

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por VALTER ROBERTO LINARDI e aprovada pela Comissão Julgadora em 02.07.85.
Campinas, 02 de julho de 1985.

J. C. A.

Presidente da Banca

MELHORAMENTO DE *Bacillus amyloliquefaciens* POR

TRANSFORMAÇÃO E FUSÃO, PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE

E PROTEASES.

11/85

VALTER ROBERTO LINARDI

Orientador: Dr. Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de "Doutor" em Ciências de Alimentos.

- CAMPINAS -

1985

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Yong Kun Park, da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Departamento de Ciências de Alimentos, Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas, pelo apoio e estímulo na condução deste trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas de sua Diretora Dra. Iracema Moraes de Oliveira e do Coordenador do Curso de Pós-Graduação, Dr. Cesar F. Ciacco.

À Telma Silvia Tomé Assad Salim, secretária do Curso de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas, pela simpatia e dedicação aos estudantes de Pós-Graduação

Aos amigos Lúcio F. Antunes, Raul S.H. Castro Gómez, Hélia Satto e Lúcia S. Jafelice, pelo estímulo.

De modo particular e especial agradecemos aos Profs. Eduardo Osório Cisalpino e Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da Universidade de Minas Gerais.

Agradecemos aos colegas que sempre nos apoiaram, especialmente Elisabeth Spangler Andrade, Maria Elizabeth Bernardes Margutti Pinto, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto e Patrícia Silva Cisalpino, do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos Profs. Eder Silva e Flávia Maria de Oliveira, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela leitura do trabalho.

À bibliotecária Ana Lúcia de Menezes Linardi, da Universidade Federal de Minas Gerais, somos gratos pela colaboração e dedicação a nós prestadas.

A Marinês Martini Teixeira, pelo trabalho de datilografia.

A CAPES/PICD, pela bolsa de estudos concedida.

A Associação Brasileira de Indústrias da Alimentação (ABIA), pelas cópias deste trabalho.

*À Ana Lúcia, Silvia,
Leonardo e Fernando.*

ÍNDICE

| | PÁGINA |
|--|--------|
| RESUMO ----- | XI |
| SUMMARY ----- | XIII |
| 1. - INTRODUÇÃO ----- | 1 |
| 2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ----- | 5 |
| 3. - MATERIAIS E MÉTODOS ----- | 22 |
| 3.1. - PROCEDÊNCIAS DAS DROGAS E MEIOS DE CULTURA - | 22 |
| 3.2. - MICRORGANISMOS ----- | 23 |
| 3.3. - MEIOS DE CULTURA ----- | 24 |
| 3.4. - ISOLAMENTO DO <i>B. natto</i> ----- | 29 |
| 3.5. - ISOLAMENTO DO <i>B. natto</i> RESISTENTE À ESTREPTO MICINA ----- | 30 |
| 3.6. - EXPERIMENTOS COM DNA TRANSFORMANTE ----- | 30 |
| 3.7. - EXPERIMENTOS COM FUSÃO DE PROTOPLASTOS ----- | 35 |
| 3.8. - PRODUÇÃO DE α -AMILASE ----- | 37 |
| 3.9. - PRODUÇÃO DE PROTEASES ----- | 39 |
| 3.10 - ASPECTOS TAXONÔMICOS DIFERENCIAIS DOS PAREN- TAIS E RECOMBINANTES ----- | 41 |
| 3.11 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE ----- | 41 |
| 3.12 - EFEITO DO pH, TEMPERATURA E ESTABILIDADE(°C) NA ATIVIDADE DA α -AMILASE ----- | 42 |
| 3.12 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS PRODU- TOS DE HIDRÓLISE DO AMIDO PELA α -AMILASE PRO- DUZIDAS PELAS LINHAGENS <i>B. amyloliquefaciens</i> E T-41 ----- | 44 |

| | |
|---|----|
| 3.14 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRA E ALCALINA ----- | 45 |
| 3.15 - EFEITO DO EDTA NAS ATIVIDADES PROTEOLÍTI - CAS ----- | 45 |
| 4. - RESULTADOS ----- | 47 |
| 5. - DISCUSSÃO ----- | 78 |
| 6. - CONCLUSÕES ----- | 89 |
| 7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----- | 91 |

LISTA DE TABELAS

| | PÁGINA |
|--|--------|
| TABELA 1 - Produção de α -amilase e proteases, neutra e alcalina, obtidas de linhagens parentais e recombinantes, por transformação ----- | 50 |
| TABELA 2 - Produção de α -amilase e proteases, neutra e alcalina, obtidas de linhagens parentais e recombinantes, por fusão-- | 51 |
| TABELA 3 - Aspectos taxonômicos diferenciais dos parentais e das linhagens recombinantes ----- | 53 |
| TABELA 4 - Cinética de produção da α -amilase pelo <i>B. amyloliquefaciens</i> ----- | 55 |
| TABELA 5 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-41 ----- | 57 |
| TABELA 6 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-49 ----- | 59 |
| TABELA 7 - Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo <i>B. natto</i> (Sm) ^R -- | 69 |

| | |
|---|----|
| TABELA 8 - Cinética de produção das proteases , neutra e alcalina, pelo recombinante F-52 ----- | 71 |
| TABELA 9 - Cinética de produção das proteases , neutra e alcalina, pelo recombinante T-39 ----- | 74 |
| TABELA 10- Efeito do EDTA nas atividades proteo_ líticas ----- | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| | PÁGINA |
|--|--------|
| FIGURA 1 - Espectro de absorção do DNA extraído do <i>B. natto</i> (Sm) ^R ----- | 49 |
| FIGURA 2 - Cinética de produção da α -amilase pelo <i>B. amyloliquefaciens</i> ----- | 56 |
| FIGURA 3 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-41 ----- | 58 |
| FIGURA 4 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-49 ----- | 60 |
| FIGURA 5 - Efeito do pH na atividade da α -amila- se ----- | 63 |
| FIGURA 6 - Efeito da temperatura na atividade da α -amilase ----- | 64 |
| FIGURA 7 - Estabilidade das α -amilase nas tempe- raturas 60°C e 65°C ----- | 65 |
| FIGURA 8 - Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise do amido pela α - amilase produzidas pelas linhagens <i>B.</i> <i>amyloliquefaciens</i> e T-41 ----- | 67 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 9 - Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo <i>B. natto</i> ----- | 70 |
| FIGURA 10- Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo recombinante F-52 ----- | 72 |
| FIGURA 11- Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina pelo recombinante T-39 ----- | 75 |

RESUMO

Utilizando-se duas espécies distintas de *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* ATCC 2342 e o *B. natto*, isolado do produto comercial "Natto", respectivamente, bons produtores de α -amilase e proteases, conseguiu-se aumentar os níveis de produção destas enzimas, através das técnicas de transformação e fusão de protoplastos.

O melhoramento genético por transformação mostrou ser mais eficiente do que o realizado por fusão de protoplastos.

Dos vários recombinantes isolados, obtidos por transformação, foram selecionadas as linhagens T-41 e T-39. A primeira, T-41, produziu duas vezes mais α -amilase e três ve

zes mais proteases, enquanto que a segunda, T-39, produziu quatro vezes mais proteases, considerando-se o receptor *B. amylo-liquefaciens*.

Estudos comparativos demonstraram que a α -amilase produzida pelo receptor apresentou atividade ótima, em pH 6,0 e temperatura ótima a 65°C. Na temperatura de 60°C a enzima foi estável por 60 minutos. Por outro lado, a enzima produzida pelo T-41 apresentou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura ótima a 65°C. A 60°C a atividade amilásica começou a decrescer a partir de 40 minutos, com declínio acentuado a partir de 65°C.

A análise do cromatograma evidenciou que as enzimas produzidas por essas linhagens apresentaram a mesma maneira de atuação sobre o amido.

O recombinante T-41 mostrou ser mais susceptível à autólise celular do que o *B. amyloliquefaciens*.

A atividade amilásica da linhagem F-52, obtida por fusão de protoplastos, foi o dobro da atividade do parental *B. natto*, e somente este recombinante desenvolveu a capacidade de crescer a 50°C.

SUMMARY

Two different strains of *Bacillus*, were used *B. amyloliquefaciens* ATCC 2342 and *B. natto*, isolated from the commercial product "Natto", good producer of α -amylase and of proteases, respectively. The level of production of these enzymes was increased through technique using transformant DNA and fusion of protoplasts. The genetic improvement by transformation was shown to be more efficient than that obtained by protoplast fusion.

Among the various recombinant DNA's isolated and obtained by transformation, the T-41 and T-39 strains were selected. The former produced twice as much α -amylase and

three times the quantity of proteases as the *B. amyloliquefaciens*, while the T-39 strain produced four times as much proteases as *B. amyloliquefaciens*.

Comparative studies demonstrated that the α -amylase produced by the recipient had maximum activity at pH 6,0 and 65°C. At 60°C, the enzyme was stable for 60 minutes. Similarly, the enzyme produced by T-41 showed maximum activity at pH 6,0 and 65°C. At 60°C, the amylase activity began to decrease after 40 minutes, with a sharp decline in activity at 65°C.

An analysis of the chromatogram indicated that the enzymes produced by these strains demonstrated the same type of activity on starch.

The recombinant T-41 was shown to be more susceptible to cellular autolysis than *B. amyloliquefaciens*.

The amylase activity of the F-52 strain, obtained by protoplast fusion, was twice that of the parent *B. natto* and only this recombinant developed the capacity to grow at 50°C.

1. - INTRODUÇÃO

Quando se quer produzir enzima a preço acessível para sua utilização em grande escala, deve -se levar em consideração os seguintes itens: melhoramento genético de cepas produtoras e resistentes à repressão catabolítica durante a fermentação, otimização do meio de cultura e otimização das condições de fermentação.

As taxas de mutação podem ser aumentadas substancialmente pela ação de agentes mutagênicos de natureza física ou química, sendo que os mais usados no melhoramento genético de microrganismos são: N- metil N-nitro N-nitrosoguanidina (NTG) , luz ultra-violeta e irradiações ionizantes. Entretanto, o uso

destes agentes apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade de se obter mutantes estáveis, devido ao mecanismo de reparo do microrganismo. Uma outra seria a escolha do meio de cultura seletivo e indicador para o isolamento dos mutantes. Além disso, a manipulação destes agentes exige cuidados especiais, pois são na maioria, cancerígenos. Estes problemas são reduzidos quando se pode utilizar, no melhoramento genético, o DNA transformante ou a fusão de protoplastos. Em ambas as técnicas, o uso de marcadores seletivos, como resistência a drogas ou necessidades nutricionais, acrescido do substrato específico ao meio de cultura, quando se está melhorando a produção de uma enzima, facilita o isolamento dos recombinantes.

A transformação só ocorre após a célula receptora ter desenvolvido a capacidade de se ligar irreversivelmente ao DNA do doador, o que irá reduzir a instabilidade do recombinante. Porém, somente um número limitado de espécies bacterianas é capaz, sob condições fisiológicas apropriadas, de incorporar DNA em solução, no processo denominado transformação¹⁶. Segundo FOX¹⁶, se o fragmento de DNA for homólogo ao DNA do receptor, uma fração substancial incorpora-se ao genoma da célula receptora criando regiões de vários milhares de nucleotídeos em comprimento, no qual uma fita do DNA duplex é do DNA doador e a fita complementar é do receptor.

Como a taxa de recombinação ocorre com baixa frequência, marcadores seletivos devem ser usados. Estes marcadores devem estar contidos no DNA do doador, o que irá permitir a sele-

ção de recombinantes na presença de um grande número de células receptoras.

A resistência a drogas e as necessidades nutricionais são marcadores normalmente usados nos experimentos de transformação^{16, 52}.

A fusão de protoplastos tem sido um instrumento bastante útil na manipulação genética assexual de vários microrganismos e, como tal, é uma técnica com grande potencialidade no melhoramento genético de microrganismos. Como na transformação, devem ser usados marcadores seletivos. Os protoplastos de duas linhagens distintas são misturadas e tratadas com agente fusogênico. Em seguida, os protoplastos são inoculados em meios seletivos específicos para a regeneração e seleção dos recombinantes⁵⁷.

As α -amilases e proteases microbianas são enzimas de grande aplicabilidade industrial. As α -amilases são utilizadas nas indústrias têxteis, de papel, de adesivos e alimentos²⁹ e as proteases microbianas em indústrias de alimento, de couro e farmacêutica⁷⁰.

Considerando-se a grande importância industrial destas enzimas, o presente trabalho propõe, através de manipulações genéticas, usando o DNA transformante e fusão de protoplastos, obter linhagens estáveis e capazes de produzi-las em maior escala.

Serão utilizados o *B. amyloliquefaciens* e o *B. natto* considerados, respectivamente, bons produtores de α -amilase e

proteases.

Pretende-se também comparar algumas propriedades das enzimas produzidas pelos recombinantes com aquelas produzidas pelas linhagens parentais.

2. - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As bactérias do gênero *Bacillus* são organismos quimio organotróficos, facilmente cultivadas e mantidas em laboratório, apresentando acentuada heterogeneidade de características.

Virtualmente, todas as quarenta e oito espécies de *Bacillus* descritas por GIBSON *et alii*¹⁷, no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", secretam uma grande variedade de enzimas extracelulares. Entre estas, as amilases e proteases são as mais ubíquas, pois, das quarenta e oito espécies, trinta e duas degradam o amido e a grande maioria degrada a caseína⁴³.

As enzimas envolvidas na quebra do amido recebem o nome genérico de amilases. Estas enzimas hidrolizam ligações gli

cosídicas α -1-4 e/ou 1-6. Sob o ponto de vista biotecnológico , as amilases classificam-se em α -amilases, β -amilases, amiloglicosidasas e enzimas desramificantes¹⁵.

α -AMILASES MICROBIANAS

As α -amilases (α ,1-4 glucan, 4-glucanohidrolase:EC 3. 2.1.1.), atuam no interior do substrato (endoenzimas), rompendo ao acaso as ligações glicosídicas α ,1-4 do amido, do glicogênio e de maltooligosacarídeos, com produção de açúcares redutores , formando, principalmente, maltose e pequenas quantidades de glicose e maltotriose³⁰.

As α -amilases são encontradas em vegetais, tecidos a nimais e microrganismos. As de origem microbiana são obtidas na forma cristalina a partir de bactérias do gênero *Bacillus* como: *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* e a par tir de fungos, principalmente do gênero *Aspergillus* como *A. niger* e *A. oryzae*⁵¹.

A produção de amilase por leveduras do gênero *Schwan-*
niomyces e *Endomycopsis* tem sido estudada por vários pesquisado
res, como CLEMENTI *et alii*¹¹ e WILSON *et alii*⁷¹, dentre outros.

As amilases microbianas têm grande aplicabilidade in
dustrial, sendo utilizadas nas indústrias têxteis, de papel, de
adesivos e de alimentos²⁹. As α -amilases de diferentes fon

tes diferem em estrutura química, na afinidade pelo substrato e nos produtos de sua hidrólise, porém, têm a mesma especificidade enzimática.

As α -amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis do que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial⁹.

As α -amilases produzidas por várias espécies de *Bacillus* diferem entre si quanto à faixa ótima de pH, temperatura, estabilidade da enzima, além de outros fatores fisiológicos inerentes à cada espécie. Portanto, as enzimas de diferentes origens têm aplicabilidades específicas em diferentes setores⁹.

CAMPBELL⁸ isolou e purificou α -amilase produzida pelo *B. coagulans*. Esta enzima mantém 90% de sua atividade após uma hora a 90°C.

HARTMAN *et alii*²² verificaram que α -amilase de *B. stearothermophilus* permaneceu ativa após 12 horas a 90°C. A enzima produzida por este microrganismo é mais termoestável do que a secretada pelo *B. subtilis*.

MADSEN *et alii*³² e CHIANG *et alii*¹⁰ isolaram de diferentes linhagens de *B. licheniformis* uma α -amilase termoestável e ativa em solução de amido a temperaturas superiores a 100°C, que recebeu a denominação comercial de Thermamyl³² e Taka Therm¹⁰.

As α -amilases estudadas, incluindo a termoestável se-
cretada pelo *B. stearothermophilus*, têm pH ótimo na faixa neu-
tra ou ácida, diminuindo a atividade na faixa alcalina⁶. Poucas
são as espécies de *Bacillus* capazes de secretar amilase alcali-
na que apresentam pH ótimo entre 9,2 e 10,5. Contudo, a enzima
perde atividade rapidamente a temperaturas acima de 40°C³⁴.

SAITO⁴⁶ isolou de solo uma cepa de *B. licheniformis*,
produtora de α -amilase, com atividade numa faixa ampla de pH,
sendo a atividade máxima na faixa alcalina, a 76°C.

MORGAN *et alii*³⁷, trabalhando com *B. licheniformis* ob-
tidas de coleções de cultura, verificaram que a produção de α -
amilase termorresistente é uma característica desta espécie.

Na tabela que se segue estão relacionadas as proprie-
dades gerais de amilases secretadas por algumas espécies de *Ba*
*cillus*¹⁵.

| Microrganismos | pH ótimo de atividade | pH ótimo de estabilidade | Temperatura ótima (°C) |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>B. subtilis</i> NRRL 83411 | 6,0 | 5,5 - 9,5 | 60 |
| <i>B. stearothermophilus</i> | 4,5 - 5,1 | -- | 55 - 70 |
| <i>B. licheniformis</i> | 5,0 - 8,0 | 6,0 - 11,0 | 76 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 5,9 | 5,9 | 65 |

As α -amilases são parcialmente indutíveis para algumas espécies de *Bacillus*. Como o amido não pode penetrar na célula bacteriana, ele não está diretamente envolvido no processo de indução. Estas bactérias sintetizam constitutivamente a α -amilase em níveis bem baixos, mas o suficiente para quebrar o substrato exógeno, resultando produtos de baixo peso molecular. Estes compostos resultantes da hidrólise entram na célula e estimulam a maior produção da α -amilase⁴³.

A maltotetraose é o indutor mais efetivo para o *B. stearothermophilus*⁶⁸ e para o *B. licheniformis*⁴⁷. A maltotriose e maltooligosacarídeos (G5, G6 e G7) são indutores menos efetivos do que a maltotetraose. Os oligosacarídeos não relacionados com o amido como a melibiose e a celobiose não induzem a α -amilase⁷. Alguns *Bacillus* parecem sintetizar constitutivamente a α -amilase. O *B. amyloliquefaciens*¹², *B. subtilis* 168⁴⁹ e o *B. licheniformis*³⁵ sintetizam a α -amilase, mesmo na ausência de oligosacarídeos α -1-4.

Os *Bacillus* produzem dois tipos de α -amilase: a liquificante e a sacarificante. Estas enzimas diferem, principalmente, quanto à ação sobre o amido. A sacarificante produz maiores quantidades de produtos com capacidade redutora do que a liquificante³³. A amilase sacarificante, além de possuir característica liquificante, possui atividade sobre as ciclodextrinas e difere imunologicamente da amilase liquificante³⁹.

O *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*, *B. natto* e o *B. subtilis* Marburg, produzem amilases do tipo sacarificante. O *B.*

amyloliquefaciens produz enzima do tipo liquificante¹³.

Todas as α -amilases são cálcio-metaloenzimas⁵¹, o cálcio atua como cofator¹³. O efeito estabilizante dos sais de cálcio nas preparações de α -amilases foi primeiramente observado por Wallerstein em 1909, que patenteou a adição destes sais nas preparações enzimáticas para a fabricação de cervejas. Desde então, como o fenômeno de estabilização tem sido observado em todas as preparações de α -amilases, tornou-se rotina a adição destes íons na purificação da enzima com o objetivo de estabilizar e promover a sua cristalização⁵⁶.

Várias α -amilases têm sido cristalizadas. O seu peso molecular está em torno de 50.000 e todas contêm um átomo grama de cálcio por molécula. A α -amilase do *B. subtilis* é a única que contém zinco, além do cálcio⁵³.

O íon cálcio está ligado firmemente à molécula e tem papel importante na preservação da integridade da enzima, tornando-a estável e imune aos ataques de enzimas proteolíticas, além de atuar em sua atividade catalítica⁵³.

A remoção dos íons cálcio por agentes quelantes faz com que a enzima se torne altamente susceptível ao ataque de proteases, presentes nas preparações como contaminantes⁵⁶.

Não existem evidências de que o cálcio participe diretamente na formação do complexo enzima-substrato. Provavelmente o metal não está localizado no centro ativo da enzima, mas preferencialmente localizado no interior da molécula. O cálcio confere à molécula uma conformação ótima para a sua máxima atividade

de e estabilidade e está relacionado com a manutenção da estrutura terciária da enzima²³. Segundo HSIU *et alii*²³ a α -amilase do *B. subtilis* não possui pontes dissulfeto. Parece que o íon cálcio substitui as ligações S-S. Segundo estes autores, as α -amilases pertencem a uma nova classe de metaloenzimas, caracterizadas por um grupo prostético que é um metal alcalino-terroso no lugar de um elemento de transição com função estrutural, substituindo as pontes dissulfeto.

BIOSSÍNTESE DAS α -AMILASES - ANÁLISE GENÉTICA

GREEN *et alii*¹⁸ foram os primeiros pesquisadores a iniciar o estudo genético da biossíntese da α -amilase, utilizando o *B. subtilis*. As linhagens receptoras e doadoras produziam amilases que diferiam em vários aspectos, incluindo estabilidade ao calor e sensibilidade à repressão catabólica. Os recombinantes isolados incorporaram as informações genéticas contidas no DNA do doador.

Posteriormente, YUKI⁶⁷, realizando experimentos de transformação para o gene de α -amilase, com diferentes linhagens de *B. subtilis*, concluiu que o gene estrutural para α -amilase está ligado ao gene aro¹¹⁶, que direciona a biossíntese de aminoácidos aromáticos. Concluiu também que o gene regulador está ligado ao gene estrutural. Portanto, o gene regulador está

localizado próximo ao gene aro¹¹⁶. Os genes estruturais das diferentes linhagens estudadas são alelos⁶⁷.

YMAGUCHI *et alii*⁶⁰, realizando experimentos de transformação com cepas de *B. natto* IAM 1212, atuando como doador de DNA e com *B. subtilis* Marburg, como receptor, confirmaram as posições de YUKI⁶⁷ de que o gene regulador controla a síntese da α -amilase e participa do sistema de produção da enzima. Este gene está ligado ao gene estrutural que, por sua vez, está ligado ao gene aro¹¹⁶.

Foram realizados estudos de transformação utilizando-se o *B. natto*⁵⁸ e *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*⁶⁴ como doadores de DNA e o *B. subtilis* como receptor. Em ambos os casos, o gene que controla a velocidade de síntese, característica dos doadores, recombina-se independentemente do gene estrutural para α -amilase.

O gene estrutural para α -amilase foi denominado amy E e o regulador amy R. O gene regulador para o *B. subtilis* foi designado como amy R1 e os genes que conferem alta velocidade de síntese para α -amilase foram designados amy R2 para o *B. natto* e amy R3 para o *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*⁶⁴.

A ultra-estrutura da região genética que codifica a síntese de α -amilase foi estudada por YAMAGUCHI *et alii*⁵⁹. Os autores isolaram 28 mutantes de *B. subtilis* defectivos para a síntese de α -amilase. A partir dos dados obtidos verificaram que as mutações ocorreram na região amy E e que o gene amy R está contíguo à porção terminal do gene estrutural amy E. Todos os

genes amy são co-transferíveis com o gene aro¹¹⁶, numa frequência de 30 a 40%. Além dos genes amy E e amy R, outros genes afetam a biossíntese da amilase.

YONEDA *et alii*^{63,62} isolaram mutantes de linhagens transformantes de *B. subtilis* após tratamento com nitrosoguanidina. Dos mutantes obtidos, com característica de alta produção de amilase, seis tiveram a produção de proteases aumentada simultaneamente. O estímulo para produção destas enzimas é controlado por um outro gene que foi denominado pelos autores de pap. O gene pap não está ligado ao aro¹¹⁶ e nem ao estrutural amy E. Quando o gene pap e o amy R coexistem numa mesma cepa, observa-se o efeito sinérgico para a produção da α -amilase. Os mutantes produziam de duas a três vezes mais esta enzima e oito a dezesseis vezes mais proteases do que os parentais. Após a introdução do gene pap observam-se as seguintes modificações fenotípicas: os mutantes perdem a característica de competência para a transformação, as células em cultivo tornam-se filamentos formando cadeias e a autólise celular diminui.

A tunicamicina (TM) é um antibiótico anti-viral, ativo também contra bactérias Gram positivas, leveduras e fungos. SASAKI *et alii*⁴⁸ obtiveram mutantes de *B. subtilis* TM resistentes. Entre os mutantes, uma cepa produzia cinco vezes mais amilase do que os parentais. Este aumento foi observado só para a α -amilase. A análise por transformação sugere que uma mutação simples induziu a resistência à TM e leva à hiperprodução da enzima. A

produção de α -amilase é, então, regulada por inúmeros genes. Os mais significativos são: amy R, pap e tmr. O amy R regula a síntese da enzima e está ligado ao estrutural amy E. O pap regula a produção de proteases e α -amilase e afeta algumas propriedades pleiotrópicas do *Bacillus*. O tmr está envolvido com a resistência à TM e com o aumento da α -amilase⁶¹ *B. subtilis* leva o gene amy R1, o *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* o amy R3. Na ausência de outros genes o amy R1 induz a produção de 10 UD/mL e o amy R3 de 50 UD/mL. É possível introduzir outros genes através de experimentos de transformação, o que irá aumentar a produção de α -amilase⁶¹. A ação destes genes não é aditiva, mas de natureza sinérgica. Como exemplo, o transformante SP38, obtido por transformação do *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* produz em torno de 250 UD/mL de amilase. Duas vezes mais do que a cepa doadora. A análise genética revelou que o SP38 adquiriu o gene amy R3, bem como mais dois novos genes do *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*, o papS1 e amy S1. A denominação destes genes se relaciona com a linhagem e função. Os genes papS1 e amyS1, codificam a hiperprodução de α -amilase e proteases. O papS1 codifica a produção de duas a três vezes mais α -amilase e de cinco a quinze vezes mais proteases do que o gene pap. O papS não altera as características pleiotrópicas da célula bacteriana, ao passo que o pap altera. A tabela que se segue demonstra o efeito sinérgico dos vários genes para a produção de α -amilase⁶¹.

| Linhagens | GENES | | | | | | | Produção de amilase (UD/mL) |
|-----------|-------|-------|-------|-------|------|-----|-----|-----------------------------------|
| | amyR1 | amyR2 | amyR3 | papS1 | amyS | tmR | pap | |
| 6160 | + | | | | | | | 11,4 |
| YN118 | + | | | | | | + | 22,3 |
| Na64 | | + | | | | | | 46,0 |
| YY110 | | + | | | | | + | 140,0 |
| B7 | | + | | | | | + | 175,0 |
| SP38 | | | + | + | + | | | 209,0 |
| TM23 | | | + | + | + | + | | 1475,0 |
| PP13 | | | + | + | + | + | + | 2532,0 |

Vários genes estão envolvidos na produção de α -amilases pelo *B. subtilis*, sendo um o regulador específico. Como a amilase é sintetizada no interior da célula e secretada para o exterior, pelo menos duas etapas estão envolvidas na síntese da enzima: a transcrição do mRNA específico e o transporte da enzima nascente para o exterior da célula⁴⁰. NAGATA *et alii*⁴⁰ sugerem que a capacidade de síntese de α -amilase está relacionada também com o quantidade de mRNA.

PROTEASES MICROBIANAS

As proteases microbianas, que têm aplicações interessantes nas indústrias alimentícias, de couro e farmacêuticas, são todas enzimas extracelulares⁷⁰. Numerosos microrganismos, incluindo principalmente aqueles do gênero *Bacillus*, produzem grande quantidade de proteases no meio, durante a fermentação.

KEAY²⁶ divide as proteases microbianas em ácidas, neutras e alcalinas.

HARTLEY²¹ propõe uma classificação baseada no mecanismo de ação das proteases, agrupando-as em serino-proteases, metaloproteases, proteases ácidas e as tiol-proteases.

MORIHARA³⁸ classificou as proteases de acordo com a sua especificidade, dividindo-as em quatro grupos:

- proteases como tripsina, específicas para as ligações peptídicas envolvendo resíduos básicos;
- proteases alcalinas, com especificidade para as ligações peptídicas envolvendo pequenos resíduos alifáticos como a alanina;
- proteases de estafilococos, com especificidade para as ligações peptídicas envolvendo resíduos acíclicos, com ponto de quebra no lado carboxílico.

As tiol-proteases com pH ótimo próximo à neutralidade, são ativas na presença de agentes redutores e inibidas por agentes sulfidrílicos, porém são pouco afetadas pelo di-isopro

pil-fosfogluoridrato (DFP) ou agentes quelantes. MORIHARA³⁸ as divide em dois grupos:

- . clostripainas: que são secretadas pelo *Clostridium histolyticum* e que são altamente específicas para as ligações peptídicas envolvendo resíduos básicos, com ponto de quebra no lado carboxílico; e
- . proteases de estreptococos, com especificidade mais ampla.

As metaloproteases, com o ótimo de atividade em pH neutro, são divididas em quatro grupos por MORIHARA³⁸:

- proteases neutras, específicas para as ligações peptídicas envolvendo resíduos hidrofóbicos;
- proteases alcalinas, com especificidade bastante ampla;
- myxobacter AL-1-protease, com especificidade para resíduos de aminoácidos pequenos, com ponto de quebra em ambos os lados nas cadeias de insulina B oxidada e peptídeos sintéticos, e
- myxobacter AL-1-protease II, específica para os resíduos de lisina, atuam em cadeias de insulina B oxidada e em peptídeos sintéticos.

As proteases ácidas não são subdivididas. São específicas para as ligações peptídicas envolvendo resíduos aromáticos ou para resíduos maiores de peptídeos sintéticos, e mostram uma ampla atividade na hidrólise de cadeias de insulina B oxidada³⁸.

Com poucas exceções, as proteases excretadas pelos *Bacillus* são proteases neutras (metaloenzimas) ou proteases alcalinas (serino-proteases)⁴³.

As proteases neutras são produzidas por um grande número de bactérias e fungos. Todas estas proteases são metaloenzimas contendo 1 mol de Zn/mol de enzima¹⁴. São inibidas por agentes quelantes como o EDTA. Estes agentes se ligam inicialmente ao zinco sem desprendê-lo da enzima. A diálise do complexo enzima-inibidor resulta em uma rápida restauração da atividade catalítica. As proteases neutras não são inibidas pelo DFP ou tiol-reagentes. Estas enzimas são as menos estáveis entre as proteases microbianas. A rápida autólise destas enzimas dificulta a determinação de algumas características físico-químicas como, por exemplo, o peso molecular. A estabilidade diminui rapidamente em valores de pH abaixo de 6,0 ou acima de 9,0. As proteases neutras são mais estáveis na presença de cálcio¹⁵. Fugindo à regra, o *B. thermoproteolyticus* excreta uma protease neutra bastante estável⁵. O *B. polymyxa*, o *B. megaterium*, o *B. cereus* e o *B. thermoproteolyticus* somente sintetizam proteases neutras, embora muitas bactérias secretem proteases neutra e alcalina, simultaneamente. As proteases neutra e alcalina excretadas pelo *B. subtilis* podem ser separadas por cromatografia de adsorção em hidroxil-apatita^{27, 28}.

As proteases alcalinas são produzidas por bactérias e fungos e se assemelham às proteases de origem animal, como a tripsina e quimiotripsina. As enzimas alcalinas, secretadas por

uma grande variedade de microrganismos do gênero *Bacillus* são denominadas subtilisinas⁵⁵. A subtilisina Novo é produzida pelo *B. amyloliquefaciens* e a Carlsberg é representada pelas enzimas produzidas pelo *B. licheniformis* e *B. pumilus*. Estas subtilisinas são distintas entre si, embora possuam muitas propriedades em comum²⁸. Os estudos imunológicos das inúmeras proteases alcalinas excretadas por um grande número de *Bacillus* demonstraram não haver reação cruzada entre a subtilisina Novo e Carlsberg²⁸.

As proteases alcalinas microbianas apresentam a serina em seu centro ativo. O pH ótimo está na faixa alcalina, são inibidas por agentes organofosfóricos como o DFP e não são inibidas por agentes quelantes e tiol-reagentes¹⁵.

KATO *et alii*²⁵ isolaram uma bactéria marinha psicrófila que excreta protease alcalina sensível ao EDTA.

As proteases ácidas têm grande aplicabilidade nas indústrias de alimentos. São produzidas principalmente por fungos. Estas enzimas mostram propriedades similares às de origem animal, como a pepsina e a quinase. Não são sensíveis a agentes quelantes, a metais pesados, a agentes sulfidrílicos ou ao DFP⁷⁰.

BIOSSÍNTESE DE PROTEASES - ANÁLISE GENÉTICA

O *B. subtilis* sintetiza proteases neutra e alcalina no início da fase estacionária. Porém, a produção de protease alcalina parece estar intimamente associada com o processo de esporulação. Embora a análise genética da síntese de proteases seja bastante complicada, alguns avanços têm sido obtidos pelo emprego de transformação inter-específica, como as realizadas na análise genética da α -amilase⁴³.

O *B. natto* produz proteases com atividade total de quinze a vinte vezes maior que a produzida pelo *B. subtilis*. Esta diferença em atividade é devida à quantidade de protease neutra produzida pelo *B. natto*. A razão entre as atividades de protease neutra e alcalina (N/A) foi de 1 para o *B. subtilis* e 13 para o *B. natto*⁵⁵.

A transformação do *B. subtilis* com DNA do *B. natto* realizada por UEHARA *et alii*⁵⁵, resultou no isolamento de 73 transformantes com a característica de hiperprodução de protease neutra (Nprh). Estes recombinantes produziram proteases com atividade total idêntica à produzida pelo doador.

Os 73 transformantes isolados podem ser divididos em três grupos:

- . 69 com o fenótipo Nprh Sep⁺ Amy⁺;
- . 1 com o fenótipo Nprh Seph Amy⁺ e
- . 3 com fenótipo Nprh Sep⁺ Amyh.

(Npr= protease neutra e sep= serino-protease)

UEHARA *et alii*⁵⁵ sugeriram que a protease neutra pode ser regulada por um mecanismo idêntico àquele que controla a síntese de α -amilase. A protease neutra é codificada por um gene estrutural nprE, que é controlado pelo regulador nprR. Os genes nprR1 e nprR2, encontrados no *B. subtilis* e *B. natto*, respectivamente, direcionam a baixa e alta produção de protease neutra.

A análise genética da síntese de serino-protease é complicada pela sua íntima associação com a esporulação. O gene estrutural para a serino-protease foi identificado por mutações ts.5, isolado por LEIGHTON *et alii*³¹. O *B. subtilis* WB 746 ts.5, a 30°C, possui propriedades do tipo selvagem mas, a 47°C, produz uma serino-protease defectiva. O ts.5 foi mapeado por LEIGHTON *et alii*³¹, que o localizaram entre o aroD e lys por transdução, mas ainda permanecem dúvidas se os fenótipos obtidos são resultados de uma mutação simples, pois MILLET *et alii*³⁶ não tiveram sucesso na separação destas características por transformação. Apesar das evidências obtidas por LEIGHTON *et alii*³¹ o envolvimento da síntese da serino-protease com a esporulação ainda não está confirmado. Mutações específicas para o aumento de serino-protease ainda não foram obtidas, embora muitas mutações pleiotrópicas aumentem a produção de serino-protease, além de outras enzimas⁴³.

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. - PROCEDÊNCIAS DAS DROGAS E MEIOS DE CULTURA

No presente trabalho foram utilizadas substâncias de alto grau de pureza, provenientes dos seguintes laboratórios : Sigma Chemical Company, E. Merck Ag. Darmstad, Carlo Erba, Riedel, Reagen e Fontoura-Wyeth.

As drogas relacionadas abaixo foram provenientes dos seguintes laboratórios:

Tirosina: Sigma
Lisozima: Sigma
RNase : Sigma
DNase : Sigma
Caseína hidrolisada: Sigma
Caseína purificada : Sigma
Polietileno glicol - 6000 (PEG): Sigma
Amido solúvel: Reagen
Etilenodiamina tetra acetato di-sódio(EDTA): Reagen
(Hidroximetil) amino metano (Tris): Riedel
Dodecilhidrogênio sulfato sal sódico (SDS): Merck
Reagente de fenol seg. folin-ciocalteu: Merck
Estreptomicina: Fontoura-Wyeth
Peptona: Difco
Extrato de levedura: Difco
Ágar nutriente: Difco
Caldo nutriente: Difco
Tioglicolato de sódio: Merck.

3.2. - MICRORGANISMOS

No presente trabalho utilizou-se o *Bacillus amyloli* - *quefaciens* - ATCC 2342, cedido gentilmente pelo Dr. Tobias Menezes (ITAL/Campinas) e o *Bacillus natto*, isolado do produto comercial "Natto".

As culturas-estoque foram mantidas por repicagens bimestrais, em tubos inclinados com o meio Ágar Nutriente. Após o crescimento a 37°C, as culturas eram mantidas à temperatura de 5°C.

3.3. - MEIOS DE CULTURA

3.3.1. - Meio para isolamento de mutantes de *Bacillus natto* resistente à estreptomicina

Ágar Nutriente acrescido de estreptomicina na concentração de 100 µg/mL⁵⁵.

3.3.2. - Meio de crescimento para extração de DNA (experimentos com DNA transformante)

Foi usado o meio Mínimo - Glicose⁴⁵, cuja composição química em gramas/litro é a seguinte:

| | |
|------------------|-----|
| Glicose | 5,0 |
| K_2HPO_4 | 7,0 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1,0 |
| Citrato de Na | 0,5 |
| $MgSO_4$ | 0,2 |
| Peptona | 5,0 |
| Extrato levedura | 0,5 |

3.3.3. - Meio de crescimento para as células receptoras

Utilizou-se o meio C-G, descrito por HAAS *et alii*¹⁹. O meio C-G é constituído pelo meio Basal C⁶⁵, cuja composição em gramas/litro é:

| | |
|----------------------------|------|
| K_2HPO_4 | 14,0 |
| KH_2PO_4 | 6,0 |
| Citrato de Na | 1,0 |
| $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$ | 2,0 |

Glicose 5,0; acrescido de caseína hidrolizada, a 0,05%, L-triptofano: 50µg/mL, L-ácido glutâmico: 100 µg/mL. A glicose foi esterilizada separadamente.

3.3.4. - Meio de cultura para indução de competência

Foi utilizado o meio CT¹⁹, que é constituído do meio C acrescido de caseína hidrolisada a 0,01%, L-triptofano: 5 µg/mL e histidina: 5 µg/mL.

3.3.5. - Caldo nutriente suplementado

Caldo nutriente acrescido de: MgSO₄.7H₂O: 0,25 g/L ;
CaCl₂: 5 x 10⁻⁴M e FeSO₄: 1 x 10⁻⁶M⁴².

3.3.6. - Meio seletivo e indicador para isolamento de recombinantes (transformação e fusão)

Agar nutriente acrescido de caseína a 1% e estreptomina na concentração de 100 µg/mL⁵⁵.

3.3.7. - Meios indutores de α -amilase

Foram utilizados os meios seletivos AH e de produção SH*, descrito por SAITO^{4,6}. Composição química em gramas/litro:

| | AH | SH |
|---|--------|-------|
| Amido solúvel | 0,2 | 4,0 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 0,025 | 0,35 |
| Extrato de levedura | 0,025 | 0,60 |
| Citrato de Na | 0,01 | 0,20 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 | 0,05 |
| KCl | 0,15 | -- |
| CaCl_2 | 0,0008 | 0,008 |
| Ágar | 2,0 | -- |

*: pH antes da esterilização: 7,0.

3.3.8. - Meio indutor de protease neutra e alcalina

Utilizou-se o meio Glutamato - Citrato⁴¹. Composição química em gramas/litro:

| | |
|--|------|
| Glicose | 1,0 |
| Ácido cítrico | 3,0 |
| Citrato de Na | 6,0 |
| Glutamato Na | 8,0 |
| MgSO ₄ | 0,5 |
| KCl | 1,5 |
| CaCl ₂ | 0,1 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 10,0 |
| Extrato levedura | 2,0; |

acrecido dos seguintes elementos traços: sulfato de zinco: 2,0 mg; cloreto férrico: 0,2 mg; sulfato de cobre: 0,1 mg; cloreto de manganês: 0,02 mg e molibdato de amônio: 0,01mg.

pH antes da esterilização: 7,0.

3.3.9. - Meio para pré-inóculo

Para produção de amilase e proteases os microrganismos eram previamente inoculados em Caldo Nutriente e incubados a 30°C durante 24 horas sob agitação de 150 RPM e após, inoculados nos meios específicos.

3.4. - ISOLAMENTO DO *Bacillus natto*

Foi isolado do produto comercial "Natto". Aproximadamente 0,1 g do polímero, componente viscoso do alimento, foi diluído em 5,0 mL de solução salina estéril. Após homogeneização inoculou-se por esgotamento em ágar nutriente. Incubou-se a 50°C por 24 horas. As colônias isoladas foram então inoculadas em meio AH (ítem 3.3.7) a 30°C, por 24 horas. As colônias formadoras de halo de hidrólise para o amido foram submetidas à coloração de Gram e inoculadas em tubos inclinados com ágar nutriente. Após o crescimento foram mantidas à temperatura de 5°C.

3.5. - ISOLAMENTO DO *B. natto* RESISTENTE À ESTREPTOMICINA - *B. natto* (Sm)^R

O *B. natto*, isolado como no ítem 3.4., foi inoculado em ágar nutriente acrescido de estreptomicina na concentração de 100 µg/mL. Após o crescimento, os mutantes foram novamente inoculados no mesmo meio de cultura. A seguir, foram inoculados em tubos inclinados com ágar nutriente acrescido de estreptomicina, e após o crescimento foram mantidos a temperatura de 5°C.

3.6. - EXPERIMENTOS COM DNA TRANSFORMANTE

O *Bacillus amyloliquefaciens* codificado com B.A. foi utilizado como receptor e o *Bacillus natto* (Sm)^R como doador de DNA.

3.6.1. - Extração do DNA

Utilizou-se a técnica descrita por SAITO *et alii*⁴⁵, como descrita a seguir:

. foram distribuídos 100 mL de meio Mínimo-Glicose (ítem 3.3.2.) em frascos erlenmeyer de 500 mL.

O conjunto foi esterilizado em autoclave à temperatura 121°C durante 15 minutos.

Os frascos foram inoculados com 0,5 mL do *B. natto* (SM)^R (ítem 3.5) previamente desenvolvidos em caldo nutriente acrescido de estreptomicina a 100 µg/mL, e incubados aerobicamente por 15 horas em agitador recíproco, New Brunswick, modelo G-25, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 30°C.

. Após o crescimento, as células foram centrifugadas a 12 000 Xg por 10 minutos, e lavadas duas vezes com solução salina-EDTA (NaCl a 0,15M e EDTA a 0,1M, pH 8,0). Utilizou-se centrífuga Sorvall modelo RC2-B.

. Doze mg de lisozima dissolvida em 6,0 mL de solução salina-EDTA foram misturados com aproximadamente 6,0 g de células (massa úmida) e o conjunto foi incubado em banho de água durante 30 minutos à temperatura de 30°C. Ocasionalmente, o pH da suspensão celular foi ajustado para 8,0, pela adição de NaOH a 1,0N. Após o tratamento com lisozima, as células foram congeladas.

. Adicionou-se em seguida 50 mL de tampão tris - SDS (Tris a 0,1M, SDS a 1% e NaCl a 0,1M, pH 9,0). As células congeladas e ressuspensas por agitação com bastão de vidro foram submetidas a banho de água a 60°C. O congelamento e descongelamento foi repetido por duas vezes para se obter lise total das células, o que foi confirmado pela microscopia ótica.

. A suspensão de células lisadas foi então misturada com igual volume de fenol redestilado e saturado com água. O conjunto foi agitado manualmente, com bastão de vidro por 20 minutos em banho de gelo.

. A emulsão resultante foi separada em duas camadas por centrifugação a baixa rotação (3 000 xg/10 minutos). A porção superior, fase aquosa, foi clarificada por centrifugação a 12 000 xg durante 10 minutos.

. Os ácidos nucleicos foram precipitados após mistura de dois volumes de etanol frio, e o precipitado foi coletado com auxílio de bastão de vidro e dissolvido em 20 mL de solução salina-citrato diluída (NaCl a 0,15M e citrato de Na a 0,015M).

3.6.2. - Remoção de RNAs

Preparou-se uma solução de RNase a 0,2% em 0,15M de NaCl. A solução foi aquecida a 80°C por 10 minutos para inatil

var as DNAses contaminantes.

A seguir, adicionaram-se 50 µg/mL da enzima ao precipitado de ácidos nucleicos dissolvidos em salina-citrato e incubou-se por 30 minutos a 37°C. O digerido foi resfriado e misturado com igual volume de fenol saturado com água. A mistura foi em seguida agitada por 10 minutos em banho de gelo.

A emulsão resultante foi separada em duas camadas por centrifugação a baixa rotação. A fase aquosa foi clarificada por centrifugação a 10 000 xg por 10 minutos.

O DNA, precipitado pela adição de 2 volumes de etanol, foi coletado com bastão de vidro e lavado por agitação em álcool-água nas concentrações 70, 80 e 90 (v/v).

Após a lavagem o DNA foi dissolvido em 20 mL de salina citrato, diluída, acrescida de 2 mL de solução salina citrato concentrada (NaCl a 1,5M e citrato Na a 0,15M).

3.6.3.- Espectro de absorção do DNA extraído do *B. natto*(Sm)^R

Após a remoção de RNAs, fez-se o espectro de absorção do DNA transformante. As leituras em densidade ótica foram feitas nos comprimentos de onda de 210 a 300 nm. Utilizou-se o espectrofotometro Beckman, modelo DB-GT.

3.6.4. - Indução de competência

As células receptoras de B.A. foram inoculadas em meio CG (ítem 3.3.3.) e incubadas sob agitação de 150 rpm a 37°C por 7 horas, antes de atingir a fase estacionária.

Após o crescimento, adicionou-se 20% de glicerol e as células foram mantidas sob congelamento até o momento de uso.

3.6.5. - Procedimento para a transformação

Foram realizados segundo método descrito por YOSHIKAWA⁶⁶. As células recipientes foram rapidamente descongeladas a 37°C e diluídas 1:10 em meio CT (ítem 3.3.4) e incubadas a 37°C durante 90 minutos. A concentração final de células foi de 10^8 / mL.

A seguir, 0,1 mL da solução de DNA na concentração de 0,1 µg/mL foi adicionado a 1,0 mL de células competentes e incubadas a 37°C durante 40 minutos. Após, 0,1 mL de células e DNA foram plaqueadas em meio seletivo indicador (ítem 3.3.6) e incubadas a 37°C por 48 horas.

A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente pelo método de SAITO *et alii*⁴⁴, no qual 0,022 de

densidade ótica a 260 nm corresponde a 1 μ g de DNA/mL.

3.6.6. - Isolamento dos recombinantes

As células com halo de hidrólise que se desenvolveram no meio seletivo e indicador, foram inoculadas em ágar nutriente . Posteriormente, os recombinantes isolados foram testados quanto à produção de α -amilases e protease neutra e alcalina em meios líquidos.

3.7. - EXPERIMENTOS COM FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Utilizou-se a técnica descrita por PEBERDY⁴², como descrita a seguir.

3.7.1. - Preparação dos protoplastos

0,5 mL da suspensão de B.A. e *B. natto* (Sm)^R, obtidos segundo item 3.3.9, foram inoculados separadamente em 20 mL de caldo nutriente suplementado (item 3.3.5), a 37°C, sob agitação de 150 rpm.

Após, 15 mL do caldo de cada cultura, correspondendo a 6,0 unidades em densidade ótica a 570 nm, ou 4×10^8 colônias/mL, foram centrifugados a 12 000 xg por 5 minutos e as massas de células obtidas foram ressuspensas em 3,0 mL de SMMD (sacarose a 0,5M, ácido máleico a 0,02M, $MgCl_2$ a 0,02M e DNase 5µg/mL). A lisozima foi adicionada a cada suspensão para uma concentração final de 200 µg/mL. As suspensões foram levemente agitadas durante 30 minutos a 37°C.

3.7.2. - Procedimento de fusão

1,0 mL de cada uma das suspensões de protoplastos foi misturado e centrifugado a 3 000 xg por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso em 0,2 mL de SMMD. Após, 1,8 mL de polietileno glicol, PEG, (peso molecular 6000) a 40% foi adicionado aos 0,2 mL de células ressuspensas em SMMD.

Após 10 minutos, adicionaram-se 10 mL de caldo nutriente suplementado (ítem 3.3.5), que foi incubado a 37°C por 24 horas. A seguir, as células foram inoculadas no meio seletivo e indicador (ítem 3.3.6).

3.7.3. - Isolamento dos recombinantes

As células com halo de hidrólise, que se desenvolveram no meio seletivo e indicador, foram inoculadas em agar nutriente e, posteriormente, foram testadas quanto à produção de α -amilase e proteases neutra e alcalina.

3.8. - PRODUÇÃO DE α -amilase

Todos os recombinantes isolados, obtidos por transformação e fusão de protoplastos, foram testados quanto à capacidade de produzir α -amilase.

3.8.1. - Condições de crescimento

Foram distribuídos 25 mL de meio de produção SH (ítem 3.3.7) em frascos erlenmyer de 250 mL e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C durante 15 minutos. Os frascos eram inoculados com 0,5 mL da suspensão do microrganismo a ser testado (ítem 3.3.9) e incubados em agitador recíproco, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 30°C, durante

3 dias. Após o período de incubação, pequenas alíquotas eram submetidas à centrifugação de 12 000 xg por 10 minutos. O sobrenadante era analisado quanto à produção de α -amilase.

3.8.2. - Determinação da atividade α -amilásica

A produção de amilase foi determinada segundo a técnica descrita por SMITH *et alii*⁵⁰, e modificada segundo MEDDA *et alii*³⁴, sendo expressa como atividade dextrinizante. Uma unidade dextrinizante (UD) foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido por minuto, sob as condições específicas do ensaio.

3.8.3. - Condições do ensaio para determinação da atividade amilásica

A cada 0,5 mL de amido solúvel a 1% acrescentava-se 0,1 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,0; 0,3 mL de água destilada e 0,1 mL do sobrenadante, como descrito no ítem 3.8.1. Após incubação de 5 minutos em banho de água à temperatura de 50°C, a reação era paralisada pela adição de 0,5 mL de HCl 1,0N. Para o desenvolvimento de cor, adicionava-se 0,1 mL de solução de lugol (0,3% de I em 30% de solução de KI), sendo o volume

completado para 15 mL. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 620 nm. Usou-se como branco o tampão fosfato 0,1M , pH 6,0.

3.9. - PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRA E ALCALINA

Todos os recombinantes isolados, obtidos por transformação e fusão de protoplastos, foram testados quanto à capacidade de produzir protease neutra (N) e alcalina (A).

3.9.1. - Condições de crescimento

Foram distribuídos 30 mL de meio Glutamato - Citrato (ítem 3.3.8) em frascos erlenmeyer de 250 mL e esterilizados em autoclave à temperatura de 121°C, durante 15 minutos.

Os frascos foram inoculados com 0,5 mL da suspensão do microrganismo a ser testado (ítem 3.3.9) e incubados em agitador recíproco, com velocidade regulada para 150 rpm, à temperatura de 30°C, durante 24 horas. Após o período de incubação, pequenas alíquotas eram submetidas à centrifugação de 12000 xg por 10 minutos. O sobrenadante era analisado quanto à produção de proteases neutra e alcalina.

3.9.2. - Determinação da atividade proteolítica

Foi determinada segundo técnica descrita por ANSON², modificada. Uma unidade proteolítica (UP) foi definida como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina por minuto, sob as condições específicas do ensaio.

3.9.3. - Condições do ensaio para determinação da atividade proteolítica

Para cada 1,0 mL de caseína purificada a 0,6% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 ou 0,1M de tampão TRIS-HCl, pH 9,0 (atividade determinada como protease neutra ou alcalina respectivamente) adicionavam-se 0,2 mL do sobrenadante (ítem 3.9.1) a ser testado. Após 5 minutos de incubação a 40°C em banho de água a reação era paralisada pela adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético a 0,11M, contendo ácido acético 0,33M e acetato de sódio 0,22M. A mistura era deixada à temperatura ambiente por 30 minutos, e após era centrifugada a 3000 xg por 10 minutos. O sobrenadante era filtrado em papel de filtro. Para cada 1,0 mL do filtrado acrescentavam-se 2,0 mL de NaOH, 0,5N e 0,6 mL de reagente de fenol, 1,0N. As leituras eram feitas em espectrofotometro a 550 nm⁴¹. Como branco usou-se 1,0 mL de caseína a

0,6%, diluída em tampão fosfato ou TRIS, acrescido de 0,2mL do sobrenadante, com adição imediata de 1,0 mL de tricloroacético a 0,11M. Ao filtrado, como descrito acima, acrescentavam-se 2,0 mL de NaOH, 0,5N e 0,6 mL do reagente de fenol. Usou-se a tirosina nas concentrações de 0,05; 0,075; 0,15 e 0,20 mg/ mL na construção da curva padrão.

3.10. - ASPECTOS TAXONÔMICOS DIFERENCIAIS DOS PARENTAIS E RECOMBINANTES

Os parentais B.A. e *B. natto* e as linhagens recombinantes T-30, T-39, T-41, T-47, T-49 e F-52 foram inoculados nos meios: Agar Nutriente, Caldo Nutriente contendo NaCl a 7,5% e 10% e Tioglicolato de Sódio. Após, foram incubados por 48 horas a 37°C e 50°C (microrganismos inoculados em Agar Nutriente).

3.11. - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE

Para o estudo da cinética foram utilizadas as linhagens B.A., T-41 e T-49.

As condições de crescimento foram as mesmas descri -

tas no ítem 3.8.1. O tempo de fermentação foi de 72 horas, e a partir de 12 horas, com intervalos de 12 em 12 horas, determinou-se o pH do caldo de cultura. Após centrifugação, com o sobrenadante, determinou-se a atividade amilásica, como descrito nos ítems 3.8.2 e 3.8.3 e com a massa celular, o massa seca.

3.11.1. - Determinação da massa seca

10 mL do caldo de cultura era centrifugado a 12000 xg durante 10 minutos, em frascos de centrífuga, previamente tarados. Após a lavagem das células com solução salina (NaCl a 0,85%), os frascos eram colocados em estufa regulada para 80°C, durante 12 horas. Os resultados foram expressos em mg/mL.

3.12. - EFEITO DO pH, TEMPERATURA E ESTABILIDADE (°C) NA ATIVIDADE DA α -AMILASE

Os microrganismos B.A. e T-41 foram cultivados como descrito no ítem 3.8.1.

3.12.1. - Efeito do pH

As atividades amilásicas dos microrganismos testados foram determinadas segundo os itens 3.8.2. e 3.8.3., usando-se os seguintes tampões: citrato 0,05M, com valores de pH 4,0 , 4,5, 5,0 e 5,5; fosfato 0,1M com valores de pH 6,0, 6,5 e 7,0 e TRIS-HCl 0,1M, com valores de pH 8,0 e 9,0. Os ensaios foram realizados à temperatura de 50°C.

3.12.2. - Efeito da temperatura

As atividades amilásicas dos microrganismos testados foram determinadas nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C, segundo os itens 3.8.1. e 3.8.3. Os ensaios foram realizados usando-se tampão fosfato 0,1M, pH 6,0.

3.12.3. - Estabilidade da α -amilase nas temperaturas de 60 e 65°C

Os sobrenadantes a serem testados foram incubados em banho de água regulado à temperatura de 60°C e posteriormente de 65°C, e de 5 em 5 minutos a partir do tempo zero, alíquotas e

ram retiradas e testadas quanto à atividade dextrinizante. Os ensaios foram realizados em pH 6,0.

3.13. - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DO AMIDO PELA α -AMILASE PRODUZIDA PELOS BACILOS B.A. E T-41

Para a hidrólise, os sobrenadantes foram obtidos segundo as técnicas descritas no ítem 3.8.1. Após, foram dialisados por 24 horas em água destilada. A seguir, 1,0 mL dos dialisados obtidos foi adicionado a 10 mL de amido gelatinizado, a 1%, respectivamente. O sistema de reação foi incubado durante 12 horas a 50°C. As misturas de reação foram aplicadas em papel de cromatografia Whatman nº 1. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia descendente em papel foi butanol : piridina : água, na proporção 6:4:3 (v/v), respectivamente.

O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 24 horas. Como açúcar-padrão utilizou-se uma mistura de Glicose (G₁), Maltose (G₂), Maltotriose (G₃), maltotetraose (G₄), Maltopentaose (G₅) e maltohexaose (G₆). Os açúcares redutores foram revelados com AgNO₃ e NaOH alcóolico, de acordo com o método descrito por TREVELYAN *et alii*⁵⁴.

3.14. - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DAS PROTEASES NEUTRA E ALCALINA

Para o estudo da cinética de produção de proteases foram utilizadas as linhagens *B. natto* (Sm)^R, F-52 e T-39. As condições de crescimento foram as mesmas descritas no ítem 3.9.1. O tempo de fermentação foi de 36 horas e a partir de 6 horas, com intervalos de 6 em 6 horas, determinou-se o pH do caldo de cultura. As atividades proteolíticas foram determinadas como nos ítems 3.9.2. e 3.9.3 e o peso seco como no 3.11.1.

3.15. - EFEITO DO EDTA NAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS

Foram utilizados o parental *B. natto* e os recombinantes F-52, obtido por fusão, e T-39, obtido por transformação.

As condições de crescimento foram as mesmas descritas no ítem 3.9.1. Para cada 1,0 mL do sobrenadante adicionava-se 1,0 mL de EDTA a 10 mM, diluída em tampão TRIS-HCl, 0,1M, pH 7,0. O conjunto foi incubado a 37°C em banho de água, por 30 minutos⁵⁵. Após tratamento, as atividades proteolíticas foram determinadas como descrito nos ítems 3.9.2 e

3.9.3, usando-se respectivamente tampão TRIS-HCl a 0,01M nos valores de pH 7,0 e 9,0. As atividades remanescentes foram expressas em %.

4. - RESULTADOS

4.1. - ISOLAMENTO DO *B. natto*

O *B. natto* foi isolado do produto comercial "Natto" e apresenta as seguintes características: bastonetes Gram positivos, crescimento a 50°C e formação de halo de hidrólise para o amido. Posteriormente, isolou-se o mutante resistente à estreptomicina.

4.2. - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO DNA DO *B. natto* (Sm)^R

Após a extração do DNA, determinou-se o seu espectro de absorção. A Figura 1 mostra dois picos máximos, um a 220nm e outro a 260 nm, sendo que este último corresponde ao pico de absorção do DNA.

4.3. - SELEÇÃO DE RECOMBINANTES OBTIDOS POR TRANSFORMAÇÃO

Foram isolados 85 recombinantes resistentes à estreptomicina e entre estes selecionaram-se onze transformantes que apresentaram produção de α -amilase superior ao receptor B.A. Selecionou-se também o transformante que produziu mais proteases, entre os 85 isolados (Tabela 1). Observa-se que a linhagem T-39 produziu quatro vezes mais proteases do que o B.A.

4.4. - SELEÇÃO DE RECOMBINANTES OBTIDOS POR FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Nos experimentos de fusão isolaram-se 42 recombinantes resistentes à estreptomicina. A Tabela 2 relaciona os seis me

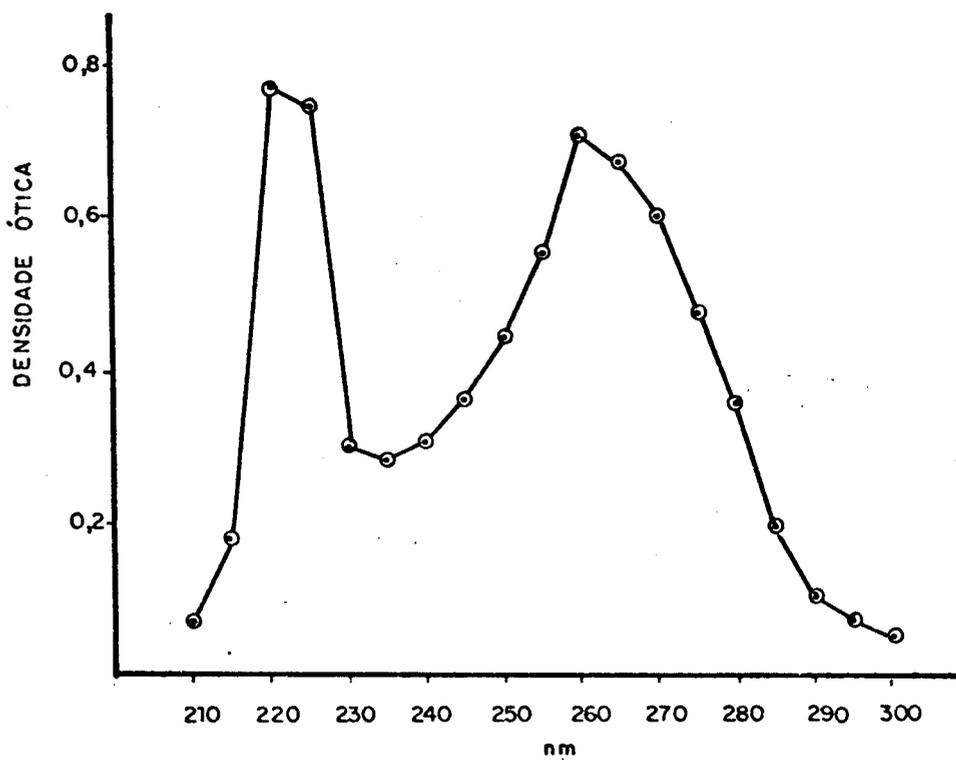


FIGURA 1 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO D NA EXTRAÍDO DO B. natto (sm)^R

TABELA 1 - Produção de α -amilase e proteases, neutra e alcalina, obtidas de linhagens parentais e recombinantes, por transformação.

| L I N H A G E N S | α -amilase | proteases | | N/A |
|---|-------------------|-----------|------|-----|
| | UD/mL | UP-N | UP-A | |
| Parentais | | | | |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> (Sm) ^S (receptor) | 42,0 | 1,8 | 1,5 | 1,2 |
| <i>B. natto</i> (Sm) ^R (doador) | 2,0 | 8,4 | 10,5 | 0,8 |
| Transformantes (Sm) ^R | | | | |
| T-4 | 55,0 | 5,7 | 3,0 | 1,9 |
| T-5 | 55,0 | 4,2 | 1,8 | 2,3 |
| T-12 | 55,0 | 6,0 | 2,4 | 2,5 |
| T-14 | 52,0 | 5,7 | 3,3 | 1,7 |
| T-15 | 52,0 | 5,5 | 3,1 | 1,8 |
| T-18 | 55,0 | 3,6 | 2,5 | 1,4 |
| T-20 | 55,0 | 2,7 | 2,0 | 1,3 |
| T-30 | 70,0 | 4,8 | 3,6 | 1,3 |
| T-39 | 44,0 | 7,2 | 5,4 | 1,3 |
| T-41 | 74,0 | 6,0 | 4,2 | 1,4 |
| T-47 | 70,0 | 4,5 | 1,8 | 2,5 |
| T-49 | 74,0 | 3,0 | 1,2 | 2,5 |

Total de transformantes obtidos: 85

UD = Unidade Dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 1.0 mg de amido, sob as condições específicas do ensaio.

UP-N = Unidade Proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade Proteolítica, dosada como protease alcalina. Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina/min., sob as condições específicas de ensaio.

N/A = Razão entre UP-N e UP-A.

TABELA 2 - Produção de α -amilase e proteases, neutra e alcalina, obtidas de linhagens parentais e recombinantes, por fusão de protoplastos.

| L I N H A G E N S | α -amilase | proteases | | N/A |
|---------------------------------|-------------------|-----------|------|------|
| | UD/mL | UP-N | UP-A | |
| Parentais | | | | |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 42,0 | 1,8 | 1,5 | 1,2 |
| <i>B. natto</i> | 2,0 | 8,4 | 10,5 | 0,8 |
| Recombinantes (Sm) ^R | | | | |
| F-5 | 25,0 | 1,8 | 0,9 | 2,0 |
| F-7 | 26,0 | 1,5 | 0,15 | 10,0 |
| F-8 | 24,0 | 2,4 | 0,03 | 8,0 |
| F-12 | 27,0 | 2,4 | 1,8 | 1,3 |
| F-15 | 25,0 | 2,1 | 0,06 | 3,5 |
| <u>F-52</u> | 4,0 | 7,5 | 9,5 | 0,8 |

Total de recombinantes obtidos: 42

UD = Unidade Dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido, sob as condições específicas do ensaio.

UP-N = Unidade Proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade Proteolítica, dosada como protease alcalina. Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina/min., sob as condições específicas do ensaio.

N/A = Razão entre UP-N e UP-A.

lhores produtores de α -amilase e proteases. Estas linhagens produziram menos α -amilase do que o parental B.A. e menos proteases do que o *B. natto*. Entre estes recombinantes, o F-52 foi o que excretou mais proteases e em relação a α -amilase, produziu duas vezes mais do que o parental *B. natto*.

4.5. - ASPECTOS TAXONÔMICOS DIFERENCIAIS DOS PARENTAIS E DAS LINHAGENS RECOMBINANTES

A Tabela 3 mostra o crescimento das linhagens parentais e recombinantes, em diferentes condições de cultivo.

O *B. natto* e o recombinante F-52 cresceram a 50°C, ao passo que o parental B.A. e as outras linhagens não foram capazes de se desenvolverem a esta temperatura. Os parentais e recombinantes apresentaram bom crescimento em meio contendo NaCl a 7,5% e crescimento moderado em NaCl a 10%, e o crescimento destes bacilos em toda a extensão dos tubos contendo o meio de tioglicolato de sódio mostraram que eles são facultativos.

TABELA 3 - Aspectos taxonômicos diferenciais dos parentais e das linhagens recombinantes.

| MICROORGANISMOS | CONDIÇÕES DE CULTIVO | | | |
|-----------------------------|----------------------|------|-------|-----------------------|
| | 50°C | NaCl | | TIOGLICOLATO DE SÓDIO |
| | | 7,5% | 10,0% | |
| Parentais | | | | |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | - | + | M | F |
| <i>B. natto</i> | + | + | M | F |
| Recombinantes | | | | |
| T-30 | - | + | M | F |
| T-39 | - | + | M | F |
| T-41 | - | + | M | F |
| T-47 | - | + | M | F |
| T-49 | - | + | M | F |
| F-52 | + | + | M | F |

M = crescimento moderado; F = facultativo.

4.6. - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE

4.6.1. - Microrganismo parental: *B. amyloliquefaciens*

A Tabela 4 e a Figura 2 mostram que o aumento de produção da α -amilase teve início com 12 horas de fermentação, aumentando gradualmente até atingir 44 UD/mL num período de 72 horas.

Com 24 horas de fermentação obteve-se o máximo de crescimento celular, com massa seca de 3,7mg/mL, após o que houve um decréscimo, atingindo 2,6 mg/mL ao fim do experimento. No tempo zero o pH do caldo de cultura era 6,8, elevando-se para 8,0 após 72 horas.

4.6.2. - Linhagem recombinante: T-41

Os dados da Tabela 5 e Figura 3 mostram que o aumento em atividade da α -amilase ocorreu com 12 horas de fermentação, elevando-se até atingir 80 UD/mL, num período de 72 horas.

O crescimento celular aumentou até 24 horas, com massa seca máxima de 3,9 mg/mL, seguindo-se um decréscimo, atinginu

TABELA 4 - Cinética de produção de α -amilase pelo *Bacillus amyloliquefaciens*

| Horas | pH | Massa Seca | α -amilase |
|-------|-----|------------|-------------------|
| | | mg/mL | UD/mL |
| 0 | 6,8 | -- | -- |
| 12 | 7,3 | 1,9 | 2,0 |
| 24 | 7,6 | 3,7 | 16,0 |
| 36 | 7,8 | 3,4 | 26,0 |
| 48 | 7,9 | 3,0 | 36,0 |
| 60 | 7,9 | 2,8 | 40,0 |
| 72 | 8,0 | 2,6 | 44,0 |

UD = Unidade dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido, sob as condições específicas do ensaio.

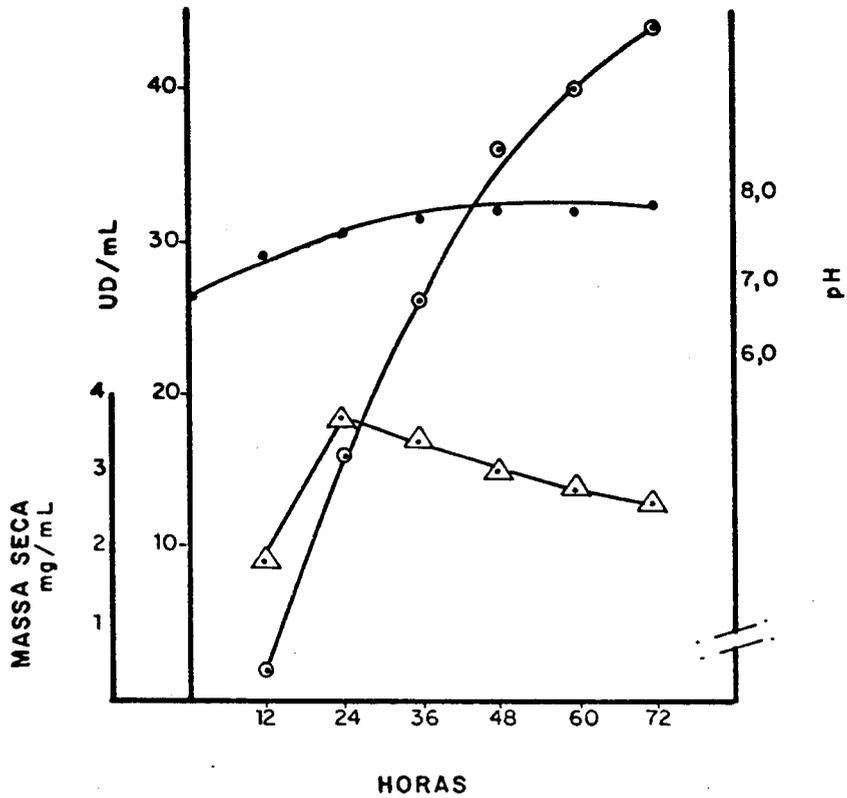


FIGURA 2 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE PELO B. amyloliquefaciens

- UD - UNIDADE DEXTRINIZANTE
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

TABELA 5 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-41.

| Horas | pH | Massa Seca | α -amilase |
|-------|-----|------------|-------------------|
| | | mg/mL | UD/mL |
| 0 | 6,8 | -- | -- |
| 12 | 7,1 | 1,7 | 1,0 |
| 24 | 7,6 | 3,9 | 14,0 |
| 36 | 7,9 | 3,2 | 33,0 |
| 48 | 7,8 | 3,0 | 62,0 |
| 60 | 7,9 | 2,6 | 72,0 |
| 72 | 8,1 | 2,0 | 80,0 |

UD = Unidade dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido, sob as condições específicas do ensaio.

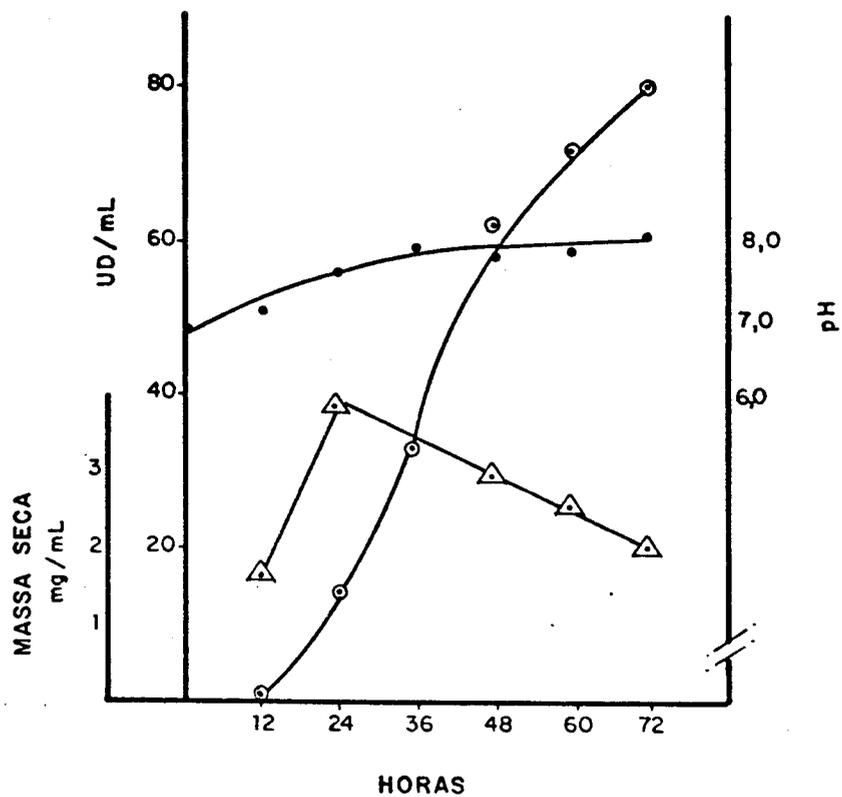


FIGURA 3- CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE PELO TRANSFORMANTE T-41

- UD — UNIDADE DEXTRINIZANTE
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

TABELA 6 - Cinética de produção da α -amilase pelo transformante T-49.

| Horas | pH | Massa Seca | α -amilase |
|-------|-----|------------|-------------------|
| | | mg/mL | UD/mL |
| 0 | 6,8 | -- | -- |
| 12 | 7,1 | 1,6 | 1,0 |
| 24 | 7,7 | 3,8 | 14,0 |
| 36 | 7,9 | 3,4 | 30,0 |
| 48 | 7,9 | 3,1 | 48,0 |
| 60 | 7,9 | 2,6 | 61,0 |
| 72 | 8,0 | 2,0 | 70,0 |

UD = Unidade dextrinizante, definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 mg de amido, sob as condições específicas do ensaio.

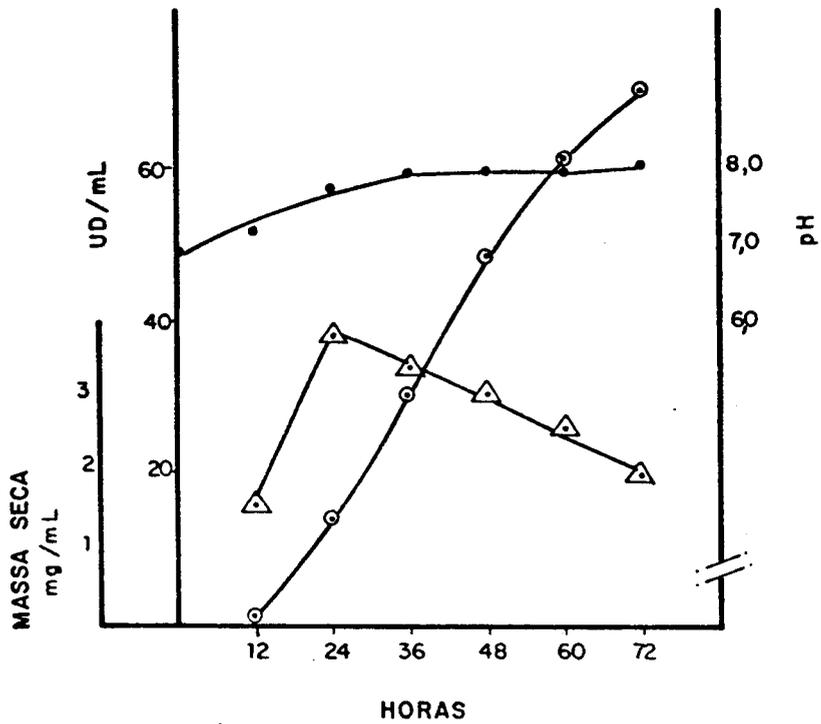


FIGURA 4- CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA α -AMILASE PELO TRANSFORMANTE T-49

- UD - UNIDADE DEXTRIZANTE
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

do 2,0 mg/mL após 72 horas. O pH do caldo de cultura foi 6,8 no tempo zero, aumentando gradualmente ao término da fermentação.

4.6.3. - Linhagem recombinante: T-49

A Tabela 6 e a Figura 4 mostram que o aumento em atividade da α -amilase iniciou com 12 horas de fermentação, aumentando gradualmente, até atingir 70 UD/mL num período de 72 horas.

O aumento da massa celular atingiu valor máximo de 3,8 mg/mL com 24 horas de fermentação, havendo um decréscimo que, após 72 horas, alcançou 2,0 mg/mL. No tempo zero, o pH do caldo de cultura era 6,8, elevando-se para 8,0 ao término do experimento.

4.7. - EFEITO DO pH NAS ATIVIDADES DAS α -AMILASES

Os dados da Figura 5 mostram que as atividades amilásicas das linhagens B.A. e T-41 aumentaram gradualmente com a elevação do pH do ensaio, atingindo valor máximo em pH ao redor de 6,0. Neste pH as atividades amilásicas foram 44 UD/mL para B.A. 78

UD/mL para o T-41. A atividade decresceu em valores de pH acima de 6,5, mostrando redução mais acentuada nos valores de pH acima de 8,0.

4.8. - EFEITO DA TEMPERATURA NAS ATIVIDADES DAS α -AMILASES

Os dados da Figura 6 mostram que as atividades amilásicas dos microrganismos B.A. e T-41 foram aumentando com a elevação da temperatura. À temperatura de 60°C as atividades foram de 52 UD/mL para o B.A. e 87 UD/mL para o T-41. Na temperatura de 65°C houve redução de 1 UD/mL para a linhagem T-41. Por outro lado, nesta temperatura, a atividade amilásica do B.A. não se alterou.

4.9. - ESTABILIDADE DAS α -AMILASES ÀS TEMPERATURAS DE 66 e 65°C

Os dados da Figura 7 mostram que a 60°C a atividade amilásica do B.A. praticamente não se alterou, num período de 60 minutos. À 65°C, no tempo zero, a atividade era de 40 UD/mL e, após 30 minutos, foi para 26 UD/mL, correspondendo a uma perda de 35% em atividade.

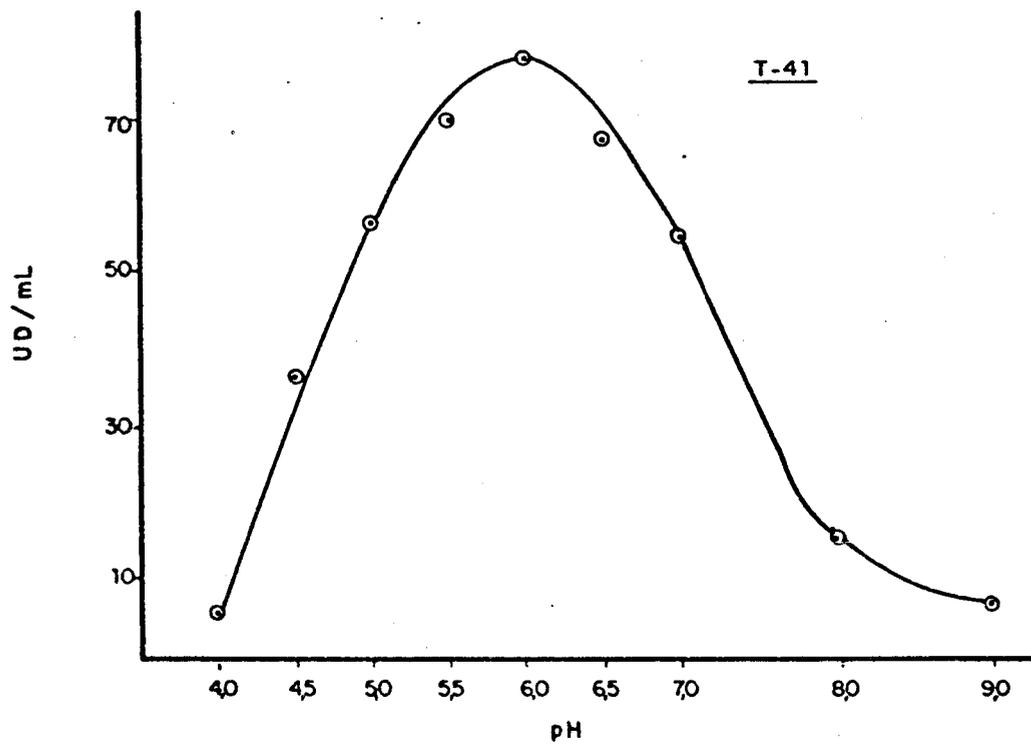
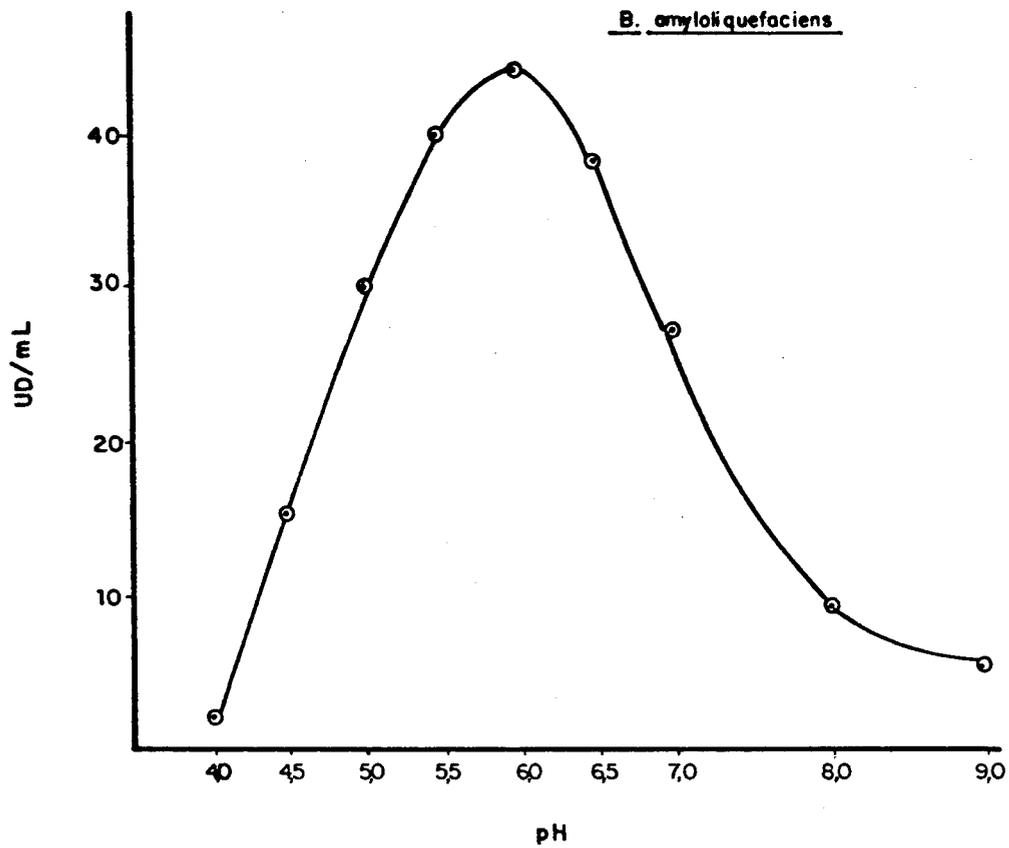


FIGURA 5- EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA α -AMILASE

UD- UNIDADE DEXTRINIZANTE

ATIVIDADES MEDIDAS À TEMPERATURA DE 50°C

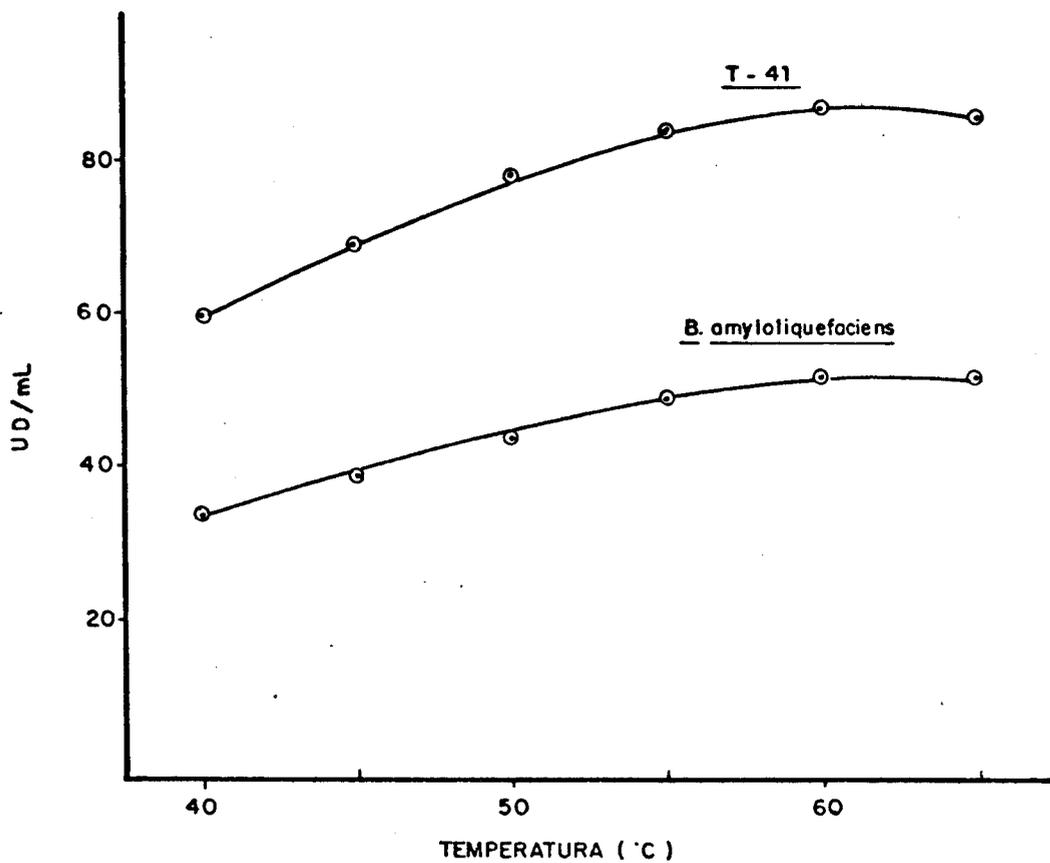


FIGURA 6- EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA α -AMILASE

UD- UNIDADE DEXTRINIZANTE

ATIVIDADES MEDIDAS EM TAMPÃO FOSFATO 0,1M, pH 6,0

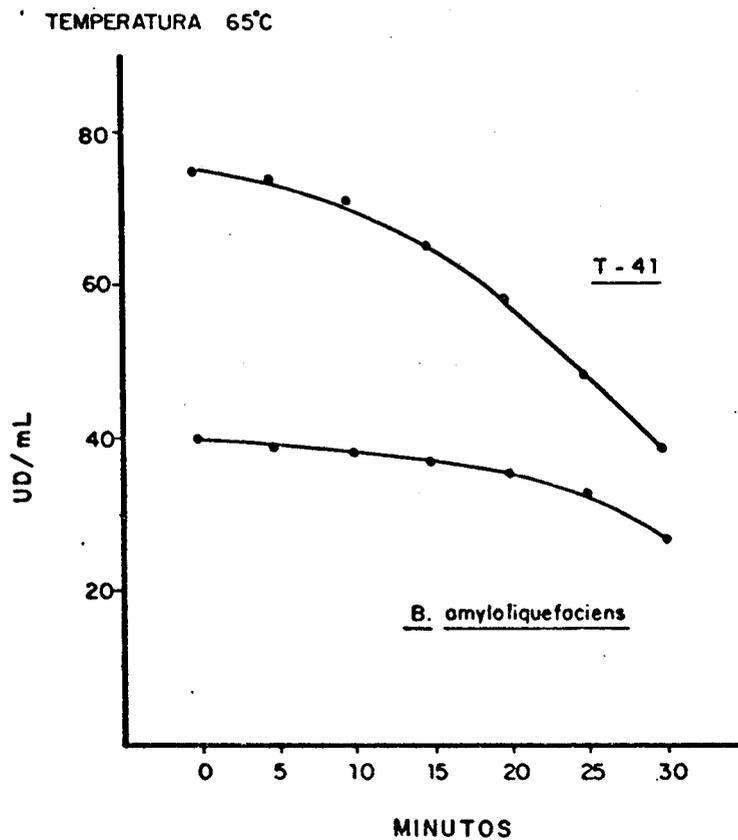
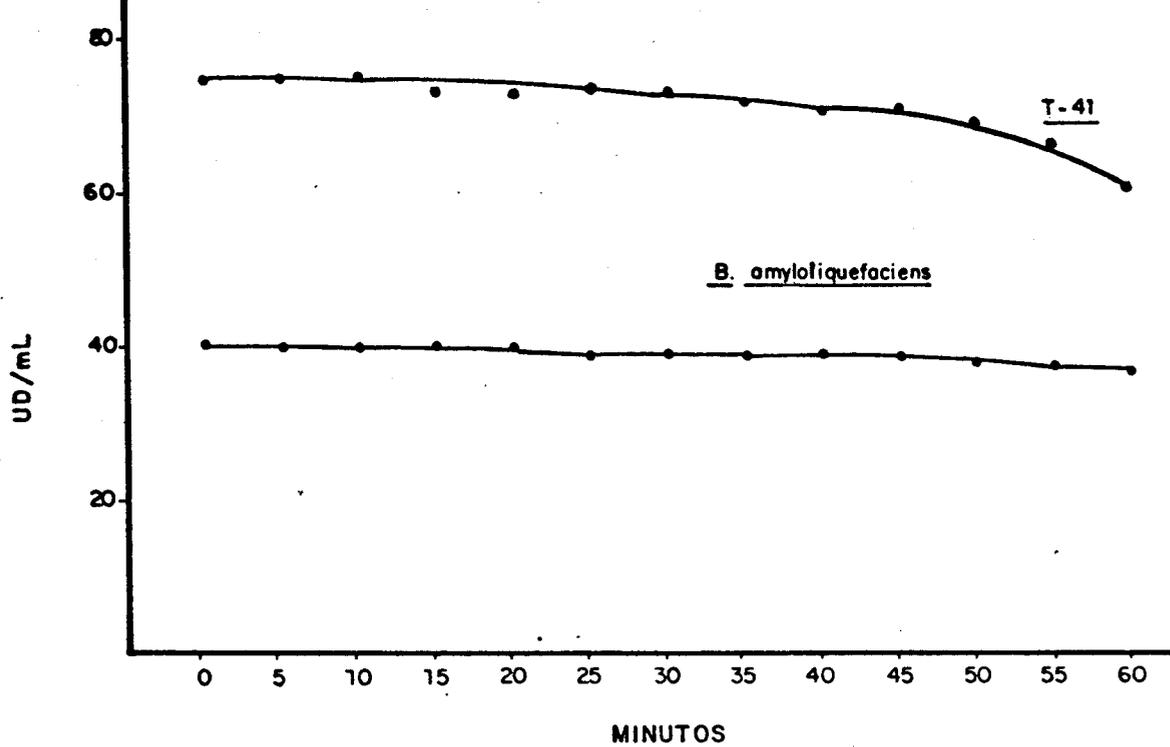


FIGURA 7 - ESTABILIDADE DAS α -AMILASES NAS TEMPERATURAS 60°C E 65°C

UD- UNIDADE DEXTRINIZANTE

ATIVIDADES MEDIDAS EM TAMPÃO FOSFATO 0,1M, pH 6,0

A atividade amilásica do T-41 na temperatura de 60°C era de 75 UD/mL, no tempo zero. Após 60 minutos houve redução para 61,0 UD/mL. A redução em atividade foi mais drástica a 65°C. Após 30 minutos, a atividade atingiu 38 UD / mL, correspondendo a uma perda de 51% em atividade.

4.10. - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS PRODUTOS DE HI DRÓLISE DO AMIDO PELA α -AMILASE PRODUZIDA PELAS LINHA- GENS B.A. E T-41

Através do cromatograma (Figura 8), verifica-se que os valores de Rf para o padrão e para as linhagens B.A. e T-41 se acham bem próximos.

As enzimas produzidas por estas linhagens apresentaram a mesma maneira de atuação sobre o amido.

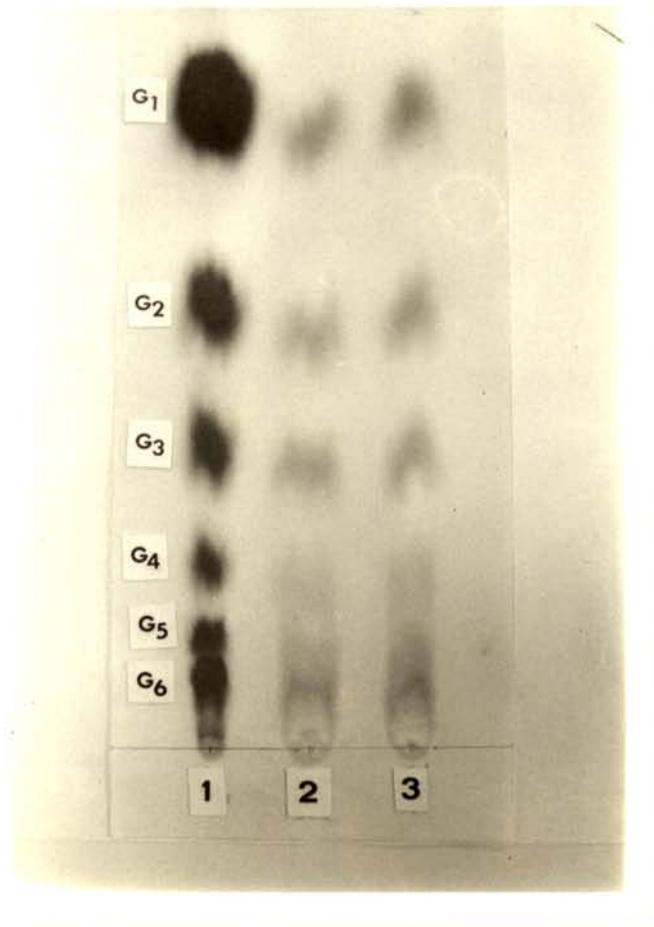


FIGURA 8 - Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise do amido pela α -amilase produzidas pelas linhagens *B. amyloliquefaciens* e T-41.

1: padrão - G₁ (glicose), G₂ (maltose); G₃ (malto-triose); G₄ (maltotetraose); G₅ (Maltopentaose) e G₆ (Maltohexaose).

2: *B. amyloliquefaciens*.

3: T-41.

4.11. - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRA E ALCALINA

4.11.1. - Microrganismo parental: *B. natto*

Verifica-se, através da Tabela 7 e Figura 9, que a síntese da protease neutra ocorreu a partir de 12 horas, com atividade máxima de 8,5 UP em 24 horas. Nos intervalos de 30 e 36 horas houve redução da atividade, encontrando-se os valores de 8,4 e 8,3 UP, respectivamente.

Em relação à protease alcalina, houve um aumento gradual de 0,6 UP (12 horas) para 10,6 UP, em 36 horas.

A massa celular alcançou o valor máximo de 3,4mg/mL, em 24 horas. Nos intervalos de 30 e 36 horas os valores encontrados foram de 3,0 e 2,5 mg/mL, respectivamente.

Em relação ao pH observou-se alcalinização do caldo de cultura até o valor de 8,7 ao final da fermentação.

4.11.2. - Linhagem recombinante: F-52

A Tabela 8 e a Figura 10 mostram que a atividade da protease neutra aumentou nos intervalos de 12,18 e 24 horas. Nes

TABELA 7 - Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo *B. natto* (Sm)^R.

| Horas | pH | Massa seca proteases | | |
|-------|-----|----------------------|------|------|
| | | mg/mL | UP-N | UP-A |
| 6 | 6,6 | 0,5 | -- | -- |
| 12 | 7,2 | 1,2 | 1,2 | 0,6 |
| 18 | 7,6 | 2,7 | 4,5 | 2,5 |
| 24 | 8,2 | 3,4 | 8,5 | 10,4 |
| 30 | 8,5 | 3,0 | 8,4 | 10,5 |
| 36 | 8,7 | 2,5 | 8,3 | 10,6 |

UP-N = Unidade proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade proteolítica, dosada como protease alcalina. Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina/min., sob as condições específicas do ensaio.

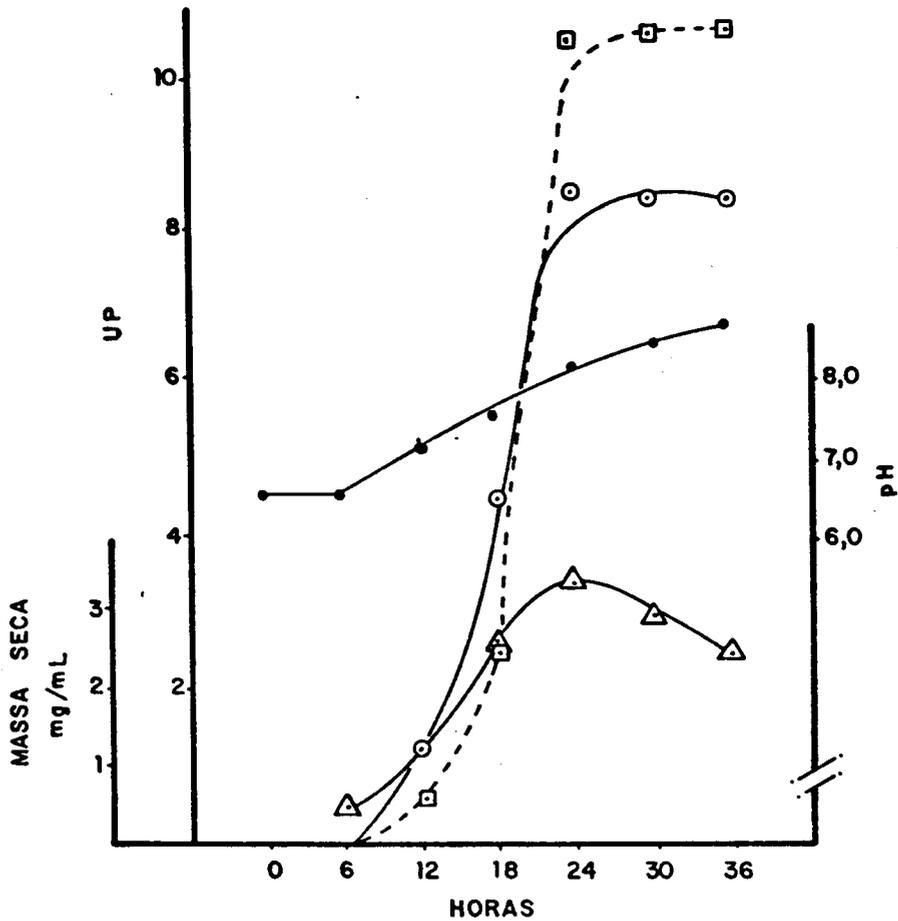


FIGURA 9 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DAS PROTEASES NEUTRA E ALCALINA PELO *B. natto*.

- UP-N-UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE NEUTRA
- UP-A-UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE ALCALINA
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

TABELA 8 - Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo recombinante F-52.

| Horas | pH | Massa seca | Proteases | |
|-------|-----|------------|-----------|------|
| | | mg/mL | UP-N | UP-A |
| 6 | 6,6 | 0,4 | 0,0 | 0,0 |
| 12 | 7,2 | 1,1 | 1,0 | 0,4 |
| 18 | 7,5 | 2,5 | 4,5 | 1,6 |
| 24 | 8,0 | 3,2 | 7,5 | 9,5 |
| 30 | 8,4 | 2,7 | 7,4 | 9,7 |
| 36 | 8,6 | 2,0 | 7,3 | 9,8 |

UP-N = Unidade proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade proteolítica, dosada como protease alcalina.

Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina/min., sob as condições específicas do ensaio.

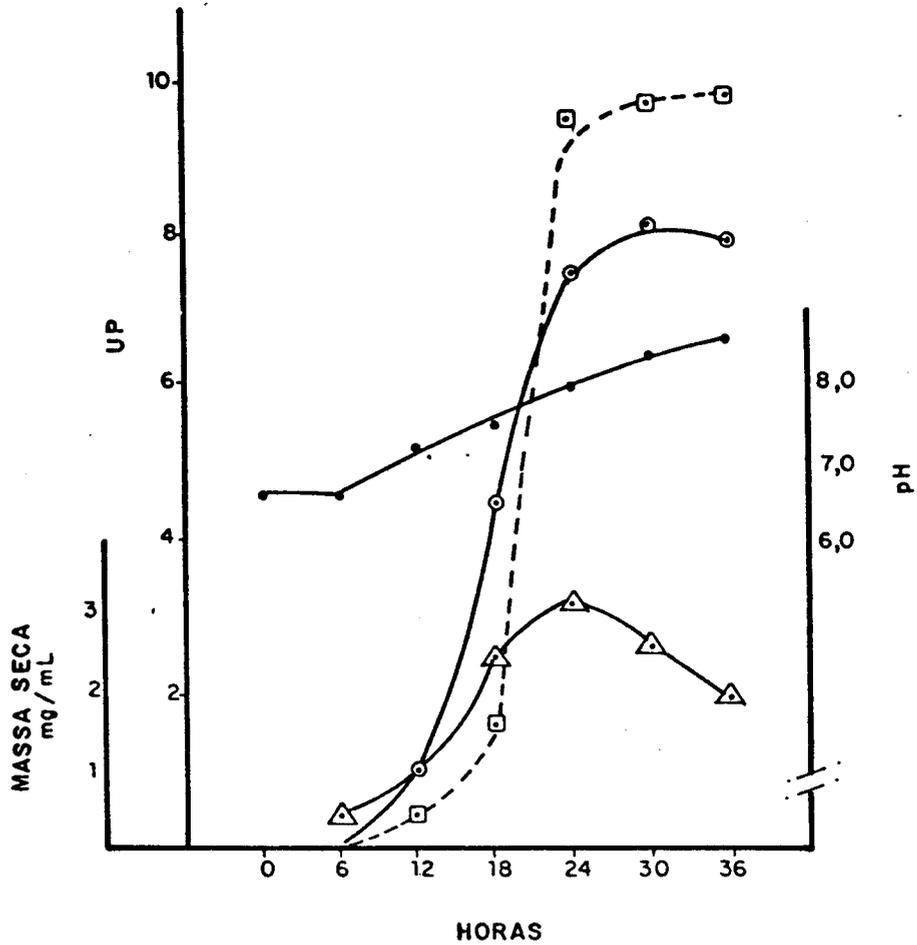


FIGURA 10- CINÉTICA DE PRODUÇÃO DAS PROTEASES, NEUTRA E ALCALINA PELO RECOMBINANTE F-52

- UP-N-UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE NEUTRA
- UP-A-UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE ALCALINA
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

te período os valores encontrados foram: 1,0; 4,0 e 7,5 UP respectivamente, verificando-se em seguida redução das atividades, que atingiu, após 30 horas, 9,7 e 9,8 UP após 36 horas.

A massa celular alcançou o valor máximo de 3,4mg/mL em 24 horas, obtendo-se 2,7 e 2,0 mg/mL, após 30 e 36 horas respectivamente. O pH do caldo de cultura aumentou gradualmente até o valor de 8,6 ao término da fermentação.

4.11.3. - Linhagem recombinante: T-39

Os dados da Tabela 9 e Figura 11 mostram que a produção de protease neutra iniciou-se com 12 horas de fermentação, com aumento gradual em 18 e 24 horas. As atividades obtidas foram de 1,0; 4,0 e 7,4 UP respectivamente. Nos períodos de 30 e 36 horas os valores encontrados foram de 7,3 e 7,2 UP, respectivamente. Em relação à protease alcalina, houve um aumento gradual de 0,3 UP em 12 horas para 5,7 UP, em 36 horas.

A massa celular alcançou o valor máximo de 3,3mg/mL, em 24 horas, que alcançou 2,1 mg/mL em 36 horas. O pH do caldo de cultura elevou-se para 8,0 após 36 horas de fermentação.

TABELA 9 - Cinética de produção das proteases, neutra e alcalina, pelo recombinante T-39.

| Horas | pH | Massa seca | Proteases | |
|-------|-----|------------|-----------|------|
| | | mg/mL | UP-N | UP-A |
| 6 | 6,6 | 0,4 | -- | -- |
| 12 | 7,3 | 1,1 | 1,0 | 0,3 |
| 18 | 7,5 | 2,5 | 4,0 | 1,5 |
| 24 | 8,0 | 3,3 | 7,4 | 5,5 |
| 30 | 8,4 | 2,8 | 7,3 | 5,6 |
| 36 | 8,6 | 2,1 | 7,2 | 5,7 |

UP-N = Unidade proteolítica, dosada como protease neutra;

UP-A = Unidade proteolítica, dosada como protease alcalina.

Ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que, atuando sobre a caseína, libera 0,01 mg/mL de tirosina/min., sob as condições específicas do ensaio.

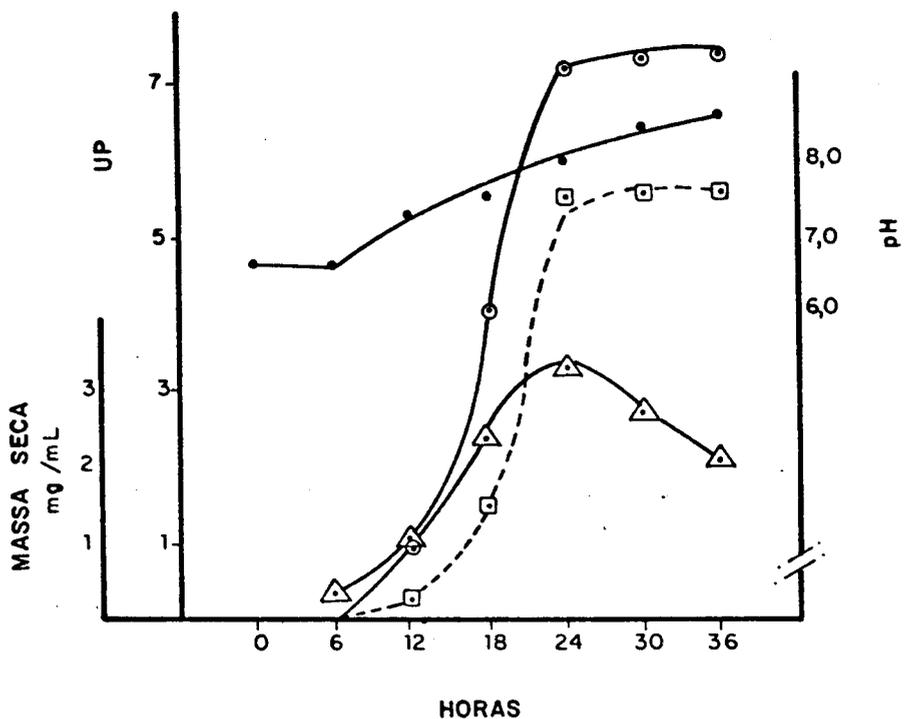


FIGURA 11 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DAS PROTEASES, NEUTRA E ALCALINA PELO TRANSFORMANTE T-39

- UP-N - UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE NEUTRA
- UP-A - UNIDADE PROTEOLÍTICA, DOSADA COMO PROTEASE ALCALINA
- △—△ MASSA SECA
- pH (CALDO DE CULTURA)

4.12. - EFEITO DO EDTA NAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS

Os dados da Tabela 10 mostram que as atividades proteolíticas dos sobrenadantes obtidos de *B. natto* e dos recombinantes F-52 e T-39 sofreram redução após tratamento com EDTA. As atividades remanescentes, dosadas em pH 7,0 e pH 9,0, expressas em %, foram: para o *B. natto*, 36,0 e 54,5; para o F-52, 36,0 e 54,0 e para o T-39, 31,0 e 44,0.

TABELA 10 - Efeito do EDTA nas atividades proteolíticas.

| MICROORGANISMOS | ATIVIDADE REMANESCENTE | |
|-----------------|------------------------|--------|
| | pH 7,0 | pH 9,0 |
| <i>B. natto</i> | 36,0 | 54,5 |
| F-52 | 36,0 | 54,0 |
| T-39 | 31,0 | 44,0 |

Os sobrenadantes foram incubados em EDTA (concentração final 5 mM), durante 30 minutos/37°C. Após as atividades proteolíticas, foram dosados como protease neutra em pH 7,0 e protease alcalina em pH 9,0.

5. - DISCUSSÃO

5.1. - COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO E FUSÃO

Conforme YAMAGUCHI *et alii*⁶⁰, SAWAMURA em 1905, isolou pela primeira vez o *B. natto*, a partir de queijo de soja fermentado. É sabido que este bacilo produz grande quantidade de proteases extra-celulares. E algumas linhagens de *B. natto* produzem grande quantidade de α -amilase, como o *B. natto* IAM 1212, que produz cinco vezes mais α -amilase do que o *B. subtilis*⁵⁸.

O *B. natto* usado nos experimentos apresentou as características de produzir proteases, neutra e alcalina, com baixa produção de α -amilase, enquanto o *B. amyloliquefaciens* ATCC 2342 excretou grande quantidade de α -amilase com pouca produção de proteases (Tabela 1).

Comparando as Tabelas 1 e 2, verifica-se que os recombinantes obtidos por transformação são melhores produtores de enzimas do que os obtidos por fusão de protoplastos. Isto nos leva a crer na maior eficiência da transformação na obtenção de recombinantes quando se está trabalhando com bactérias. A baixa frequência na obtenção de recombinantes por fusão é devida à dificuldade de interação entre os cromossomos inteiros dos parentais⁴², enquanto que na transformação são pedaços de DNA que interagem com o genoma do receptor.

Para evitar que pedaços de DNA, oriundos da ruptura de protoplastos pudessem interagir com o DNA dos protoplastos íntegros de outra linhagem, usou-se DNase durante o experimento⁴².

Após a adição do PEG, os protoplastos devem primeiramente ser inoculados em meio líquido apropriado para serem revertidos à forma bacilar e, então, inoculados em meio seletivo indicador.

Segundo HADLACZKY *et alii*²⁰, a reversão do protoplasto para a forma bacilar se faz em três seqüências: aumento de tamanho dos protoplastos, divisão não orientada dos protoplastos e crescimento da forma bacilar. Os recombinantes obtidos por fusão são haplóides e estáveis⁴².

O tipo de agente fusogênico usado também pode afetar a frequência dos recombinantes. VIDOLI *et alii*⁵⁷, trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* obtiveram um aumento considerável na obtenção de recombinantes quando o gel de alginato de cálcio -

cio foi usado ao invés do PEG, normalmente usado nos experimentos de fusão.

O fator limitante na produção de transformantes é devido à competência das células receptoras em incorporar o DNA do doador. Competência é um estado fisiológico e significa a susceptibilidade de uma população de células para se transformar¹. Segundo ANGOSTOPOULOS *et alii*¹, o aumento da capacidade de o microrganismo se transformar ocorre no final da fase logarítmica de crescimento. A presença de extrato de leveduras, L-triptofano e um agente quelante como a L-histidina ao meio de cultura, também aumenta a eficiência de transformação. Estes fatos sugeriram aqueles autores que algum tipo de crescimento não balanceado, sob condições especiais do meio de cultura, são necessários para uma ótima transformação.

A velocidade de transformação vai depender também da concentração de DNA usado nos experimentos. Em altas concentrações, a velocidade se torna irregular e o número de transformantes diminui^{52,44}.

A frequência de transformantes aumenta linearmente, com adição constante de DNA, e o máximo de saturação é alcançado em torno de 0,1 µg/mL³. O excesso de proteínas associadas com o DNA após a sua extração diminui a atividade do DNA transformante⁵². A Figura 1 mostra o pico máximo de absorção do DNA a 260 nm. O excesso de proteínas associada ao DNA iria deslocar este pico para as faixas de 270 a 280 nm.

Um fator de indução de competência foi isolado do sobrenadante do meio de cultura e do extrato de *B. subtilis*. Este fator estimulante da transformação, após a sua purificação, apresentava atividade lítica e comportava-se como DNase⁴.

Baixas concentrações de lisozima também estimulam a transformação, reforçando o papel das enzimas líticas no processo^{4 3}.

5.2. - ASPECTOS TAXONÔMICOS

Do ponto de vista taxonômico o *B. natto* (*B. subtilis*, NAT), está intimamente relacionado com o *B. subtilis* Marburg (*B. subtilis*) e com o *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* (*B. subtilis* SAC), ao passo que o *B. amyloliquefaciens* está distanciada da espécie *B. subtilis*^{4 3}.

Considerando-se aspectos fisiológicos e bioquímicos, algumas propriedades indicam que o *B. amyloliquefaciens* difere do *B. subtilis* pela capacidade de crescimento a 50°C, de se desenvolver em meio contendo NaCl a 10%, por apresentar crescimento característico em meio de batata, de produzir grande quantidade de α -amilase e fermentar a lactose com produção de ácido. O *B. subtilis* apresenta crescimento moderado em meio com NaCl a 7.5%. Ambos são facultativos^{6 9}.

A linhagem de *B. natto* utilizada cresceu em meio com NaCl a 10% (Tabela 3), apesar do íntimo relacionamento taxonômi

co com o *B. subtilis*⁴³. Foi ainda capaz de crescer a 50°C, característica esta que foi transferida somente para a linhagem F-52.

5.3. - CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DOS RECOMBINANTES

Os parentais *B. amyloliquefaciens* e *B. natto*, quanto à produção de α -amilase e proteases, apresentam, respectivamente, os fenótipos: AMI^a, PN^b-PA^b e AMI^b, PN^a - PA^a indicando "a" alta produção e "b" baixa produção, respectivamente, de α -amilase (AMI) e de proteases neutra ou alcalina (PN-PA).

Para a síntese de α -amilase os transformantes selecionados (Tabela 1) podem ser divididos em dois grupos: os AMI^a e os AMI^s, indicando "s" produção superior.

Para a produção de proteases neutra e alcalina a divisão em grupos é dificultada pela variação dos valores das atividades proteolíticas obtidas. Porém, todos os transformantes produziram mais proteases neutra e alcalina do que o receptor. Portanto, a característica PN^a-PA^a do *B. natto* foi transferida para estas linhagens.

O genes reguladores, designados como amyR1, amyR2 ou amyR3 são alelos e controlam a velocidade de síntese da α -amilase⁶¹. A velocidade de síntese da protease neutra é controlada pelos genes nprR1 ou nprR2⁵⁵.

O *B. amyloliquefaciens* com fenótipo AMI^a, PN^b - PA^b teria o genótipo amyR2, nprR1..., Sm^S e o *B. natto* AMI^b, PN^a-PA^a seria amyR1, nprR2... Sm^R. Os genes nprR2 e Sm^R devem ter sido transferidos para os transformantes através do DNA - *B. natto*. Portanto, os recombinantes selecionados, incluindo os grifados com os fenótipos AMI^S, seriam: amyR2, nprR2..., Sm^R (Tabela 1).

Como os genes amyR1,2,3 não existem juntos⁶¹, isto nos leva a crer que a duplicação na produção da amilase nas linhagens AMI^S é devido à ação pleiotrópica do gene Sm^R transferido do *B. natto* ou, ainda, à ação pleiotrópica de uma outra característica ainda não identificada nos experimentos, herdada pelos recombinantes.

O recombinante F-52 (Tabela 2), com o mesmo genótipo do parental *B. natto* produziu duas vezes mais amilase do que este microrganismo, sugerindo que a característica Sm^R poderia ter afetado também a produção da enzima.

Observou-se em alguns recombinantes um aumento considerável na produção da protease alcalina. Como mutações específicas para essa enzima ainda não foram obtidas⁴³, admite-se que o aumento observado poderia ser devido à ação pleiotrópica do gene Sm^R.

Além dos fatores genéticos do microrganismo, outros fatores como composição de meio de cultura (com ênfase na fonte de carbono e nitrogênio), aeração, agitação e temperatura afetam a biossíntese da α -amilase^{12,29}.

5.4. - PRODUÇÃO DE ENZIMAS E ESTUDO DE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

As bactérias produtoras de amilases têm um ciclo de crescimento que pode ser dividido em três fases: trofofase, com produção da biomassa; fase intermediária e idiofase, com produção da enzima²⁴.

As Figuras 2, 3 e 4 mostram que as linhagens T-41 e T-49 apresentaram o mesmo perfil de produção para a α -amilase, com aumento linear nos intervalos de 24 e 48 horas. O aumento coincidiu com a fase de declínio da biomassa. Com o *B. amyloliquefaciens* o aumento da enzima ocorreu nos intervalos de 12 a 24 horas. Os transformantes diferiam do receptor quanto ao início da idiofase. A produção máxima da biomassa (trofofase), para as três linhagens, ocorreu com 24 horas de fermentação.

Para o *B. subtilis* a produção da amilase ocorre no momento em que as células começam a crescer. Com o decréscimo da massa celular, a velocidade de síntese da enzima aumenta, atingindo valores altos que são mantidos, mesmo na fase estacionária¹². Segundo COLEMAN¹² há redução na síntese do mRNA da exoenzima pela utilização dos precursores do ácido nucléico para a síntese do RNA ribossomal. Quando a velocidade de cres-

cimento diminui, a síntese do RNA ribossomal também diminui. Como conseqüência, haverá o aumento da síntese do mRNA da amilase. Esta relação da síntese da α -amilase com o conteúdo de mRNA foi confirmada por NAGATA *et alii*⁴⁰.

A maioria dos estudos de produção da amilase bacteriana envolve o gênero *Bacillus*, porém, a relação entre o processo de síntese da enzima com a diferenciação de células vegetativas para esporos ainda está obscura e confusa²⁴.

Observou-se que os recombinantes T-41 e T-49, bons produtores de amilase (Figuras 2, 3 e 4) apresentaram autólise celular mais acentuada que o receptor, o que reforça as indicações da literatura de que linhagens recombinantes podem apresentar características fenotípicas que não aquelas dos parentais⁶².

Em relação à variação do pH do caldo de cultura, as Figuras 2, 3 e 4 mostram que as três linhagens apresentaram o mesmo perfil com alcalinização crescente.

O transformante T-41 foi escolhido para os experimentos subseqüentes por produzir mais α -amilase do que o T-49 (Figuras 3 e 4).

As amilases produzidas pela *B. amyloliquefaciens* e T-41 apresentaram atividade ótima em pH 6,0 (Figura 5), e temperatura ótima a 65°C (Figura 6). A 60°C a enzima excretada pelo receptor foi praticamente estável durante 60 minutos, ao contrário do T-41, cuja atividade apresentou um declínio mais

acentuado a partir de 40 minutos. O declínio em atividade foi mais marcante a 65°C (Figura 7). Portanto, o receptor produz α -amilase mais termoestável do que o transformante T-41.

Os valores encontrados na literatura para pH ótimo, temperatura ótima e temperatura de estabilidade para a α -amilase do *B. amyloliquefaciens* são respectivamente 5,9; 65°C e 60°C^{39,43}.

A enzima produzida pelo *B. amyloliquefaciens* é do tipo liquificante¹³ e a produzida pelo *B. natto* é do tipo sacarificante³⁹.

A análise do cromatograma (Figura 8) mostrou não haver diferença entre as enzimas excretadas pelo receptor e transformante, quanto à maneira de atuação sobre o amido.

Para o estudo da cinética de produção das proteases neutra e alcalina foram utilizados o parental *B. natto* e os recombinantes F-52 e T-39 (Figuras 9, 10 e 11). Estes microrganismos apresentaram o mesmo perfil para a produção de proteases, da biomassa e para a variação de pH. A síntese das proteases iniciou no intervalo de 6 a 12 horas, coincidindo com a fase logarítmica de crescimento. Nos intervalos de 18 a 24 horas, correspondendo à fase estacionária de crescimento, observou-se um aumento linear da protease alcalina.

Concordando com a literatura⁵⁵, a síntese da protease neutra parece preceder a síntese da serino-protease.

No final da fermentação, a relação entre as proteases neutra e alcalina, para os bacilos *B. natto* e F-52 foi de 0,8 e 1,3 para o T-39.

O *B. amyloliquefaciens*, o *B. subtilis* SAC e o *B. natto* apresentam altas atividades proteolíticas em meio de cultura, o que é devido principalmente à atividade de protease neutra^{43,55}.

A linhagem T-39 apresentou um aumento nítido em atividade, para a protease neutra, ao final da fermentação (Figura 11).

As proteases sintetizadas pelo *B. subtilis* praticamente não são detectadas no início da fase logarítmica de crescimento³⁶, o aumento se dá na fase estacionária com o aparecimento de esporos⁵⁵.

Como as dosagens das atividades proteolíticas foram determinadas a partir do sobrenadante e, portanto, na presença das duas enzimas, é possível que as baixas atividades iniciais observadas para a protease alcalina sejam devidas à ação da protease neutra, pois o pH ótimo de atividade desta enzima está entre os valores 7,0 e 8,0 e para a alcalina, na faixa de 9,0 e 11,0^{26,27}.

Este fato foi observado quando se testou o efeito de EDTA sobre as atividades proteolíticas do sobrenadante (Tabela 10). Em pH 7,0, os microrganismos *B. natto*, F-52 e T-39 apresentaram uma atividade remanescente bastante alta, após o

tratamento com EDTA, quando a atividade esperada seria nula, se estivesse trabalhando com a protease neutra isoladamente. Em pH 9,0 as atividades não deveriam ser alteradas, pois o EDTA não afeta as atividades das serino-proteases²⁸. Em relação ao pH do caldo de cultura (Figuras 9, 10 e 11), houve alcalinização crescente, como observado na síntese das α -amilases (Figuras 2, 3 e 4).

6.- CONCLUSÕES

. Conseguiu-se obter, através de experimentos com DNA transformante, as linhagens T-39 e T-41, que produziram, respectivamente, mais proteases e mais α -amilase e proteases do que o receptor *B. amyloliquefaciens*.

. As características, alta produção de proteases e resistência à estreptomicina foram transferidas para os recombinantes pelo DNA do *B.natto*.

. O aumento na produção de α -amilases observado nos transformantes pode ter sido devido à ação pleiotrópica do gene Sm^R.

. Conseguiu-se, através de experimentos com fusão de protoplastos, isolar a linhagem F-52, que, apesar de ter o mesmo genótipo do *B. natto*, produziu duas vezes mais α -amilase que o parental, talvez devido à ação pleiotrópica do gene Sm^R.

. O melhoramento genético por transformação mostrou ser mais eficiente na obtenção de recombinantes do que a fusão de protoplastos.

. A α -amilase do transformante T-41 mostrou-se menos termoestável do que a do receptor.

. A análise do cromatograma evidenciou que as enzimas produzidas pelo receptor e pelo T-41 apresentaram a mesma maneira de atuação sobre o amido.

7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPILIZEN, J. Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 81: 711-46, 1961.
2. ANSON, M.L. The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. J. Gen. Physiol., 20: 565-74, 1937.
3. AUMAYR, A.; HARA, T.; UEDA, S. Transformation of Bacillus in polyglutamante production by DNA from Bacillus natto. J. Gen. Appl. Microbiol., 27: 115-23, 1981.

4. AYAD, S.R. & SCHIMMIN, E. Properties of the competence inducing factor of Bacillus subtilis 168. Biochem. Genet., 11: 455-74, 1974.
5. BARACH, J.T. & ADAMS, D.M. The thermostability at ultrahigh temperatures of thermolysin and a protease from a psychrotrophic Pseudomonas. Biochem. Biophys. Acta, 485: 417-23, 1977.
6. BOYER, E.W. & INGLE, M.B. Extracellular alkaline amylase from Bacillus species: J. Bacteriol., 110(3): 992-1000, 1972.
7. BURBIDGE, E. & COLLIER, B. Production of bacterial amylases. Process Biochem., 3: 53-6, 1968.
8. CAMPBELL, L.L. Purification and properties of an α amylases from facultative thermophilic bacteria. Arch. Biochem. Biophys., 54: 154-61, 1955.
9. CHANDRA, A.K.; MEDDA, S.; BHADRA, A.K. Production of extracellular thermostable α amylase by Bacillus licheniformis. J. Ferment. Technol., 58(1): 1-10, 1980.
10. CHIANG, J.P.; ALTER, J.E.; STERNBERG-ELKAHART, M. Purification and characterization of a thermostable α -amylase from Bacillus licheniformis. Die Starke, 31: 86-92, 1979.

11. CLEMENTI, F.; ROSSI, J.; COSTAMAGNA, L.; ROSI, I. Production of amylase(s) by Schwanniomyces castelli and Endomycopsis fibuligera: Antonie Van Leeuwenhoek, 46: 399-405, 1980.
12. COLEMAN, G. Studies on the regulation of extracellular enzyme synthesis by Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol., 49: 421-31, 1967.
13. FISCHER, E.H. & STEIN, E.A. Bacterial and mold amylases. In: _____. The enzymes, New York, Academic Press, 1971, v.5., p. 247,
14. FOGARTY, W.M. & GRIFFIN, P.S. Production and purification of the metalloprotease of Bacillus polymyxa. Appl. Microbiol. 26(2): 185-90, 1973.
15. FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Developments in microbial extracellular enzymes. In: _____. Topics in enzyme and fermentation biotechnology-3. England, J. Wiley, 1979. cap. 3, p. 45-102.
16. FOX, M.S. Some features of genetic recombination in procaryotes. Ann. Rev. Genet., 12: 47-68, 1978.
17. GIBSON, T. & GORDON, R.E. Endospore-forming rods and cocci. In: _____. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th. ed. Baltimore, Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., 1975. p. 529-75.
18. GREEN, D.M. & COLARUSSO, L.S. The physical and genetic characterization of a transformable enzyme: Bacillus subtilis α -amylase. Biochem. Biophys. Acta, 89: 277-90, 1964.

19. HAAS, M. & YOSHIKAWA, H. Defective bacteriophage PBSH in Bacillus subtilis. II. - Intracellular development of the induced prophage. J. Virology, 3(2): 248-60, 1969.
20. HADLACZKY, G.; FODOR, K.; ALFOLDI, L. Morphological study of the reversion to bacillary form of Bacillus megenterium. Protoplast.J.Bacteriol., 125(3): 1172-9, 1976.
21. HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes. Ann.Rev. Biochem., 29: 45-72, 1960.
22. HARTMAN, P.A.; WELLERSON, R.; TETRAULT, P.P. Bacillus stearothermophilus. I. - Thermal and pH stability of the amylase. Appl. Microbiol., 3: 7-10, 1955.
23. HSIU, J.; FISCHER, E.H.; STEIN, E.A. Alpha-amylases as calcium metalloenzymes. II. Calcium and the catalytic activity. Biochemistry, 3(1): 61-6, 1964.
24. INGLE, M.B.; ERICKSON, R.J. The α -amylases. Adv. Appl. Microbiol., 24: 257-78, 1978.
25. KATO, N.; ADACHI, S.; TAKEUCHI, K.; MORIHARA, K.; TANI, Y.; OGATA, K. Substrate specificities of the proteases from a marine psychrophilic bacterium Pseudomonas sp n° 548. Agr. Biol. Chem. 38(1): 103-9, 1974.
26. KEAY, L. Microbial proteases. Process Biochem., 6(8): 17-22, 1971.

27. KEAY, L. & WILDI, B.S. Proteases of the Genus Bacillus.
I.- Neutral proteases. Biotechnol. Bioeng., 12(2): 179-212, 1970.
28. KEAY, L.; MOSER, P.W.; WILDI, B.S. Proteases of the genus Bacillus. II.- Alkaline proteases. Biotechnol. Bioeng., 12(2): 213-49, 1970.
29. KRISHNAN, T. & CHANDRA, A.K. Effect of oilseed cakes on α -amylase production by Bacillus licheniformis CUM C305. Appl. Environ. Microbiol., 44(2): 270-4, 1982.
30. KUESITADZE, G.I. & DUALI, M.S.H. Immobilization of mold and bacterial amylases on silica carries. Biotechnol. Bioeng., 24: 1765-72, 1982.
31. LEIGHTON, T.J.; DOI, R.H.; WARREN, R.A.J.; KELLN, R.A. The relationship of serine protease activity to RNA. Polymerase modification and sporulation in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol., 76: 103-22, 1973.
32. MADSEN, G.B.; NORMAN, B.E.; SLOTT, S. A new heat stable bacterial amylase and its use in high temperature liquefaction. Die Starke, 9: 304-8, 1973.
33. MATSUZAKI, H.; YAMANE, K.; NAGATA, Y.; MARUO, B. Hybrid α -amylases produced by transformant of Bacillus subtilis. I.- Purification and characterization of extracellular α -amylases produced by the parental strains and transformants. Biochem. Biophys. Acta, 356: 235-47, 1974.

34. MEDDA, S. & CHANDRA, A.K. New strains of Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. J.Appl.Microbiol., 48: 47-58, 1980.
35. MEERS, J.L. The regulation of α -amylases production in Bacillus licheniformis. Antonie Van Leeuwenhoek, 38: 570-85, 1972.
36. MILLET, J.; LARRIBE, M.; AUBERT, J.P. Mutant thermosensible de B. subtilis affecté dans la sporulation et la seryl protease extracellulaire. Biochimie, 58: 109-17, 1976.
37. MORGAN, F.J. & PRIEST, F. G. . Characterization of a thermostable α -amylase from Bacillus licheniformis NCIB 6346. J.Appl.Bacteriol., 50: 107-14, 1981.
38. MORIHARA, K. Comparative specificity of microbial proteinases. Adv. Enzymol., 41: 179-244, 1974.
39. MOSELEY, M.H. & KEAY, L. (1970) Biotechnol. Bioeng., 12:251 Apud.: FOGARTY, W.M. & KELLY, C.T. Developments in microbial extracellular enzymes. In: _____. Topics in enzyme and fermentation biotechnology-3. England, J.Willey, 1979. cap. 3, p. 45-102.
40. NAGATA, Y.; YAMAGUCHI, H.; MARUO, B. Assay of messenger activity of RNA from Bacillus subtilis in heterologous cell-free system and its relation to α -amylase productivity. Agr. Biol. Chem., 44(6): 1283-9, 1980.

41. OISHI, M.; TAKAHASHI, H.; MARUO, B. Intracellular α -amylase in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 85: 246-7, 1963.
42. PEBERDY, J.F. Isolation and fusion of bacterial protoplasts. In: _____. A handbook of experimental methods. England, Dept. Botany. University of Nottingham, 1979. Cap. 1, p. 1-4.
43. PRIEST, F.G. Extracellular enzyme synthesis in the Genus Bacillus. Bacteriol. Reviews, 41(3): 711-53, 1977.
44. SAITO, H.; KOHIYAMA, M.; KEDA, Y. DNA mediated transformation in Bacillus subtilis with special reference to the method for preparing competent cells. J. Gen. Appl. Microbiol., 7(4): 243-52, 1961.
45. SAITO, H. & MIURA, K.I. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochem. Biophys. Acta, 72: 619-29, 1963.
46. SAITO, N. A thermophilic extracellular α -amilase from Bacillus licheniformis. Arch. Biochem. Biophys., 155: 290-8, 1973.
47. SAITO, N. & YAMAMOTO, K. Regulatory factors affecting α -amylase production in Bacillus licheniformis. J. Bacteriol., 121(3): 848-56, 1975.

48. SASAKI, T.; YAMASAKI, M.; MARUD, B.; YONEDA, Y.; YAMANE, K.; TAKATSUKI, A.; TAMURA, G. Hyperproductivity of extracellular α -amylase by a tunicamycin resistant mutant of Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Research Communications, 70(1): 125-31, 1976.
49. SEKIGUCHI, J. & OKADA, H. Regulation of α -amylase production in a Bacillus subtilis Marburg strain. I.- Isolation of mutants which produce high levels of α -amylase and analysis of their enzymes. J. Ferment. Technol., 50: 801-9, 1972.
50. SMITH, B.W. & ROE, J.H. A photometric method for the determination of α -amylase in blood and urine with use of the starch-iodine color. J. Biol. Chem., 179: 53-9, 1949.
51. SOLOMON, B. Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial applications. Adv. Biochem. Eng., 10: 132-72, 1978.
52. SPIZIZEN, J. Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44(10): 1072-8, 1958.
53. STEIN, E.A.; HSIU, J.; FISCHER, E.H. Alpha-amylases as calcium metalloenzymes. I- Preparation of calcium free apoamylases by chelation and eletrodialysis. Biochemistry, 3(1): 56-61, 1964.

54. TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.G. Detection of sugar on paper chromatograms. Nature, 166: 444-5, 1950.
55. UEHARA, H.; YONEDA, Y.; YAMANE, K.; MARUO, B. Regulation of neutral protease productivity in Bacillus subtilis: transformation of high protease productivity. J. Bacteriol., 119: 82-91, 1974.
56. VALLEE, B.L.; STEIN, E.A.; SUMERWELL, W.N.; FISCHER, E.H. Metal content of α -amylases of various origins. J. Biol. Chem., 234(11): 2901-5, 1959.
57. VIDOLI, R.; YAMAZAKI, H.; NASIM, A.; VELIKY, I.A. A novel procedure for the recovery of hybrid products from protoplast fusion. Biotechnol. Letters, 4: 781-4, 1982.
58. YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y.; MARUO, B. Genetic control of the rate of α -amylase synthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 119: 410-5, 1974.
59. YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y.; MARUO, B. Isolation of mutants defective in α -amylase from Bacillus subtilis and their genetics analysis. J. Bacteriol., 119: 416-24, 1974.
60. YAMAGUCHI, K.; MATSUZAKI, H.; MARUO, B. Participation of a regulator gene in the α -amylase production of Bacillus subtilis. J. Gen. Appl. Microbiol., 15: 97-107, 1969.
61. YONEDA, Y. Increased production of extracellular enzymes by the synergistic effect of genes introduced into Bacillus subtilis by stepwise transformation. Appl. Env. Microbiol., 39: 274-6, 1980.

62. YONEDA, Y. & MARUO, B. Mutation of Bacillus subtilis causing hyperproduction of α -amylase and protease and its synergistic effect. J. Bacteriol., 124(1): 48-54, 1975.
63. YONEDA, Y.; YAMANE, K.; MARUO, B. Membrane mutation related to the production of extracellular α -amylase and protease in Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Research Comm., 50(3): 765-70, 1973.
64. YONEDA, Y.; YAMANE, K.; YAMAGUCHI, Y. Transformation of Bacillus subtilis in α -amylase productivity by DNA from Bacillus subtilis var. amylosacchariticus. J. Bacteriol., 120: 1144-50, 1974.
65. YOSHIKAWA, H. Mutations resulting from the transformation of Bacillus subtilis. Genetics, 54: 1201-14, 1966.
66. YOSHIKAWA, H. Temperature-sensitive mutants of Bacillus subtilis. I. - Multiforked replication and sequential transfer of DNA by a temperature sensitive mutant. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 65(1): 206-13, 1970.
67. YUKI, S. On the gene controlling the rate of amylase production. Biochem. Biophys. Research Comm., 31(2): 182-7, 1968.
68. WELKER, N.E. & CAMPBELL, L.L. Induction of α -amylase of Bacillus stearothermophilus by malto- dextrins. J. Bacteriol., 86: 687-91, 1963.

69. WELKER, N.E. & CAMPBELL, L. Unrelatedness of Bacillus amyloliquefaciens and Bacillus subtilis.
J. Bacteriol., 94(4): 1124-30, 1967.
70. WHITAKER, J.R. Proteolytic enzymes. In: _____. Principles of enzymology for the food sciences. New York, Marcel Dekker, 1972. p. 511-39.
71. WILSON, J.J. & INGLEDEW, W.M. Isolation and characterization of Schwanniomyces alluvins amylolytic enzymes.
Appl. Environ. Microbiol., 44(2): 301-7, 1982.