuldades, e clones foram selecionados pelo halo de hidrólise do amido e resistência aos antibióticos marcadores, sendo então usados, posteriormente, para as dosagens de α -amilase (Figura 10).

Observou-se uma diferença na taxa de produção de α -amilase extracelular entre clones de *E. coli* HB101 e de *E. coli* 5K, sendo que esta última apresentou maior quantidade de enzima produzida em relação a *E. coli* HB101.

Em seguida, experimentos foram feitos para se

obter células competentes de *Bacillus subtilis* SB202 e obteve-se uma eficiência de transformação ao redor de 10^4 transformantes por micrograma de DNA.

Utilizando-se da mesma técnica de CONTENTE & DUBNAU (1979) e DUBNAU & DAVIDOFF (1971) para obtenção de células competentes de *B. subtilis*, foram feitas diversas tentativas para se obter clones transformantes do *B. amyloliquefaciens*, entretanto nenhum resultado foi obtido embora seja considerável a proximidade filogenética entre as duas espécies (WELKER & CAPBELL, 1967a,b).

Novas possibilidades surgiram com a perspectiva da obtenção de protoplasto do *B. amyloliquefaciens*, pela técnica proposta por CHANG & COHEN (1979), para *B. subtilis*, sendo que todas as referências consultadas citavam esta técnica como básica para a obtenção de protoplastos.

De acordo com o trabalho de CHANG & COHEN (1979), a eficiência para *B. subtilis* Marbug 168 atingida foi de 4×10^7 transformantes por micrograma de DNA. A eficiência obtida para o *B. subtilis* SB202 foi de aproximadamente 10^4 transformantes por micrograma de DNA e para o *B. amyloliquefaciens* foi de 13 transformantes por micrograma de DNA.

Diversas transformações de protoplastos de *B. amyloliquefaciens* foram feitas, tendo sempre o *B. subtilis* SB202 como controle do experimento, mas nenhum outro clone

transformante foi conseguido além daqueles já obtidos e que possibilitaram o andamento dos trabalhos.

Com estes resultados levantou-se a hipótese de que o *B. amyloliquefaciens* estaria produzindo endonucleases de restrição, que estariam digerindo o DNA e assim dificultando o processo de transformação.

Outro indício de que a digestão do DNA estaria ocorrendo é que algumas cepas de *B. amyloliquefaciens* são produtores naturais da endonuclease de restrição Bam e o plasmídeo pHVA⁴ possui um sítio de BamHI no gene da tetraciclina.

Para verificar a presença das endonucleases de restrição, incubou-se o DNA de fago lâmbda (λ) com o sobrenadante do lisado de células do *B. amyloliquefaciens*.

A clivagem do DNA demonstrou a presença de endonuclease e o perfil de restrição obtido se assemelha ao perfil que a enzima comercial BamHI produz, quando incubada com o DNA de fago lâmbda (de acordo com o catálogo da NEW ENGLAND BIOLABS, 1987).

Uma baixa eficiência de transformação de *B. subtilis* M foi obtida também por BRON *et alii* (1988) ao estudar um plasmídeo derivado do pHV33, o pHV1401. Neste estudo ficou evidenciado a presença de um sistema de Restrição/Modificação do próprio *Bacillus*. Com estes dados fica ressaltada

a importância do *B. subtilis* SB202 como célula hospedeira, pois não produz enzimas de restrição, e justifica, em parte, a dificuldade em se obter transformantes de *B. amyloliquefaciens*.

Observa-se pelos resultados obtidos, que a linhagem SB202 do *B. subtilis*, apresentou eficiência de transformação semelhante tanto para células competentes como para protoplastos, com a mesma preparação de DNA, sugerindo que esta linhagem de *B. amyloliquefaciens* talvez tenha requerimentos especiais.

Um outro fator responsável pela baixa frequência de transformação em *B. amyloliquefaciens* poderia estar relacionado com a característica morfológica da linhagem, cujas colônias secretam camadas espessas de mucopolissacarídeos. Provavelmente estaria ocorrendo uma interferência desses mucopolissacarídeos nos esferoplastos, durante a transformação.

O peso molecular do plasmídeo é um fator importante também a ser considerado, mas neste caso, o plasmídeo pHVA4 tem um peso molecular de 9,15Kb e transformou células competentes de *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

Uma vez obtidos os clones transformantes, foi feita uma análise de restrição com EcoRI para se averiguar a presença do plasmídeo pHVA4, que pode ser demonstrado pelas Figuras 10, 12 e 13.

Os clones escolhidos para as dosagens de α -amilase seguiram os seguintes critérios: análise de restrição do plasmídeo recuperado de *E. coli*, boa resistência aos antibióticos marcadores e um halo de hidrólise do amido em placa.

Considerando os resultados obtidos, o próximo passo foi retirar o sítio de BamHI (do gene de Tc), do plasmídeo pHVA4, dando origem ao plasmídeo pHVB7 (Figuras 7 e 8), esperando-se, assim, uma eficiência de transformação bem maior àquela obtida anteriormente para o *B. amyloliquefaciens*. O resultado esperado contudo, não foi obtido.

A dificuldade em se obter transformantes continuou apesar das várias tentativas feitas, fazendo crer que outros fatores estariam influenciando nos resultados. Estes fatores poderiam ser: a formulação do meio de cultura e o inóculo. MARTIN *et alii*, 1981 observou que a frequência de transformação de protoplastos de *B. thuringiensis* aumentava significativamente quando era suprimido do meio de cultura (Penasay) a glucose. Verificaram, também, que somente quando o inóculo inicial se encontrava na fase vegetativa é que ocorria a formação dos protoplastos.

Um outro fator que poderia interferir na transformação está relacionado com a forma do DNA plasmidial requerido pela célula em estado de competência.

A transformação de células competentes de *B. subtilis* requer, aparentemente, plasmídios na forma de múltiplos, devido ao processo de absorção e incorporação do plasmídio (no caso de *Bacillus* e outras bactérias gram-positivas, se faz necessário que o DNA esteja em dupla fita).

Protoplastos de *B. subtilis* transformados com plasmídios na forma ccf (circular covalentemente fechado), resultaram em baixa eficiência, segundo dados obtidos por MOTTES *et alii* (1979). Também RUDOLPH *et alii* (1986), verificaram que os protoplastos de *B. subtilis* foram mais prontamente transformados com DNA plasmidial de fita simples.

SOUZA¹ (1988) através de um simplex, otimizou as condições de dosagem da atividade de α -amilase para o *B. subtilis* HVS contendo o plasmídio pABCl. Estas condições estabelecidas foram utilizadas para o estudo comparativo da produção enzimática entre cepas de microrganismos utilizados para este trabalho.

Através da análise dos dados obtidos com cepas de *E. coli* (Figura 17), verificou-se baixa produção da enzima em clones transformantes, sendo que a *E. coli* 5K apresentou

(1) SOUZA, M. (UnB - Laboratório de Bioquímica). Comunicação pessoal 1988a.

uma atividade específica cerca de três vezes maior que a cepa transformante de *E. coli* HB101 com o tempo de 24 horas de incubação.

Resultados obtidos por GRAEL *et alii* (1988b), indicaram que a linhagem de *E. coli* 5K produz mais α -amilase de *B. subtilis* que a linhagem de *E. coli* HB101. Foi verificado, também, um sensível aumento na atividade enzimática na fase estacionária (48 horas), indicando que a maior parte da enzima ficou retida no interior da célula, possivelmente no espaço periplasmático e estaria sendo liberada no meio de cultura como resultado da lise celular.

CHANG *et alii* (1987) estudando a secreção do hormônio de crescimento humano por *E. coli* verificaram que altos níveis de secreção eram obtidos, embora 90% fossem secretados para o espaço periplasmático (Figura 18).

Os pontos da curva de crescimento usados para as dosagens comparativas foram tomados a partir de 6 horas de crescimento, quando então as culturas estariam entre o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária, período este citado como o de melhor produção da α -amilase para a maior parte dos *Bacillus* (PRIEST, 1977). Sabe-se, entretanto, que o *B. liqueniformis*, por exemplo, produz α -amilase em maiores quantidades durante a fase logarítmica de crescimento (ROTHSTEIN *et alii*, 1986).

Avaliando-se a Figura 18, verifica-se que o clone transformante do *B. subtilis* SB202 apresentou uma atividade específica no intervalo de tempo de 8 a 10 horas, duas vezes maior que a cepa selvagem, indicando que para esta cepa o plasmídeo pHVA4 reforçou a produção de α -amilase. Entretanto, o mesmo efeito não ocorreu para o *B. amyloliquefaciens*. O clone transformante apresentou atividade menor em relação à cepa selvagem.

Baseando-se no fato de que era esperado que a expressão e a secreção do gene de α -amilase do *B. amyloliquefaciens* transformado fossem pelo menos semelhantes ao da cepa selvagem, sugeriu-se que durante a transformação, tenha ocorrido uma recombinação tal que interferiu na expressão gênica.

Como foi mencionado anteriormente, a utilização de vetores possibilita que diversas informações genéticas sejam clonadas e expressas em organismos heterólogos; assim, os plasmídios tem capacidade de comandar vias biossintéticas dentro da célula hospedeira.

Os impactos provocados pela recombinação da informação genética podem ser tanto positivos como negativos para a própria célula hospedeira, bem como sob o aspecto biotecnológico.

A extensão das interações plasmídeo-célula hospedeira, dependem de diversos fatores como, por exemplo, do

número de cópias do plasmídio, extensão da informação genética (tamanho do plasmídio) e da estabilidade do plasmídio na célula hospedeira.

BAILEY *et alii* (1986), baseando-se nos conhecimentos de vias energéticas e através dos cálculos da produção teórica máxima, apoiado nos fatores ATP, glucose e O_2 , demonstrou que profundas alterações metabólicas ocorriam em células recombinantes de *E. coli* com altos níveis de expressão do gene clonado.

Dados como estes indicam que diversas alterações metabólicas podem estar ocorrendo nas células recombinantes e que um estudo mais aprofundado pode levar a uma maior conhecimento dos efeitos da recombinação do material genético sobre o metabolismo celular.

Estudos posteriores podem levar também ao desenvolvimento de vetores de clonagem mais adequados para o *B. amyloliquefaciens* PZ26, e a um maior conhecimento dos requerimentos específicos para uma transformação mais eficiente com esta linhagem.

Dando continuidade a este trabalho, pretende-se:

- transformar outras espécies de bactérias Gram positivas com o plasmídio pHVA4 e quantificar a produção de α -amilase.

- alterar o promotor do gene da α -amilase objetivando a superprodução de α -amilase em microrganismos recombinantes.

- Caracterizar bioquímica e fisicoquimicamente a α -amilase produzida por bactérias recombinantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRIGG, A. & AYAD, S.R. Studies on the competence - Inducing factor of *Bacillus subtilis* - Biochem. J. 117: 393-403, 1970.
- ALDERSON, G.; WARD, W.H. & FEVOLD, H.L. Isolation of lysozyme from egg white. J. Biol. Chem., 157: 43-58, 1945.
- ALEIXANDRE, V. & BLANCO, M. Heterogeneity in the level of ampicillin resistance conferred by pBR322 derivatives with different DNA supercoiling. Mol. Gen. Genet., 209: 56-60, 1987.
- AIBA, S.; KITAI, K. & IMANAKA, T. Cloning and expression of thermostable α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol., 46: 1059-1065, 1983.

- ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPIZIZEN, J. Requeriments for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 81: 741-746, 1961.
- AVERY, O.T.; MACLEOD, C.M. & Mc CARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. J. Exp. Med., 79: 137-158, 1944.
- BAILEY, J.E ; DA SILVA, N.A.; PERETTI, S.W.; SEO, J. H. & SRIENC, F. Studies of host-plasmid interactions in recombinant microorganisms. Biochem. Eng., 469: 194-211, 1986.
- BENTON, W. & DAVIS, R. Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques "in situ". Science, 196: 180-2, 1977.
- BHELLA, R.S. & ALTOSAR, I. Purification and some properties of the extracelullar α -amylase from *Aspergillus awamori*. Can. J. Microbiol., 31: 149-53, 1985.
- BIRBOIN, H.C. & DOLY, L. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7: 1513-23, 1979.

- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. Transfer of proteins across membranes I - Presence of proteolytically processed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of Murine myeloma. J. Cell. Biol., 67: 835-851, 1975.
- BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R.L.; GREENE, P.J.; BETLACH, M.C.; HEYNEKER, H.L. & BOYER, H.W. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene, 2: 95-113, 1977.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254, 1976.
- BRODA, P. Plasmids. USA. W.H. Freeman & Co. S. Francisco, 1979, 197 p.
- BRON, S.; JANNIÈRE, L. & EHRLICH, S.D. Restriction and modification in *Bacillus subtilis* Marbug 168: Target sites and effects on plasmid transformation. Mol. Gen. Genet., 211, 186-189, 1988.
- BOYER, H.W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 41: 459-472, 1969.

CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and the other body fluids. Amer. J. Clin. Path., 32: 97-99, 1959.

CASTRO, M.E.B. Análise do gene de α -amilase de *Bacillus subtilis* visando o desenvolvimento de um vetor bifuncional de expressão-secreção. Brasília, 1988, 91 p. (MS - Universidade de Brasília).

CHANG, C.N.; REY, M.; BOCHNER, B.; HEYNEKER, H. & GRAY, G. High level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. Gene, 55: 189-196, 1987.

CHANG, S. & COHEN, S.N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. Molec. Gen. Genet. 168: 111-115, 1979.

CHUNG, H.E. & FRIEDBERG, F. Sequence of the N-terminal half of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase. Biochem. J., 185: 387-395, 1980.

COLLINS, J. & BRUNING, H.J. Plasmids usable as gene cloning vectors in an "in vitro" packaging by coliphage λ : "cos-mids". Gene, 4: 85-107, 1979.

- COLLINS, J. & HOHN, B. Cosmids: A type of plasmid gene - cloning vector that is packageable "in vitro" in bacteriophage heads. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4242-6, 1979.
- CONTENTE, S. & DUBNAU, D. Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: kinetic properties and the effect of DNA conformation. Mol. Gen. Genet., 167: 251-258, 1979.
- DARGET, M. & EHRLICH, S.D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene, 6: 23-28, 1979.
- DENHARDT, D.J.; DRESSLER, D. & RAY, D.S. eds. The single-stranded DNA phages. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1978.
- DUBNAU, D., 1976. Genetic transformation in *B. subtilis*: a Review with emphasis on the recombinant mechanism. In D. Schlessinger (ed) Microbiology, 1976. American Society for Microbiology, W. DC. 14-27 p.
- DUBNAU, D. & CIRIGLIANO, C., 1972. Fate of transformation DNA following uptake by competent *B. subtilis* III. Formation and properties of products isolated from transformed cells which are derived entirely from donor DNA. J. Mol. Biol., 64: 31-46.

- DUBNAU, D. & DAVIDOFF, A.E. Fate of transforming DNA following uptake by competente *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 56: 209-221, 1971.
- DUGAICZYK, A.; BOYER, H.W. & GODMAN, H.M. Ligation of EcoRI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol., 96: 171-84, 1975.
- EHRLICH, S.D. Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 1680-82, 1977.
- FISHER, E.H. & STEIN, E.A. Bacteriol and mold amylases. In: The Enzymes, New York, Academic Press, 1971, V. 5, 247 p.
- FOGARTY, W.M. Microbial amylases. In: Fогarty, W.M. Microbial enzymes and biotechnology. London and New York. Applied Science Publishers, 1983, 1-92 p.
- FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: Rose, A.H. Microbial enzymes and bioconversions. England, Academic Press, 1980, V. 5, Cap. 3.

GARGER, S.I.; GRIFFTH, O.M. & GRILL, L.K. Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two-step cesium chloride - Ethidium bromid gradient. Biochem. Biophys. Res. Comm., 117: 835-842, 1983.

GASSON, M.J. & DAVIES, F.L. The genetics of dairy lactic-acid bacteria. In: Davies, F.L. & Law, B.A. (ed.). Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Amsterdam, Elsevier Applied Science Publishers, 1984, p. 99-126.

GRAEL, E.T.; SOUZA, M.T.; CRUZ, W.B. & ASTOLFI Fº S. Produção de α -amilase de *Bacillus subtilis* por *Escherichia coli* recombinante. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 15. Piracicaba, 1988. Universidade de Brasília, 1988b

GRAEL, E.T.; VASCONCELOS, S.A.; TAVARES, F.C.A. & ASTOLFI Fº. Transformação de *Bacillus* com plasmídeo recombinante contendo o gene de α -amilase. In: Reunião Anual de Genética de Microrgasnismos, 15. Piracicaba, 1988. Universidade de Brasília, 1988a

GRIFFTH, F. The significances of pneumococcal types. J. Hyg. 27: 113-159, 1928.

- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol., 166: 557-580, 1983.
- HARDY, K.G. Bacillus cloning method. In: Glover, D.M. DNA cloning - A practical approach. Oxford, W.D., TRL Press Limited, Vol. II, 1985.
- HOPKINS, R.H. Actions of amylasis. Adv. Enz., 6: 389-414, 1946.
- HORINOUCHI, S. & WEISBLUM, B. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: mechanisms that regulated erythromycin - induced resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 7079-83, 1980.
- HUBACEK, J. & GLOVER, S.W. Complementation analysis of temperature - sensitive host specificity mutations in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol., 50: 111-127, 1970.
- IKUTA, N.; VALENCIA, F.F.; CASTRO, M.E.B.; SOUZA, M.B.N.S. & ASTOLFI F?, S. O gene de α -amilase como marcador genético para clonagem molecular. In: Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Goiânia, 1987. Universidade de Brasília, 1987.

ISERENTANT, D. & FIER, W. Secondary structure of mRNA and efficiency of translation initiation. Gene, 9: 1-12.

KEGGINS, K.M.; LOVETT, P.S. & DUVALL, E.J. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus* DNA in *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pVB110. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 574-578, 1978.

KRISHNAN, T. & CHANDRA, A.K. Purification and characterization of α -amylase lacking identifiable phenotypic properties. J. Bacteriol., 124: 225-231, 1983.

LEDERBERG, J. Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiological Reviews, 32: 403-30, 1952.

LEHTOVAARA, P.; ULMANEN, I. & PALVA, I. "In vivo" transcription initiation and termination sites of an α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* cloned in *Bacillus subtilis*. Gene, 30: 11-16.

LONG, D.E. Simplex optimization of the response from chemical systems. Anal. Chim. Acta, 46: 193-206, 1969.

MALHER, H.R. & CORDES, E.H. Biological chemistry. 2^a ed., New York, Harper & Row Publishers, EUA, 1971, p. 477-478.

- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982.
- MATSUZAKI, H.; YAMANE, K.; NAGATA, Y. & MARUO, B. Hybrid α -amylases produced by transformant of *B. subtilis*. I. Purifications and characterization of extracellular α -amylases produced by the parental strain transformants. Biochem. Biophys. Acta, 365: 235-47, 1974.
- MEDDA, S. & CHANDRA, A.K. (1980). New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. J. Appl. Bacteriol., 48: 47-58.
- MORAN, C.P.; LANG, N.; LE GRICE, S.F.J.; LEE, G.; STEPHENS, M.; SONENSHEIN, A.L.; PERO, J. & LOSICK, P. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet., 186: 339-346.
- MORRISON, D.A. Transformation in *Pneumococcus*: Existence and properties of a Complex Involving donor deoxyribonucleate single strand in eclipse. J. Bacteriol, 132: 576-583, 1977.

- MORRISON, D.A. & MANNARELLI, B. Transformation in *Pneumococcus*: Nuclease Resistance of deoxyribonucleic Acid in the Eclipse complex. J. Bacterial, 140: 655-665, 1979.
- MOSELEY, M.H. & KEAY, L. Purification and characterization of the amylases of *Bacillus subtilis* NRRL B3411. Biotech. Bioeng., 12: 251-271, 1970.
- MOTTES, M.; GRANDI, G.; SGARAMELLA, V.; CANOSI, U.; MORELLI, G. & TRAUTNER, T.A. Different specific activities of the monomeric and oligomeric forms of plasmid DNA in transformation of *Bacillus subtilis* and *E. coli*. Molec. Gen. Genet. 174: 281-286, 1979.
- OHMURA, K.; YAMAZAKI, H.; TAKEICHI, Y.; NAKAYAMA, A.; OTOZAI, K.; YAMANE, K.; YAMAZAKI, M. & TAMURA, G. Nucleotide sequence of the promoter and NH₂ - terminal signal peptide region of *Bacillus subtilis* α -amylase gene cloned in pUB110. Bioch. Bioph. Res. Com., 112: 678-683, 1983.
- ORTLEPP, S.A.; OLINGTON, J.F. & McCONNELL, D.J. Molecular cloning in *Bacillus subtilis* of a *Bacillus licheniformis* gene encoding a thermostable alpha amylase. Gene, 23: 267-276, 1983.

- PALVA, I. Molecular cloning of α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and its expression in *Bacillus subtilis*. Gene, 15: 43-51, 1981.
- PALVA, I.; OETTERSON, R.F.; KALKKINEN, N.; LEHTOVAARA, P.; SARVAS, M.; SODERLUND, H.; TAKKINEN, K. & KAARIAINEN, L. Nucleotide sequence of the promoter and NH₂ - terminal signal peptide region of the α -amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. Gene, 15: 43-51, 1981.
- PALVA, I.; SARVAS, M.; LEHTOVAARA, P.; SIBAKOV, M. & KAARIAINEN, L. Secretion of *Escherichia coli* β -lactamase from *Bacillus subtilis* by the aid of α -amylase signal sequence. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 5582-86, 1982.
- PIGGOTT, R.P.; ROSSITER, A.; ORTLEPP, S.A.; PEMBROKE, J.T. & OLLINGTON, J.F. Cloning in *Bacillus subtilis* of an extremely thermostable alpha-amylase: Comparison with other cloned heatable α -amylase. Bioch. Bioph. Res. Com., 122: 175-183, 1984.
- PIRROTA, B. & BICKLE, T.A. General purification schemes for restriction endonucleases. In: Methods in Enzymology. 65: 89-95, 1980.

- PRIBNOW, D. Nucleotid sequence of an RNA polimerase binding site at an early T7 promoter. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72: 784-789.
- PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacter. Rev., 41: 711-753, 1977.
- PRIMROSE, S.B. & EHRLICH, S.D. Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. Plasmid, 6: 193-201, 1981.
- ROBYT, J.F. & FRENCH, D. Multiple attack hypothesis of α -amylase action: Action of porcine pancreatic, human salivary and *Aspergillus oryzae* α -amylases. Arch. Bioch. Bioph. 122, 1967.
- ROLLINGS, J.E. & THOMPSON, R.W. Kinetics of enzymatic starch liquefaction: Simulation of hight molecular wheight produced distribution. Biotec. Bioeng., 126: 1475-84, 1984.
- ROSEMBERG, M. & COURT, D. Regulatory: sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Gen., 13: 319-353, 1979.

- ROTHSTEIN, D.M.; DEVLIN, P.E. & CATE, R.L. Expression of α -amylase in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol., 168 (2): 839-842, 1986.
- RUDOLPH, C.T.; SCHMIDT, B.J. & SAUNDERS, C.W. Transformation of *Bacillus subtilis* by single-stranded plasmid DNA. J. Bacteriol., 165 (3): 1015-18, 1986.
- SAITO, N. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Bioch. Bioph., 165: 290-298, 1973.
- SCHOROEDER, J.L. & BLATTNER, F. Least-squares method for restriction mapping. Gene, 4: 167-74, 1978.
- SHINE, J. & DALGARNO, L. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature, 254: 34-38, 1975.
- SIBAKOV, M. & PALVA, I. Isolation and 5'-end nucleotide sequence of *Bacillus licheniformis* α -amylase gene. Eur. J. Biochem., 145: 567-572, 1984.
- SMITH, H.O.; DANNER, D.B. & DEICH, R.A. Genetic transformation. Ann. Rev. Biochem., 50: 41-68, 1981.

- SOUZA, E.C. Plasmídios bacterianos. In: Costa, S.O.P. In: Genética molecular e de microrganismos. São Paulo. Editora Manoele Ltda., 1987, Cap. 16.
- SOUZA, E.C. & COSTA, S.O.P. Recombinação em bactérias. In: Costa, S.O.P. Genética molecular e de microrganismos. São Paulo. Editora Manoele Ltda., 1987, Cap. 15.
- SOUZA, M.B.N.S. Clonagem molecular e expressão do gene de α -amilase de *Bacillus* sp. Brasília, 1986, 80 p. (MS - Universidade de Brasília).
- SPIZIZEN, J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 44: 1072-78, 1958.
- STEIN, E.A.; HSIU, J. & FISCHER, E.H. Alpha-amylases as calcium - metalloenzymes. I. Preparations of calcium free apomyases by chelation and eletrodialysis. Biochemistry, 3 (1): 56-61, 1964.
- TAKKINEN, K.; PETTERSSON, R.F.; KALKKINEN, N.; PALVA, I.; SODERLUND, H. & KAAIAINEN, L. Amino acid sequence of α -amylase from *Bacillus amylobliquefaciens* deduced from the nucleotide sequence of the cloned gene. J. Biol. Chem., 258: 1007-1013, 1983.

TICHY, P. & LANDMAN, O.E. (1969). Transformation in spheroplasts of *B. subtilis* J. Bacteriol., 97: 42-51.

TWIGG, A.J. & SHERRATT, D. Trans - complementable copy - number mutants of plasmid col EI. Nature, 283: 216-218, 1980.

WELKER, N.E. & CAMPBELL, L.L. Crystallization and properties of α -amylase from five strains of *Bacillus amyloliquefaciens*. Biochem., 6: 3681-89, 1967a.

WELKER, N.E. & CAMPBELL, L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 94 (4): 1124-30, 1967b.

WILLEMOT, K. & CORNELIS, P. Growth defects of *Escherichia coli* cells which contain the gene of an α -amylase from *Bacillus coagulans* on a multicopy plasmid. J. Gen. Microb., 311-319, 1983.

YAMAZAKI, H.; OHMURA, K.; NAKAYAMA, A.; TAKEICHI, Y.; OTOZAI, K.; YAMASAKI, M.; TAMURA, G. & YAMANE, K. Alpha-amylase - genes (amyR2 and amyE*) from an α -amylase hyperproducing *B. subtilis* strain: Molecular cloning and nucleotide sequences. J. Bacteriol., 156: 327-337, 1983.

YANG, M.; GALIZZI, A. & HENNER, D. Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. Nucleic. Acids. Res., 11: 237-249, 1983.

YONEDA, Y. & MARUO, B. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α -amylase and protease and its synergistic effect. J. Bacteriol., 124: 40-54, 1975.