

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/12153
IB/81145

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1990

**EXPRESSÃO DO GENE DA ALFA - AMILASE
(*amy*) DE *Bacillus subtilis* SOB O CONTROLE
DE UM PROMOTOR DE *Xanthomonas campestris***

ANDRÉA DE LIMA PIMENTA

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Yoko B. Rosato.

CAMPINAS - SP

1990

T/UNICAMP

P649_e

Este exemplar corresponde à
redação final da Tese defendida
pela candidata Andréa de L. P.
Pimenta e aprovada pela Comissão
Julgadora.
Campinas 19/3/90
Y. Rosato

CLASSIF.	T
AUTOR.	P672c
V.	EX
FORMO	12153
BCI	EB944

*Aos meus pais, Maria Heliette e Talmo,
meus irmãos, Adriana e Paulo de Tarso e
à minha família como um todo,
pelo amor e pela confiança que depositam em mim,
dedico.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Profª Drª Yoko Bomura Rosato,

minha orientadora e "mãe campineira", pela dedicação, apoio e interesse recebidos durante a realização deste trabalho e por ter confiado em mim para realizá-lo.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho,

meu "chefe" e co-orientador deste trabalho, pelo carinho e desprendimento com que me recebeu em seu laboratório e pelo interesse que sempre demonstrou por essa sua orientada distante.

Ao Rogério,

por não ter me deixado trabalhar todos os fins-de-semana dos últimos dois anos, por ter compreendido as vezes em que tive fazê-lo e por ter "segurado minha barra" de geneticista-tempo-integral.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores João Lúcio de Azevedo, Renato Bonatelli Júnior e Vanderlei Dias da Silveira, pela disponibilidade, cuidado e paciência que tiveram na leitura e correção do manuscrito deste trabalho.

A amiga Lucília, pela paciência com que me iniciou nas técnicas de Biologia Molecular e pelo carinho com que me recebeu em sua casa.

As colegas de laboratório Renata, Suzi, Rejane, Valéria Maia e Valéria Mineira, pela camaradagem com que desenvolvemos nossos trabalhos e pelas discussões a respeito dos mesmos.

A Sandra e Wilson, pela ajuda com a infra-estrutura do trabalho de laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda, pela utilização de reagentes e equipamentos de seu laboratório.

Ao Dr. Adilson Leite, pelos inúmeros conselhos técnicos e pela ajuda prestada à realização deste trabalho.

Aos colegas Ale, Cristina, Laura, Sílvia, Isa, Márcio e Rosângela, pela disponibilidade com que sempre receberam meus pedidos de auxílio.

A Prof^a Dr^a Ana Clara S. Francino, pelo interesse e auxílio recebidos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UnB, todos sem exceção, por me terem feito sentir como "parte da turma" durante o tempo em que convivemos.

exceção

A CAPES, pela concessão da bolsa.

ÍNDICE

Página

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Características Gerais da Bactéria <i>X. campestris</i>	05
2.1.1 Fitopatogenicidade	06
2.1.2 Biossíntese de goma xantana	09
2.2 A Goma Xantana	10
2.2.1 Composição e produção da goma xantana	12
2.3 Vetores de Clonagem e Expressão em <i>X. campestris</i>	14
2.4 Regulação da Transcrição em Sistemas Procarióticos ..	17
2.4.1 Promotores procarióticos	17
2.4.2 Vetores-sonda para promotores	20
2.4.3 RNA polimerases procarióticas	23
2.5 As Amilases	25
2.5.1 A alfa-amilase de <i>Bacillus</i>	27
2.5.2 Regulação da síntese da alfa-amilase em <i>B. subtilis</i>	28
2.6 O Locus Estabilizador <i>parB</i>	33

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1	Linhagens Bacterianas Utilizadas	36
3.2	Plasmídios Utilizados	39
3.3	Meios de Cultura	40
3.4	Reagentes e Soluções	
3.4.1	Soluções utilizadas nas extrações de DNA	42
3.4.2	Soluções para eletroforese	44
3.4.3	Soluções para transformação bacteriana	44
3.4.4	Soluções para isolamento de DNA	45
3.4.5	Soluções usadas na marcação do DNA	45
3.4.6	Soluções para "Southern Blotting"	46
3.4.7	Soluções usadas nos experimentos de "Low Melting"	47
3.4.8	Tampões de enzimas	48
3.4.9	Soluções para dosagem de alfa-amilase	49
3.5	Curva de Crescimento	51
3.6	Construção de Moléculas Híbridas de DNA	52
3.7	Clonagem das Sequências Promotoras de <i>X. campestris</i> ..	53
3.8	Extração de DNA Total de <i>X. campestris</i>	54
3.9	Purificação do DNA em CsCl	56
3.10	Extração de Plasmídios em Grande Escala	57
3.11	Avaliação das Concentrações das Soluções de DNA	58
3.12	Minipreparação de Plasmídios	60
3.13	Digestão do DNA com Enzimas de Restrição	62

3.14 Extração das Enzimas de Restrição	64
3.15 Análise do DNA digerido em Géis de Agarose	65
3.16 Purificação de Fragmentos de DNA em Papel de DEAE ...	66
3.17 Isolamento de DNA de Géis de Agarose de Baixo Ponto de Fusão ("Low Melting")	69
3.18 Cálculo da Concentração Molar de Terminções Livres em Moléculas Linearizadas de DNA	70
3.19 Defosforilação dos Vetores Linearizados	70
3.20 Ligação das Moléculas Híbridas de DNA	71
3.21 Transformação de <i>E. coli</i>	72
3.22 Marcação de DNA por "Primers" de Oligonucleotídeo Randômicos	73
3.23 Montagem da Coluna de Sephadex G-50	75
3.24 Transferência de DNA para Membranas de Nylon	76
3.25 Pré-Hibridização	78
3.26 Hibridização	78
3.27 Conjugação	79
3.28 Determinação da Estabilidade das Construções Plasmidiais em <i>X. campestris</i>	81
3.29 Avaliação da Atividade de Alfa-Amilase em Meio Líquido	
3.29.1 Análise do consumo de amido em meio de cultura	82
3.29.2 Formação de açúcar redutor em meio de cultura	83

3.29.3	Quantificação da atividade de alfa-amilase no sobrenadante de culturas	84
3.29.4	Quantificação de proteína total no sobrenadante de culturas	86
3.29.5	Cálculo da atividade específica de alfa-amilase	87
3.30	Avaliação do Consumo de Amido em Meio Sólido	87
3.31	Avaliação da Produção de Goma Xantana	88

4. RESULTADOS

4.1	Curva de Crescimento	90
4.2	Construção do PAP2	90
4.3	Clonagem das Sequências Promotoras de <i>X. campestris</i> ..	95
4.4	"Southern Blotting"	98
4.5	Introdução da Sequência Promotora do pAX1 no PAP2 ...	101
4.6	Subclonagem do <i>parB</i> no PAP2	105
4.7	Introdução da Sequência Promotora do pAX1 no PAP23 ..	109
4.8	Estabilidade das Construções Plasmidiais em <i>X. campestris</i>	114
4.9	Atividade de Alfa-Amilase	117
4.10	Atividade Específica de Alfa-Amilase	122
4.11	Produção de Goma Xantana	128

5. DISCUSSÃO

5.1	Seleção da Linhagens Hospedeiras	132
5.2	Construção dos Plasmídios Portadores de <i>amy</i>	134
5.3	Isolamento das Sequências Promotoras	136
5.4	Subclonagem do <i>Locus</i> Estabilizador <i>parB</i>	138
5.5	Subclonagem das Sequências Promotoras	139
5.6	Estabilidade dos plasmídios em <i>X. campestris</i>	141
5.7	Produção de Alfa-Amilase	143
5.7.1	O efeito da glicose	145
5.7.2	O efeito do <i>locus parB</i>	147
5.7.3	O efeito do promotor de <i>X. campestris</i>	148
5.8	Produção de Goma Xantana	152
5.9	Perspectivas	154
6.	ABSTRACT	156
7.	APÊNDICES	158
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Construção do pAP2	93
FIGURA 2: Perfil de Restrição do pAP2	94
Figura 3: Clonagem da Sequência Promotora de <i>X. campestris</i> ...	96
Figura 4: Perfil de Restrição do pAX1	97
Figura 5: Hibridização do DNA de <i>X. campestris</i> com o Promotor Clonado	100
Figura 6: Construção do pAP2X	102
Figura 7: Perfil de Restrição do pAP2X/ <u>EcoR</u> I	103
Figura 8: Perfil de Restrição do pAP2X/ <u>EcoR</u> I/ <u>Hind</u> III	104
Figura 9: Construção do pAP23	106
Figura 10: Perfil de Restrição do pAP23	107
Figura 11: Construção do pAP23X	111
Figura 12: Perfil de Restrição do pAP23X/ <u>EcoR</u> I	112
Figura 13: Perfil de Restrição do pAP23X/ <u>EcoR</u> I/ <u>Hind</u> III	113

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1:	Curva de Crescimento	91
Gráfico 2:	Estabilidade Conferida por <i>parB</i> na Linhagem 280 Nal ^r	115
Gráfico 3:	Estabilidade Conferida por <i>parB</i> na Linhagem REF Cm ^r	116
Gráfico 4:	Alfa-Amilase Produzida por Linhagens 280 Nal ^r	120
Gráfico 5:	Alfa-Amilase Produzida por Linhagens REF Cm ^r	121
Gráfico 6:	Atividade Específica de Alfa-Amilase em Culturas da Linhagem 280 Nal ^r	125
Gráfico 7:	Atividade Específica de Alfa-Amilase em Culturas da Linhagem REF Cm ^r	126
Gráfico 8:	Produção de Goma Xantana por Linhagens 280 Nal ^r ..	130
Gráfico 9:	Produção de Goma Xantana por Linhagens REF Cm ^r ...	131

ABREVIATURAS

Ác.	= Ácido
AE	= Atividade específica
AMI	= Amido
Amp	= Ampicilina
AMP	= Mono fosfato de Adenosina
AMPc	= AMP cíclico
<i>amy</i>	= Gene que codifica a enzima alfa-amilase
Atm	= Atmosferas
ATP	= Trifosfato de adenosina
B	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>EamH</u> I.
BAP	= Fosfatase alcalina bacteriana
BSA	= Albumina de soro bovino
Cam	= Cloranfenicol
cap.	= Capítulo
<i>cat</i>	= Gene que codifica a enzima cloranfenicol acetil transferase
Cm	= Cloranfenicol
cps	= Centipoises
CsCl	= Cloreto de Césio
dATP	= Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	= Deoxicitidina trifosfato
dGTP	= Deoxiguanosina trifosfato
dTTP	= Deoxitimidina trifosfato

dNTP	= Deoxiribonucleotídeo trifosfatado
DNA	= Ácido desoxiribonucleico
DNase	= Deoxiribonuclease
D.O.	= Densidade ótica
DSR	= Região "downstream"
DTT	= Ditionotreitól
E	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>EcoR</u> I.
EDTA	= Ácido etilenodiaminotetracético
EPS	= Exopolissacarídeo
EV	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>EcoR</u> V.
fMet-tRNA ^{fMet}	= tRNA da formil-metionina carregado.
H	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Hind</u> III.
Hc	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Hinc</u> II.
Inc	= Grupo de incompatibilidade plasmidial
Kb	= Quilobases
KD	= Quilodaltons
Km	= Canamicina
M	= Molar
mA	= Miliampère
ml	= Mililitros
mM	= Milimolar
<i>mob</i>	= Gene responsável pela capacidade de mobilização durante conjugações
mRNA	= Ácido ribonucleico mensageiro
N	= Normal
Nal	= Ácido nalidíxico

nm	= Nanômetros
<i>opxA</i>	= Gene que codifica a resistência à canamicina.
³² p	= Fósforo radioativo
<i>parB</i>	= <i>Locus</i> de estabilização plasmidial compreendendo os genes <i>hok</i> e <i>sok</i> .
P	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Pst</u> I.
p.	= Página
pb	= Pares de base
pol	= Polimerase
Pv	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Pvu</u> II.
pv	= Patovar
p/v	= Peso por volume
RNA	= Ácido ribonucleico
RNase	= Ribonuclease A
REF	= Referência (linhagem de <i>X. campestris</i>)
rpm	= Rotações por minuto
S	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Sau</u> I.
SDS	= Duodecil sulfato de sódio
Sm	= Sítio de reconhecimento e corte da enzima <u>Sma</u> I.
subsp	= Subespécie
Tet	= Tetraciclina
Tn	= Transposon
<i>tra</i>	= Gene responsável pela capacidade de autotransferência por conjugação
Tris	= Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	= Ácido ribonucleico transportador

U	= Unidade de atividade enzimática
UV	= Ultravioleta
v.	= Volume (de livro)
V	= Volume
uCi	= Microcurie
ug	= Microgramas
ul	= Microlitros

RESUMO

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica responsável pela podridão negra de várias espécies vegetais e produtora de um mucopolissacarídeo extracelular de ampla utilização industrial conhecido como goma xantana.

Com o intuito de se obter linhagens desta bactéria com alta capacidade de expressão do gene da alfa-amilase e potencialmente capazes de produzir a goma xantana a partir de substratos amiláceos, foram clonadas e caracterizadas sequências promotoras específicas de *X. campestris* e, de posse destas foram construídos e introduzidos em duas de suas linhagens (REF Cm^r e 280 NaI^r) quatro vetores distintos portadores do gene da alfa-amilase de *Bacillus subtilis*: (1) pAP2, contendo o gene *amy* sob o controle do promotor de *B. subtilis*; (2) pAP2X, contendo o gene *amy* sob controle do promotor de *X. campestris*, em adição ao promotor original; (3) pAP23, construção semelhante à do pAP2 contendo a inserção do locus de estabilização *parB*; e (4) pAP23X, obtido a partir da introdução do promotor de *Xanthomonas* no pAP23.

Análises do nível de estabilização obtido após a introdução do locus *parB* no plasmídeo pAP2 mostraram que linhagens portadoras do plasmídeo contendo este locus estabilizador apresentaram índice de perda plasmidial até 27 vezes menor do que aquelas cujo plasmídeo não fora dotado desse locus.

A quantificação da produção de alfa-amilase pelas oito linhagens obtidas após a introdução dos plasmídios em *X. campestris* mostrou que linhagens originalmente amilolíticas (Cm^r), portadoras de vetores nos quais o gene *amy* está sob o controle do promotor específico dessa bactéria, apresentaram atividade específica de alfa-amilase 100% superior a da linhagem controle, chegando esta diferença à 300% no caso das linhagens originalmente não amilolíticas (Nal^r).

Apesar de nenhuma das linhagens obtidas ter se mostrado capaz de produzir goma xantana tendo o amido como único substrato, o caráter amilolítico introduzido conferiu a estas bactérias, de um modo geral, melhor capacidade de aproveitamento de todos os substratos estudados (sacarose, amido e amido+sacarose) para produção de xantana, tendo o mais alto nível de produção correspondido ao da linhagem N2X (portadora do plasmídio amilolítico onde foi introduzido o promotor de *X. campestris*) crescida em amido+sacarose.

Estes resultados permitem considerar promissoras as possibilidades de produção de goma xantana a partir de amido, sendo para tanto necessários alguns estudos adicionais envolvendo a caracterização dos produtos de hidrólise do amido por esta alfa-amilase de *B. subtilis* e seu aproveitamento por linhagens de *X. campestris*.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica responsável pela podridão negra de muitas espécies vegetais e produtora de um mucopolissacarídeo extracelular industrialmente conhecido como goma xantana.

A extensa utilização da goma xantana em escala industrial e o fato desse exopolissacarídeo ser atualmente totalmente importado em nosso país, motivou a criação de um projeto conjunto entre a Faculdade de Engenharia de Alimentos e o Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas com o objetivo de otimizar as condições de fermentação da goma e obter linhagens melhoradas de *Xanthomonas campestris* visando viabilizar a produção nacional deste biopolímero.

Dentro desta linha, vários trabalhos têm sido desenvolvidos em nosso laboratório utilizando-se tanto técnicas da chamada Genética Clássica como também explorando-se as possibilidades de manipulações gênicas oferecidas pela Tecnologia do DNA Recombinante. Uma das possibilidades por nós explorada tem sido a obtenção de linhagens de *X. campestris* capazes de produzir goma xantana com as qualificações industrialmente desejáveis a partir de substratos amiláceos, por serem

estes mais baratos e de maior disponibilidade no país (SCHENBERG & COSTA, 1987).

Com este objetivo, STRIPECKE (1988) construiu um plasmídio portando o gene responsável pela produção da enzima alfa-amilase (*amy*), clonada de *Bacillus subtilis* (SOUZA, 1986) e contendo uma origem de replicação promíscua, oriunda do plasmídio pMFY-40 (FUKUDA & YANO, 1985), e portanto capaz de ser reconhecida pela maquinaria replicativa de *X. campestris*. No entanto, este plasmídio, denominado pAP1, quando introduzido em linhagens de *X. campestris*, além de ter se mostrado geneticamente instável, não se mostrou eficaz em capacitar suas linhagens hospedeiras a produzir goma xantana tendo amido como única fonte de carbono.

Uma das razões que para nós explicaria a incapacidade do plasmídio pAP1 em dirigir a produção de goma xantana a partir de amido, seria a insuficiência da quantidade da enzima alfa-amilase disponível para a degradação do amido a açúcares mais simples, estes sim acessíveis à maquinaria metabólica da bactéria responsável pela produção da goma. Esta baixa produção de alfa-amilase, por sua vez, foi por nós atribuída à uma possível baixa afinidade existente entre a enzima RNA polimerase da bactéria hospedeira do plasmídio pAP1 (*X. campestris*) e o sítio promotor responsável por dirigir a transcrição do gene *amy*. Esta baixa afinidade estaria então concorrendo para que a taxa de transcrição do gene *amy* de *B. subtilis* fosse inferior à necessária para a produção de uma quantidade suficiente dessa enzima

capaz de degradar o amido e produzir o substrato para a biossíntese da goma xantana.

A fim de tentar solucionar estes problemas surgidos após a introdução do pAPi em *X. campestris*, e tendo sempre em mente o objetivo inicial do trabalho que é a viabilização da produção de goma xantana a partir de amido, propusemo-nos a:

1. Clonar e caracterizar sequências promotoras de *X. campestris*.
2. Construir um plasmídio vetor portando o gene da alfa-amilase de *B. subtilis* apropriado para receber, imediatamente "upstream" a esse mesmo gene, uma sequência promotora de *X. campestris*.
3. Isolar e introduzir neste novo plasmídio construído sequências gênicas capazes de lhe conferir maior estabilidade em *X. campestris*.
4. Introduzir este novo plasmídio recombinante em linhagens de *X. campestris* e verificar sua estabilidade dentro desta bactéria.
5. Verificar os níveis de produção de alfa-amilase pelas bactérias portadoras desta nova construção plasmidial, contendo agora o gene *amy* sob o controle de um promotor oriundo da própria *Xanthomonas*.

6. Verificar a potencialidade das linhagens de *X. campestris* portadoras deste novo plasmídio em produzir goma xantana a partir de amido.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA BACTÉRIA *Xanthomonas campestris*

As bactérias fitopatogênicas encontram-se agrupadas em quatro gêneros pertencentes à família das *Pseudomonadaceas*, um dos quais corresponde ao gênero *Xanthomonas* (DOWSON, 1939), sendo os demais: *Erwinia*, *Agrobacterium* e *Pseudomonas*.

Bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* caracterizam-se por serem gram-negativas, bacilares, dotadas de um flagelo polar e aeróbicas estritas (LEYNS e cols., 1984). DYE e LELLIOT (1974) dividem o gênero *Xanthomonas* em cinco espécies diferentes: *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas fragariae*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas ampelina*, sendo todas elas patógenos de plantas.

A espécie *Xanthomonas campestris* é dividida em 123 patovares (pv) ou variedades patológicas (LEYNS e cols., 1984), os quais são diferenciáveis entre si com precisão apenas através de sua especificidade de hospedeiro (DYE e cols., 1980). Bactérias pertencentes à essa espécie produzem um mucopolissacarídeo

extracelular (EPS), conhecido como goma xantana, que é secretado ao meio, conferindo às colônias de *X. campestris* uma aparência mucóide e brilhante especialmente quando crescidas em meios contendo açúcares.

Dentre os diferentes patovares que compreendem a espécie *Xanthomonas campestris*, somente o patovar *manihotis* não produz o pigmento amarelo característico da fração EPS.

2.1.1 Fitopatogenicidade:

Xanthomonas campestris é o agente causal da podridão negra de diversas espécies vegetais, tais como crucíferas (pv *campestris*), citrus (pv *citri*) e solanáceas (pv *vesicatoria*), e os danos por ela causados à várias lavouras agrícolas de grande importância econômica explicam o interesse suscitado no estudo de seus mecanismos de fitopatogenicidade e regulação gênica.

A abordagem mais amplamente explorada atualmente no estudo dos mecanismos de patogenicidade de *X. campestris* vem utilizando as técnicas de biologia molecular na tentativa de detectar os genes envolvidos no processo de infecção e na especificidade da interação parasita-hospedeiro (DANIELS e cols., 1987).

O caráter de patogenicidade é em si um fenômeno complexo. Uma bactéria considerada patogênica necessita mostrar-se capaz de, além de induzir o dano característico da doença na planta hospedeira, alcançar e crescer nos tecidos da mesma e resistir aos seus mecanismos químicos de defesa (DANIELS, 1989).

Por conta desse grande número de características envolvidas na expressão final da patogenicidade, torna-se difícil a definição do que seriam "genes de fitopatogenicidade". Estudos fisiológicos levaram à identificação de numerosos fatores produzidos pela bactéria que são, *a priori*, determinantes de patogenicidade, entre eles enzimas, fitotoxinas, reguladores do crescimento da planta hospedeira e polissacarídeos extracelulares (EPS). Na maioria dos casos o papel dessas substâncias no processo de manifestação da patologia não é claro e, como as técnicas genéticas de DNA recombinante oferecem a possibilidade de demonstrar inequivocamente a importância de cada fator neste processo, existe um grande interesse em se clonar os genes que codificam a produção dessas substâncias (DANIELS, 1989).

Através dessa abordagem molecular, TANG e colaboradores (1984) clonaram o gene responsável pela produção de protease extracelular e DANIELS e colaboradores (1987) o da poligalacturonato liase de *X. campestris* pv *campestris* que, quando transferidos por conjugação para mutantes não patogênicos, eram capazes restaurar seu caráter de patogenicidade. TURNER e colaboradores (1985) identificaram, por complementação de mutações induzidas por inserção

do transposon Tn5, um conjunto de genes de patogenicidade do mesmo patovar estudado por DANIELS e colaboradores (1987). SHAW e colaboradores (1987) identificaram e clonaram um gene capaz de complementar uma mutação que eliminava a capacidade invasiva de um mutante de *X. campestris* pv *campestris*. Em 1987, DOW e colaboradores identificaram um conjunto gênico necessário para o controle da secreção de diferentes enzimas e envolvido com a patogenicidade em *X. campestris* pv *campestris*. OSBOURN e colaboradores (1987) identificaram sequências promotoras de *X. campestris* pv *campestris* cuja utilização é aparentemente induzida pela planta hospedeira. SWANSON e colaboradores (1988) clonaram genes de avirulência capazes de inativar a virulência de linhagens de *X. campestris* pv *vesicatoria* os quais RONALD e STASKAWICZ (1988) mostraram posteriormente codificar uma proteína de 50 KD.

Alguns trabalhos publicados sugerem ainda que o exopolissacarídeo (EPS) secretado pelos diversos patovares de *X. campestris* seja também um fator de fitopatogenicidade (COREY & STARR 1957; GOTO, 1982), uma vez que mutantes deficientes em EPS são geralmente avirulentos (KELMAN, 1954). Alguns autores acreditam que a viscosidade gerada pela goma da bactéria no xilema da planta infectada possa ser um fator importante para a patogenicidade (LEACH e cols., 1957; COREY & STARR, 1957; SUTTON & WILLIAMS, 1970). Além disso, RAMIREZ e colaboradores (1988) demonstraram a existência de uma correlação entre o grau de viscosidade da goma produzida e a virulência de alguns isolados de *X. campestris* pv *campestris*, tendo

chegado a propor a utilização do caráter virulência como critério para seleção de linhagens produtoras de goma xantana de alta qualidade. Estes autores propuseram ainda que a estrutura conformacional deste polissacarídeo pode estar associada à virulência da bactéria, o que vem a reforçar a hipótese da necessidade de um reconhecimento molecular patógeno-hospedeiro para a ocorrência da infecção (MORRIS e cols, 1977).

2.1.2 Biossíntese de goma xantana:

A função biológica específica da goma produzida pelos diferentes patovares que compõem a espécie *X. campestris* é até hoje desconhecida, podendo estar relacionada com a proteção da bactéria a condições ambientais adversas, tais como dessecação, altas temperaturas ou exposição à luz ultra-violeta (LEACH e cols., 1957); com a adesão da bactéria à superfície da planta hospedeira, previamente à infecção (MORRIS e cols., 1977) ou ainda com a obstrução de vasos da planta acarretando a necrose característica de seu processo infeccioso (LEACH e cols., 1957).

Pouco se conhece a respeito dos genes envolvidos na biossíntese dos polissacarídeos extracelulares (EPS) bacterianos em geral. Estudos bioquímicos e fisiológicos definiram alguns passos envolvidos nessa biossíntese e indicaram a complexidade de sua regulação (SUTHERLAND, 1985). HARDING e colaboradores (1987)

identificaram e clonaram um conjunto de genes (*xps*) essenciais na biossíntese da goma xantana, inclusive um gene envolvido na piruvatação desse polissacarídeo.

Estudos detalhados realizados *in vitro* demonstraram que a via metabólica da biossíntese da xantana pode ser dividida em três etapas: (1) incorporação de açúcares simples e sua conversão em derivados nucleotídicos; (2) construção das subunidades pentassacarídicas acopladas a um carreador lipídico e (3) polimerização das unidades repetitivas de pentassacarídeos e sua secreção (IELPI e cols., 1981, 1983).

2.2 A GOMA XANTANA

O grande potencial de aplicação industrial da goma xantana justifica o interesse suscitado no estudo da sua biossíntese e dos genes envolvidos na sua regulação. A goma xantana é o primeiro polissacarídeo de origem microbiana de significado comercial, e sua tecnologia de produção foi inicialmente desenvolvida pelo Departamento de Agricultura (NRRL, Peoria, IL) dos Estados Unidos da América em 1959, tendo sido produzida comercialmente a partir de 1961 e aprovada para uso na alimentação humana em 1969 (BAIRD, 1983).

A importância comercial desse exopolissacarídeo é resultante de suas propriedades reológicas únicas tais como alta viscosidade mesmo em baixas concentrações, solubilidade em água fria ou quente, pseudoplasticidade (diminuição reversível da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento), tolerância a grandes variações de temperatura, pH e concentrações de sais, estabilidade à degradação enzimática (KENNEDY e cols., 1984; JEANES e cols., 1961) e capacidade de interagir com galactomanas propiciando a formação de géis (COTTRELL, 1979).

Essas características dão à goma xantana um imenso potencial de aplicação industrial. Na indústria alimentícia, destacam-se a sua utilização em conservas, laticínios, produtos de panificação, sorvetes e produtos liofilizados (BAIRD, 1983). No que diz respeito à indústria petroquímica, devido à sua estabilidade frente à variações de pH, temperatura, cátions e íons divalentes, associadas ao seu comportamento pseudoplástico sob condições de alta tensão de cisalhamento, a goma xantana é tecnicamente o polímero preferido na utilização em lamas de perfuração de poços de petróleo, tendo também um grande potencial de utilização em projetos de recuperação melhorada de óleos (WELLS, 1977; SANDVICK & MAERKER, 1977). Dentre outras aplicações, a goma xantana é utilizada ainda como espessante de pastas de impressão de têxteis, removedores ácidos ou alcalinos, formulações de explosivos (SANDFORD, 1979), agente de suspensão de vitaminas e minerais para suplementos líquidos em alimentos animais, para suspender proteínas nos substitutos de leite para bezerros,

fungicidas, herbicidas e inseticidas aumentando sua capacidade de aderência à vegetação (COTTRELL, 1979).

No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965 (BRASIL, 1965), porém apesar de sua ampla utilização industrial e de seu potencial ainda não realizado de aplicação, em nosso país, atualmente, a goma xantana é um produto totalmente importado o que encarece seu custo e restringe seu campo de aplicação.

2.2.1 Composição e produção da goma xantana:

A estrutura química da goma xantana tem sido bastante estudada e consiste de um esqueleto de celulose com substituições laterais de cadeias trissacarídicas em resíduos alternados de glicose, as quais são posteriormente acetiladas e piruvatadas em graus variados (JANSON e cols., 1975). Os graus de acetilação e piruvatação das moléculas de xantana interferem em sua viscosidade, segundo verificado por CADMUS e colaboradores (1976) e SANDFORD & BAIRD (1983).

LEACH e colaboradores (1957) e LILLY e colaboradores (1958) estudaram a produção de polissacarídeos por espécies de *Xanthomonas* tendo como substrato diferentes fontes de carbono, tais como maltose, glicose, sacarose, amido solúvel, amido de milho e amido hidrolisado. Como resultado desses estudos, foi definido um meio para produção de xantana que consiste de glicose, sacarose ou amido como fontes de carbono, caseína hidrolisada e minerais. Estudos posteriores

realizados por SOUW & DEMAIN (1979) visando a otimização da produção de goma xantana mostraram que os maiores títulos desse polímero eram obtidos a partir de meios contendo 4% de sacarose e, como segunda opção, 4% de glicose. Estes mesmos autores mostraram ainda que a adição de alguns ácidos orgânicos, tais como succinato, piruvato e alfa-cetoglutarato, estimulava a produção de xantana, porém tinha efeito inverso em concentrações elevadas, resultado este idêntico ao conseguido com relação à frutose.

Com relação à produção de goma xantana a partir de substratos alternativos, WALSH e colaboradores (1984) introduziram em *X. campestris* o transposon Tn951 contendo o gene da beta-galactosidase e obtiveram recombinantes cuja atividade específica dessa enzima era mais de 200 vezes superior à dos selvagens. Todavia, a capacidade destes recombinantes em produzir xantana a partir de lactose, que é um dejetos da indústria de laticínios, não foi avaliada.

Ainda sob este direcionamento, STRIPECKE (1988) construiu um plasmídeo contendo o gene da alfa-amilase de *B. subtilis* (pAP1) e o introduziu em duas linhagens de *X. campestris* pv *campestris*, uma delas naturalmente produtora dessa enzima (REF) e a outra excelente produtora de goma xantana, porém não amilolítica (280). A dosagem do consumo de amido em meio de cultura e da produção de açúcares redutores pelas duas linhagens recombinantes mostrou que a introdução do plasmídeo pAP1 amplificou a capacidade amilolítica da linhagem naturalmente produtora (REF) e conferiu esta característica à linhagem

280, originalmente não amilolítica. Este plasmídio, no entanto, mostrou-se instável na linhagem 280, além de não ter sido capaz de dirigir a produção de goma xantana a partir de substratos unicamente amiláceos, fato esse atribuído presumivelmente à baixa expressão de gene de *B. subtilis* em seu novo hospedeiro, *X. campestris* (STRIECKE e cols., 1989).

2.3 VETORES DE CLONAGEM E EXPRESSÃO EM *Xanthomonas campestris*

Uma vez que o estudo das diversas atividades metabólicas de bactérias fitopatogênicas e de solo são atualmente de grande interesse e utilização, diversos grupos de pesquisa tem direcionado suas investigações no sentido de possibilitar a análise e manipulação gênicas em tais bactérias.

Ainda que os sistemas vetor-hospedeiro de *E. coli*, seus plasmídios e bacteriófagos mostrem-se de valor inestimável para a clonagem e estudo de diferentes loci gênicos, esta bactéria geralmente parece não apresentar um ambiente fisiológico apropriado para a expressão de genes de bactérias fitopatogênicas e de solo (INOUE e cols., 1981). Por outro lado, a maioria dos vetores de clonagem desenvolvidos apresentam uma gama de hospedeiros muito restrita, não sendo aplicáveis para a maioria das bactérias fitopatogênicas. Para a manipulação genética destas bactérias, os plasmídios mais apropriados

parecem ser os chamados "plasmídios promíscuos", ou vetores de clonagem de amplo espectro de hospedeiros.

Plasmídios promíscuos caracterizam-se como tal por serem capazes de duplicar-se e manter-se em uma grande variedade de bactérias. Muitos grupos de plasmídios de bactérias gram-positivas possuem esta capacidade, que é, no entanto, uma propriedade menos comum entre os plasmídios de bactérias gram-negativas, estando basicamente restrita a plasmídios dos grupos de incompatibilidade C, N, P, Q e W, de *E. coli*. O que distingue os plasmídios promíscuos daqueles ditos restritos é principalmente seu sistema de manutenção na célula hospedeira, já que mesmo plasmídios restritos, como o fator sexual F e plasmídios do grupo de incompatibilidade IncI-alfa, também são capazes de mediar sua transferência para diferentes espécies bacterianas, nas quais eles não são capazes, no entanto, de se manter. Essa capacidade de manutenção em uma grande variedade de hospedeiros, que caracteriza a promiscuidade, depende de funções codificadas pelo próprio plasmídio e pelo hospedeiro. Falhas neste sistema de manutenção podem ser atribuídas à ausência de sinais adequados à expressão dos genes plasmidiais no hospedeiro heterólogo, à falta de habilidade em recrutar funções deste hospedeiro para a duplicação, segregação ou resolução de multímeros do plasmídio, ou ainda à interferência no crescimento do hospedeiro causada por funções codificadas pelo plasmídio (PINKNEY & THOMAS, 1987).

Os vetores de clonagem utilizados em *X. campestris* são em geral plasmídios promíscuos e cosmídios. Embora já tenham sido descritos alguns bacteriófagos com capacidade de multiplicação em *Xanthomonas* (LIEW & ALVAREZ, 1981), estes ainda não foram utilizados como vetores, pois não se conhece, até hoje, relato a respeito da ocorrência de transdução de qualquer tipo nestas bactérias.

Em 1985, FUKUDA e YANO relataram a construção de dois vetores de clonagem promíscuos derivados do plasmídio RSF1010: o PMFY31 e o PMFY40. O RSF1010 é um plasmídio pequeno (8.684 pb), de ocorrência natural, promíscuo, pertencente ao grupo de incompatibilidade Q de *E. coli* e que codifica a resistência à estreptomicina e à sulfonamidas (SCHOLZ, e cols., 1989). O plasmídio PMFY40, construído por FUKUDA e YANO (figura 1), tem um tamanho de 11,6 kb, sítios únicos para clonagem localizados dentro e fora dos genes que codificam resistência aos antibióticos ampicilina (Ap^r) e tetraciclina (Tet^r), sendo estes dois últimos derivados do conhecido vetor pBR322. Estes autores relatam ainda a eficiência de introdução, propagação e expressão dos genes de resistência do plasmídio PMFY40 em *Pseudomonas putida*, o que o caracteriza como um vetor de clonagem bastante apropriado para a manipulação gênica em bactérias gram-negativas, em especial *X. campestris*.

2.4 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA EM SISTEMAS PROCARIÓTICOS

A expressão gênica em sistemas procarióticos está sujeita basicamente à três tipos de regulação: (1) transcricional, envolvendo repressão, desrepressão e ativação gênicas e eficiência de iniciação e término da transcrição; (2) traducional, envolvendo o reconhecimento eficiente de sinais de iniciação e término da tradução, e finalmente (3) ao nível pós-traducional, que compreende a eficiência com que modificações pós-traducionais, tais como glicosilações, acetilações e hidrólise de peptídeos sinais, são introduzidas nas cadeias proteicas.

Em procariotos na maior parte das vezes a expressão gênica mostra-se regulada ao nível da iniciação da transcrição, etapa esta dirigida pela interação entre a RNA polimerase e a sequência promotora do gene a ser transcrito (ISHIHAMA, 1988).

2.4.1 Promotores procarióticos:

Promotores são, por definição, sequências específicas de DNA localizadas a distâncias proximais ("upstream") determinadas da região estrutural do(s) gene(s) por eles regulado(s) e que afetam a frequência e localização da iniciação de sua transcrição através de interações com a RNA polimerase.

Extensos trabalhos de compilação e análise de promotores de *E. coli*, seus fagos e plasmídios através de programas de computador (HAWLEY & McCLURE, 1983; HARLEY & REYNOLDS, 1987) dão suporte ao conceito existente de uma "sequência promotora consenso" consistindo de: uma região -35 e uma região -10, esta última também conhecida como sequência de Pribnow (PRIBNOW, 1975; SCHALLER, 1975), formadas respectivamente pelos hexanucleotídeos TTGACA e TATAAT e separadas por 17 pares de base, sendo a transcrição iniciada em uma purina localizada a aproximadamente 7 pares de base distais ("downstream") da extremidade 3' da região -10 (ROSEMBERG & COURT, 1979; HAWLEY & McCLURE, 1983).

O significado biológico fundamental dessas sequências conservadas confirma-se através dos relatos de que mutações que diminuem a atividade de promotores também diminuem a homologia de sua sequência com as sequências consenso, o inverso ocorrendo para mutações que aumentam sua atividade (RAIBAUD & SCHWARTZ, 1984; SZOKE e cols., 1987). Mutações que alterem o tamanho do espaçador de 17 pares de bases existente entre as sequências -10 e -35 também modificam o nível da transcrição dirigida pelo promotor mutado (ROSEMBERG & COURT, 1979; HAWLEY & McCLURE, 1983). Além disso, JACQUET e colaboradores (1989) demonstraram que sequências sintéticas de DNA portadoras destes hexâmeros de consenso sintéticos separados por 17 pares de base, quando inseridas no plasmídio pBR329, são capazes de dirigir a transcrição do gene que confere resistência ao cloranfenicol (Cm^r), o qual havia tido sua região promotora original previamente retirada.

No que diz respeito aos passos envolvendo o reconhecimento e ligação da RNA polimerase às sequências promotoras, GILBERT (1976) propôs que a região -35 estivesse envolvida com o reconhecimento e a ligação inicial da RNA polimerase ao promotor, estando a região -10 envolvida na abertura das fitas liberando o molde para início da transcrição. Baseado neste e em outros trabalhos propõe-se um mecanismo envolvendo três etapas distintas para esta fase inicial da transcrição: (1) reconhecimento inicial do sítio promotor pela subunidade sigma da RNA polimerase e ligação da holoenzima à região -35 (formação do complexo de iniciação); (2) estabelecimento de uma ligação estável entre a RNA polimerase e as regiões -35 e -10 do promotor (formação do complexo fechado); e (3) denaturação de uma sequência de aproximadamente 12 a 17 pares de base localizada na região -10 do promotor (formação do complexo aberto).

Já foi demonstrado que a função de alguns promotores é absolutamente dependente da influência de uma molécula reguladora positiva. Estes efetores são necessários no reconhecimento adequado do sítio promotor pela RNA polimerase (ROSEMBERG & COURT, 1979). A análise da sequência de três promotores regulados positivamente mostrou que estes não apresentavam homologia de sequência na região -35, o que reafirma a idéia de que a região -35 é importante no reconhecimento do promotor pela RNA polimerase e que o regulador positivo de alguma forma compensa a ausência desta sequência nos promotores dependentes de efetores (MEYER e cols., 1975; MAJORS,

1975).

A força de um promotor, ou seja, a eficiência com que ele é capaz de dirigir a transcrição do gene sob seu controle, não está relacionada apenas à sua afinidade em se ligar à RNA polimerase, mas também à taxa de isomerização de seu complexo fechado em complexo aberto (CHAMBERLIN, 1974) bem como à sua eficiência em completar os passos subsequentes que envolvem a iniciação da transcrição (YOUDEIRIAN, 1988). KAMMERER e colaboradores (1986) mostraram que após sua ligação a uma sequência promotora, a RNA polimerase de *E. coli* encontra-se em contato com uma região de DNA de aproximadamente 70 pares de bases dos quais aproximadamente 20 são transcritos. Esta sequência localizada em posição distal ("downstream") ao ponto inicial da transcrição foi denominada região "downstream" (DSR). Os autores mostraram ainda que promotores que apresentam alta afinidade em se ligar à RNA polimerase podem perder sua eficiência de transcrição quando combinados com DSRs que aparentemente retardam os passos posteriores desse processo.

2.4.2 Vetores-sonda de promotores ("promoter-probes")

Atualmente, experimentos que envolvam a clonagem e caracterização de promotores têm lançado mão dos chamados vetores tipo sonda de promotores ("promoter-probes"). Estes vetores caracterizam-se por portarem um ou mais genes marcadores, desprovidos de seus

promotores originais, "upstream" dos quais encontram-se sítios múltiplos de restrição ("polylinker") para inserção de sequências randômicas de DNA, isoladas a partir do organismo em estudo. Em uma clonagem do tipo total ("shotgun") utilizando-se um vetor como descrito acima, podem-se identificar os plasmídios recombinantes que porventura tenham recebido a inserção de uma sequência com atividade promotora através da seleção de colônias transformadas onde o gene originalmente inativo tenha tido sua transcrição ativada.

Através desta abordagem, e utilizando como vetor-sonda o plasmídio pKK232-8 (BROSIOUS, 1984), OSBOURN e colaboradores (1987) foram capazes de clonar promotores de *X. campestris* pv *campestris* os quais foi demonstrado estarem sujeitos à indução pela planta hospedeira, já que estes promotores só eram capazes de ativar a transcrição do gene *cat* sob seu controle quando suas bactérias receptoras eram crescidas "*in planta*". Uma vez transferidas para meio de cultura em placas, essas mesmas bactérias não mais se mostravam capazes de expressar a resistência ao cloranfenicol. Utilizando estes mesmos promotores como sonda, OSBOURN e colaboradores foram ainda capazes de isolar, a partir de uma biblioteca genômica, clones supostamente portadores de genes de *X. campestris* cuja expressão está sujeita à indução pela planta hospedeira, e por isso mesmo sérios candidatos à participarem do processo infeccioso da planta pelo fitopatógeno.

Além do pKK232-8 acima citado, vários outros vetores-sonda são conhecidos, portadores dos mais diferentes genes marcadores desprovidos de promotor, tais como o pCB267 (SCHNEIDER & BECK, 1986) o qual permite a identificação de sequências promotoras qualquer que seja o sentido de sua inserção no plasmídio vetor, uma vez que contém os genes *phoA* e *lacZ*, ambos desprovidos de promotor, posicionados consecutivamente e com sentidos de transcrição divergentes.

Em 1986, SHAW e KADO construíram uma sonda de promotores, o pUCD320, cujos genes marcadores desprovidos de promotor correspondem ao cassete que codifica a bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri* (genes *lux*). Esse cassete foi subclonado em um plasmídio promíscuo (pUCD4) sob o controle do promotor constitutivo de tetraciclina, resultando no plasmídio promíscuo de bioluminescência pUCD607. Esta última construção, quando inserida em diferentes fitopatógenos, possibilitou o acompanhamento do processo invasivo e infeccioso dessas bactérias em suas plantas hospedeiras, mesmo antes do aparecimento dos sintomas patológicos característicos, através da emissão de luz.

Além destes, muitos outros vetores-sonda para promotores já foram construídos e mostraram-se eficientes em suas aplicações, alguns dos quais encontram-se relacionados no trabalho de revisão de BALBÁS e colaboradores (1986) sobre plasmídios derivados do pBR322.

2.4.3 RNA polimerases procarióticas:

Várias linhas de trabalho têm mostrado evidências diretas que indicam que a heterogeneidade da RNA polimerase tem um papel importante na regulação global da expressão gênica, particularmente durante mudanças de fase de crescimento e respostas às condições de estresse, tais como limitação de nutrientes e choque térmico (ISHIHAMA, 1988).

Em *E. coli*, a RNA polimerase dependente de DNA é uma proteína de peso molecular de 450 KD, formada por cinco subunidades: beta, beta-linha, sigma, ômega e duas subunidades alfa, ligadas entre si através da formação de pontes secundárias, sem a participação de ligações covalentes. Esse conjunto de cadeias peptídicas pode ser dissociado num "core" enzimático (beta, beta-linha ômega e as duas subunidades alfa) o qual é capaz de realizar os processos básicos de síntese enzimática do RNA mas não é capaz de reconhecer os promotores (BUJARD, 1980) e holoenzima ("core" mais a subunidade sigma). A subunidade sigma é importante no reconhecimento específico das sequências promotoras (BURGES e cols., 1969), ainda que não seja capaz de, sozinha, se ligar ao DNA. Pouco se conhece a respeito das funções das demais subunidades, a não ser que a subunidade beta está intimamente envolvida no processo catalítico de iniciação e alongamento da cadeia de RNA, uma vez que, em associação com a subunidade alfa, ela se liga à rifampicina e à estreptolidigina, drogas sabidamente inibidoras dos processos acima citados (BUJARD,

1980).

A subunidade sigma das RNA polimerases bacterianas determinam sua especificidade de ligação aos promotores e são por isso designadas "fatores de iniciação da transcrição". Em *E. coli* existem diferentes subunidades sigma, codificadas por genes distintos e com diferentes afinidades para com diversos promotores. A subunidade sigma associada à transcrição de genes de choque térmico, por exemplo, chamada sigma³², é codificada pelo gene *rpoH* enquanto o fator sigma predominante de *E. coli*, sigma⁷⁰, é codificado pelo gene *rpoD* (ISHIHAMA, 1988).

Em *B. subtilis* já foram descritas mais de seis subunidades sigma distintas em células na fase de esporulação, além do fator sigma predominante sigma⁴³. Mudanças entre grupos de unidades transcricionais, ativação e inativação gênicas durante a resposta bacteriana à condições de estresse ambiental são efetuadas através de reações de interconversão de subunidades sigma em cascata, as quais conferem à holoenzima especificidade para diferentes grupos de promotores (CHAMBERLIN, 1974; ISHIHAMA, 1988).

Além deste tipo de conversão, existem fortes evidências de que modificações do tipo fosforilação e defosforilação não apenas da RNA polimerase mas também de proteínas que com ela interagem, representam um mecanismo importante de controle da transcrição (ISHIHAMA, 1988). Em dois de seus trabalhos ISHIHAMA (1986, 1988) propõe ainda que as RNAs polimerases sejam interconversíveis não

apenas por modificações covalentes de suas subunidades, mas também através de interações com fatores reguladores nucleotídicos, tais como o ppGpp (molécula reguladora do controle estrigente sob condições de estresse de aminoácidos), fMet-tRNA^{fMet} (o tRNA iniciador) e várias proteínas acessórias.

2.5 AS AMILASES

As enzimas envolvidas na hidrólise do amido recebem o nome genérico de amilases (FOGARTY & KELLY, 1979). Segundo FOGARTY & KELLY (1980) as amilases podem ser divididas em: (1) exo-amilases, como as glucoamilases; (2) endoamilases, como as alfa-amilases; (3) enzimas desramificadoras, como a pululanase; e (4) enzimas produtoras de ciclodextrinas.

As alfa-amilases (alfa-1,4-glucan 4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1, endo-amilase) são endoenzimas (atuam no interior do substrato) que rompem ao acaso as ligações glicosídicas alfa-1,4 do amido, glicogênio e de maltoligossacarídeos, com consequente produção de açúcares redutores, como maltose, glicose e maltotriose (KUESITADZE & DUALI, 1982).

Segundo PRIEST (1977), as alfa-amilases podem ser divididas em dois grupos: as liqueficientes, que atuam preferencialmente sobre o

amido, e as sacarificantes, que atuam preferencialmente sobre as dextrinas. As alfa-amilases sacarificantes iniciam o processo de sacarificação logo após a formação das primeiras dextrinas, enquanto as liqueficientes só o fazem após a maior parte do amido ter sido liquefido. Essa diferença de atuação faz com que as enzimas sacarificantes produzam açúcares redutores numa velocidade maior que as liqueficientes.

As alfa-amilases são encontradas em vegetais, tecidos animais e microorganismos. As de origem microbiana são obtidas na forma cristalina principalmente a partir de bactérias do gênero *Bacillus* e de fungos do gênero *Aspergillus* (SOLOMON, 1978).

Alfa-amilases de diferentes fontes já foram purificadas e muitas delas cristalizadas. Elas em geral diferem em estrutura química, termoestabilidade, afinidade pelo substrato e nos produtos de sua hidrólise, mas todas apresentam a mesma especificidade enzimática (LINARDI, 1985). As alfa-amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis que as de origem fúngica, e dentre aquelas, as secretadas por bactérias do gênero *Bacillus* são as que apresentam maior termoestabilidade, característica que aumenta sua aplicabilidade industrial (CHANDRA e cols., 1980).

No que diz respeito à *X. campestris*, a maior parte dos patovares são capazes de hidrolisar o amido (DYE & LELLIOT, 1974), porém estudos aprofundados quanto às características destas enzimas

são desconhecidos.

2.5.1 A alfa-amilase de *Bacillus*:

Devido principalmente às suas características de termoestabilidade, as alfa-amilases produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* vêm merecendo especial atenção dos pesquisadores no que diz respeito ao estudo de sua regulação bem como à identificação, clonagem e caracterização dos genes envolvidos em sua produção

Em 1986, SOUZA clonou o gene da alfa-amilase (*amy*) de um *Bacillus* isolado em Brasília (DF) no plasmídio bifuncional pABC1 e estudou sua expressão em *E. coli* e em *Bacillus subtilis*. Foi demonstrado então, através da dosagem do consumo de amido em meio de cultura e da produção de açúcar redutor pelos recombinantes, que o gene *amy* em questão era capaz de expressar-se em ambos os hospedeiros testados. Estudos feitos posteriormente terminaram por melhor caracterizar o gene *amy* clonado no plasmídio pABC1. Em 1988, CASTRO procedeu à análise do padrão de restrição do fragmento de 2,4 kb que continha este gene e estudou a relação existente entre a orientação da inserção deste fragmento no plasmídio-vetor e sua expressão na bactéria hospedeira. Foi então demonstrado que, em *E. coli*, derivados do pBR322 contendo o fragmento de 2,4 Kb inserido de forma a ter sua transcrição no sentido oposto à do gene *bla* expressavam muito melhor a alfa-amilase, quando comparados àqueles contendo *amy* inserido na

direção oposta, os quais apresentavam atividade residual de alfa-amilase. Esses dados acumulados levaram os autores às seguintes conclusões: (1) o fragmento AMI de 2,4 Kb contém um promotor funcional para *B. subtilis*; (2) este promotor por si só não é funcional, ou apresenta baixa atividade, em *E. coli*; (3) na região localizada entre o gene *bla* e o sítio de EcoR I do pBR322 e derivados existe, provavelmente, uma sequência que, em adição ao promotor natural de *amy*, resulta em um promotor ativo em *E. coli*. Ainda em 1988, VALÊNCIA e colaboradores obtiveram o sequenciamento do promotor e da sequência codificadora do peptídeo sinal que dirigem a expressão e a secreção do gene *amy* e seu produto proteico, respectivamente.

Posteriormente, o fragmento original de 2,4 Kb que continha o gene *amy* foi retirado do plasmídeo pABC1, e introduzido no plasmídeo pAT153, tendo sofrido a seguir uma redução de 2,4 Kb para 1,6 Kb na região 3' do gene através de digestão com Bal 31, originando desta forma o plasmídeo pASA25. O gene da alfa-amilase, apesar da redução sofrida pelo fragmento de 2,4 Kb que o continha, manteve sua atividade (VALÊNCIA, comunicação pessoal).

2.5.2 Regulação da síntese da alfa-amilase em *Bacillus subtilis*:

A regulação da síntese de enzimas extracelulares em *B. subtilis* tem sido estudada com muito interesse (PRIEST, 1977),

principalmente pela importância que esta espécie adquiriu como hospedeira alternativa devido à sua potencialidade em expressar e secretar proteínas exógenas recombinantes visando sua produção em escala industrial (SOUZA, 1986).

As alfa-amilases são parcialmente indutíveis em algumas espécies de *Bacillus*, não estando o amido diretamente envolvido neste processo de indução, já que ele não é capaz de penetrar na célula bacteriana. Aparentemente, estas bactérias sintetizam alfa-amilase constitutivamente em níveis baixos, porém suficientes para hidrolisar o substrato exógeno dando origem a produtos de baixo peso molecular que ao penetrarem na célula bacteriana estimulam a síntese da alfa-amilase (PRIEST, 1977).

HEINEKEN e O'CONNOR (1972) mostraram que, em *B. subtilis*, a síntese da alfa-amilase é reprimida na presença de fontes de carbono facilmente metabolizáveis, tais como a glicose, o que parece não ocorrer no que diz respeito às fontes de nitrogênio, tais como a amônia (NH_3). Os efetores desse mecanismo de controle, conhecido como repressão catabólica, permanecem, no entanto, desconhecidos em *B. subtilis*, uma vez que o AMP-cíclico, agente responsável pelo "efeito glicose" em bactérias gram-negativas, não se mostra presente a níveis detectáveis em bactérias do gênero *Bacillus* (SETLOW, 1973; ULLMAN, 1974). PRICE e GALLANT (1983) sugeriram que o mecanismo de repressão catabólica em *B. subtilis* estaria ligado à capacidade dessa bactéria em ajustar a atividade da enzima fosfofrutoquinase, através de

modificações reversíveis em sua estrutura, à mudanças no transporte de glicose.

O cistron *amy* de *B. subtilis* foi estudado em detalhe pela primeira vez por YUKI e UEDA (1968), apesar do gene estrutural da alfa-amilase já haver sido reconhecido como elemento transformante cerca de quatro anos antes (GREEN & COLARUSSO, 1964).

É sabido que ao final de seu crescimento exponencial em meio líquido, bactérias da espécie *B. subtilis* ativam um conjunto de genes, que normalmente não se expressam durante a fase de crescimento vegetativo (PRIEST, 1977). Um desses genes ativados temporalmente é o gene *amyE*, que codifica a enzima alfa-amilase.

A existência de um *locus* estreitamente ligado ao gene *amyE* e responsável pelo controle de sua taxa de transcrição foi demonstrada pela primeira vez por YUKI (1968), tendo sido proposto que aquele compreenderia a região promotora deste último (YUKI, 1968; YONEDA & cols., 1974). Este *locus* regulador, denominado *amyR1* em *B. subtilis* 168, existe em pelo menos duas outras formas alélicas: *amyR2*, derivado de *B. subtilis* subsp. *natto* (YONEDA e cols., 1974) e *amyR3*, derivado de *B. subtilis* subsp. *amylosacchariticus* (YUKI, 1968), sendo ambos capazes de induzir a hiperprodução de alfa-amilase quando introduzidos por transformação em linhagens derivadas de *B. subtilis* 168.

Em 1985, NICHOLSON e CHAMBLISS propuseram a existência de uma quarta forma alélica para *locus* regulador *amyR*, identificada através da mutação *gra-10*, a qual definiria um sítio envolvido na regulação da repressão catabólica do gene *amyE*. Esses autores sugeriram que a mutação *gra-10* definiria um sítio-alvo, supostamente localizado em posição proximal ("upstream") ao gene *amyE*, o qual teria deixado de ser reconhecido por um fator regulatório responsável pela repressão em trans da utilização de *amyRi* na presença de fontes de carbono facilmente metabolizáveis. Esses mesmos autores propuseram ainda que o mecanismo de regulação temporal da ativação do gene *amyE* em *B. subtilis* seria "naturalmente insensível à repressão catabólica".

Além dos mecanismos de indução pelo substrato, ativação gênica temporal e repressão catabólica, a expressão do gene *amyE* mostra-se sujeita ainda a um quarto tipo de regulação. Sendo uma proteína extracelular, ela é codificada inicialmente como um precursor proteico, portador de uma sequência líder ou peptídeo sinal, o qual deve ser reconhecido e clivado pelas enzimas responsáveis pelo transporte transmembrana dessa exoproteína.

VAN DIJL e colaboradores (1988) estudaram o papel da enzima peptidase sinal I (SPase I), uma das responsáveis pela clivagem do peptídeo sinal da proteína madura durante ou logo após seu transporte através da membrana citoplasmática de *E. coli*, no controle da síntese e processamento da alfa-amilase de *B. licheniformis* em *E. coli*. Esses autores demonstraram que, em mutantes *lep* (SPase I⁻) de *E. coli*

portadores do gene da alfa-amilase de *B. licheniformis*, não era possível a detecção da forma precursora da enzima alfa-amilase. Esse fato, aliado ao da redução drástica da síntese da alfa-amilase (proteína madura) resultante da limitação de SPase I, levou os autores a sugerir a existência de um acoplamento tão estreito entre a síntese e o processamento da alfa-amilase, ao ponto deste último evento ser um pré-requisito para o primeiro. Esses mesmos autores sugerem ainda que, para efeito desse controle, a SPase I interagiria de alguma forma com o precursor nascente da alfa-amilase de forma a permitir o prosseguimento de sua transcrição ou tradução.

Vários autores mostraram ainda que a estabilidade de mRNAs específicos é um mecanismo importante no controle traducional de enzimas extracelulares em diferentes espécies de bactérias. Em muitas espécies de *Bacillus* foi demonstrada uma alta resistência da síntese da alfa-amilase à inibidores de transcrição (GLENN, 1976; PRIEST, 1977; INGLE & ERICKSON, 1978; KINOSHITA, 1980). Em 1989, TONOKOVA e colaboradores demonstraram que, em *Bacillus licheniformis*, esta resistência é devida à alta estabilidade do mRNA desta enzima, e não pela presença de um possível reservatório ("pool") deste mRNA nas células, como se chegara a cogitar anteriormente. Neste mesmo trabalho, a meia-vida média calculada para o mRNA da alfa-amilase variava entre 7,5 a 8,4 minutos, enquanto a meia-vida média dos demais mRNAs celulares variava entre 2,6 e 3,8 minutos.

2.6 O LOCUS ESTABILIZADOR *parB*

Em 1985, GERDS e colaboradores identificaram dois *loci* gênicos aos quais foi atribuída a alta estabilidade observada para o plasmídio R1, fator de resistência múltipla de *E. coli*, cuja taxa de perda calculada foi tão baixa quanto a taxa de mutação gênica (10^{-7} por célula por geração). Um desses *loci* foi designado *parB* ("partitioning"), o qual mostrou-se posteriormente conter 580 pb e codificar os genes *hok* ("host killing") e *sok* ("suppression of killing") (GERDS e cols., 1988).

Este sistema estabilizador foi testado numa grande variedade de hospedeiros, tendo sido para tanto, inserido em diversos plasmídios de tamanho, número de cópias e grupos de incompatibilidade diversos. Os resultados obtidos com a subclonagem do locus *parB* no plasmídio promíscuo RSF1010, e posterior introdução do mesmo em *Pseudomonas putida*, mostraram que os derivados RSF1010 *parB*⁺ apresentam uma estabilidade 30.000 vezes superior nesta hospedeira, quando comparados ao plasmídio RSF1010 original (GERDS, 1988).

O mecanismo molecular dessa estabilização plasmidial promovida pelo locus *parB*, chamado de "morte pós-segregacional", está intimamente relacionado à organização gênica intrínseca do locus, bem como às características particulares de seus produtos finais.

O gene *hok* codifica um peptídeo hidrofílico de 52 aminoácidos, cuja superexpressão induzida resulta no colapso do potencial de membrana, parada da respiração e morte celular. Métodos de fracionamento de extratos celulares mostraram que a maior parte da proteína Hok fica localizada na membrana celular (RASMUSSEN e cols., 1987).

O gene *sok* fica localizado imediatamente numa posição 5' ("upstream") em relação a *hok* e contém dentro de seus 100 pares de bases uma pequena região de superposição com a sequência codificadora de *hok* que inclui a sequência de Shine e Dalgarno (sítio de reconhecimento de ribossomos). *Sok* é transcrito no sentido oposto ao de *hok* e codifica um pequeno RNA antisense (*sok*-RNA) que, por pareamento entre suas regiões de homologia, inibe a tradução do *hok*-RNA. Diferenças na estabilidade dos dois mRNAs terminam por explicar o mecanismo de morte pós-segregacional dirigido por *parB*: o *hok*-mRNA mostra-se extremamente estável, com uma meia-vida de 20 minutos ou mais, característica esta conferida por estruturas contidas em seu terminal 3' que quando retiradas da molécula nativa tornam-na instável e inativam o mecanismo de morte pós-segregacional. O *sok*-RNA, por sua vez, é muitas vezes menos estável que o *hok*-mRNA (GERDS, 1988).

Assim, o mecanismo de morte pós-segregacional se explicaria pelo decaimento diferencial dos RNAs de *sok* e *hok*. Numa célula portadora de um plasmídio contendo o locus *parB*, o *sok*-RNA inibe a

síntese da proteína Hok e a célula permanece viável. Nas células geradas por segregação onde o plasmídio seja porventura perdido, a não produção do *sok*-RNA, aliada ao rápido decaimento de suas moléculas instáveis pré-existentes, libera a expressão do *hok*-RNA, que sendo bem mais estável que seu regulador "antisense" permanece no citoplasma da célula por um tempo mais longo. A transcrição do *hok*-RNA leva, por sua vez, à produção da proteína Hok que acaba por causar a morte da célula segregante (GERDS, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS UTILIZADAS

3.1.1 REF Cm^r:

Xanthomonas campestris pv *campestris*. Mutante induzido por luz ultra-violeta (LANZA e ROSATO, 1986), resistente ao cloranfenicol, derivado da linhagem original proveniente da Northern Regional Research Lab. (NRRL-B1459) Peoria IL, E.U. A., que é a linhagem tradicionalmente usada para estudos envolvendo produção de goma xantana.

3.1.2 280 NaI^r:

Xanthomonas campestris pv *manihotis*. Mutante espontâneo (STRIECKE, 1988), resistente ao ácido nalidíxico, derivado da linhagem nº 280 obtida do Instituto Biológico de Campinas através do Sr. Júlio Rodrigues Neto. Linhagem selecionada por CANHOS e SCAMPARINI (UNICAMP, FEA - resultados não publicados) por suas características como boa produtora de goma xantana. Analisada quanto à presença de plasmídios, apresentou três bandas correspondentes a plasmídios crípticos (STRIECKE E ROSATO, 1988).

3.1.3 HB101:

Escherichia coli (F⁻, *hsdS20* (r⁻_B, m⁻_B), *RecA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (Sm^r), *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, *lambda*⁻). Utilizada como receptora nos experimentos de transformação e para manutenção e amplificação dos plasmídios utilizados no presente trabalho (BOYER & ROULAND-DUSSOIX, 1969).

3.1.4 N2:

Linhagem 280 Nal^r de *X. campestris* portadora do plasmídio PAP2 (este trabalho).

3.1.5 N2X:

Linhagem 280 Nal^r de *X. campestris* portadora do plasmídio PAP2X (este trabalho).

3.1.6 N23X:

Linhagem 280 Nal^r de *X. campestris* portadora do plasmídio PAP23X (este trabalho).

3.1.7 C2:

Linhagem REF Cm^r de *X. campestris* portadora do plasmídio pAP2 (este trabalho).

3.1.8 C2X:

Linhagem REF Cm^r de *X. campestris* portadora do plasmídio pAP2X (este trabalho).

3.1.9 C23:

Linhagem REF Cm^r de *X. campestris* portadora do plasmídio pAP23 (este trabalho).

3.1.10 C23X:

Linhagem REF Cm^r de *X. campestris* portadora do plasmídio pAP23X (este trabalho).

3.2 PLASMÍDIOS UTILIZADOS

Os plasmídios utilizados e construídos durante este trabalho estão relacionados na tabela 1.

PLASMÍDIO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDÊNCIA
pMFY-40	Amp ^r , Tet ^r . Inc-0, replicon RSF 1010.	FUKUDA & YANO, 1985
pASA-25	Amp ^r , <i>amy</i> , replicon Col E1.	VALÊNCIA, comunicação pessoal.
pAP2	pMFY-40 + <i>amy</i> .	este trabalho
pKK232-8	Amp ^r , Cm ^r quando ligado a um promotor.	BROSIUS, 1984
pAX1	pKK232-8 com promotor de <i>X. campestris</i>	este trabalho
pKG1022	Amp ^r , Km ^r , portador do locus <i>parB</i> .	GERDS, 1988.
pAP23	pAP2 + <i>parB</i> .	este trabalho
pAP2X	pAP2 + promotor de <i>X. campestris</i>	este trabalho
pAP23X	pAP23 + promotor de <i>X. campestris</i>	este trabalho
pRK2013	Km ^r , <i>tra</i> , <i>mob</i> . Utilizado como plasmídeo mobilizador ("helper") nas conjugações.	FIGURSKI & HELINSKI, 1979.

Tabela 1: Características e procedência dos plasmídios utilizados

3.3 MEIOS DE CULTURA

3.3.1 Meio completo YM

Extrato de malte		0,3 %
Extrato de leveduras		0,3 %
Peptona		0,3 %
Sacarose		1,0 %
pH 7,2 ajustado com NaOH ou HCl		

3.3.2 Meio Complexo L

Peptona		1,0 %
Extrato de leveduras		0,5 %
NaCl		0,5 %
pH 7,2 ajustado com NaOH ou HCl		

3.3.3 Meio Complexo L-AMI

Idêntico ao meio L, contendo ainda amido solúvel na concentração de 4% no caso de meios sólidos, e de 0,4% para os meios líquidos.

3.3.4 Solução Basal I

Peptona		1,0 %
KH ₂ PO ₄		0,5 %
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,02 %
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,2 %
Ác. cítrico		0,2 %
H ₃ BO ₃		0,0006 %
ZNO		0,0006 %
FeCl ₃ .6H ₂ O		0,00024 %
CaCO ₃		0,002 %
pH 7,0 ajustado com NaOH ou HCl.		

Para a obtenção dos meios sólidos, foi acrescentado 1,5% de ágar bacteriológico aos meios líquidos acima descritos.

Os meios foram esterilizados por autoclavagem a 120°C/ 1 atm por 20 minutos.

Na preparação das placas de meio sólido contendo antibióticos estes foram adicionados às mesmas, nas concentrações adequadas, onde posteriormente o meio, liquefeito e resfriado à uma temperatura de aproximadamente 55°C, foi vertido e homogeneizado.

Os antibióticos foram utilizados, em meio sólido, nas seguintes concentrações: ampicilina 100 ug/ml, tetraciclina 10 ug/ml, canamicina 25 ug/ml, cloranfenicol 50 ug/ml e ácido nalidíxico 25 ug/ml. Quando utilizados na preparação dos meios líquidos os antibióticos tinham suas concentrações reduzidas à metade.

3.4 REAGENTES E SOLUÇÕES

3.4.1 Soluções utilizadas nas extrações de DNA:

TEN

Tris-HCl		50,0 mM	(pH 8,0)
EDTA		0,1 M	
NaCl		0,1 M	

Solução I

Tris-HCl		25,0 mM	(pH 8,0)
EDTA		10,0 mM	
Glicose		50,0 mM	

Solução II

NaOH		0,2 M	
SDS		1,0 %	

Solução III

Acetato de potássio 5,0 M (pH 5,2)

STE

Tris-HCl 10,0 mM (pH 7,8)

NaCl 0,1 M

EDTA 1,0 mM

Solução de RNase A

RNase A 10 mg/ml

Dissolvida em acetato de sódio 50 mM pH 4,8 e fervida em banho-maria por 15 minutos.

Solução de proteinase K

proteinase K 10,0 mg/ml

Dissolvida em H₂O, aliquotada e mantida à -20°C.

Clorofane

Fenol:clorofórmio 10/10

8-hidroxiquinolina 0,05 %

Solução saturada com:

Tris-HCl 20,0 mM (pH 8,0)

NaCl 100,0 mM

EDTA 1,0 mM

Clorofórmio

Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v)

Solução saturada com:

Tris-HCl 10 mM

3.4.2 Soluções para eletroforese:**TEB**

Trizma-Base 89,0 mM (pH 8,5)

EDTA 2,5 mM

Ác. Bórico 89,0 mM

Tampão de Amostra (TA 5X)

Sacarose 25,0 %

Acetato de sódio 5,0 mM

Azul de Bromofenol 0,05 %

3.4.3 Solução para transformação de Bactérias (SB1):

KCl 100,0 mM

CaCl₂ 50,0 mM

K-MES 0,5 M (pH 6,5)

Filtrada em membrana Millipore (0,22u)

3.4.4 Soluções para isolamento de fragmentos de DNA:

Tampão de Eluição

Tris-HCl		20,0 mM	(pH 8,0)
EDTA		2,0 mM	
NaCl		1,5 mM	

Tampão de Recuperação

Tris-HCl		0,1 M	(pH 7,5)
EDTA		5,0 mM	
NaCl		0,5 M	

3.4.5 Soluções para marcação do DNA com alfa-³²P:

Solução O

Tris-HCl		1,25 M	(pH 8,0)
MgCl ₂		125,0 mM	

Solução B

HEPES		2,0 M	(pH 6,6)
-------	-------	-------	----------

Soluções de dNTPs

dNTPs		100,0 mM	(pH 7,0)
-------	-------	----------	----------

Dissolvidos em H₂O; pH acertado com Trizma-Base 50,0 mM
utilizando-se papel indicador.

Solução C

Hexadeoxirribonucleotídeos 90,0 U/ml

Dissolvidos em:

Tris-HCl 3,0 mM (pH 7,4)

EDTA 0,2 mM

Solução A

solução D 1,0 ml

B-mercaptoetanol 18,0 ul

solução de dTTP 10,0 ul

solução de dGTP 10,0 ul

solução de dCTP 10,0 ul

Solução OLB

Soluções A, B e C nas proporções de 100:250:150, respectivamente.

3.4.6 Soluções para "Southern Blotting":**Solução de Depuração**

HCl 0,25 M

Solução de Denaturação

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

Solução de Neutralização

Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0)

NaCl 1,5 M

SSC (20X)

NaCl 3,0 M

Citrato de Sódio 0,3 M (pH 7,0)

Solução de Pré-Hibridização

Formamida deionizada 50,00 %

SSC 6X

Leite em pó desnatado (Molico) 0,25 %

SDS 0,20 %

Aquecer a 60°C antes de adicionar a formamida e filtrar em papel 3 MM. Preparar logo antes de usar.

Solução de Lavagem I

SSC 0,1X

SDS 0,1 %

3.4.7 Soluções para "Low melting":**Tampão de Eluição**

Tris- HCl 100,0 mM (pH 7,5)

EDTA 5,0 mM

NaCl 0,5 M

3.4.8 Tampões de Enzimas (10X):

Tampão 2

Tris-HCl		0,5 M	(pH 8,0)
MgCl ₂		0,1 M	
NaCl		0,5 M	

Tampão 3

Tris-HCl		0,5 M	(pH 8,0)
MgCl ₂		0,1 M	
NaCl		1,0 M	

Tampão 4

Tris-HCl		0,2 M	(pH 7,4)
MgCl ₂		50,0 mM	
KCl		0,5 M	

Tampão T4 DNA Ligase

Tris-HCl		0,5 M	(pH 7,4)
MgCl ₂		0,1 M	
DTT		0,1 M	
espermidina		0,1 M	
ATP		10,0 mM	

Tampão Fosfatase Alcalina Bacteriana (BAP)

Tris-HCl 0,5 M (pH 8,0)

3.4.9 Soluções para Avaliação da Atividade de Alfa-Amilase:

Solução de Iodo

Iodato de Potássio 0,36 %

Iodeto de Potássio 4,50 %

Solução de DNS (ácido dinitrosalicílico)

3,5 DNS 1,0 g

Dissolvido em 20 ml de NaOH 2N. Acrescentou-se 50 ml de água à temperatura ambiente, e:

tartarato de Na e K 30,0 g

H₂O qsp 100,0 ml

O reagente foi guardado em frasco escuro.

Solução de Dosagem

NaOH 0,100 N

Ac. Acético 0,100 N

amido solúvel 0,025 % (pH 5,5)

A solução foi fervida por 1 minuto, para hidrólise do amido, antes de ser utilizada.

Solução de Revelação

Iodina		0,01 %
KI		0,10 %
HCl		1,00 N

Solução de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250		0,01 %
Etanol		4,70 %
Ac. Fosfórico		8,50 %

O Coomassie Blue foi dissolvido em 50 ml de etanol 95 % e a essa solução foram adicionados 100 ml de ácido fosfórico 85 %. A solução resultante foi diluída para o volume final de 1 litro.

Os valores de concentração dados em porcentagem (%) correspondem a medidas de peso por volume (p/v), a não ser quando especificado.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas em água MilliQ e esterilizadas por autoclavagem a 120°C/1atm por 20 minutos, a não ser nos casos em que a esterelização por filtração foi mencionada.

A água utilizada em todos os experimentos foi sempre água MilliQ esterilizada por autoclavagem.

As enzimas utilizadas foram provenientes da Bethesda Research Laboratories, da Amersham International e da Pharmacia. A RNase A e a agarose foram adquiridas da Sigma Chemical Company.

3.5 CURVA DE CRESCIMENTO:

Foram crescidas três linhagens diferentes de *X. campestris* para construção da curva de crescimento: REF, REF Cm^r e 280 NaI^r. A primeira foi crescida em meio L enquanto o crescimento das duas últimas foi feito em meio L acrescido de seus respectivos antibióticos. A temperatura de crescimento foi sempre de 30°C e as culturas foram constantemente agitadas.

A partir de um pré-inóculo de 5 ml de meio, crescido 24 horas, foi feito um inóculo a 1 % em 100 ml de meio contidos em erlenmeyers de 500 ml. Essa cultura foi crescida por 34 horas consecutivas, nas condições acima descritas, e durante este tempo foram retiradas alíquotas de 2 ml, em intervalos de 1 hora, que foram diluídas para leitura de sua densidade ótica em um comprimento de onda de 550 nm (D.O.550), contra um branco contendo o mesmo meio utilizado para cultivo em ausência de crescimento bacteriano.

3.6 CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA:

O procedimento geral para a construção dos plasmídios descritos neste trabalho foi o seguinte:

- a. Extração e purificação dos plasmídios de interesse.
- b. Digestão do plasmídio receptor do fragmento a ser clonado com a(s) enzima(s) apropriada(s).
- c. Extração da(s) enzima(s).
- d. Tratamento do plasmídio digerido com fosfatase alcalina (BAP) a fim de evitar sua recircularização na ausência do inserto.
- e. Extração da BAP (como descrito para as enzimas de restrição, sendo que a ressuspensão final do material é feita neste caso em TE).
- f. Digestão do plasmídio portador do fragmento desejado com a(s) enzima(s) apropriada(s).
- g. Isolamento e purificação do fragmento a ser subclonado a partir de géis de agarose de baixo ponto de fusão.
- i. Ligação do inserto isolado do gel ao plasmídio-vetor linearizado e defosforilado.
- j. Transformação de *E. coli* HB101 e seleção dos clones recombinantes de acordo com as marcas de resistência e demais genes contidos no plasmídio construído.
- l. Análise do padrão de restrição dos plasmídios extraídos dos clones recombinantes.

3.7 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE *X. campestris*:

A estratégia utilizada para clonagem dos promotores foi a seguinte:

- a. Extração e purificação do plasmídeo utilizado como "promoter-probe" (pKK232-8).
- b. Extração do DNA genômico total de *X. campestris*.
- c. Purificação do DNA total de *X. campestris* em gradiente de cloreto de cézio.
- d. Digestão do plasmídeo pKK232-8 com a enzima RamH I.
- e. Extração da enzima.
- f. Tratamento do pKK232-8 linearizado com fosfatase alcalina (BAP) a fim de evitar sua recircularização na ausência de inserto.
- g. Extração da BAP como descrito para as enzimas de restrição. Ressuspensão do material em 10 μ l de TE.
- i. Cinética para determinação do tempo de digestão do DNA genômico com a enzima Sau 3AI necessário para gerar fragmentos entre 0,5 e 1 Kb.
- j. Digestão do DNA genômico com a enzima Sau 3AI pelo tempo determinado na cinética.
- k. Extração da enzima.
- l. Ligação dos fragmentos de DNA genômico gerados pela digestão com Sau 3AI ao pKK232-8 linearizado com RamH I e defosforilado.

- m. Transformação de *E. coli* HB 101 por CaCl_2 com os plasmídios construídos e seleção para resistência ao cloranfenicol.
- n. Confirmação da marca de resistência à ampicilina nos clones recombinantes, através de transferência dos mesmos, por palitagem, para placas contendo este antibiótico.
- o. Confirmação dos insertos dos plasmídios recombinantes, construídos e introduzidos em *E. coli*, em géis de agarose, através da extração dos mesmos por minipreparação e digestão com as enzimas apropriadas.
- p. Escolha de um dos clones contendo o promotor clonado de *X. campestris* para dar continuidade ao trabalho de caracterização.

3.8 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE *X. campestris*:

(MARMUR, 1961 - modificado)

1. Foi feito um pré-inóculo em 20 ml de meio L a partir de uma placa contendo a linhagem de *X. campestris*. Este pré-inóculo foi crescido por 24 horas a 30°C sob constante agitação.
2. Inoculou-se 1 litro de meio L com os 20 ml do pré-inóculo e esta nova cultura foi mantida nas condições de crescimento acima descritas por 24 horas.
3. A cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

4. As células foram lavadas 1 vez em TEN e ressuspensas em 5 ml dessa mesma solução.
5. Adicionou-se à suspensão celular 5 ml de TEN contendo 8 mg/ml de lisozima. As células foram gentilmente homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 45 minutos.
6. Adicionou-se 1,5 ml de uma solução de sarcosil a 10 % e ainda 100 μ l da solução de proteinase K.
7. Adicionou-se 1 volume de clorofane, agitou-se cuidadosamente a solução e centrifugou-se por 10 minutos a 2.000 rpm.
8. A fase fenólica foi retirada e à fase aquosa foram adicionados 3 ml de TEN além de sarcosil para uma concentração final de 2 %.
9. Adicionou-se igual volume de clorofane e repetiu-se a extração como descrita no passo 7.
10. A fase aquosa foi cuidadosamente retirada com uma pipeta de boca larga, e transferida para um tubo de vidro previamente resfriado à 0°C.
11. Adicionou-se NaCl para uma concentração final de 0,3M e ainda 2,5 volumes de etanol gelado.
12. Com o auxílio de um bastão de vidro, agitado lentamente dentro do tubo em movimentos de rotação e translação, todo o DNA foi coletado.
13. O bastão contendo o DNA enrolado foi deixado ao ar livre, para secagem do material, por cerca de 30 minutos.
14. O DNA do bastão foi ressuspensado em 2 ml de TE.
15. Adicionou-se 50 μ g/ml de RNase A e incubou-se por 20 minutos.

16. A concentração de NaCl foi acertada para 0,3 M e adicionou-se 2,5 volumes de etanol gelado.
17. Repetiu-se o procedimento do passo 12.
18. O DNA do bastão foi embebido em uma solução de etanol 70 %.
19. O Material do bastão foi finalmente seco e ressuspendido em 4 ml de TE.

3.9 PURIFICAÇÃO DO DNA POR GRADIENTE DE CsCl:

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. O DNA foi colocado em um tubo cônico graduado e o volume acertado para 4 ml com TE
2. Para cada ml da solução contendo DNA foi adicionado 1g de CsCl e a solução foi homogeneizada por inversão.
3. Foram adicionados 0,8 ml de uma solução contendo 10 mg/ml de Brometo de Etídio para cada 10 ml da solução descrita no item 2.
4. O índice de refração desta solução foi acertado para 1,3860 (para uma temperatura de aproximadamente 25°C) com o auxílio de um refratômetro.
5. Essa solução foi transferida para tubos de centrifuga Beckman de polialômero de 13 x 51 mm, e centrifugada a 60.000 rpm em rotor VTI 80, por 20 horas à 20°C.
6. O DNA, observado sob UV longo, foi coletado através de uma seringa inserida no tubo na altura da banda formada, e transferido para tubos eppendorfs.

7. Foi adicionado igual volume de 1-Butanol saturado com água. A solução foi homogeneizada e centrifugada por 1 minuto em microcentrífuga para separação das fases.
8. A fase do butanol foi retirada e essa extração foi repetida até que todo o Brometo de Etídio fosse extraído do DNA (até que a fase do butanol não mais se tornasse rosada após a homogeneização).
9. A fase aquosa foi dializada por 24 horas contra TE.

3.10 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIOS EM GRANDE ESCALA:

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. Foi crescido um pré-inóculo em 5 ml de meio L líquido, acrescido dos antibióticos necessários, por aproximadamente 12 horas a uma temperatura de 37°C (30°C no caso de *Xanthomonas*) e agitação constante.
2. A totalidade deste pré-inóculo foi utilizada para inocular 500 ml de meio L, também acrescido dos antibióticos, e essa nova cultura foi crescida por aproximadamente 22 horas nas condições acima descritas.
3. As bactérias foram então coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C.
4. O precipitado celular foi lavado com 200 ml de solução STE gelada e mantido sempre no gelo.
5. Após repetição do passo 3, as bactérias foram ressuspensas em 5 ml de Solução I gelada e transferidas para 2 tubos de centrífuga de

30 ml.

6. A cada tubo contendo 2,5 ml de suspensão bacteriana foram adicionados 2,5 ml de Solução I contendo 10 mg/ml de lisozima. Os tubos foram invertidos para homogeneização e mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos.
7. A cada tubo foram adicionados então 10 ml de Solução II recentemente preparada e o conteúdo foi homogeneizado lentamente por inversões. Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos.
8. Adicionava-se a cada tubo 7,5 ml de Solução III gelada e misturava-se por inversão.
9. Esse material foi centrifugado a 12.000 rpm por 45 minutos em rotor Beckmann JA-20 à 4°C.
10. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno e a ele foram adicionados 20 ug/ml de RNase A. Incubou-se por 1 hora a 37°C.
11. Procedeu-se então a 2 extrações com 10 ml de clorofane e uma com 10 ml de clorofórmio, durante as quais o material foi centrifugado a 7.000 rpm por 10 minutos para separação das fases e retirada da camada superior aquosa.
12. A fase aquosa resultante da última extração com clorofórmio foi transferida para tubos corex e a ela foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol. Esse material foi homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos.
13. Os plasmídios foram então coletados por centrifugação a 7.000 rpm por 45 minutos à temperatura ambiente.

14. O sedimento foi lavado com 10 ml de etanol 70 % (v/v), novamente centrifugado como descrito no passo 13 e secado em dessecador à vácuo.
15. Os plasmídios assim obtidos foram ressuspensos em 1 ml de TE e sua concentração estimada por leitura espectrofotométrica.

3.11 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE DNA:

(BERGER & KIMMEL, 1987)

Uma alíquota da solução de DNA foi diluída aproximadamente 20 vezes e sua densidade ótica medida em comprimentos de onda de 260 e de 280 nm, utilizando-se o canal de ultra-violeta do espectrofotômetro e cubetas de quartzo de 1 cm de passo ótico.

A concentração de DNA foi calculada através da leitura obtida em 260 nm, sabendo-se que 1 unidade de absorbância neste comprimento de onda corresponde a 50 ug/ml de DNA de dupla fita ou 40 ug/ml de DNA de fita simples.

O grau de contaminação do material foi estimado através da razão entre as leituras obtidas em 260 e 280 nm, cujos valores foram considerados satisfatórios quando variavam entre 1,8 e 1,9, indicando graus de pureza satisfatórios para as soluções de DNA. A presença de contaminantes típicos como proteínas e fenol fazem diminuir os valores obtidos para a razão entre as leituras a 260 e 280 nm.

Algumas vezes a concentração de DNA foi estimada apenas através da comparação, após eletroforese, entre a intensidade de fluorescência da banda formada pelo plasmídio em questão e a da banda de um plasmídio padrão, cuja concentração era conhecida, ambos linearizados. Diluições diferentes deste plasmídio padrão foram aplicadas, juntamente com uma amostra do plasmídio que se desejava quantificar, a géis de agarose 0,8% na presença de 0,5 ug/ml de brometo de etídio. A concentração do material foi avaliada observando-se as bandas sob luz ultra-violeta.

3.12 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDIOS:

(BIRNBOIM & DOLY, 1979 - modificado)

1. As bactérias portadoras dos plasmídios foram crescidas em 5 ml de meio L na presença dos antibióticos apropriados por aproximadamente 18 horas à 37°C (30°C no caso de *Xanthomonas*) sob constante agitação.
2. Cerca de 3 ml da cultura acima foram transferidos para eppendorfs e centrifugados a 12.000 g por 3 minutos.
3. O precipitado bacteriano foi ressuscitado em 100 ul de Solução I contendo 10 mg/ml de lisozima e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente.
4. Foram adicionados 200 ul de Solução II e os tubos agitados cuidadosamente por inversão. Os tubos foram mantidos no gelo por

5 minutos.

5. Foram adicionados 200 μ l de Solução III, a homogeneização foi repetida como no item 4 e os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos.
6. O material foi centrifugado por 5 minutos em microcentrífuga a 4°C e o sobrenadante resultante foi transferido para tubos limpos.
7. A precipitação dos plasmídeos foi feita adicionando-se a este sobrenadante 0,5 ml de isopropanol e incubando-se à temperatura ambiente por 20 minutos após homogeneização.
8. Os plasmídios foram coletados por centrifugação a 12.000 g por 30 minutos/4°C.
9. O precipitado foi lavado com etanol 70 % (v/v) sem ressuspender, novamente centrifugado como descrito no passo 8, e secado em estufa a 37°C por 30 minutos.
10. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 50 μ l de TE ao qual adicionou-se 1 μ l de solução de RNase A, e incubados por 30 minutos à 37°C.
11. O volume da solução foi elevado a 150 μ l com água esterilizada e procedeu-se a duas extrações com 150 μ l de clorofane e uma extração com 150 μ l de clorofórmio, durante as quais o material, após homogeneização, foi centrifugado por 1 minuto em microcentrífuga à temperatura ambiente, para formação das fases.
12. A fase aquosa obtida após a última extração com clorofórmio foi transferida para um novo eppendorf e a ela foi adicionado igual volume de uma solução 7,5 M de acetato de amônia e ainda 2,5 volumes de etanol. Esse material foi precipitado por

aproximadamente 18 horas à -20°C ou por 3 horas à -70°C .

13. Repetia-se então os procedimentos dos passos 8 e 9, após o que o material obtido foi ressuspendido em TE.

3.13 DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO:

As digestões com enzimas de restrição foram realizadas em sistemas de 10 a 20 μl contendo:

- (a) O tampão da enzima em questão (T2 para Hind III e Eco I T3 para EamH I, EcoR I e T4 para Sau 3AI), adicionado a partir de soluções estoque 10 vezes concentradas e diluído de acordo com as condições do ensaio.
- (b) 5 a 10 unidades de enzima para cada micrograma de DNA contido no sistema (o volume de enzima adicionado nunca excedia 10% do volume total do sistema, a fim de garantir a diluição adequada do glicerol presente no tampão de estocagem da mesma).
- (c) O DNA a ser digerido, cuja quantidade variava de acordo com a finalidade da digestão.
- (d) Água esterilizada o suficiente para completar o volume do sistema.

No caso de digestões duplas ou triplas, procedeu-se em primeiro lugar à digestão com a enzima cujo tampão contivesse menor

concentração de sal (NaCl), em seguida acertou-se o sal para a concentração necessária ao funcionamento da segunda enzima, completava-se o volume do sistema adicionando-se água e o tampão desta segunda enzima, quando necessário, e procedeu-se à segunda digestão, e assim sucessivamente. Quando ambas as enzimas requeriam o mesmo tampão de reação, as digestões foram realizadas simultaneamente, observando-se sempre as regras descritas no item c acima.

As quantidades de DNA a ser digerido variavam da seguinte forma:

- (a) Cerca de 2 ug de DNA quando a finalidade da digestão foi a simples análise do padrão de restrição feita a partir de minipreparações de plasmídios.
- (b) Cerca de 10 ug quando se pretendia a utilização dos plasmídios abertos como receptores de fragmentos de DNA exógenos para clonagem.
- (c) De 15 a 50 ug de DNA quando se pretendia recuperar, a partir de géis de agarose de baixo ponto de fusão, os fragmentos gerados pela digestão. Neste caso, a quantidade de material digerido dependia da porcentagem de DNA que o fragmento desejado representava dentro do plasmídio original. Assim, um fragmento de 1,5 kb inserido em um plasmídio de 5,0 Kb (como no caso do fragmento AMI do pASA25) representa 30% do DNA plasmidial. Se desejava-se obter cerca de 6 ug de fragmento para posterior recuperação do gel, digeriu-se 20 ug de DNA plasmidial (pASA25).

(d) Cerca de 2 ug quando se pretendia recuperar de géis de agarose os fragmentos gerados pela digestão, utilizando-se para tanto papéis de DEAE, para posterior marcação e utilização como sondas para "Southern Blottings". Também aqui a quantidade de material digerido dependia da porcentagem de DNA que o fragmento a ser recuperado e marcado representava dentro do plasmídeo original. De um modo geral procurava-se obter cerca de 300 ng de inserto para a marcação.

As digestões processavam-se por 3 a 4 horas à 37°C e foram interrompidas, quando necessário, por extração da(s) enzima(s) com clorofane e clorofórmio. Para análise do padrão de restrição os sistemas de digestão foram aplicados diretamente em géis de agarose 0,8%, após a adição da quantidade apropriada de tampão de amostra 5X, sem a necessidade de se proceder à extração da(s) enzima(s).

3.14 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO:

Todo o material digerido para fins de clonagem foi submetido a extrações com clorofane e clorofórmio para inativação das endonucleases de restrição antes do tratamento com a fosfatase alcalina, e depois dele para extração da BAP antes da ligação. O procedimento para as extrações foi como se segue:

- (a) À solução de DNA foi adicionado igual volume de clorofane.
- (b) A emulsão foi centrifugada por 1 minuto em microcentrífuga à temperatura ambiente e a fase inferior (clorofane) retirada com o auxílio de uma micropipeta.
- (c) Repetia-se o passo *b*.
- (d) Adicionava-se igual volume de clorofórmio e procedia-se como em *b*, retirando-se ao final a fase aquosa (superior) e transferindo-a para um novo eppendorf.
- (e) Adicionava-se igual volume de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 100% gelado. Deixava-se o material precipitando por 18 horas à -20°C.
- (f) Coletava-se o DNA por centrifugação em microcentrífuga à 4°C por 30 minutos e descartava-se o sobrenadante.
- (g) Adicionava-se 500 ul de etanol 70% gelado, sem ressuspender o DNA, e repetia-se o passo *f*.
- (h) Descartava-se novamente o sobrenadante e o DNA precipitado foi secado em estufa à 37°C por cerca de 20 minutos.
- (i) Ressuspensava-se o material em água, caso ainda fosse ser tratado com fosfatase alcalina, ou em TE.

3.15 ANÁLISE DO DNA DIGERIDO EM GÉIS DE AGAROSE:

Essa análise foi feita em géis de agarose 0,8% dissolvida em TEB e contendo 0,5 ug/ml de brometo de etídio. Ao material digerido a ser analisado adicionava-se a quantidade apropriada de tampão de

amostra (1/5 do volume final da amostra a ser aplicada em gel) e aplicava-se este sistema aos poços do gel. A migração do material foi levada a cabo a uma voltagem nunca superior a 5V/cm de gel, por aproximadamente 3 horas.

Ao final da eletroforese a migração do DNA no gel foi analisada em transiluminador de luz ultra-violeta e o gel foi eventualmente fotografado.

3.16 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM PAPEL DE DEAE:

(DRETZEN e cols., 1981 - modificado)

1. O plasmídeo foi digerido por 6 horas com a enzima de restrição apropriada a fim de gerar o fragmento de interesse.
2. O sistema de digestão acima foi precipitado na presença de 1 volume de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 volumes de etanol 100% por 18 horas a -20°C , ressuspendido em 20 μl de TÊ e acrescido de 5 μl de tampão de amostra (TA) para subsequente aplicação em gel. Quando o volume final do sistema de digestão não excedia 30 μl este foi diretamente acrescido de TA para uma concentração final de 1X e aplicado em gel.
3. O gel para separação dos fragmentos foi sempre preparado a uma concentração de 0,8 % de agarose em TEB contendo 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio.

4. Após sua aplicação no gel, os plasmídios digeridos foram submetidos à eletroforese por aproximadamente 4 horas a 30 V.
5. Durante a migração do DNA, pequenos pedaços de papel DEAE (Whatman DE 81) foram cortados de modo a se obter tiras de papel maiores que a espessura do gel e mais largas que o tamanho da banda a ser eluída.
6. Essas tiras de papel DEAE foram embebidas em uma solução de NaCl 2,5 M por aproximadamente 2 horas.
7. Os papéis foram então lavados por 3 vezes em água esterilizada e embebidos por 5 minutos em TEB.
8. As bandas de DNA a serem eluídas foram localizadas por exposição do gel ao UV-longo. Foi feita então uma incisão no gel, com uma lâmina esterilizada, perpendicular às bandas e ao lado direito das mesmas, onde os fragmentos de papel foram inseridos, com o auxílio de uma pinça esterilizada, até tocarem o fundo da placa.
9. O gel foi então virado na cuba de eletroforese de modo a permitir que a continuação da corrida carresse a banda para o fragmento de papel nele inserido.
10. Prosseguiu-se a eletroforese enquanto a migração das bandas para dentro do papel foi monitorada com o auxílio de uma lâmpada de UV-longo.
11. Quando todo o DNA havia sido transferido para o papel, o mesmo foi cuidadosamente retirado do gel com o auxílio de uma pinça esterilizada.
12. Um pequeno chumaço de lã de vidro siliconizada e esterilizada foi colocado dentro (na ponta) de uma ponteira de P-1.000, a qual foi

introduzida e encaixada em um eppendorf através de um orifício feito em sua tampa. A esta ponteira foram adicionados 200 ul de água esterilizada, a montagem foi introduzida em um tubo de centrífuga e centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos (centrífuga de mesa).

13. Adicionou-se então 200 ul de tampão de eluição e repetiu-se a centrifugação. Descartou-se o eppendorf contendo o volume eluído da coluna.
14. A montagem foi transferida para outro eppendorf com a tampa vasada, os fragmentos de papel contendo o DNA inseridos na ponteira e adicionados 200 ul de tampão de eluição.
15. Incubou-se por 1 hora a 37°C. O sistema foi centrifugado por 5 minutos a 2.000 rpm.
16. Adicionou-se 200 ul de tampão de eluição e centrifugou-se o sistema como anteriormente.
17. Adicionou-se mais 100 ul de tampão de eluição e repetiu-se a centrifugação.
18. O volume coletado no eppendorf (500 ul) foi transferido para um tubo novo e a ele foi adicionado 1 ml de n-butanol saturado com água. O sistema foi homogeneizado e centrifugado por 30 segundos em microcentrífuga para separação das fases.
19. A fase superior foi retirada, adicionou-se 1 ml de butanol não saturado e repetiu-se a extração.
20. Adicionou-se à fase aquosa, resultante da última extração com butanol, 1 ml de etanol 100 % gelado e precipitou-se o material por 2 horas a -70°C ou a -20°C durante a noite.

21. Os fragmentos de DNA foram coletados por centrifugação a 12.000 g por 30 minutos a 4°C, lavados com etanol 70 % , novamente centrifugados e ressuspensos no tampão apropriado.

3.17 ISOLAMENTO DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO ("LOW MELTING")

(BERGER e KIMMEL, 1987 - modificado)

1. A agarose de baixo ponto de fusão ("low melting" - Sigma - tipo VII) foi dissolvida em tampão TEB, aquecida a 70°C e resfriada a 37°C para adição do brometo de etídio numa concentração de 0,5 µg/ml. O gel foi deixado solidificar em refrigerador (4°C).
2. As amostras de plasmídios, adequadamente digeridos, foram aplicadas ao gel e corridas a 20 V/4°C, por aproximadamente 4 horas.
3. As bandas foram visualizadas por exposição do gel à uma lâmpada de UV-longo, cortadas com o auxílio de um bisturi esterilizado e colocadas em eppendorfs contendo o mesmo volume (aproximadamente 500 µl) de tampão de recuperação.
4. Os eppendorfs foram aquecidos em banho-maria a 65°C até que toda a agarose fosse dissolvida.
5. Procedeu-se a 3 extrações com fenol saturado e 2 extrações com clorofórmio.
6. A fase aquosa resultante da última extração com clorofórmio foi incubada a 0°C por 30 minutos e centrifugada por 1 minuto a 12.000g para retirada do material particulado residual.

7. O sobrenadante foi transferido para novos eppendorfs e a ele foram adicionados 2 volumes de etanol 100% gelado. Procedeu-se a uma precipitação a -20°C por 18 horas.
8. Os fragmentos de DNA recuperados do gel foram coletados por centrifugação a 12.000 g por 30 minutos em microcentrífuga refrigerada (4°C).
9. Procedia-se a uma lavagem, sem ressuspender o material, com etanol 70% gelado e após nova centrifugação o material foi deixado secar a 37°C e ressuspendido em TE.

3.18 CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO MOLAR DE TERMINAÇÕES 5' e 3' LIVRES EM MOLÉCULAS LINEARIZADAS DE DNA:

Esse cálculo foi feito através da seguinte equação:

$$\text{moles de terminações livres} = \frac{2 \times 10^6}{M} \times N,$$

onde $M = \text{n}^{\circ} \text{ de pb} \times 660$ (já que $1 \text{ Kb} = 6,6 \times 10^5 \text{ UPM}$) e

$N = \text{n}^{\circ} \text{ de cortes gerados pela digestão com a endonuclease.}$

3.19 DEFOSFORILAÇÃO DOS VETORES LINEARIZADOS:

(BERGER & KIMMEL, 1987)

Os plasmídios linearizados após digestão com endonucleases e extração das mesmas com clorofane e clorofórmio foram tratados com

fosfatase alcalina bacteriana (BAP), em sistemas constituídos de:

10,0 ul de DNA

2,5 ul de tampão BAP 10 X

0,1 U de BAP para cada 10 pmol de
terminações de DNA a serem
defosforiladas

H₂O qsp para 25,0 ul.

Esse sistema foi incubado por 1 hora a 60°C e em seguida a BAP foi extraída da mesma forma descrita para a extração das endonucleases de restrição, e finalmente o material, ressuspendido em 10 ul de TE, estava pronto para a ligação.

3.20 LIGAÇÃO DAS MOLÉCULAS HÍBRIDAS DE DNA:

Os fragmentos de DNA foram ligados num sistema que consistia de:

100 ng de plasmídio linearizado

300 ng de inserto

1 ul de tampão ligase 10 X

40 U de T4 DNA ligase

H₂O qsp para 10 ul.

Esse sistema foi incubado durante a noite a 16°C e em seguida foi usado para transformar células de *E. coli* HB101.

3.21 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli*:

(MANDEL & HIGA, 1970 - modificado)

1. Uma placa contendo meio L foi inoculada por esgotamento de alça com células de *E. coli* HB101, e incubada a 37°C durante a noite.
2. No dia seguinte inoculava-se 5 ml de meio L com uma única colônia dessa placa, e crescia-se esse pré-inóculo durante a noite, a 37°C sob constante agitação.
3. No dia seguinte inoculava-se 30 ml de meio L (contidos em um frasco de 150 ml) com 800 µl do pré-inóculo. Essa cultura foi crescida nas condições acima descritas até atingir a D.O₅₅₀ de 0,4 ou por aproximadamente 2 horas.
4. A cultura foi então imediatamente resfriada em banho de gelo e centrifugada a 2.000 g por 15 minutos à 4°C.
5. O sobrenadante foi descartado e os tubos deixados invertidos sobre papel absorvente por alguns segundos.
6. O precipitado bacteriano foi gentilmente ressuspendido em 1 ml de SB1. Após a homogeneização foram adicionados mais 9 ml de SB1 à suspensão bacteriana, a qual foi então incubada em gelo por 1 hora.
7. A suspensão foi novamente centrifugada como descrito no item 4, gentilmente ressuspendida em 1 ml de SB1 e aliqotada em eppendorfs previamente resfriados (200 µl por tubo).
8. As células competentes assim preparadas foram testadas adicionando-se a um dos eppendorfs 200 ng de pBR322 ou pUC19 e incubando-se o material no gelo por 1 hora. Os demais sistemas

foram guardados em refrigerador até o dia seguinte.

9. As células foram então submetidas a um choque térmico de 90 segundos a 42°C e imediatamente devolvidas ao gelo.
10. Adicionava-se 200 µl de meio L às células e incubou-se por mais 1 hora a 37°C.
11. Semeou-se 25 e 50 µl desse sistema em placas contendo meio L acrescido de 100 µg/ml de ampicilina e incubou-se durante a noite em estufa a 37°C.
12. No dia seguinte contou-se o número de colônias transformantes obtidas e calculou-se a eficiência da transformação. Estando esta acima de 10^5 transformantes por micrograma de DNA, procedeu-se a transformação com o material ligado, como descrito a partir do item 8, utilizando-se nesta transformação até 1/5 do sistema de ligação.
13. As células transformadas foram finalmente plaqueadas em meio L-AMI contendo os antibióticos apropriados à seleção do plasmídeo nelas inserido, e os transformantes selecionados para análise também pela formação do halo de amilólise ao redor das colônias.

3.22 MARCAÇÃO DE DNA POR "PRIMERS" DE OLIGONUCLEOTÍDEOS RANDÔMICOS:

(FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983, 1984)

1. Os plasmídios foram digeridos com a endonuclease apropriada e os fragmentos eletroforéticamente separados, isolados e purificados em

gel de agarose de baixo ponto de fusão ou em papel de DEAE.

2. A mistura de marcação foi feita da seguinte maneira:

30,0 ul de DNA (aproximadamente 200 ng)

10,0 ul de DLB

2,0 ul de alfa- ^{32}P dATP (46 uCi)

7,5 ul de alfa- ^{32}P dCTP (38 uCi)

2,0 ul de BSA

1,0 ul de DNA polimerase - fragmento Klenow (5U)

3. Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37°C, após o que foi retirada uma alíquota de 1 ul, diluída 10 vezes em água e 2 ul dessa diluição foram colocados sobre papel DE 81 para leitura em cintilômetro.

4. Simultaneamente um segundo filtro de papel DE 81 foi preparado como o anterior, porém lavado antes da contagem em cintilador para eluir o material não incorporado. As lavagens foram feitas embebendo-se o filtro contendo o material radioativo em tampão fosfato 0,5 M por 4 vezes, em água por 2 vezes e finalmente em etanol por 2 vezes. O filtro foi então secado sob uma lâmpada e sua radioatividade contada em cintilômetro.

5. Quando a leitura do material incorporado alcançava valores satisfatórios (geralmente ao redor de 10^6 a 10^8 cpm/ug DNA), interrompeu-se a reação de marcação com a adição de 4 ul de EDTA 0,5 M (pH 8,0).

6. O material marcado teve seu volume acertado para 0,1 ml com STE e foi então aplicado no topo de uma coluna de Sephadex G-50 para retirada do fosfato não incorporado.

7. A coluna foi centrifugada a 2.000 g por 4 minutos (centrífuga de mesa) e os 100 ul de efluente contendo o material incorporado foram coletados em um eppendorf sem tampa colocado dentro de um tubo de centrífuga ao qual fora previamente adaptada a coluna.
8. Procedeu-se então a uma nova contagem do material em cintilômetro em filtros DE 81 lavados e não lavados, como descrito no passo 4.

3.23 MONTAGEM DA COLUNA DE SEPHADEX G-50:

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. Uma seringa descartável de 1 ml foi vedada com uma pequena quantidade de lã de vidro siliconizada e esterilizada. Esta seringa foi preenchida com Sephadex G-50 equilibrada em STE.
2. A seringa foi inserida em um tubo cônico de centrífuga e centrifugada a 2.000 g por 4 minutos em centrífuga de mesa. Durante a centrifugação a resina era empacotada e continuava-se a adicionar Sephadex até que 0,9 ml de resina fosse empacotado.
3. Adicionava-se 0,1 ml de STE e centrifugou-se como no passo 2.
4. Repetia-se a etapa 3, e a coluna foi considerada então pronta para receber a amostra de DNA a ser purificada.

3.24 TRANSFERÊNCIA DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE PARA MEMBRANAS DE NYLON ("SOUTHERN BLOTTING"):

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. O DNA a ser transferido foi digerido com a(s) endonuclease(s) de restrição apropriada(s), aplicado em gel de agarose 0,8 % contendo 0,5 ug/ml de brometo de etídio e a eletroforese realizada durante a noite a 20 V. Nas canaletas onde foram aplicadas as digestões dos controles pKK232-8 e pAX1 (15 ng de cada) adicionou-se também 10 ug de DNA de esperma de salmão sonicado. No caso do DNA cromossômico, foram aplicados 5 ug de material digerido no gel.
2. O gel foi então fotografado e suas bordas aparadas com uma lâmina esterilizada.
3. O gel foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de depurinação.
4. Após a depurinação o gel foi lavado em água esterilizada e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente em solução de denaturação, sob constante agitação. A solução de denaturação foi trocada por uma nova e a incubação prosseguiu por mais 30 minutos.
5. Após a remoção da solução de denaturação o gel foi lavado em água esterilizada e incubado por 1 hora à temperatura ambiente em solução de neutralização, sob constante agitação.
6. O gel foi removido da solução de neutralização e transferido para uma cuba sobre uma tira de papel 3 MM da mesma largura do gel, porém comprida o suficiente para alcançar os reservatórios da cuba contendo tampão de transferência (20 X SSC).

7. As laterais do gel foram cobertas com tiras de filme de raio X a fim de evitar o fluxo de tampão nas regiões em que a membrana não cobria o gel.
8. Membranas de nylon (Hybond N) foram cortadas do tamanho exato do gel, colocadas diretamente sobre o mesmo e as bolhas retiradas com o auxílio de um bastão.
9. Sobre a membrana foram colocadas 3 folhas de papel 3 MM, cortadas do mesmo tamanho do gel e umedecidas em 6 X SSC. As bolhas foram retiradas como anteriormente.
10. Uma camada de 4,5 cm de papel absorvente foi colocada sobre o papel 3 MM e o sistema todo foi comprimido por uma placa de vidro e um peso de 1 a 1,5 Kg.
11. Adicionava-se então 20 X SSC aos reservatórios de tampão da cuba e este sistema foi deixado para transferência por um período de 16 horas.
12. Completada a transferência o sistema foi cuidadosamente desmontado e a membrana retirada e lavada com 2 X SSC para remoção de possíveis resíduos de agarose que tivessem ficados aderidos.
13. As membranas foram embrulhadas em papel 3 MM e em seguida em papel alumínio, e incubadas em estufa à 80°C por 2 horas.

3.25 PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO:

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. O filtro foi colocado em um saco plástico onde posteriormente foi adicionada a solução de pré-hibridização (0,08 ml/cm).
2. O saco foi selado com ajuda de uma seladora elétrica doméstica. Para a retirada das bolhas de ar foi feito um pequeno corte em um dos cantos do saco e este foi cuidadosamente pressionado até a retirada total das bolhas. O saco foi novamente selado.
3. O filtro foi incubado por 18 horas a 42°C sob agitação leve e constante.

3.26 HIBRIDIZAÇÃO:

(MANIATIS e cols., 1982 - modificado)

1. Um dos cantos do saco contendo o filtro foi cortado e a solução de pré-hibridização drenada tanto quanto possível, tomando-se o cuidado para que a membrana não secasse completamente, o que concorreria para o aumento do "background".
2. Adicionou-se novamente solução de pré-hibridização (0,05 ml/cm²) e as bolhas foram retiradas.
3. As sondas de DNA foram denaturadas em banho-maria fervente por 5 minutos e colocadas rápida e diretamente no gelo.
4. A sonda foi então adicionada ao saco contendo o filtro em solução de pré-hibridização numa concentração nunca superior a 100 ng/ml.

5. O filtro foi hibridizado a 42°C durante a noite, sob agitação lenta porém constante.
6. Uma das extremidades do saco contendo o filtro foi cortada e a solução de hibridização descartada em local apropriado.
7. A membrana foi retirada e mergulhada em 200 ml de solução de lavagem I, onde permaneceu incubada por 1 hora a 60°C. O filtro foi submetido a duas lavagens deste tipo.
8. O filtro foi finalmente lavado em 2 X SSC à temperatura ambiente, secado também à temperatura ambiente e embrulhado em membrana Magipack.
9. Por fim, o filtro foi exposto à filmes de Raio X (Hyperfilm, Amersham) em cassetes munidos de intensificadores a -70°C durante a noite ou por um período de até 72 horas.

3.27 CONJUGAÇÃO:

1. As bactérias a serem conjugadas (doadoras e receptoras) foram estriadas em placas de meio YM contendo os antibióticos apropriados. Foram utilizadas, de uma maneira geral, como receptoras as linhagens REF Cm^r e 280 Nal^r. As placas foram incubadas por 2 dias a 28°C em estufa.
2. Inoculava-se uma única colônia obtida nas placas acima em 5 ml de meio L-AMI contendo os antibióticos apropriados, e crescia-se essa cultura por 24 horas à 28°C sob constante agitação. Inoculava-se da mesma forma as bactérias portadoras do plasmídio mobilizador

("helper"), que foi crescido a 37°C nas condições acima descritas.

3. Em um eppendorf esterilizado coletava-se por centrifugação (3 minutos em microcentrífuga) 3 ml de ambas as parceiras da conjugação e 1,5 ml das portadoras do plasmídio mobilizador. Utilizava-se 250 ul desses sobrenadantes para determinação do consumo de amido do meio.
4. O precipitado bacteriano foi cuidadosamente ressuscitado, com o auxílio de uma pipeta automática, em 1 ml de meio L, para lavagem dos antibióticos, e novamente centrifugado.
5. As bactérias foram então ressuscitadas no meio residual resultante do descarte do sobrenadante e toda essa suspensão bacteriana foi aplicada sobre uma membrana esterilizada de papel celofane previamente depositadas sobre uma placa contendo meio YM.
6. As placas contendo as membranas (1 por placa) foram incubadas por 24 horas a 28°C.
7. As membranas contendo as transconjugantes foram retiradas das placas com o auxílio de uma pinça esterilizada, depositadas em tubos contendo 3 ml de água esterilizada e as bactérias foram ressuscitadas nesta água.
8. Aliquotas de 25, 50 e 100 ul dessa suspensão celular foram espalhadas em placas contendo meio L-AMI e os antibióticos apropriados (referentes às marcas cromossômicas das receptoras e às marcas seletivas do plasmídio mobilizado).
9. As placas foram então incubadas por 3 a 4 dias em estufa à 28°C e as transconjugantes assim obtidas analisadas quanto à produção de alfa-amilase e presença do plasmídio recombinante mobilizado.

3.28 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS EM *X. campestris*:

1. As linhagens portadoras dos plasmídios construídos foram estriadas em placas de meio YM contendo os antibióticos referentes às marcas cromossômicas (Cm ou Nal) e plasmidiais (Tet para o pAP2 e Tet + Km para o pAP2-3). As placas foram incubadas por 3 a 4 dias em estufa a 28°C.
2. Uma única colônia de cada linhagem a ser testada foi inoculada em 5 ml de meio L acrescido unicamente do antibiótico correspondente à marca cromossômica da linhagem em questão. Esse pré-inóculo foi crescido por 24 horas à 28°C sob constante agitação.
3. Novos tubos contendo 5 ml do mesmo meio acima descrito foram então inoculados com 0,5 ml do pré-inóculo, e crescidos por 24 nas mesmas condições do pré-inóculo.
4. Em intervalos de 24 horas, por 4 dias consecutivos, essas linhagens foram repicadas como descrito no item 3, usando-se a cultura do dia anterior como pré-inóculo.
5. Paralelamente aos repiques, alíquotas foram retiradas de cada cultura crescida por 24 horas, diluídas de 10^{13} à 10^{16} vezes e semeadas em meio contendo apenas os antibióticos das marcas cromossômicas bem como em meio contendo, além destes, os antibióticos relativos à marca plasmidial. Essas sementeiras foram feitas em 3 diluições diferentes sendo cada uma delas em

triplicata.

6. As placas foram incubadas à 28°C em estufa por 3 a 4 dias, e o número de colônias crescidas em cada uma delas contado, em uma das diluições feitas.
7. Foi feita então a média aritmética do número de colônias existente em cada placa.
8. O número de colônias crescidas nas placas contendo somente o antibiótico referente ao marcador cromossômico das linhagens testadas foi considerado 100 %.
9. A partir disso, calculou-se a porcentagem de perda de plasmídios nas linhagens portadoras das diferentes construções plasmidiais, através do número de colônias crescidas nas placas contendo, além do antibiótico referente à marca cromossômica, aquele referente à marca plasmidial.

3.29 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE EM MEIO LÍQUIDO:

3.29.1 Análise do consumo de amido em meio de cultura

1. Os clones a serem testados foram inoculados em 5 ml de meio L-AMI, contendo os antibióticos apropriados, e crescidos por 24 horas sob constante agitação na temperatura ideal para seu crescimento (37°C para *E. coli* e 30°C para *X. campestris*).

2. Cerca de 1,5 ml dessa cultura foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente.
3. 250 ul do sobrenadante foram retirados e adicionados a um tubo de ensaio contendo 2 ml de água destilada e 250 ul de solução de Iodo 0,01 N.
4. A absorbância desta solução de reação foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm, contra um branco que consistia do mesmo sistema de reação acima, onde os 250 ul de suspensão bacteriana haviam sido substituídos por 250 ul de meio L.

3.29.2 Formação de açúcar redutor em meio de cultura

(CARAWAY, 1959)

1. A preparação das culturas para dosagem de açúcar redutor foi feita como descrito nos passos 1 e 2 do item anterior.
2. Em um tubo de ensaio contendo 0,5 ml do reativo de DNS adicionava-se 0,5 ml do sobrenadante do meio de cultura e homogeneizava-se a solução.
3. O tubo foi então incubado em banho-maria fervente por 5 minutos.

4. O volume da solução foi levado a 5 ml com adição de água e a densidade ótica lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm.
5. O teor de açúcar redutor foi estimado através de uma curva padrão de maltose.

3.29.3 Quantificação da atividade de alfa-amilase no sobrenadante de culturas (SMITH & ROE, 1949 - modificado)

Essa quantificação foi realizada em sobrenadantes de culturas bacterianas crescidas tanto na presença quanto na ausência de glicose, a fim de determinarmos se a síntese da alfa-amilase estava ou não sujeita à repressão catabólica.

Ainda para efeito desta quantificação, as linhagens portadoras dos plasmídios contendo o *locus* estabilizador *parB* (pAP23 e pAP23X) foram crescidas em meio contendo apenas o antibiótico relativo à sua marca cromossômica (Nal ou Cm), a fim de ser verificada a eficiência da estabilização promovida por *parB* no que diz respeito à produção final de alfa-amilase.

1. As bactérias foram crescidas em 5 ml de meio L, acrescido do(s) antibiótico(s) apropriado(s), por 18 horas à 30°C sob constante

agitação.

2. 2 ml desse pré-inóculo foram utilizados para inocular 20 ml de meio L, também acrescidos do(s) antibiótico(s) apropriado(s) e essas culturas foram mantidas nas condições acima descritas. Estes inóculos foram feitos em duplicata.
3. Após 2 horas de crescimento, a cada uma das duplicatas acima foi adicionada glicose para a concentração final de 2%. As culturas foram mantidas nas condições de crescimento já descritas pelo tempo necessário à tomada de pontos para a construção das curvas de atividade de alfa-amilase e proteína total.
4. A cada tempo pré-determinado, foram retiradas alíquotas de 1,5 ml de cada uma das culturas e esse material foi centrifugado em eppendorfs por 5 minutos em microcentrífuga.
5. Adicionavam-se então 0,2 ml do sobrenadante das culturas a tubos de ensaio contendo 1 ml da Solução de Dosagem pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos.
6. Procedia-se a uma incubação a 37°C por 5 a 15 minutos, quando a reação era paralisada pela adição de 0,5 ml da Solução de Revelação.

7. O coeficiente de extinção a 620 nm foi medido para cada uma das reações, e a variação de 0,1 unidades de absorbância por minuto foi considerada como 1 unidade de atividade (U).

3.29.4 Quantificação de proteína total no sobrenadante de culturas

(BRADFORD, 1976 - modificado)

1. As culturas foram crescidas para essa dosagem da maneira descrita nos passos de 1 à 3 do item anterior.
2. 300 ul do sobrenadante das culturas foram adicionados a 1 ml de Solução de Bradford e o volume da reação completado para 2 ml com água esterilizada.
3. Foi medida a densidade ótica dessas reações no comprimento de onda de 595 nm, contra um branco que consistia da mesma reação acima onde os 300 ul de sobrenadante foram substituídos por 300 ul de meio L.
4. A quantidade de proteína total desses sobrenadantes foi calculada através de uma curva padrão feita nas mesmas condições do ensaio acima descrito onde os 300 ul de sobrenadante foram substituídos por soluções contendo 20, 40, 60, 80 e 100 ug de BSA.

5. A solução estoque de BSA preparada para a construção da curva padrão consistia de 100 mg de BSA dissolvidos em 100 ml de água esterilizada. A concentração dessa solução foi acertada através da leitura de sua densidade ótica à 280 nm, sabendo-se que, neste comprimento de onda, uma solução de 1 ug/ml de BSA deve apresentar uma leitura de 0,6 unidades de absorbância.

3.29.5 Cálculo da atividade específica de alfa-amilase no sobrenadante de culturas

A atividade específica de alfa-amilase foi definida como unidades de atividade enzimática (U) por miligrama de proteína celular (PRUDENCE e cols., 1989).

3.30 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE EM MEIO SÓLIDO:

Os clones a serem testados foram inoculados por pontos em placas contendo meio L-AMI, acrescidos dos antibióticos apropriados e incubados por cerca de 48 horas a 30°C. As placas contendo as bactérias crescidas foram então mantidas em refrigerador por 24 horas, período após o qual foi possível visualizar a formação de halos de amilólise ao redor das colônias produtoras de alfa-amilase. A formação deste halo ocorre porque o amido, à concentração utilizada (4%), torna

o meio de cultura opaco após o resfriamento, enquanto nas áreas onde ocorre a hidrólise do amido o meio permanece translúcido após a permanência no refrigerador.

3.31 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA:

1. A partir de placas contendo bactérias com 3 dias de crescimento, uma única colônia da linhagem bacteriana a ser testada foi inoculada em 20 ml de meio YM acrescido dos antibióticos adequados, em erlenmeyer de 125 ml.
2. Esse pré-inóculo foi incubado à 28°C por 24 horas, sob constante agitação.
3. Aliquotas de 2 ml foram inoculadas, em triplicatas, em erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de solução basal I acrescida da fonte de carbono, amido e/ou sacarose, nas concentrações adequadas.
4. As culturas foram crescidas por 72 horas à 28°C sob constante agitação.
5. A viscosidade da goma produzida pelas culturas foi estimada através de análise em viscosímetro, utilizando-se para tanto um aparelho Brookfields (RV Series Viscosimeters) com adaptador para pequenas amostras e "spindle" nº 21.
6. As medidas foram feitas nas rotações de 20, 50 e 100 rpm, as quais, para conversão aos valores finais (centipoise), foram multiplicadas pelos fatores 25, 10 e 5, respectivamente, conforme especificações do fabricante.

7. De acordo com os resultados obtidos, uma das rotações foi escolhida cujos dados foram utilizados para posterior análise. Neste trabalho a rotação escolhida foi a de 20 rpm.

4. RESULTADOS

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO:

Foram estabelecidas as curvas de crescimento para as linhagens REF, REF Cm^r e 280 NaI^r, utilizadas como controle e receptoras, respectivamente, e os resultados obtidos encontram-se expostos no gráfico 1.

4.2 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDIO AMILOLÍTICO PROMÍSCUO PAP2:

Essa construção foi feita segundo o esquema geral para construção de moléculas híbridas de DNA, descrita no item 3.6 de Material e Métodos, e a estratégia utilizada bem como a construção final obtida (pAP2) podem ser vistas na Figura 1.

O plasmídeo pMFY-40 foi linearizado por digestão com as enzimas EcoR I e Hind III, tendo liberado um pequeno fragmento de cerca de 31 pares de bases. A quase totalidade do plasmídeo original foi isolada do gel de agarose de baixo ponto de fusão e utilizada para ligação com o fragmento EcoR I/Hind III de 1,6 Kb (*amy*) do pASA25,

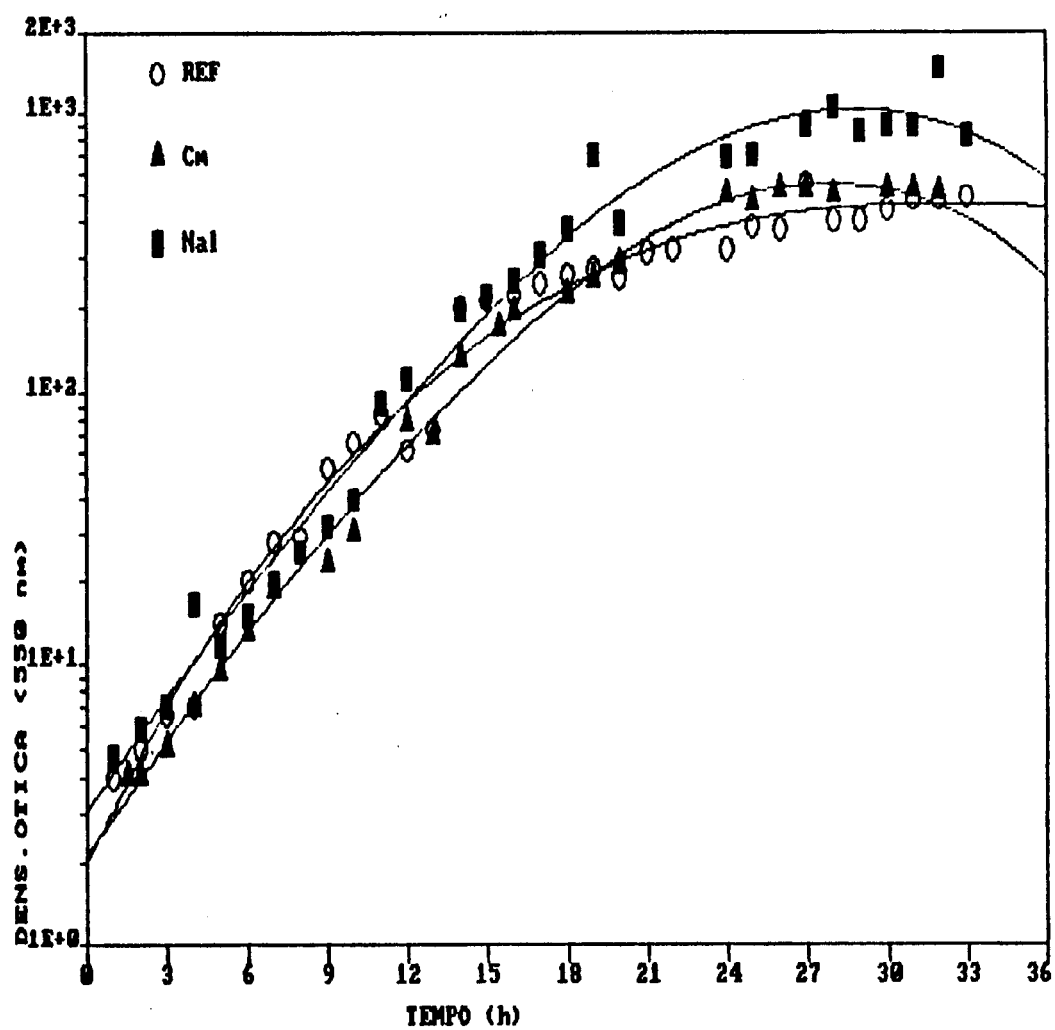


Gráfico 1. Curva de crescimento das linhagens REF, REF Cm^r e 280 NaI^r de *Xanthomonas campestris*.

isolado do gel pela mesma técnica, como descrito no item 3.17 de Material e Métodos.

O plasmídeo obtido (pAP2) foi introduzido em *E. coli* HB101 por transformação (item 3.21 de Material e Métodos) e os clones transformados selecionados por sua resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, bem como pela presença do halo de amilólise ao redor das colônias.

Alguns clones tiveram seu plasmídeo extraído por minipreparação (item 3.12 de Material e Métodos) e seu padrão de restrição avaliado após digestão e eletroforese em géis de agarose (figura 2).

O pAP2 foi então introduzido nas linhagens REF Cm^r e 280 NaI^r de *X. campestris* por conjugação, como descrito no item 3.27 de Material e Métodos.

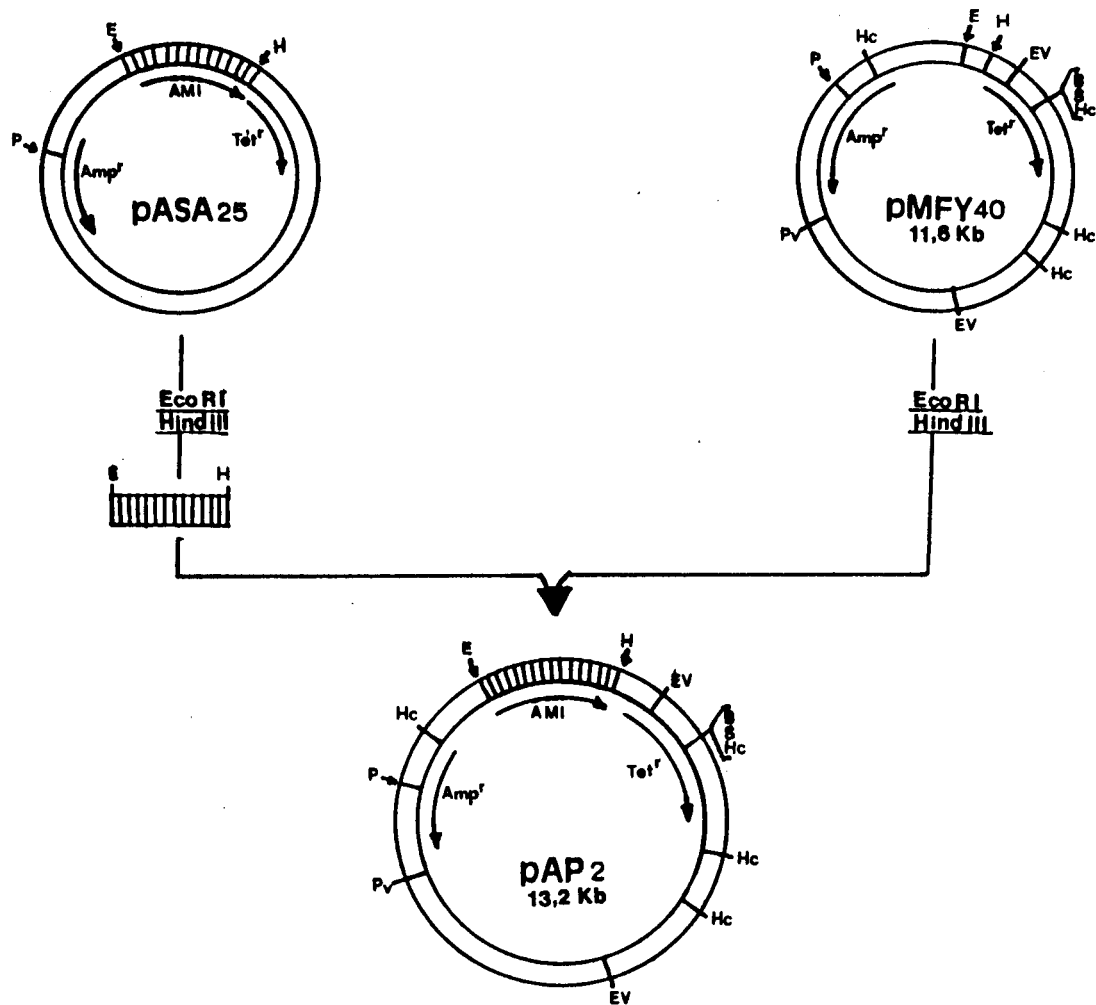


Figura 1. Construção do plasmídeo promíscuo contendo o gene da alfa-amilase (pAP2).

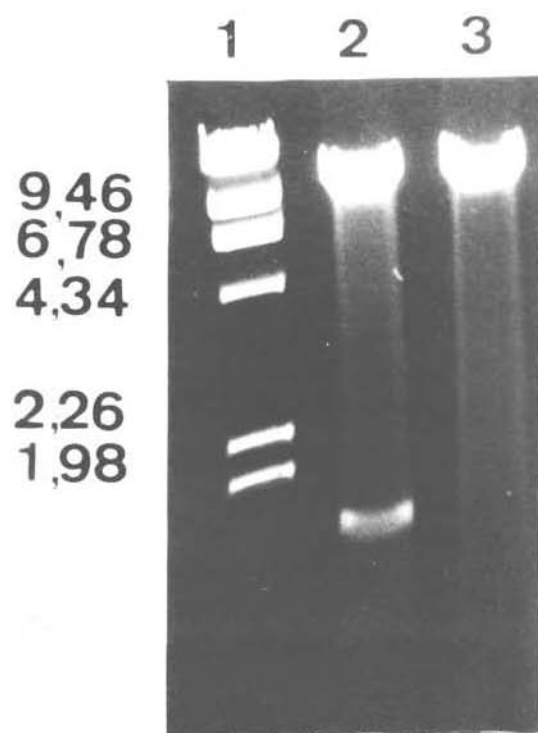


Figura 2: Perfil de restrição do plasmídio pAP2. (1) Lambda/Hind III; (2) pAP2(EcoR I/Hind III); (3) pAP2/EcoR I.

4.3 CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE *X. campestris*:

A estratégia utilizada para a clonagem dos promotores de *Xanthomonas*, bem como a construção final obtida (pAX1), está esquematizada na figura 3.

O plasmídeo pKK232-8, utilizado como "promoter-probe", foi linearizado no sítio de BamH I e ligado à fragmentos gerados pela digestão do DNA genômico de *Xanthomonas* com a enzima Sau 3AI, conforme descrito no item 3.7 de Material e Métodos. Essa ligação colocou os fragmentos genômicos numa posição imediatamente "upstream" ao gene da enzima cloranfenicol acetil transferase, desprovido de promotor, e portanto inativo, no vetor original pKK232-8.

Os clones de *E. coli* HB101 transformados com essa construção plasmidial foram testados quanto ao seus níveis de resistência ao antibiótico cloranfenicol, e mostraram-se capazes de crescer em placas de meio L contendo este antibiótico em concentrações de até 1 mg/ml.

A análise do padrão de digestão de 30 dos clones recombinantes que apresentaram maior resistência ao cloranfenicol permitiu a escolha de um deles para dar continuidade ao trabalho. O plasmídeo escolhido, pAX1, apresentou um inserto de aproximadamente 600 pb correspondente ao fragmento de DNA contendo o promotor de *X. campestris*, e seu padrão de digestão pode ser observado na figura 4.

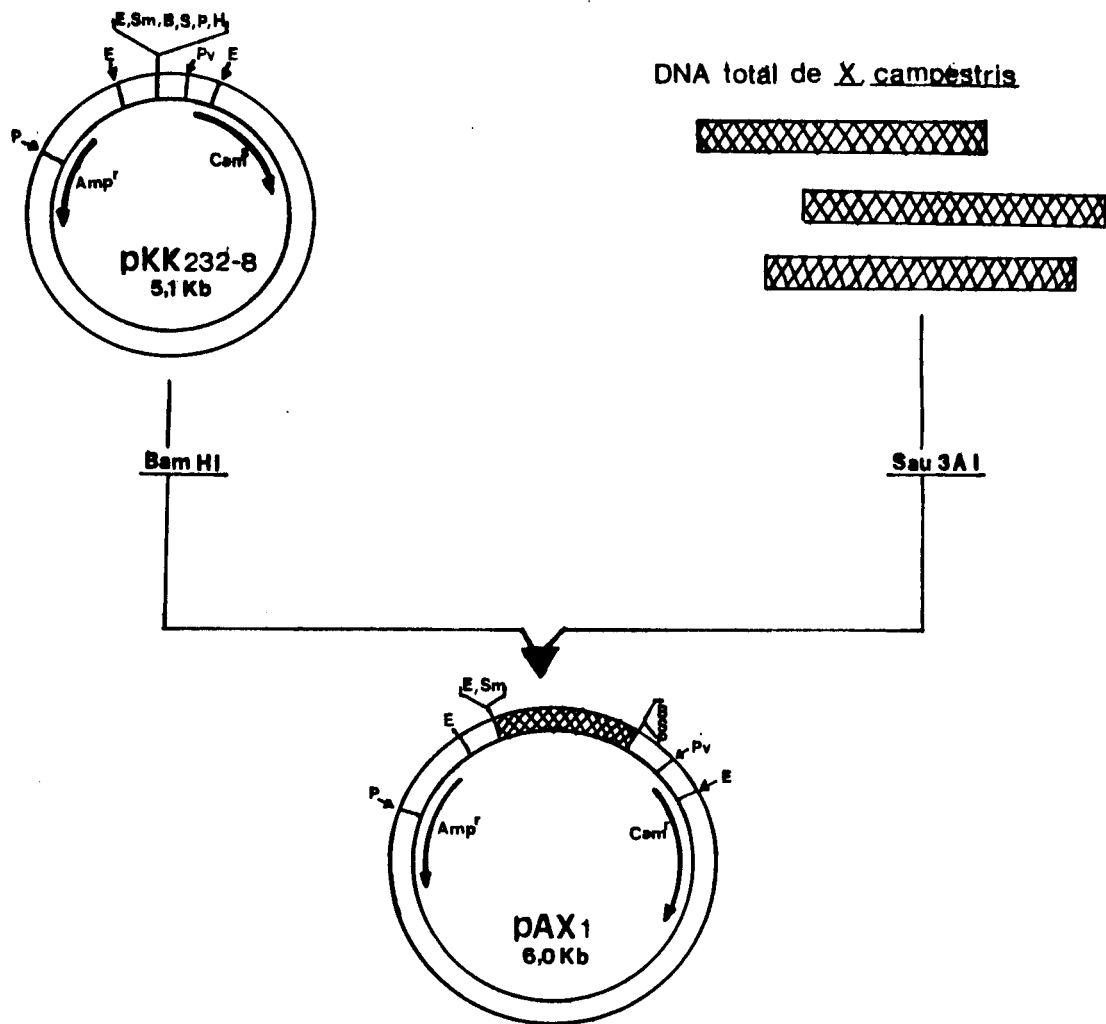


Figura 3. Construção do plasmídeo pAX1.

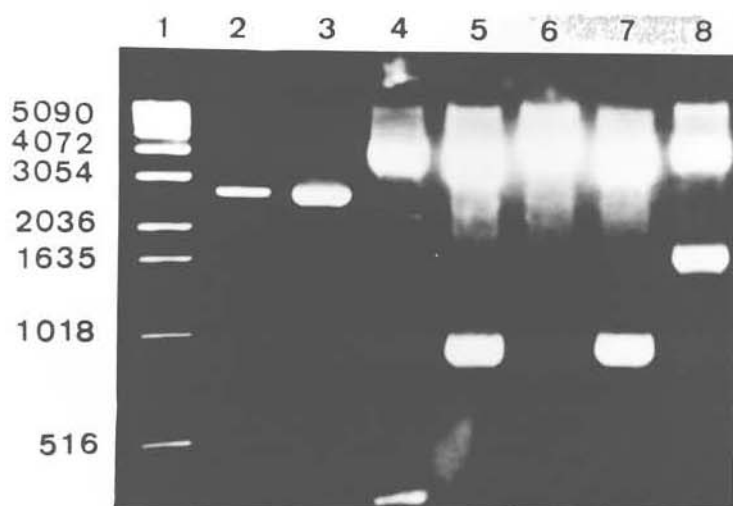


Figura 4. Perfil de restrição do plasmídio pAX1. (1) "Ladder"; (2) pUC 8/EcoR I - 0,5 ug; (3) pUC 8/EcoR I - 1,0 mg; (4) pKK232-8/EcoR I; (5) pAX1/EcoR I; (6) pAX1/ BamH I; (7) pAX1(EcoR I/BamH I); (8) pAX2/EcoR I. As colunas (1), (2) e (3) representam, respectivamente, o padrão de peso molecular e duas diluições do padrão de concentração.

Conforme esperado, a digestão desse plasmídio com EcoR I gerou fragmento de 900 pb correspondente à sequência de 600 pb de *Xanthomonas* mais 300 pb originados do fragmento EcoR I-RamH I do vetor pKK232-8. Uma dupla digestão desse plasmídio com EcoR I e Hind III permitiu a liberação do inserto de 600 pb bem como o fragmento original de 300 pb do vetor (resultados não documentados). A digestão com RamH I apenas linearizou o plasmídio, mostrando que o sítio original foi reconstituído em apenas um dos lados após a ligação heteróloga dos insertos digeridos com Sau 3AI ao vetor digerido com RamH I. A dupla digestão com EcoR I e RamH I demonstrou que o sítio não recuperado desta última enzima foi aquele localizado "upstream" com relação ao inserto, já que não houve liberação do fragmento de 300 pb do vetor original após esta dupla digestão.

4.4 HIBRIDIZAÇÃO PARA CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA CLONADA:

Foram realizados experimentos de "Southern blotting" a fim de nos certificarmos de que a sequência promotora clonada no plasmídio pAX1 era realmente originada do genoma da bactéria *X. campestris*.

Para tanto, o DNA genômico total de *X. campestris* digerido com as enzimas EcoR I, RamH I e Hind III além de amostras do vetor original pKK232-8 digerido com RamH I e do pAX1 digerido com RamH I e EcoR I/Hind III, foi submetido à eletroforese em gel de agarose e

transferido para membranas de nylon pelo método de Southern Blotting, conforme descrito no item 3.24 de Material e Métodos. Após a pré-hibridização, estes filtros foram hibridizados com uma sonda que consistiu do fragmento EcoR I/Hind III do pAX1, contendo a sequência promotora clonada de *Xanthomonas campestris*, marcado como descrito no item 3.22 de Material e Métodos.

Os resultados obtidos podem ser observados na figura 5, onde fica evidenciada a presença das seguintes bandas, após a hibridização:

- (a) Coluna 1: Uma banda de 6,0 Kb correspondente ao plasmídeo pAX1 linearizado com BamH I.
- (b) Coluna 2: Uma banda de aproximadamente 0,6 Kb correspondente ao fragmento EcoR I/Hind III contendo a sequência promotora de *X. campestris*.
- (c) Coluna 3: Duas bandas de aproximadamente 7,0 Kb e 6,5 Kb obtidas após digestão do DNA cromossômico de *Xanthomonas* com a enzima EcoR I.
- (d) Coluna 4: Três bandas de aproximadamente 7,2 Kb, 6,8 Kb e 6,5 Kb obtidas após a digestão do DNA genômico com BamH I.
- (e) Coluna 5: Uma banda de aproximadamente 7,0 Kb obtida após digestão do DNA genômico com Hind III.

É também importante salientar a ausência de bandas na coluna 6, correspondente ao vetor original pKK232-8.

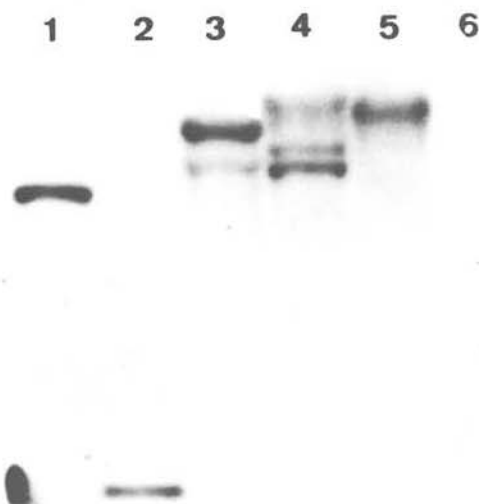


Figura 5. (1) pAX1/BamH I; (2) pAX1(EcoR I/Hind III); (3), (4) e (5) DNA genômico total de *Xanthomonas campestris* digerido, respectivamente, com: EcoR I, BamH I e Hind III; (6) pKK232-8/BamH I. O filtro foi hibridizado com o fragmento EcoR I/Hind III do pAX1.

4.5 INTRODUÇÃO DA SEQUÊNCIA PROMOTORA DO pAX1 NO PAP2:

A estratégia utilizada nesta subclonagem, bem como a construção final obtida (pAP2X) estão esquematizadas na figura 6.

O plasmídio pAX1 foi digerido com a enzima *EcoR* I a fim de liberar o fragmento de 0,9 Kb contendo a sequência promotora clonada de *X. campestris*, o qual foi isolado após eletroforese em um gel de agarose de baixo ponto de fusão. Esse fragmento foi então ligado ao PAP2 linearizado com *EcoR* I, sítio este localizado imediatamente "upstream" ao gene *amy*, e a construção final assim obtida foi denominada pAP2X.

O pAP2X foi introduzido por conjugação em *E. coli* HB101 e os clones transformados selecionados por sua resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, bem como pela formação do halo de amilólise ao redor das colônias.

A confirmação da inserção da sequência promotora no sítio de *EcoR* I foi feita através da análise do padrão de restrição dos plasmídios obtidos por minipreparação de alguns dos clones transformados, como exemplificado nas figuras 7 e 8. De acordo com o esperado, a digestão dos plasmídios recombinantes com *EcoR* I gerou um fragmento de 0,9 Kb que corresponde à sequência promotora inserida. A dupla digestão desses mesmos plasmídios com *EcoR* I e *Hind* III

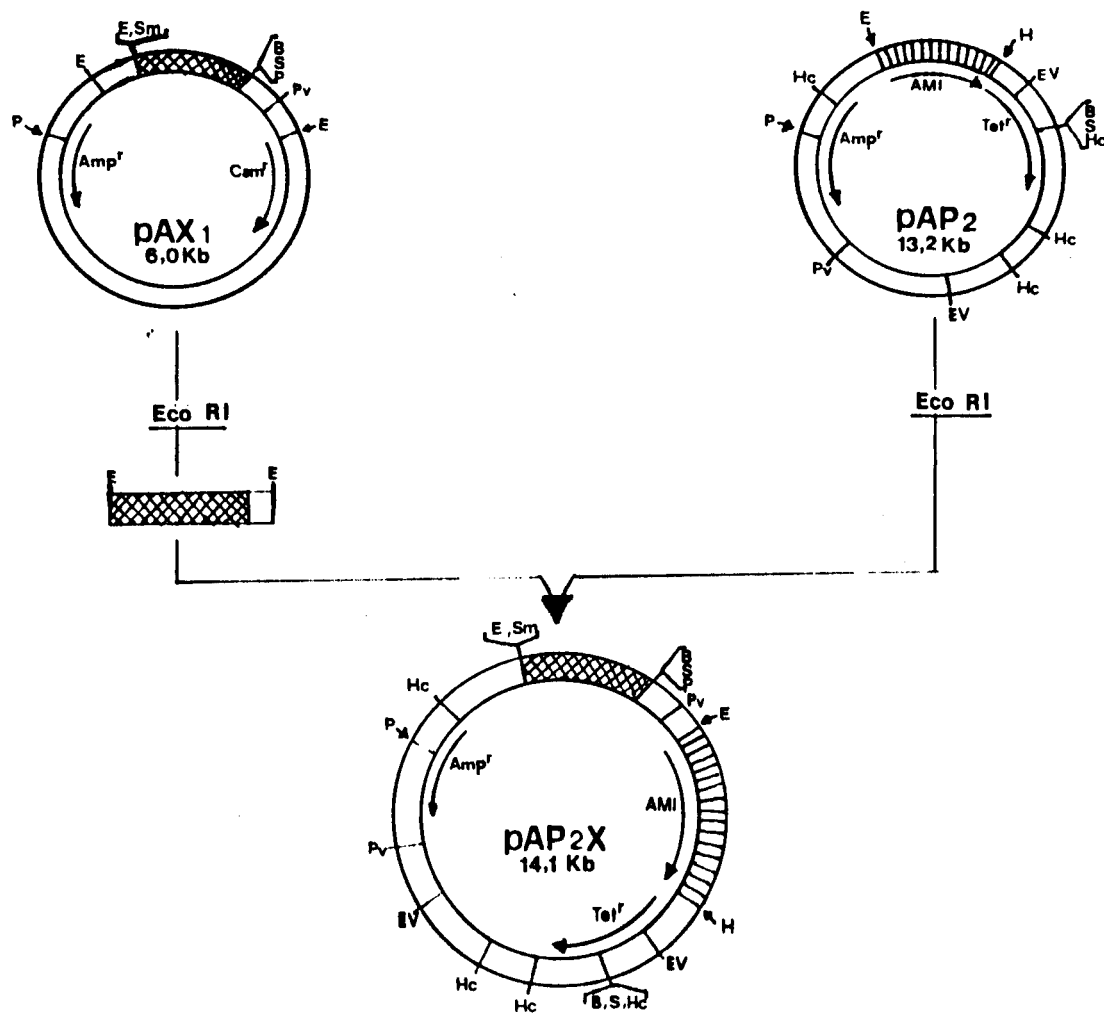


Figura 6. Construção do plasmídeo pAP2X: subclonagem da sequência promotora de *Xanthomonas campestris* no plasmídeo pAP2.

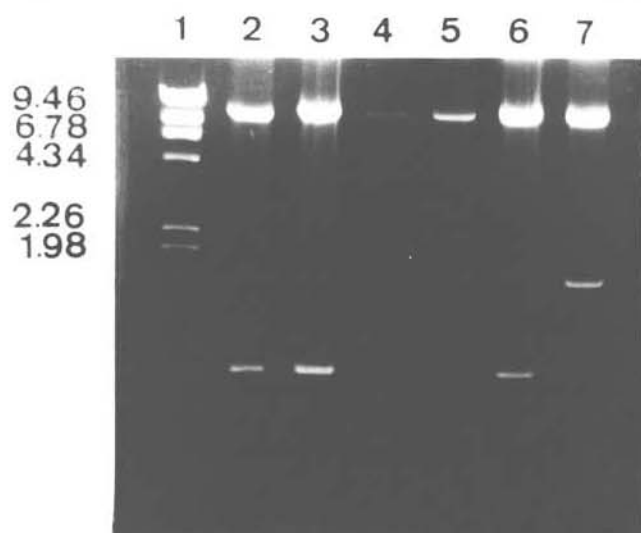


Figura 7. Digestão do pAP2X extraído de 5 clones transformados. (1) λ /Hind III; (2), (3), (4), (5) e (6) pAP2X de 5 clones digeridos com EcoR I; (7) pAP2(EcoR I/Hind III).

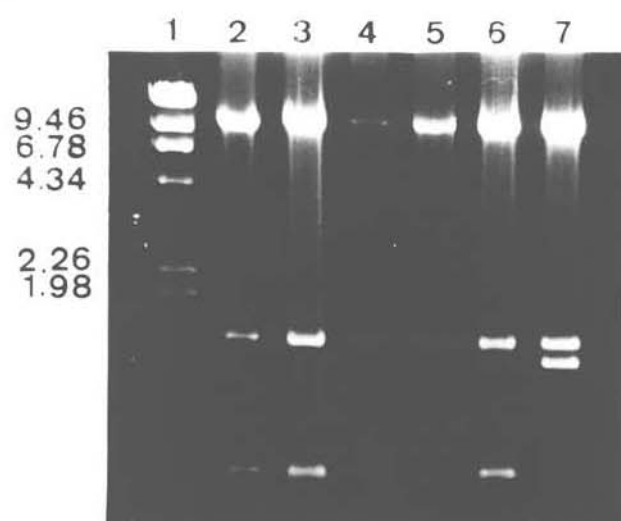


Figura 8. Digestão do pAP2X extraído de 5 clones transformados. (1) *lambda/Hind* III; (2), (3), (4), (5), (6) e (7) pAP2X extraído dos 5 clones e digerido com *EcoR* I e *Hind* III.

originou dois fragmentos, o de 0,9 Kb acima citado e o de 1,6 Kb correspondente ao fragmento do gene *amy* subclonado do pASA25.

4.6 SUBCLONAGEM DO *LOCUS* ESTABILIZADOR *parB* no pAP2:

A estratégia utilizada para a introdução do *locus parB* no plasmídio pAP2 encontra-se resumida na figura 9, assim como o mapa da construção plasmidial final obtida (pAP23).

O plasmídio pKG1022 foi digerido com a enzima PstI a fim de liberar o fragmento de 1,63 Kb contendo o *locus parB* e o gene *opbA* que confere resistência à canamicina, o qual foi isolado após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão. Esse fragmento foi então ligado ao sítio de PstI do pAP2 e a construção assim obtida (pAP23) introduzida em *E. coli* HB101 por transformação.

Os clones transformados foram selecionados por suas características de resistência à tetraciclina e canamicina e sensibilidade à ampicilina, bem como por sua capacidade amilolítica. Esta última avaliação foi feita através do consumo de amido em meio líquido e formação de açúcar redutor, como descrito nos itens 3.29.1 e 3.29.2 de Material e Métodos. O padrão de restrição dos plasmídios obtidos por minipreparação de alguns desses clones foi confirmado em gel de agarose, um dos quais pode ser observado na figura 10. Nesta

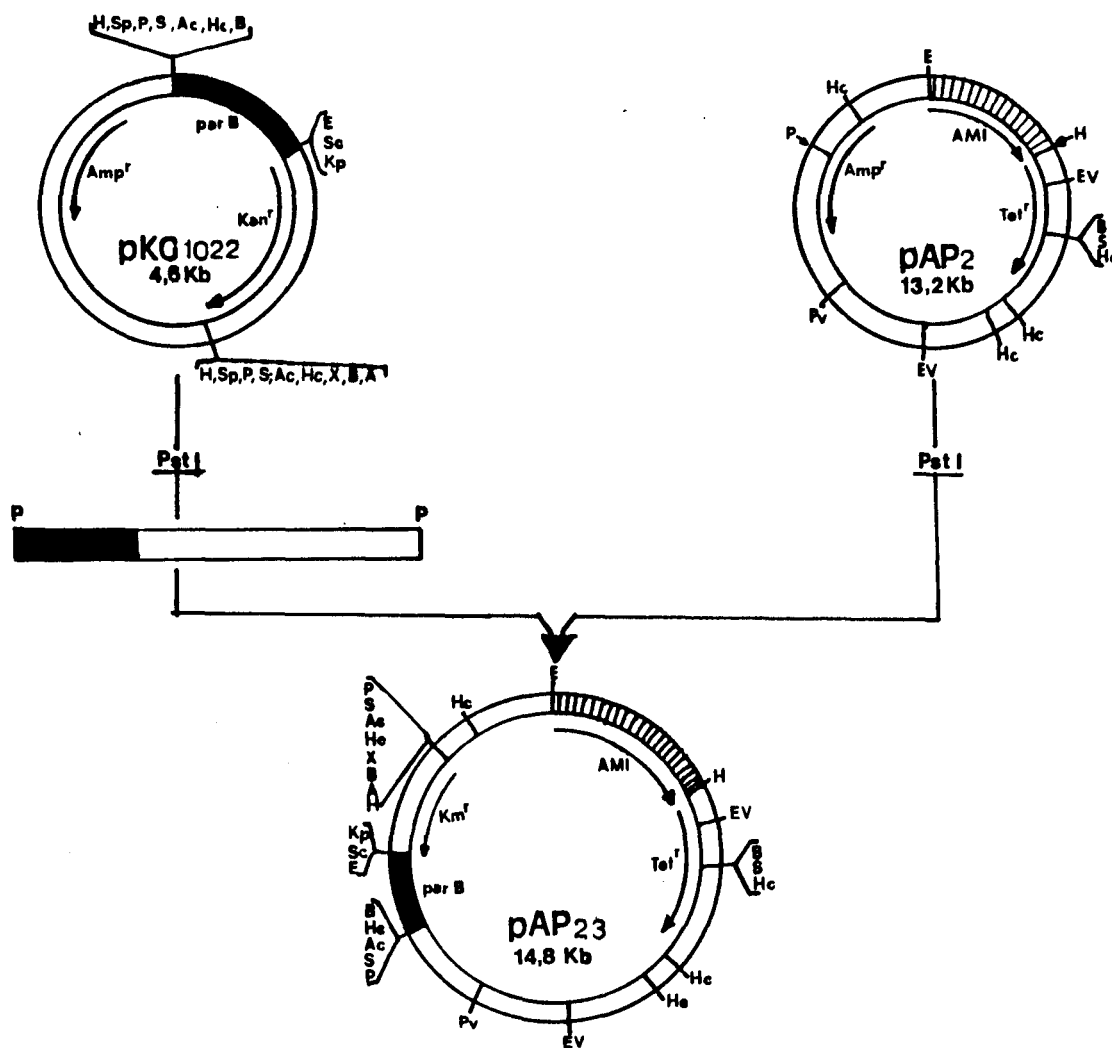


Figura 9. Construção do plasmídeo pAP23: introdução do *locus parB* no plasmídeo recombinante pAP2.

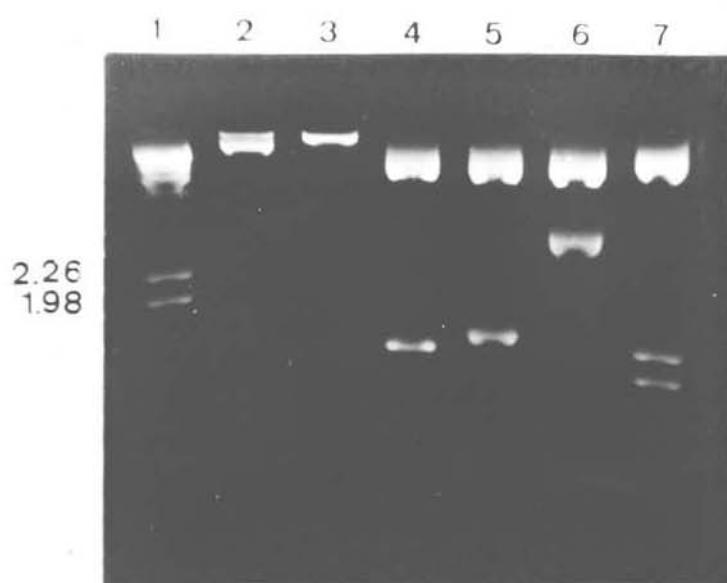


Figura 10. Perfil de restrição do plasmídeo pAP23. (1) lambda/ Hind III; (2) pMFY 40/EcoR I; (3) pMFY 40/ Hind III; (4) pAP23/Est I; (5) pAP23/EcoR I; (6) pAP23/ Hind III; (7) pAP23(EcoR I/Hind III).

foto, no entanto, não está visível o fragmento EcoR I/Hind III de 0,748 Kb.

Conforme o esperado, a digestão do pAP23 com Pst I gerou um fragmento de 1,63 Kb correspondente ao inserto contendo o *locus parB* e o gene *opxA*. A digestão subsequente com EcoR I gerou um fragmento de aproximadamente 1,8 Kb que corresponde aos 1,05 Kb do gene *opxA* e 0,748 de fragmento EcoR I-Pst I pré-existente no vetor. No entanto, a digestão com Hind III, que segundo o esperado deveria somente linearizar o plasmídio construído, gerou um fragmento de 2,3 Kb, possivelmente referente ao gene *amy* (1,6 Kb) acrescido de 0,748 Kb do vetor original, indicando a criação de um novo sítio de Hind III na extremidade distal ("downstream") de *opxA*, após a ligação do *locus parB* ao pAP2. Finalmente, a dupla digestão com EcoR I e Hind III gerou, de acordo com o esperado, um fragmento de 1,6 Kb correspondente ao fragmento AMI e mais um fragmento de 1,05 Kb possivelmente correspondente ao gene *opxA*, o que veio confirmar a hipótese de que o novo sítio de Hind III gerado localiza-se entre o gene *opxA* e o fragmento AMI.

O pAP23 foi finalmente introduzido nas linhagens REF Cm^r e 280 Nal^r de *X. campestris* por conjugação, utilizando-se o pRK2013 como plasmídio mobilizador.

4.7 INTRODUÇÃO DA SEQUÊNCIA PROMOTORA DO pAX1 NO PAP23:

A estratégia utilizada nesta subclonagem está apresentada na figura 11, onde se encontra também o mapa da construção final obtida (pAP23X).

O plasmídio pAX1 foi digerido com a enzima EcoR I afim de liberar o fragmento de 0,9 Kb que contém ao promotor clonado de *Xanthomonas*, o qual foi isolado após eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão.

O PAP23, por sua vez, foi digerido com a mesma enzima, liberando um fragmento de 1,8 Kb correspondente ao gene *ophA* (1,05 Kb) e parte do gene *b1a* (Amp^r). O restante do plasmídio (13,0 Kb) foi isolado a partir de um gel de agarose de baixo ponto de fusão e ligado ao fragmento de 0,9 Kb obtido do pAX1.

O novo plasmídio assim obtido (pAP23X) foi introduzido por transformação em células de *E. coli* HB101 sendo os clones transformados selecionados por sua resistência à tetraciclina e sensibilidade à ampicilina e canamicina, bem como por sua capacidade amilolítica.

Alguns dos clones transformados tiveram seus plasmídios extraídos por minipreparação e seu padrão de restrição observado em

gel de agarose para confirmação da inserção da sequência promotora após digestão com *EcoR* I e *EcoR* I/*Hind* III, como pode ser observado nas figuras 12 e 13.

O plasmídio pAF23X foi então introduzido por conjugação nas linhagens já descritas de *X. campestris*.

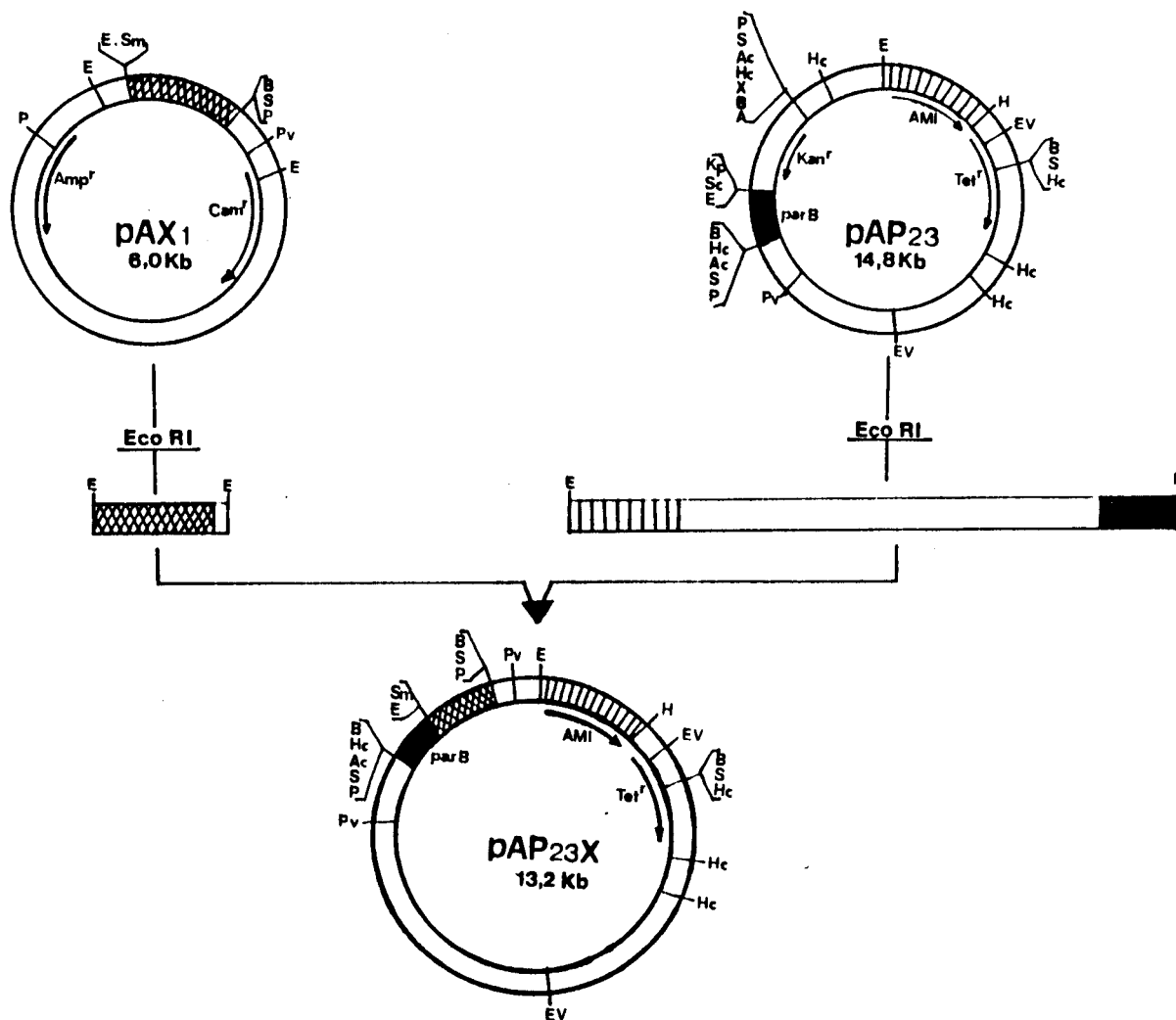


Figura 11. Construção do plasmídeo pAP23X: subclonagem do *locus parB* no plasmídeo pAP23.

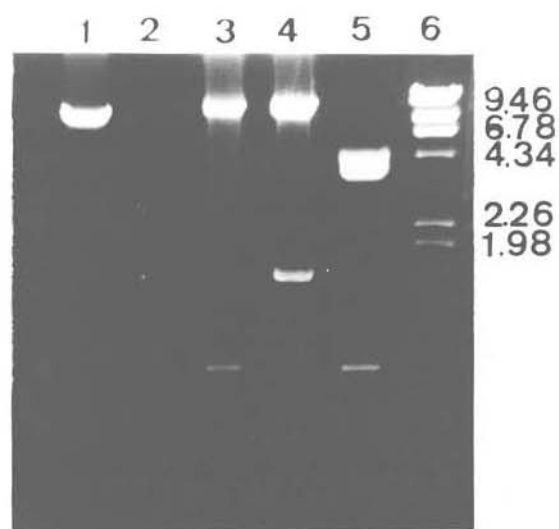


Figura 12. Perfil de restrição do pAP23X, com a enzima *EcoR* I. (1) pAP23/*EcoR* I; (2), (3), (4) e (5) correspondem ao pAP23X extraído de 4 clones após transformação; (6) lambda/*Hind* III.

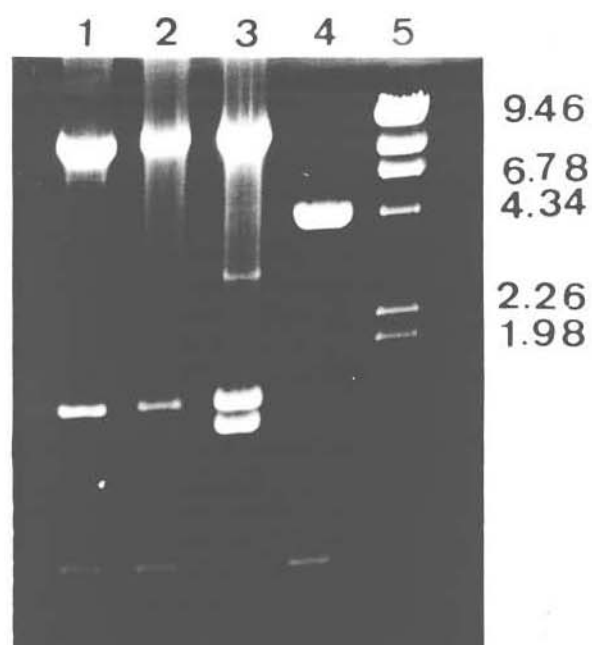


Figura 13. Perfil de restrição do plasmídio pAF23X com as enzimas EcoR I e Hind III. (1), (2) e (3) correspondem ao pAF23X extraído de 3 diferentes clones após transformação; (4) pAX1(EcoR I/Hind III); (5) lambda/Hind III.

4.8 ESTABILIDADE DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS EM *X. campestris*:

Os testes de estabilidade foram realizados conforme descrito no item 3.28 de Material e Métodos e os resultados estão expostos nos gráficos 2 e 3. As linhagens 280 Nal^r e REF Cm^r foram utilizadas como receptoras.

Como pode-se observar através dos gráficos, os valores relativos à perda plasmidial, quando se toma a linhagem 280 Nal^r como hospedeira do plasmídio portador do *locus parB* (pAP23), foram de 4%, 20%, 33% e 60% para cada um dos quatro dias de experimento, respectivamente, contra 65%, 75%, 93% e 86% no caso do plasmídio não portador de *parB* (pAP2).

Em se tratando da linhagem REF Cm^r , os valores encontrados para perda de plasmídios portadores de *parB* foram de 3%, 33%, 48% e 42%, para cada um dos quatro dias, respectivamente, contra 73%, 75%, 54% e 78% no caso de plasmídios não portadores deste *locus* de estabilização.

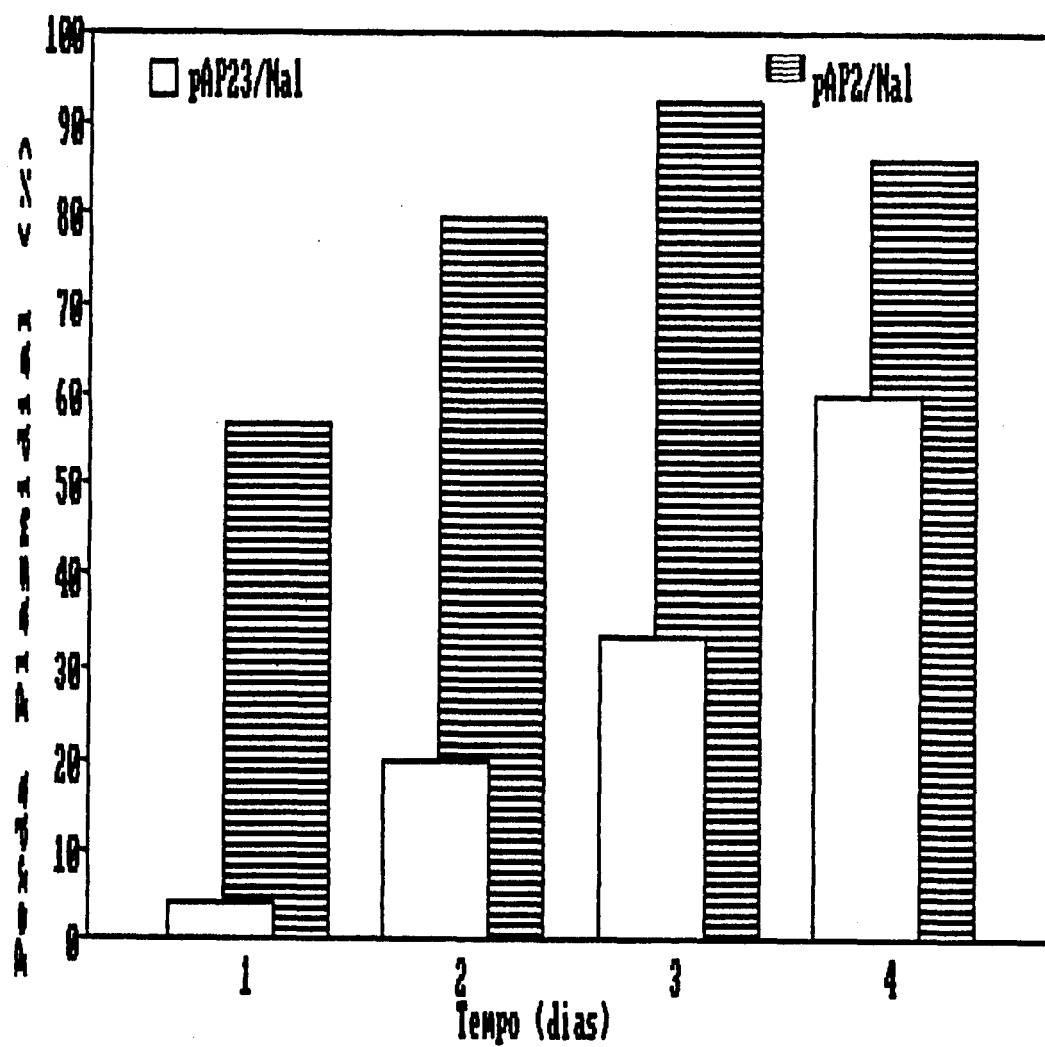


Gráfico 2. Perda dos plasmídios pAP2 e pAP23 na linhagem 280 Nal^r.

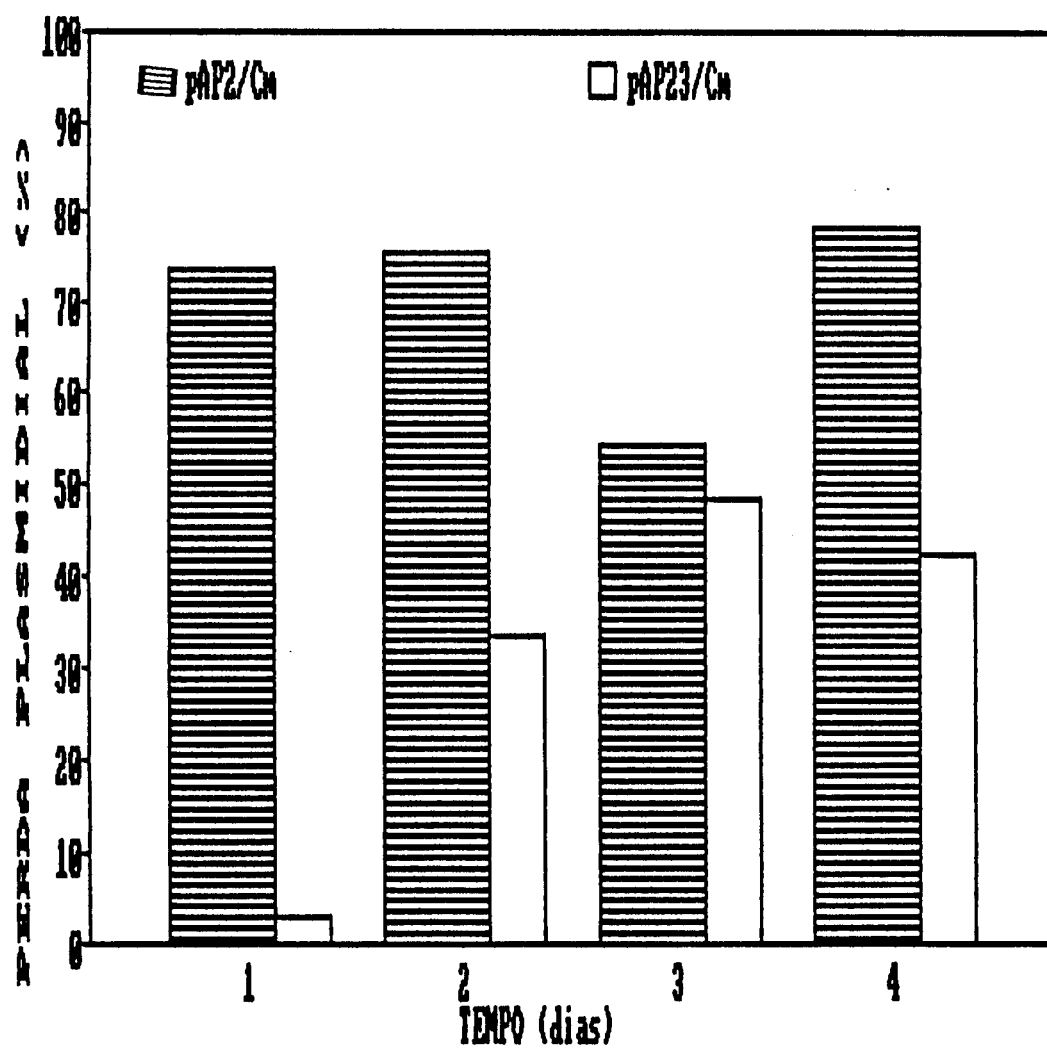


Gráfico 3. Perda dos plasmídios PAP2 e PAP23 na linhagem REF

Cm^r.

4.9 ATIVIDADE DE ALFA-AMILASE NO SOBRENADANTE DE CULTURAS:

Os resultados da dosagem da atividade de alfa-amilase no sobrenadante de culturas de *X. campestris* portadoras ou não dos diferentes plasmídios construídos, crescidas na presença e na ausência de glicose, encontram-se expostos nos gráficos 4 e 5 e a análise estatística destes dados (Análise de Variância e Teste de Tukey) pode ser vista nos apêndices 1 à 6.

Como pode ser visto nos gráficos acima mencionados, ambas as linhagens (Nal^r e Cm^r) levam cerca de 30 horas para atingir o índice máximo de produção de alfa-amilase, tempo este que excede em 6 horas aquele utilizado no crescimento das linhagens em meio rico para posterior produção de goma xantana. Este resultado difere apenas no caso da linhagem Nal portadora do plasmídio amilolítico pAP2X (N2X), cujo pico máximo de produção está ao redor das 48 horas, tanto na presença quanto na ausência de glicose.

Através do gráfico 4 pode-se notar que a introdução dos plasmídios amilolíticos na linhagem 280 Nal^r promoveu um aumento considerável na produção de alfa-amilase por estas bactérias. Este incremento variou, em média, da ordem de 210%, quando comparamos a linhagem original (Nal) àquelas nas quais foi introduzido o plasmídio pAP2 (Nal2 e Nal23), e da ordem de 280% se levarmos em consideração a linhagem Nal e aquelas onde foram inseridos os plasmídios amilolíticos

portadores do promotor de *Xanthomonas* (Nal2X e Nal23X).

Quanto à influência da glicose adicionada ao meio de cultura na produção de alfa-amilase, vemos uma ligeira superioridade na produção das linhagens crescidas em ausência deste açúcar, embora esta diferença não se evidencie em todos os pontos da curva.

Nota-se ainda que as linhagens nas quais foram introduzidos plasmídios portadores do *locus parB* tiveram desempenho inferior àquelas cujos plasmídios não portavam este locus, especialmente quando comparamos as curvas de produção de amilase das linhagens Nal2 e Nal23, quer na presença ou na ausência de glicose. Essa diferença deixa de ser acentuada, no entanto, quando comparamos as linhagens cujo gene *amy* encontra-se sob o controle do promotor de *X. campestris* (Nal2X e Nal23X).

No que diz respeito à produção de alfa-amilase pelas linhagens REF Cm^r, seu comportamento é semelhante ao observado para as linhagens 280 Nal^r, como pode ser visto através do gráfico 5. A linhagem Cm2X, portadora de um plasmídio amilolítico onde foi inserida a sequência promotora de *X. campestris*, produz 90% mais alfa-amilase quando comparada àquela não portadora do plasmídio amilolítico (Cm) e cerca de 100% mais quando comparada à linhagem Cm2, a qual é portadora do plasmídio amilolítico onde não houve a inserção do promotor.

A análise de variância destes dados de produção de alfa-amilase (apêndices 7 à 12) mostra que as diferenças entre as linhagens são significativas, com linhagens portadoras de plasmídios amilolíticos onde houve a inserção do promotor de *X. campestris* destacando-se como as melhores produtoras de alfa-amilase (C2X e C23X).

No que diz respeito à influência do *locus parB* na produção final de alfa-amilase pelas linhagens testadas, tanto o gráfico 5 como os resultados do Teste de Tuckey mostram que os mais altos níveis de produção desta enzima são alcançados sempre pelas linhagens não portadoras deste *locus*.

Quanto à produção de alfa-amilase por linhagens Cm^r na presença e na ausência de glicose adicionada ao meio, neste caso as linhagens crescidas em meio contendo 2% de glicose apresentaram níveis de produção de alfa-amilase significativamente mais elevados quando comparadas àquelas crescidas na ausência deste açúcar. O incremento na produção de alfa-amilase promovido pela adição de glicose ao meio de crescimento bacteriano evidencia-se pelo fato de que os dois melhores índices de produção desta enzima foram alcançados por linhagens crescidas exatamente sob estas condições (C2X e C23X).

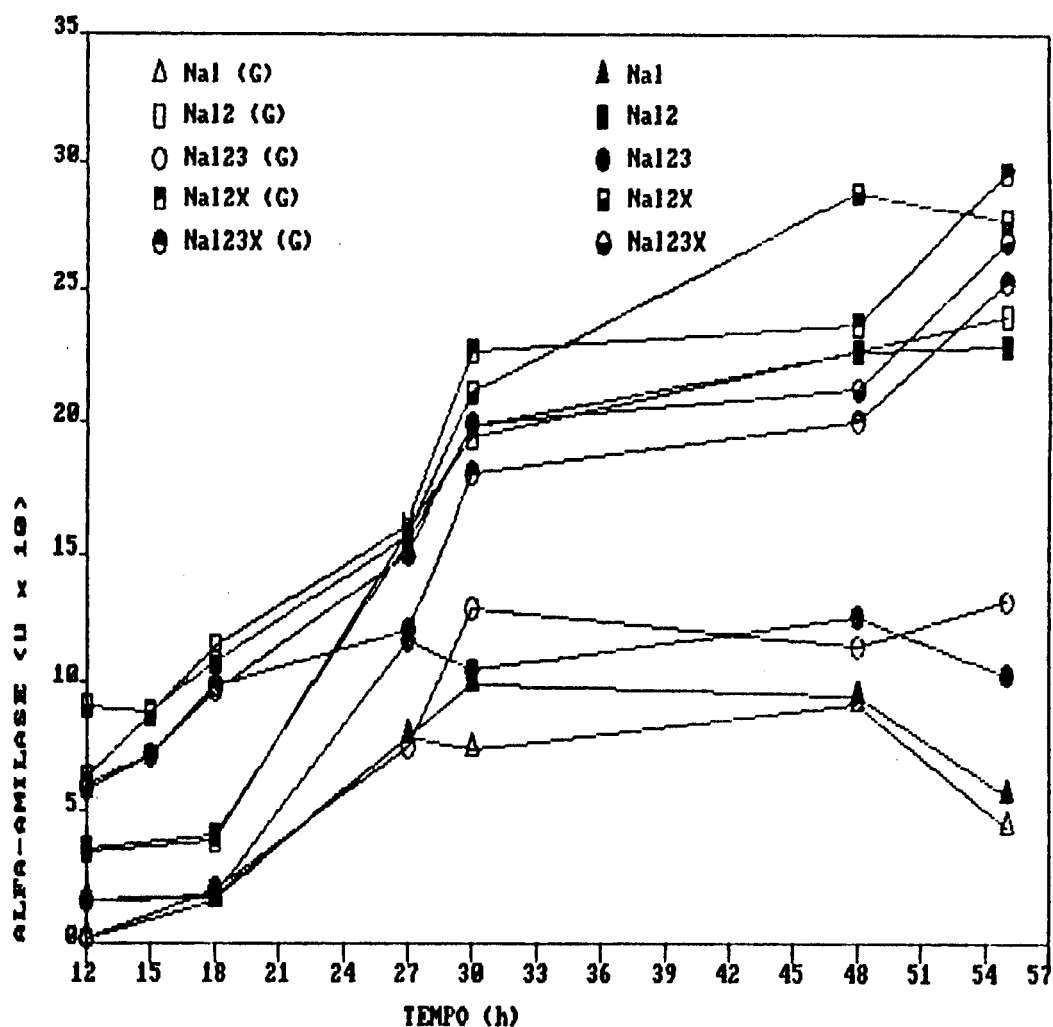


Gráfico 4. Atividade de alfa-amilase no sobrenadante de culturas da linhagem 280 NaI^r portadoras dos plasmídios pAP2, pAP23, pAP2X e pAP23X. (G) = linhagens crescidas na presença de glicose.

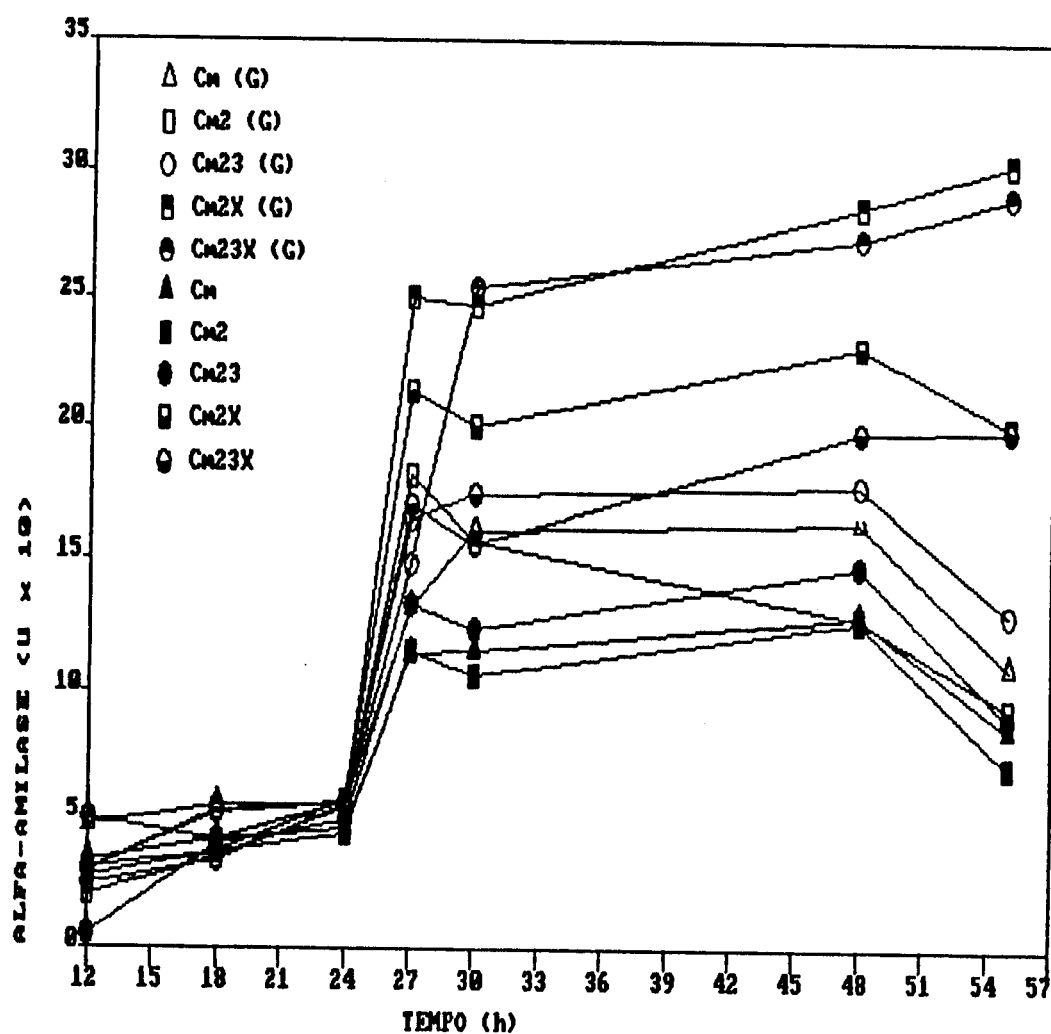


Gráfico 5. Atividade de alfa-amilase no sobrenadante de culturas da linhagem REF Cm^I portadoras dos plasmídios pAP2, pAP23, pAP2X e pAP23X. (G) = linhagens crescidas na presença de glicose.

4.10 ATIVIDADE ESPECÍFICA DE ALFA-AMILASE NO SOBRENADANTE DE CULTURAS:

Esse cálculo foi realizado segundo a descrição que consta do item 3.29.5 de Material e Métodos, e os resultados podem ser visualizados nos gráficos 6 e 7.

Como pode ser observado no gráfico 6, as curvas de atividade específica de alfa-amilase acompanham o traçado daquelas obtidas para unidades de alfa-amilase produzida, com a ocorrência de um pico de atividade por volta das 27 horas e posterior decaimento dessa produção até atingir seu mínimo em 54 horas. No entanto, diferentemente dos resultados apresentados nos Gráficos 5 e 6, ocorre neste caso um pico de atividade específica por volta das 12 horas (primeiro ponto da curva), com uma posterior queda antes da ocorrência do já mencionado pico de atividade específica das 27 horas.

A existência deste pico de atividade específica (A.E.) em 12 horas deve-se ao fato da quantidade de proteína total produzida pelas linhagens neste período de crescimento ser bastante reduzida, ocorrendo o efeito inverso no caso do decaimento da A.E. após 24 horas de crescimento (resultados não apresentados).

Quando são comparadas as atividade específicas de alfa-amilase de linhagens Nal^r portadoras de plasmídios amilolíticos onde

houve a inserção do promotor de *X. campestris* (Nal2X e Nal23X) com sua correspondente não portadora de plasmídio amilolítico (Nal), verifica-se que os primeiros valores representam em média cerca de 300% do segundo.

A análise de variância dos dados lançados no gráfico 6 (apêndices 13 à 18) confirma o fato de que as linhagens portadoras de plasmídios contendo a inserção do promotor de *X. campestris* apresentam os mais altos índices de A.E. de alfa-amilase.

Quanto ao efeito da glicose adicionada ao meio e da inserção do *locus parB* nos plasmídios amilolíticos nas curvas de atividade específica de alfa-amilase das linhagens Nal^r, verifica-se que se repete o efeito observado no gráfico 4, com linhagens portadoras de *parB* apresentando valores de atividade específica mais baixos que suas correspondentes portadoras de plasmídios onde este *locus* não foi inserido, e com linhagens crescidas na ausência de glicose mostrando desempenho igualmente superior às aquelas crescidas na presença deste açúcar, sendo que para as curvas de atividade específica o efeito da glicose parece ser mais acentuado que para aquelas de unidades de enzima produzida.

Da mesma maneira, o comportamento observado para as curvas de atividade específica das linhagens Cm^r no gráfico 7 assemelha-se aquele das curvas das linhagens Nal^r acima descritas. Há a ocorrência do mesmo pico por volta das 12 horas de crescimento, com posterior

decaimento para novamente ocorrer o aparecimento de um pico de atividade específica por volta das 27 horas, e a partir de então os valores decrescem até atingir seu mínimo por volta das 55 horas.

Novamente este traçado singular das curvas de A.E., no que diz respeito ao pico das 12 horas e à queda de produção das 18 horas, reflete a existência de picos invertidos na produção de proteína total extracelular, sobrepostos aos picos de atividade de alfa-amilase mostrados no gráfico 5.

Os efeitos da glicose e da presença do *locus parB* acompanham igualmente aqueles observados no gráfico 5, com linhagens crescidas na presença de glicose apresentando valores de atividade específica superiores aqueles das linhagens crescidas na ausência deste açúcar, e com linhagens portadoras de plasmídios sem a inserção de *parB* apresentando desempenho melhor do que suas correspondentes cujos plasmídios não portam este *locus*, a não ser no caso das linhagens Cm23X e Cm2X (crescidas em glicose) onde este último comportamento se inverte.

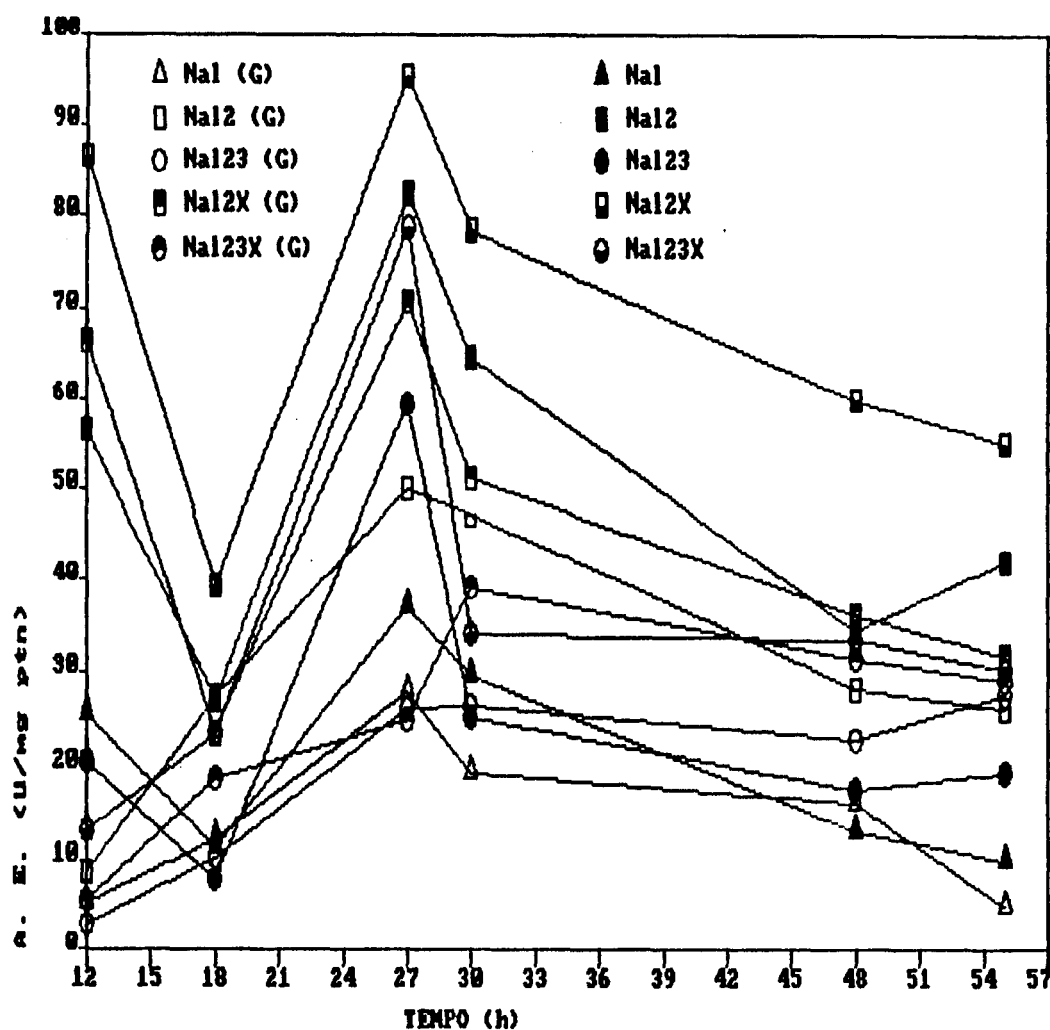


Gráfico 6. Atividade específica de alfa-amilase no sobrenadante de culturas da linhagem 280 Nal^r portadoras dos plasmídios pAP2, pAP23, pAP2X e pAP23X. (G) = linhagens crescidas na presença de glicose.

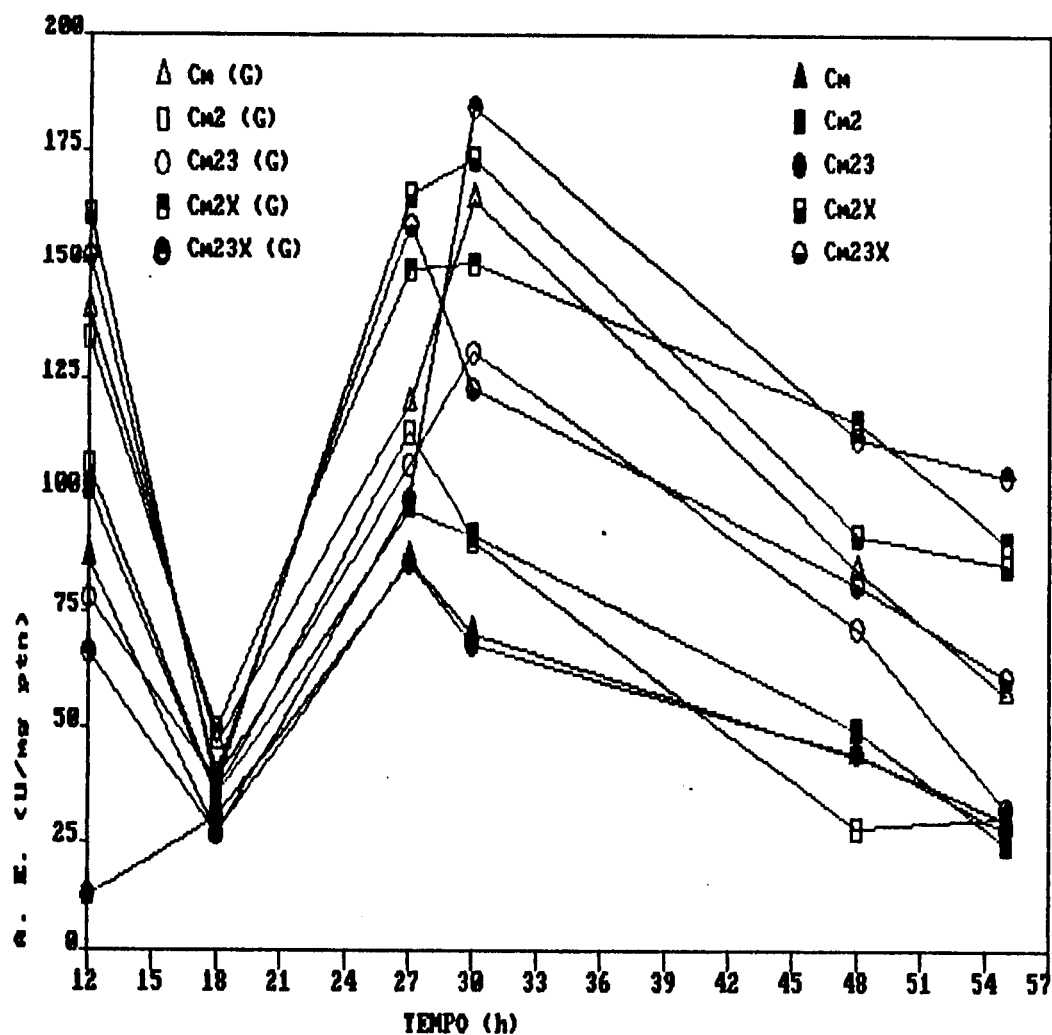


Gráfico 7. Atividade específica de alfa-amilase presente no sobrenadante de culturas da linhagem REF Cm^r portadoras dos plasmídios pAP2, pAP2X, pAP23 e pAP23X. (G) = linhagens crescidas na presença de glicose.

Em linhas gerais as linhagens estudadas comportaram-se da seguinte maneira quanto à produção de alfa-amilase:

(1) A introdução dos plasmídios amilolíticos aumentou o nível de alfa-amilase produzida por todas as suas hospedeiras em todos os casos estudados.

(2) Linhagens portadoras de plasmídios amilolíticos contendo a inserção do promotor de *X. campestris* produziram significativamente mais alfa-amilase que suas correspondentes não portadoras deste tipo de construção plasmidial.

(3) A introdução do *locus parB* nos plasmídios amilolíticos diminuiu a taxa de produção de alfa-amilase pelas linhagens portadoras destas construções plasmidiais.

(4) A adição de glicose ao meio de cultura influenciou negativamente na produção de alfa-amilase por linhagens Nal^r .

(5) O efeito da glicose descrito no item (4) é inverso para as linhagens Cm^r .

(6) A introdução do plasmídio pAP2X em linhagens Nal^r tornou-as aptas a produzir alfa-amilase em níveis comparáveis aos de linhagens Cm^r portadoras dos mesmos plasmídios, ainda que, diferentemente das linhagens Nal^r , estas sejam originalmente amilolíticas.

4.11 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA:

A avaliação da produção de goma xantana pelas linhagens portadoras ou não das diferentes construções plasmidiais obtidas neste trabalho foi feita conforme descrito no item 3.30 de Material e Métodos, e seus resultados podem ser observados nos gráficos 8 e 9.

Estas medidas, cuja análise estatística encontra-se nos apêndices 25 à 29, mostram que praticamente nenhuma goma foi produzida quando as linhagens testadas foram crescidas em meio contendo apenas amido como fonte de carbono. No que diz respeito às linhagens Nal^r, existe uma pequena variação nesta produção mínima de goma em amido, onde a linhagem N2X, portadora do plasmídio amilolítico contendo a inserção do promotor de *X. campestris* (pAP2X), apresenta medidas de viscosidade 100% superiores às demais, sem no entanto alcançar níveis de produção de goma sequer comparáveis àqueles obtidos a partir dos demais substratos testados.

Observa-se, no entanto, no gráfico 8, que a melhor medida de viscosidade de goma produzida a partir de sacarose foi obtida pela linhagem N2, portadora do plasmídio amilolítico pAP2, superando em 20% àquela produzida pela linhagem original Nal^r. Quando observamos a produção de goma a partir de amido por estas mesmas linhagens, vemos que as melhores medidas de viscosidade correspondem à linhagem N2X, portadora do plasmídio pAP2X contendo a inserção do promotor de *X.*

campestris, superando em 100% a produção de goma de todas as demais linhagens. E finalmente, se for levada em consideração a produção de goma xantana a partir de amido e sacarose (AMI+SAC), nota-se que a linhagem original *Nal^r* é superada por todas as demais linhagens portadoras de plasmídios amilolíticos, N2X, N23X, N2 e N23, nesta ordem, tendo a linhagem 2X alcançado valores de viscosidade cerca de 160% mais elevados que a linhagem original.

No caso das linhagens *Cm^r*, a observação do gráfico 9 mostra, em primeiro lugar, que esta linhagem produz significativamente menos goma xantana que a linhagem *Nal^r*. O efeito de aumento de viscosidade da goma produzida em sacarose pelas linhagens portadoras de plasmídios amilolíticos se repete, destacando neste caso as linhagens N2X e N23X, ambas portadoras de plasmídios contendo a inserção do promotor de *Xanthomonas*, as quais alcançaram valores de viscosidade superiores em 160% aos da linhagem original *Cm^r*. Esta última, no entanto, mostrou melhor desempenho na produção de goma a partir de amido, e foi superada em 30% pela linhagem C2X na produção de xantana a partir de amido e sacarose (AMI+SAC).

É importante ainda salientar que, os melhores índices de produção de xantana foram alcançados pelas linhagens portadoras do plasmídio pAP2X em meio contendo amido e sacarose (AMI+SAC) quando a linhagem original *Nal^r* alcança taxa de produção maior em sacarose. A linhagem original *Cm^r*, por sua vez, tem sua taxa de produção de goma igualmente elevada pela adição de amido ao meio contendo sacarose.

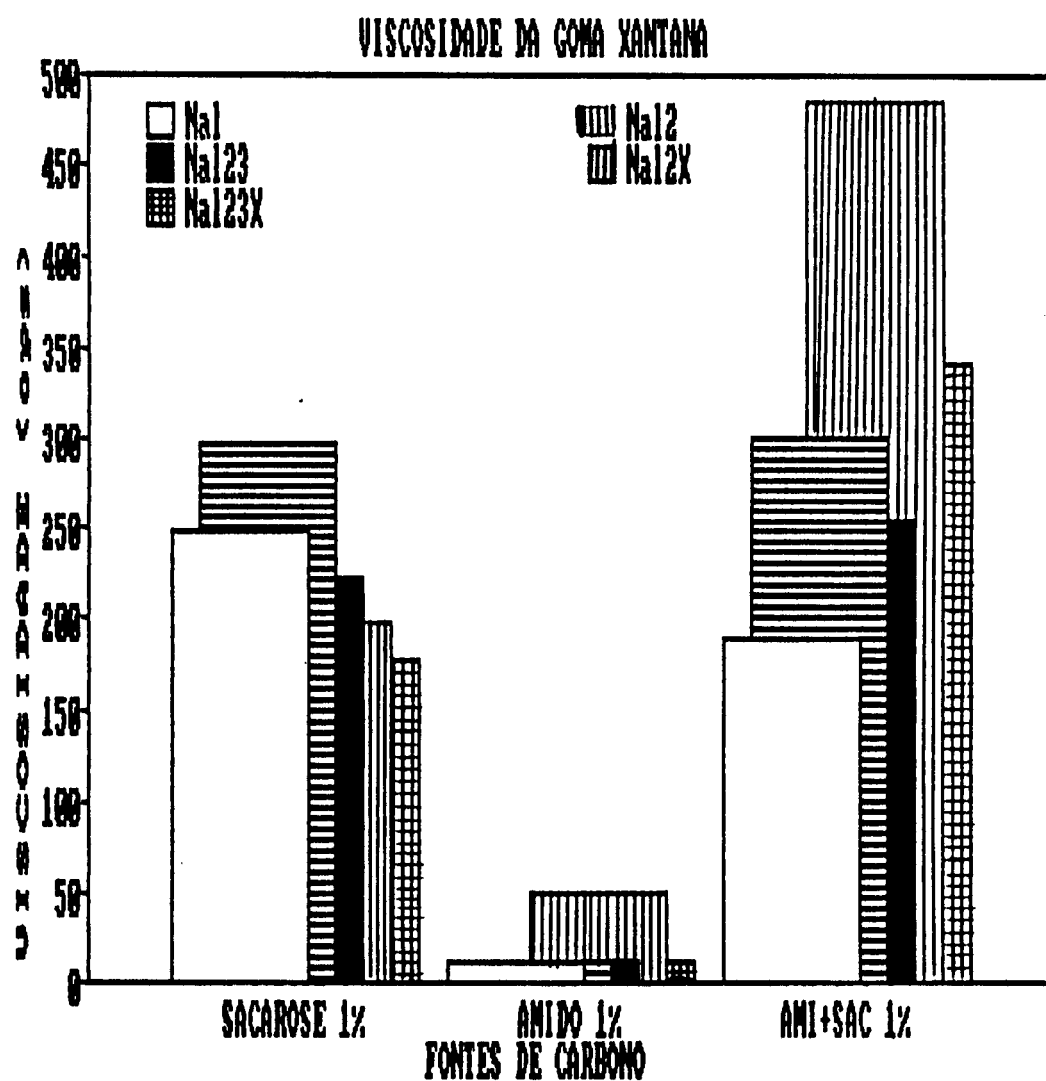


Gráfico 8. Viscosidade do caldo de fermentação de culturas da linhagem 280 NaI^r portadoras dos plasmídios pAP2, pAP23, pAP2X e pAP23X.

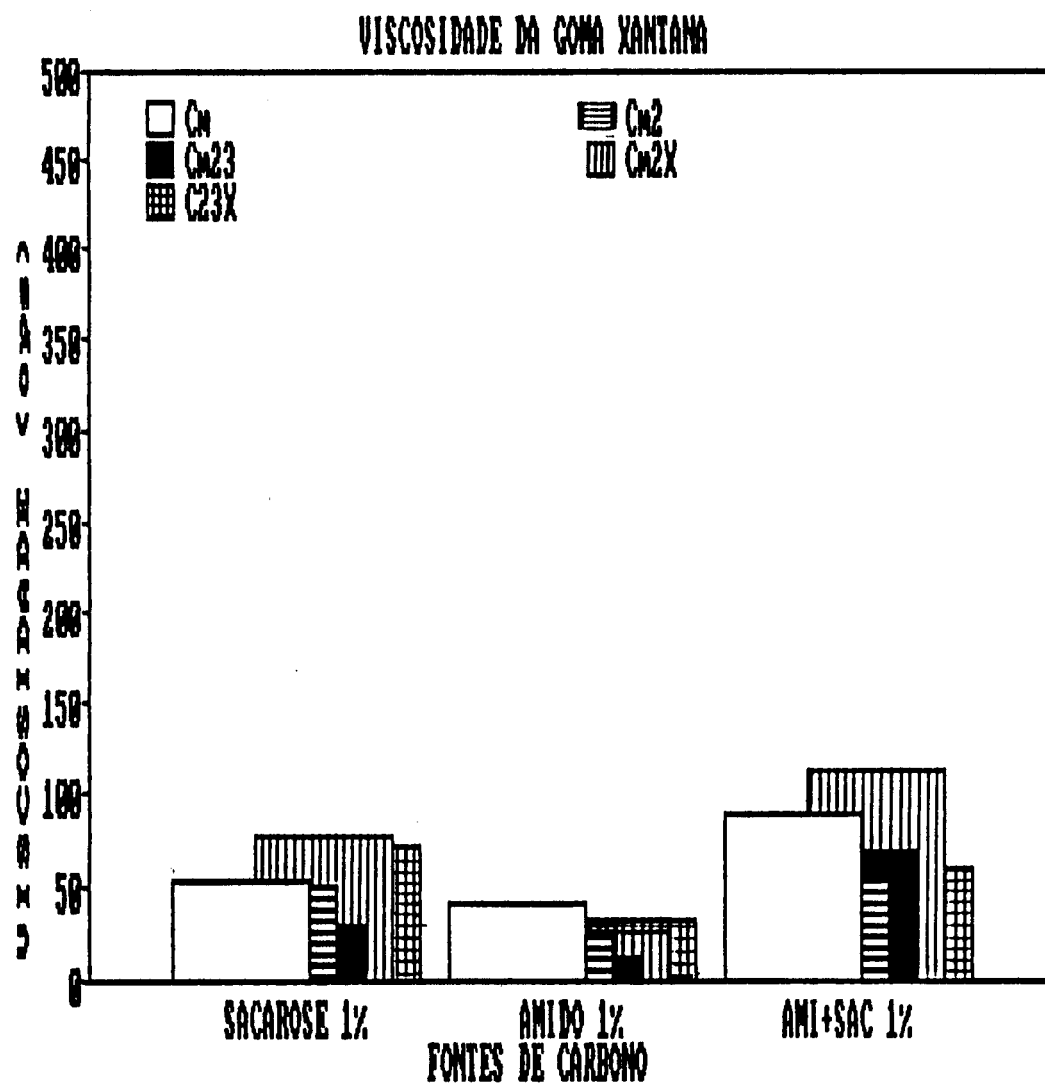


Gráfico 9. Viscosidade do caldo de fermentação de culturas da linhagem REF Cm^r portadoras dos plasmídios pPA2, pAF23, pAF2X e pAF23X.

5. DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DAS LIHAGENS HOSPEDEIRAS:

A partir do momento em que nos propusemos, pelas razões expostas e discutidas nas seções "Introdução" e "Revisão Bibliográfica", a construir um vetor que, quando introduzido em *Xanthomonas campestris*, dotasse sua hospedeira de capacidade amilolítica e se mostrasse estável dentro dessa mesma bactéria, nossa primeira preocupação foi selecionar, a partir da coleção de bactérias existente em nosso laboratório, as hospedeiras mais apropriadas a receber os plasmídios construídos e expressar convenientemente o gene da alfa-amilase neles contidos, com o propósito final de se conseguir a produção de goma xantana a partir de substratos amiláceos.

Para a seleção destas receptoras, quatro características foram observadas: (1) capacidade amilolítica; (2) capacidade de produção de xantana; (3) existência de uma marca cromossômica de resistência a antibióticos, diferente da(s) existente(s) nos vetores a serem introduzidos, que permitisse sua seleção como receptora após as conjugações; e (4) que sua taxa de crescimento não se alterasse significativamente na presença deste(s) antibiótico(s).

Dessa forma, duas linhagens foram selecionadas para serem utilizadas como receptoras dos plasmídios a serem construídos:

(1) 280 Nal^r, portadora da marca cromossômica de resistência ao ácido nalidíxico; originalmente não amilolítica, o que nos permitiu analisar a expressão e regulação do gene *amy* de *Bacillus subtilis* dentro desta hospedeira heteróloga sob diferentes condições de crescimento; e a melhor linhagem existente no laboratório no que diz respeito à produção de goma xantana, o que nos permitiu analisar a possibilidade da produção de xantana a partir de amido.

(2) REF Cm^r, portadora da marca cromossômica de resistência ao cloranfenicol; originalmente amilolítica, o que nos permitiu analisar a possibilidade de se aumentar o nível de produção da alfa-amilase através do aumento do número de cópias do gene responsável pela sua síntese; e boa produtora de goma xantana, ainda que não tanto quanto a linhagem 280 Nal^r. É também a linhagem padrão utilizada na quase totalidade dos trabalhos envolvendo produção de goma xantana.

A taxa de crescimento destas duas linhagens na presença dos antibióticos referentes às suas respectivas marcas cromossômicas foi avaliada e, como pode ser visto através de suas curvas de crescimento mostradas no Gráfico 1, ambas mostraram-se capazes de crescer na presença destes antibióticos tão bem quanto a linhagem REF.

5.2 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDIOS AMILOLÍTICOS:

Uma vez selecionadas as linhagens receptoras, passou-se à construção do plasmídio amilolítico que posteriormente deveria conferir capacidade de degradação de amido às suas hospedeiras. Esse vetor deveria apresentar as seguintes características: (1) origem de replicação compatível com a maquinaria de duplicação de *Xanthomonas campestris*; (2) ser autoconjugativo ou mobilizável com ajuda de um plasmídio mobilizador, a fim de permitir sua posterior introdução em *X. campestris*; (3) possuir marcas de resistência à antibióticos selecionáveis nesta espécie bacteriana, bem como em *E. coli*; (4) conter ao menos um sítio de clonagem disponível, para posterior inserção do *locus* estabilizador *parB*; e (5) conter o gene da alfa-amilase de *B. subtilis* posicionado entre dois sítios de restrição distintos, a fim de possibilitar a abertura do plasmídio unicamente no sítio proximal ("upstream") do gene *amy*, para posterior introdução da sequência promotora a ser clonada de *Xanthomonas*. Desta forma poderíamos colocar o gene *amy* sob o controle do promotor de *Xanthomonas*, de modo a amplificar sua expressão e possibilitar o estudo de sua regulação sob este novo controle gênico, neste novo "background" genético.

Esse vetor (pAP2) foi então construído inserindo-se o gene *amy*, oriundo do plasmídio pASA25, entre os sítios de *EcoR* I e *Hind* III do plasmídio pMFY-40, tendo este último perdido, durante a clonagem,

um fragmento de aproximadamente 31 pb localizado entre os sítios acima citados.

O que motivou a escolha do pMFY-40 como plasmídeo receptor do gene *amy* foi sua reconhecida funcionalidade e capacidade de duplicação em *X. campestris* e o fato de possuir o gene *mob*, o que o torna mobilizável em experimentos de conjugação, enquanto a escolha do pASA25 como doador do gene *amy* deveu-se ao fato de que, neste plasmídeo, este gene encontra-se estrategicamente flanqueado por dois sítios distintos de restrição, compatíveis com aqueles disponíveis no pMFY-40 (5' *EcoR* I e 3' *Hind* III).

Esse tipo de construção dotou ainda o pAP2 de um sítio de *Eco* I disponível para clonagem e introdução do locus *parB* (já que a marca de resistência à ampicilina interrompida por clonagens neste sítio é dispensável para *Xanthomonas*, cuja maioria das linhagens é naturalmente resistente a esse antibiótico), além de uma marca de resistência ao antibiótico tetraciclina, apropriada para seleção tanto em *E. coli* quanto em *X. campestris*.

Feita a construção e uma vez inserida por transformação em *E. coli*, o nível de resistência à tetraciclina condicionado pelo pAP2 mostrou-se inicialmente inferior àquele condicionado pelo pMFY-40, o que pode ser explicado pelo fato de termos lançado mão do sítio de *Hind* III para clonagem do gene *amy*, sítio este localizado no início da sequência codificadora da resistência à tetraciclina. É sabido que

clonagens feitas utilizando-se este sítio (que é o mesmo presente no conhecido vetor pBR322, já que ambos os genes de resistência a antibióticos do pMFY-40 são dele derivados) podem ou não inativar o gene Tet (ASTOLFI-FILHO, comunicação pessoal). No caso do pAP2, a resistência à tetraciclina parece ter sido afetada, porém não de maneira a comprometer sua eficácia como marca seletiva. Essa diferença pode ser notada apenas pelo fato de culturas portadoras do pAP2, semeadas em meio sólido na presença de concentrações normais de tetraciclina, apresentarem crescimento retardado em aproximadamente 12 horas, além de exigirem uma redução pela metade na concentração de antibiótico adicionado para crescimento em meio líquido.

Os clones foram selecionados também por sua capacidade amilolítica, estimada através da formação de halos de amilólise em meio sólido e consumo de amido e formação de açúcar redutor em meio líquido. A expressão da alfa-amilase de *B. subtilis* em *E. coli* é obtida a partir da combinação do promotor original contido na sequência *amy* de 1,6 Kb com uma suposta sequência localizada entre o gene *bla* e o sítio de *EcoR* I do pMFY-40, a qual tornaria o promotor de *Bacillus* funcional em *E. coli* (CASTRO, 1988).

5.3 ISOLAMENTO DAS SEQUÊNCIAS PROMOTORAS:

O passo seguinte à construção do pAP2 foi a clonagem molecular da sequência promotora de *X. campestris* que posteriormente viria a dirigir a transcrição do gene *amy* subclonado no pAP2.

O vetor escolhido como "promoter-probe" foi o plasmídeo pKK232-8, pela variedade de sítios de restrição disponíveis no sítio múltiplo de clonagem ("polilinker") localizado em posição proximal ("upstream") ao gene *cat* desprovido de promotor, bem como pela facilidade da seleção das colônias transformadas com o plasmídeo recombinante após clonagem da sequência promotora: simples seleção para resistência ao cloranfenicol, mostrando que a sequência aleatoriamente inserida no sítio escolhido apresentava atividade promotora, uma vez que fora capaz de ativar a transcrição do gene *cat*.

O sítio escolhido para clonagem do promotor neste plasmídeo foi o de RamH I, o que possibilitava a digestão do DNA genômico de *Xanthomonas* com a enzima Sau 3AI, cujo sítio de reconhecimento e corte, sendo constituído por apenas 4 pb (e não 6 como no caso da maioria das enzimas), possibilita maior número de cortes no DNA genômico, gerando, por conseguinte, fragmentos de digestão menores. O interesse em reduzir o tamanho dos fragmentos a serem clonados deveu-se ao fato de sequências promotoras procarióticas constituírem-se, em geral, de não mais que 200 pb (LEWIN, 1985). Além disso, os 4 pb que

constituem o sítio de restrição da enzima Sau 3AI (GATC) são exatamente os 4 pb centrais do sítio de reconhecimento de RamH I (GGATCC), o que viabiliza a ligação dos fragmentos gerados por digestão com estas duas enzimas, embora não reconstituindo necessariamente ambos os sítios de RamH I após a ligação.

Desta forma, foram clonados diversos fragmentos capazes de ativar a transcrição do gene *cat* do pKK232-8, e o menor deles, contido no plasmídeo denominado pAX1, foi escolhido para dar prosseguimento ao trabalho.

Essa sequência, cujo tamanho é de 600 pb, foi em seguida isolada, purificada e marcada radioativamente a fim de ser utilizada como sonda molecular em hibridizações com filtros contendo DNA genômico de *X. campestris*. Os autoradiogramas resultantes desta hibridização permitem-nos afirmar que este fragmento promotor de 600 pb é realmente oriundo do genoma de *X. campestris*, tendo mostrado homologia com um total de 7 bandas nas diferentes digestões do DNA genômico desta bactéria.

5.4 SUBCLONAGEM DO LOCUS *parB*:

A etapa cumprida a seguir foi a introdução do locus estabilizador *parB* no plasmídeo pAP2. O sítio disponível para essa

clonagem neste plasmídio foi o de Est I, e por esse motivo este foi o sítio escolhido para retirada do fragmento de 1,63 Kb contendo o *locus parB* e o gene *ophA* (Km^r) do plasmídio pKG1022. A existência deste gene de resistência ligado ao *parB* nos foi bastante oportuna, uma vez que nos proporcionou uma marca para seleção dos clones recombinantes portadores da inserção do *parB*.

O vetor resultante desta construção foi denominado pAP23 e estava agora pronto para receber a inserção da sequência promotora clonada de *X. campestris*, de maneira a colocar sob seu controle o gene *amy* já subclonado neste plasmídio.

O sentido da inserção do fragmento de 1,63 Kb, contendo o *locus parB* e o gene *ophA*, no plasmídio pAP23 pode ser verificado pelo tamanho do fragmento gerado pela digestão com a enzima EcoR I (aproximadamente 1,8 Kb). Caso a inserção tivesse acontecido no sentido inverso ao exposto na Figura 9, o fragmento gerado após digestão com EcoR I teria um tamanho aproximado de 1,3 Kb.

5.5 SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA PROMOTORA:

Para esta última clonagem, o sítio disponível no pAP23 era o de EcoR I, e por este motivo esta foi a enzima escolhida para retirar do pAX1 a sequência promotora, ainda que com essa digestão levássemos

junto ao fragmento de 600 pb do promotor uma sequência adicional de 300 pb pertencente ao vetor original pKK232-8.

A digestão com EcoR I do vetor pAP23, que o preparou para receber a sequência promotora, levou à liberação de um fragmento de 1,8 Kb contendo o gene *amyA*, fazendo com que a construção final obtida após ligação do promotor perdesse a marca seletiva de resistência à canamicina.

Uma vez feita a ligação EcoR I/EcoR I, obtivemos, como nos havíamos proposto, um plasmídio compatível com *Xanthomonas campestris* e portador do gene *amy* de *B. subtilis* sob o controle do promotor de *X. campestris*, além do locus estabilizador *parB*. Esta construção final foi denominada pAP23X.

Foi feita ainda a ligação da sequência promotora de 0,9 Kb também no plasmídio pAP2 (pAP23 menos *parB*), a fim de compararmos posteriormente a eficiência da expressão da alfa-amilase dirigida por cada um desses plasmídios intermediários à construção final obtida (pAP23X). Este último plasmídio construído foi denominado pAP2X.

é importante lembrar que a ligação do promotor de *Xanthomonas* "upstream" ao gene *amy* de *Bacillus*, tanto no pAP2X quanto no pAP23X, foi feita sem que o promotor original deste gene tivesse sido previamente retirado. Isso dota, na realidade, o gene *amy* contido neste plasmídio de dois promotores. A hipótese, porém, de que a

presença desse promotor original pudesse trazer qualquer prejuízo à eficiência de ligação da RNA polimerase de *X. campestris* ao seu próprio promotor nos parece bastante improvável, uma vez que, sendo esta última uma sequência promotora específica de *Xanthomonas*, seu reconhecimento como tal pela RNA polimerase de bactérias da mesma espécie deva ser mais eficiente e a ligação com esta última bem mais estável do que com sequências promotoras heterólogas.

Existe ainda a possibilidade de que a RNA polimerase de *X. campestris* utilize ambos os promotores disponíveis para dar início à transcrição de *amy*, e neste caso, talvez a simples presença de dois, e não um único sítio de reconhecimento para esta enzima, venha a concorrer para o aumento esperado no nível de transcrição deste gene.

5.6. ESTABILIDADE DOS PLASMÍDIOS CONSTRUÍDOS EM *X. campestris*:

O primeiro requisito para que um plasmídio expresse eficientemente um gene do qual é portador consiste em sua capacidade de se manter estável dentro de sua hospedeira durante a duplicação celular, passando às células filhas a cada evento de divisão. Para garantir este comportamento aos plasmídios construídos, dois deles foram dotados do locus estabilizador *parB*, e os resultados dos testes de estabilidade realizados mostram que as construções contendo este locus gênico são significativamente mais estáveis que aquelas

desprovidas desse sistema estabilizador, ainda que a estabilização por nós conseguida não se iguale àquela descrita por GERDS (1988) para plasmídios igualmente derivados do RSF1010 quando inseridos em *Pseudomonas putida*.

GERDS, no entanto, estima o nível de estabilização atingido após a inserção do *locus parB* em seus plasmídios em termos de perda plasmidial por célula por geração. Este tipo de experimento leva em consideração apenas os índices de perda plasmidial das primeiras 10 ou 12 gerações, em um tempo máximo de crescimento igual a 12 horas. No caso deste trabalho, no entanto, interessava que os plasmídios permanecessem estáveis em *Xanthomonas* por pelo menos 24 horas, uma vez que é esse o tempo necessário para o crescimento do pré-inóculo para fermentação da goma xantana. Após este período de crescimento em meio rico, as células são então transferidas para um meio de fermentação onde, devido ao balanço nitrogênio/carbono presente (baixa concentração de nitrogênio e alta de carbono) ocorre pouco crescimento celular e baixa atividade metabólica. Essas condições levam à suposição de que as primeiras 24 horas de crescimento do pré-inóculo sejam as mais importantes no que diz respeito à síntese enzimática e que requeiram, portanto, uma maior estabilidade do plasmídio contendo o gene da alfa-amilase.

Para este período de tempo (24h), a taxa de perda plasmidial para bactérias contendo o plasmídio portador de *parB* (Nal/pAP23 e Cm/pAP23) é de, respectivamente, 4% e 2,7%, contra 66% e 74% para

linhagens portadoras de plasmídios sem o *locus parB* (Nal^r e Cm, respectivamente), o que resulta em níveis de estabilização 16 e 27 maiores para cada caso, respectivamente.

A maior instabilidade observada após as primeiras 24 horas para os plasmídios inseridos na linhagem 280 Nal^r, em comparação com aqueles inseridos na linhagem REF Cm^r, está de acordo com os dados obtidos por STRIPECKE (1988), que ao medir a porcentagem de perda do plasmídio pAF1 (semelhante ao pAF2) nas mesmas linhagens receptoras, observou uma maior instabilidade do mesmo quando a hospedeira era a linhagem 280 Nal^r.

O fato da linhagem 280 Nal^r apresentar plasmídios nativos pode ter contribuído para a diminuição da eficiência de estabilização plasmidial promovida por *parB*, uma vez que a perda do plasmídio introduzido pode ser atribuída ao fenômeno de incompatibilidade plasmidial. Novos estudos são necessários a fim de confirmar esta hipótese, incluindo-se a caracterização do grupo de incompatibilidade ao qual pertencem os plasmídios nativos da linhagem 280 Nal^r.

5.7 PRODUÇÃO DE ALFA-AMILASE POR LINHAGENS DE *X. campestris*:

Concluída a etapa das construções plasmídias e sua introdução nas linhagens selecionadas de *X. campestris*, foram

estabelecidas as curvas de produção de alfa-amilase para as diferentes linhagens obtidas. O primeiro ponto que chama a atenção na observação dos resultados expostos nos gráficos 4 e 5 relaciona-se ao tempo necessário a estas linhagens para atingir o pico de produção de alfa-amilase (mais de 26 horas), tempo este superior aquele utilizado para crescimento das linhagens visando a a produção de goma xantana (24 horas de pré-inóculo).

Este tipo de comportamento, no que diz respeito às curvas de atividade específica de alfa-amilase, difere daquele observado para este mesmo tipo de curvas obtidas por PRUDENCE e colaboradores (1989) para linhagens de *B. subtilis* que expressavam um gene *amy* clonado de *B. amyloliquefaciens*. No trabalho em questão, a gráfico obtido para atividade específica de alfa-amilase mostra-se como uma curva crescente a partir de 2 horas de crescimento celular até cerca de 45 horas, quando o pico de atividade é atingido e o crescimento da curva estaciona. Já os dados de LINARDI (1975), no entanto, mostram que a produção de alfa-amilase endógena por *B. amyloliquefaciens* é residual até cerca de 12 horas de crescimento, aumentando linearmente até 72 horas de crescimento bacteriano, onde atinge seu índice máximo. A existência de dados conflitantes no que diz respeito à cinética de produção de alfa-amilases em diferentes hospedeiros reflete a interferência do metabolismo particular e sistemas de regulação gênica de cada hospedeiro na expressão final do gene em questão.

É interessante notar que as curvas de atividade específica de alfa-amilase das linhagens Cm^r apresentam uma relativa estabilização dos níveis de atividade enzimática entre os pontos de 27 e 30 horas, o que não é observado para as mesmas curvas no que diz respeito às linhagens Na^r. Isto pode ser atribuído à expressão possivelmente retardada da alfa-amilase endógena de *X. campestris* em comparação àquela de *B. subtilis* introduzida através dos plasmídios.

Ainda no que diz respeito ao traçado geral das curvas obtidas, vemos que os resultados expostos nos gráficos 6 e 7 para as curvas de atividade específica (A.E.) de alfa-amilase mostram a ocorrência de dois picos (12 e 27 horas) separados por um vale (18 horas). Este efeito tem origem na variação da produção de proteína total extracelular pelas mesmas linhagens, a qual inicia quase nula (12 horas), apresenta um pico às 18 horas, fazendo cair os valores de atividade específica neste ponto, e estabiliza-se até as 30 horas, o que, somado ao aumento real da produção desta enzima neste ponto, promove o aparecimento do pico de A.E. das 30 horas. Este traçado particular obtido para as curvas de atividade específica de alfa-amilase não encontra paralelo nos trabalhos de PRUDENCE e colaboradores (1989) ou de LINARDI (1975), os quais mostram curvas de atividade específica sempre crescentes a partir do ponto inicial de leitura.

5.7.1 O efeito da glicose

Uma vez que dados da literatura mostravam que, de modo geral, a síntese das alfa-amilases de *B. subtilis* está sujeita à algum tipo de repressão por glicose (HEINEKEN & O'CONNOR, 1972), foram realizados testes de produção de alfa-amilase pelas linhagens portadoras dos diferentes plasmídios construídos tanto em presença quanto na ausência de glicose.

Os resultados obtidos mostram que a adição de glicose ao meio de cultura causou um pequeno efeito de redução na expressão do gene *amy* nas linhagens Nal^r , o efeito inverso tendo ocorrido, no entanto, no que diz respeito às linhagens Cm^r . Este comportamento nos leva a supor que o promotor do gene *amy* de *B. subtilis* seja realmente passível de repressão por glicose em seu hospedeiro original, e que este efeito esteja bastante reduzido em *X. campestris* devido às diferenças existentes entre os mecanismos de regulação gênica destes dois gêneros de bactérias. Esta hipótese fica corroborada pelas observações de SETLOW (1973) e ULLMAN (1974) que mostraram que embora o "efeito glicose" ocorra em *B. subtilis* o efector deste mecanismo de controle não parece ser, como ocorre nas demais bactérias gram-negativas, o AMPc. Uma vez que os promotores passíveis de repressão catabólica em *B. subtilis* (como o do gene *amy* em questão) não parecem ser regulados por variações dos níveis de AMPc intracelular, e como este último parece ser o principal efector do "efeito glicose" em todas as demais bactérias gram-negativas, parece possível que esta diferença

de efetores de regulação seja a causa da diminuição do efeito de repressão por glicose sobre o gene *amy* de *B. subtilis* quando em *X. campestris*.

No caso das linhagens *Cm^r*, onde a adição de glicose ao meio de crescimento mostra efeito inverso aquele acima descrito, o efeito de repressão do gene *amy* exógeno (oriundo de *B. subtilis*) pode ter sido mascarado pela produção endógena de alfa-amilase que esta linhagem já apresenta mesmo na ausência dos plasmídios amilolíticos. Esta produção de alfa-amilase a partir do gene da própria *Xanthomonas* não está sujeita à repressão catabólica, como mostram os resultados dos gráficos 5 e 7 corroborados pela análise estatística dos dados contida nos apêndices 7 à 12 e 19 à 24. Como a glicose vem a ser uma fonte de carbono de metabolização mais fácil e rápida do que aquela presente no meio L, as linhagens *Cm^r* tendem mesmo a aumentar a síntese de alfa-amilase na presença deste açúcar, pelo simples efeito do aumento geral de suas funções metabólicas promovido pela utilização da glicose como fonte de carbono.

5.7.2 O efeito do locus *parB*

Uma vez que, como já foi discutido no item 5.6, o primeiro requisito para garantir a boa expressão de qualquer gene episssomal é a manutenção do plasmídio que o contém de maneira estável dentro de sua célula hospedeira, a inserção do locus *parB* nos plasmídios

amilolíticos parecia um bom recurso para conseguir o aumento da expressão do gene *amy* neles contidos.

O que se pode observar, no entanto, foi que todas as linhagens portadoras de plasmídios contendo a inserção do locus *parB* apresentaram níveis de produção de alfa-amilase inferiores aqueles observados para suas correspondentes portadoras de plasmídios onde este locus não fora inserido. Possivelmente, o tipo de estabilização promovida por *parB*, como descrito por GERDS e colaboradores (1988), tenha-se revelado na verdade um ônus metabólico muito grande à célula hospedeira, que tendo parte de seu metabolismo comprometido pelo processo de estabilização plasmidial, mostra-se menos apta a desempenhar suas demais funções metabólicas. Este efeito pode também explicar o fato de que a estabilização promovida por *parB* em *X. campestris*, como mostram os dados discutidos no item 5.6 acima, não tenha se mostrado tão eficiente quanto aquela observada para outras bactérias gram-negativas, como descrito por GERDS (1988).

5.7.3 O efeito do promotor de *X. campestris*

A baixa expressão do gene *amy* de *B. subtilis* em *X. campestris* poderia ser atribuída, segundo o exposto no item "Revisão Bibliográfica", ao fato de que o promotor original deste gene, sendo oriundo de *Bacillus*, não se adequasse ao aparato transcricional de *Xanthomonas*. Devido à escassez de dados a respeito da regulação do

gene *amy* utilizado neste trabalho, várias hipóteses de trabalho foram levantadas:

(a) O promotor do gene *amy* em questão, apesar de se constituir em uma sequência consenso, não se mostrava apropriado para dirigir a transcrição deste gene em *X. campestris*.

(b) O promotor do gene *amy* de *B. subtilis* é dependente da atuação de uma molécula reguladora positiva para ser adequadamente reconhecido pela RNA polimerase, mecanismo semelhante ao descrito por ROSEMBERG & COURT (1979), e este regulador encontra-se ausente em células de *X. campestris*.

(c) O gene *amy* de *B. subtilis* é um gene originalmente ativado por substituição da subunidade sigma predominante (sigma 43) da RNA polimerase de *Bacillus* por uma de suas 5 outras subunidades sigma disponíveis nesta bactéria (CHAMBERLIN, 1974; ISHIHAMA, 1978), como ocorre na ativação de genes durante a esporulação. A não ocorrência deste tipo de interconversão da RNA polimerase, ou a não existência a subunidade sigma adequada ao reconhecimento deste promotor na célula hospedeira, prejudicaria a expressão de *amy* em *Xanthomonas*.

Em qualquer das hipóteses, permanecia o fato de que a transcrição do gene *amy* de *Bacillus subtilis* parecia deficiente em *Xanthomonas campestris*, e que a subclonagem de um promotor de *Xanthomonas* "upstream" a esse gene deveria melhorar sua expressão

independente da presença do promotor original de *B. subtilis*.

Realmente, os dados expostos nos gráficos 4, 5, 6 e 7 e corroborados pela análise estatística contida nos apêndices de 1 à 24, mostram que as linhagens de *X. campestris* portadoras de plasmídios contendo a inserção de seu promotor homólogo produzem significativamente mais alfa-amilase que suas correspondentes.

Obtivemos, após introdução destes plasmídios amilolíticos construídos, linhagens Cm^r capazes de produzir 100% mais alfa-amilase (C2X) que a linhagem amilolítica original e linhagens Nal^r capazes de produzir 300% mais alfa-amilase (N2X) que a linhagem original não amilolítica, o que demonstra a atuação significativa do promotor de *X. campestris* sobre a expressão do gene *amy* clonado, superando as deficiências do promotor heterólogo original.

Os níveis de atividade específica de alfa-amilase obtidos pelas linhagens Cm^r portadoras de plasmídios amilolíticos contendo a inserção do promotor de *Xanthomonas campestris* são equivalentes àqueles obtidos por PRUDENCE e colaboradores (1989) para linhagens de *B. subtilis* que expressam o gene de alfa-amilase clonado de *B. amyloliquefaciens*. No caso destas linhagens de *B. subtilis*, no entanto, o pico de atividade enzimática só é alcançado após cerca de 40 horas de crescimento celular, enquanto no caso das linhagens de *X. campestris* portadoras do pAP2X este pico de atividade encontra-se em torno das primeiras 27 horas de crescimento, iniciando o decaimento

logo após este período.

A equivalência dos níveis de atividade específica obtidos nos dois hospedeiros acima citados descarta a hipótese de que a alfa-amilase, sendo uma enzima que prescinde de modificações pós-transcricionais para garantir sua atividade (VAN DIJL, 1988) tivesse seu nível de expressão prejudicado em um hospedeiro heterólogo (no caso, *X. campestris*).

Os níveis de atividade específica máximos atingidos pelas linhagens *Nal^r*, no entanto, ficam um pouco aquém daqueles obtidos para as linhagens *Cm^r*, embora os gráficos de produção enzimática (U de alfa-amilase) mostrem que as linhagens *Nal^r* portadoras de plasmídios contendo a inserção do promotor de *X. campestris* atingem picos de produção desta enzima comparáveis àqueles das linhagens *Cm^r*. Este comportamento pode ser atribuído à alta produção de proteína total por linhagens *Nal^r*, a qual chega alcançar o dobro daquela alcançada por linhagens *Cm^r*, o que causa a queda nos valores obtidos para atividade específica de alfa-amilase das linhagens *Nal^r*.

Uma vez que mesmo na ausência do promotor de *Xanthomonas* o gene *amy* de *Bacillus* é expresso nesta bactéria, é possível que ocorra, nos casos de bactérias portadoras de plasmídios contendo dois promotores "upstream" ao gene *amy*, a utilização de ambos os promotores presentes (o promotor original de *B. subtilis* e aquele clonado de *X. campestris* posicionado "upstream" ao anterior) para dar início à

transcrição da alfa-amilase, de modo que o aumento observado para a taxa de síntese desta enzima se deva não apenas a presença de um promotor compatível com o aparato transcricional de *X. campestris*, mas também a existência de dois sítios disponíveis para ligação da RNA polimerase.

5.8 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA:

Os testes de fermentação realizados a fim de determinar a capacidade de produção de goma xantana pelas linhagens contendo os plasmídios construídos mostraram que nenhuma das linhagens testadas foi capaz de produzir goma xantana a níveis satisfatórios tendo o amido como única fonte de carbono.

A característica amilolítica de que foram dotadas, no entanto, parece conferir a estas linhagens melhor capacidade de aproveitamento dos substratos, quer se trate de amido, sacarose ou de ambos, já que, em todos os casos, as linhagens portadoras de plasmídios amilolíticos apareceram como as melhores produtoras de goma xantana, exceção feita apenas à produção de goma a partir de amido por linhagens Cm^r, onde a linhagem original Cm se sobressai sobre as demais.

Além disso, os maiores valores para viscosidade de goma xantana foram obtidos por linhagens amilolíticas crescidas em amido e sacarose (AMI+SAC). Mesmo quando se compara a linhagem Cm^r desprovida de plasmídios, porém originalmente amilolítica, seu desempenho é melhor em amido+sacarose do que em sacarose apenas, o que não ocorre com a linhagem original Nal^r (não amilolítica), que apresenta seu melhor desempenho em sacarose.

Estes dados levam à suposição de que, a razão pela qual nenhuma das linhagens é capaz de utilizar o amido como único substrato para produção de goma xantana, reside no fato de que, apesar de todo o amido contido no meio de cultura estar sendo degradado, as linhagens de *Xanthomonas* não estão sendo capazes de utilizar integralmente estes produtos de degradação para a produção da goma. Isto poderia explicar a baixa produção de goma em amido, que tende a aumentar com o aumento da produção de alfa-amilase pela hospedeira. Explicaria também o aumento da produção de goma devido à adição de amido ao meio contendo sacarose, fenômeno este que só ocorre com as linhagens amilolíticas (todas menos Nal).

Como já foi comentado anteriormente, a alfa-amilase cujo gene foi utilizado no presente trabalho não foi ainda caracterizada quanto aos seus produtos de degradação, entretanto conhece-se que, em geral, o principal produto de hidrólise do amido por alfa-amilases é a maltose seguida de glicose (KUESITADZE & DUALI, 1982). As linhagens de *X. campestris* utilizadas mostraram-se perfeitamente capazes de

crescer em meio mínimo contendo apenas maltose como fonte de carbono, embora cresçam reconhecidamente melhor em glicose. Uma melhor caracterização dos produtos de degradação obtidos após tratamento do amido por esta alfa-amilase de *B. subtilis* é, pois, uma etapa necessária a fim de determinar quais os tipos de bloqueios impedem a conversão dos produtos de hidrólise do amido em goma xantana.

5.9 PERSPECTIVAS:

Acreditamos que alguns estudos complementares se mostram necessários a fim de complementar os resultados obtidos por este trabalho, tais como:

(a) Caracterização do menor fragmento de DNA que contém o promotor de *X. campestris* dentro dos 600 pb clonados.

(b) Sequenciamento desta sequência promotora.

(c) Comparação da sequência obtida com um "banco de promotores" a fim de determinar homologias e variações de sequência que possam ajudar a interpretar o funcionamento *in vivo* deste promotor.

(d) Análise dos produtos de degradação do amido pela alfa-amilase de *B. subtilis*.

(e) De acordo com os resultados obtidos em (d) estudar as vantagens da introdução de genes de outras enzimas desramificadoras ou exoamilases nas linhagens de *Xanthomonas*, visando obter produtos de degradação do amido mais acessíveis à maquinaria metabólica destas bactérias.

Além disso, no intuito de conseguir a produção de goma xantana tendo o amido como único substrato, acreditamos que torna-se necessário um maior conhecimento do ciclo biossintético da goma xantana, em especial de suas primeiras etapas que envolvem a incorporação de açúcares simples e sua conversão em derivados nucleotídicos (IELPI & cols., 1981).

6. ABSTRACT

Xanthomonas campestris is a phytopathogenic bacteria responsible for the black rot of crucifers and a variety of other economically important plant diseases, and which produces an exopolisacharide with large industrial applications known as xanthan gum.

Promoter sequences isolated from *X. campestris* were cloned and four plasmids harboring the *amy* gene of *B. subtilis* were constructed in order to obtain strains showing high expression of the alpha-amylase gene and thus potentially capable to use starch in fermentation processes. The new plasmids constructed were: (i) pAP2, which contains the *amy* gene under the control of its original promoter of *Bacillus*; (ii) pAP2X, which contains an additional promoter of *X. campestris* placed upstream of the *amy* gene; (iii) pAP23, obtained upon introduction of the stabilizer *locus parB* in pAP2; and (iv) pAP23X, obtained upon introduction of the *Xanthomonas* promoter sequence in pAP23.

Analysis of the stabilization levels obtained after the introduction of *parB* in pAP2 showed a reduction of up to 27 times in the loss rate of plasmid containig this *locus*.

Quantification of the alpha-amylase production by the 8 strains obtained after the introduction of the new plasmids in *X. campestris* showed that, strains containig both *Bacillus* and *Xanthomonas* promoters were able to produce up to 300% more alpha-amylase than strains lacking those plasmids.

Although none of the strains tested has been able to produce xanthan gum from starch, the amylolytic character introduced improved their capacity to utilize starch containing media (starch and starch plus sucrose) for the production of this biopolymer. The highest level of xanthan production was achieved by strain N2X, which harbours the amylolytic plasmid with the insertion of the *X. campestris* promoter (pAP2X)..

These results show that there are promising possibilities for the production of xanthan gum utilizing starch as the unique carbon source, although additional studies involving characterization of the hydrolysis products of the alpha-amylase gene cloned from *B. subtilis* and their utilization by strains of *X. campestris* should still be carried out.

7. APÊNDICES

Os apêndices de 1 à 24 referem-se à análise estatística (Análise de Variância e Teste de Tukey) dos dados de produção de alfa-amilase pelas linhagens construídas. Nestes, as convenções utilizadas para as análises foram:

- Trat 1 = dados em triplicata dos valores de produção de alfa-amilase da linhagem 280 Nal^r crescida em presença de glicose.
- Trat 2 = idem para a linhagem 280 Nal^r crescida sem glicose.
- Trat 3 = idem para a linhagem N2 crescida em glicose.
- Trat 4 = idem para a linhagem N2 crescida sem glicose.
- Trat 5 = idem para a linhagem N23 crescida em glicose.
- Trat 6 = idem para a linhagem N23 crescida sem glicose.
- Trat 7 = idem para a linhagem N2X crescida em glicose.
- Trat 8 = idem para a linhagem N2X crescida sem glicose.
- Trat 9 = idem para a linhagem N23X crescida em glicose.
- Trat 10 = idem para a linhagem N23X crescida sem glicose.

Estas mesmas convenções repetem-se para as linhagens Cm^r, nesta mesma ordem.

O símbolo *** que aparece na frente dos dados obtidos para F indica que o valor em questão é significativo a nível de 0,1%.

Alfa-Amilase (U) - 12h

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	0.23	1.58	3.49	3.60	0.18	1.63	4.23
	0.22	1.63	3.56	3.62	0.15	1.59	4.32
	0.30	1.59	3.51	3.70	0.11	1.70	4.65
TOTAL	0.75	4.80	10.56	10.92	0.44	4.92	17.20
MEDIA	0.250	1.600	3.520	3.640	0.100	1.640	4.400
S.D.	0.0436	0.0265	0.0360	0.0329	0.0100	0.0357	0.0211
S.E.	0.0258	0.0153	0.0200	0.0305	0.0123	0.0321	0.1277

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	8.98	5.86	6.03
	9.04	5.95	6.10
	9.04	5.89	6.14
TOTAL	27.06	17.70	18.27
MEDIA	9.020	5.900	6.090
S.D.	0.0345	0.0450	0.0557
S.E.	0.0199	0.0264	0.0337

	SO	GI	OM	T
Tratamentos	236.920000	9	26.324400	3221.6644
Residuo	0.131897	20	0.006595	
Total	237.052000	29		

Desvio padrao residual (s): 0.00121 C.V. = 2.1%

TUKEY 5%

TRAT 8	9.020 a
TRAT 7	6.400 b
TRAT 10	6.090 c
TRAT 9	5.900 c
TRAT 4	3.640 d
TRAT 3	3.520 d
TRAT 6	1.640 e
TRAT 2	1.600 e
TRAT 1	0.250 f
TRAT 5	0.180 f

DMS= 0.235

ANALISE DE REGRESSÃO (ANOVA) - 1994

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	1.59	1.72	3.67	4.05	2.06	1.85	11.00
	1.63	1.86	3.92	4.06	1.90	1.76	11.21
	1.58	1.64	4.05	4.13	2.00	1.97	11.27
TOTAL	4.80	5.22	11.64	12.24	6.06	5.58	33.28
MEDIA	1.600	1.740	3.880	4.080	2.020	1.860	11.400
S.D.	0.0265	0.1114	0.1931	0.0435	0.0400	0.1054	0.5022
S.E.	0.0153	0.0643	0.1115	0.0251	0.0200	0.0700	0.2200

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	10.75	9.86	9.74
	10.76	9.95	9.71
	10.69	9.86	9.62
TOTAL	32.40	29.67	29.07
MEDIA	10.800	9.890	9.690
S.D.	0.1417	0.0523	0.0623
S.E.	0.0810	0.0302	0.0359

	SS	GL	QM	F
Tratamentos	476.077000	9	52.897500	1534.30***
Resíduo	0.688599	90	0.034430	
Total	476.766000	99		

Desvio padrão residual (s): 0.18555 C.V. = 3.3%

TUKEY 5%

TRAT 7	11.400	a
TRAT 8	10.800	b
TRAT 9	9.890	c
TRAT 10	9.690	c
TRAT 4	4.080	d
TRAT 3	3.880	d
TRAT 5	2.020	e
TRAT 6	1.860	e
TRAT 2	1.740	e
TRAT 1	1.600	e

DMST = 0.537

ANALISA DE REGRESSÃO (C) - 1971

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	7.89	7.70	16.01	19.00	7.32	11.60	16.01
	7.97	7.76	15.99	19.73	7.63	11.63	16.20
	7.90	7.79	16.00	19.75	7.67	11.63	16.09
TOTAL	23.76	23.33	48.00	59.20	22.62	34.84	48.60
MEDIA	7.920	7.777	16.000	19.760	7.540	11.620	16.200
S.D.	0.0438	0.0149	0.0096	0.0350	0.1916	0.0175	0.1070
S.E.	0.0253	0.0086	0.0055	0.0507	0.1106	0.0101	0.0434

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	15.86	11.96	15.06
	15.75	12.02	15.03
	15.79	12.05	15.18
TOTAL	47.40	36.03	45.27
MEDIA	15.800	12.010	15.090
S.D.	0.0552	0.0459	0.0795
S.E.	0.0319	0.0265	0.0459

	SO	BL	OH	F
Tratamentos	488.771000	9	54.307900	8457.97***
Residuo	0.128418	20	0.006421	
Total	488.899000	29		
Desvio padrao residual (s):	0.00011		C.V. = 0.6%	

TUKEY 5%

TRAT 4	19.760	a
TRAT 7	16.200	b
TRAT 3	16.000	bc
TRAT 8	15.800	c
TRAT 10	15.090	d
TRAT 9	12.010	e
TRAT 6	11.620	f
TRAT 1	7.920	g
TRAT 2	7.777	g
TRAT 5	7.540	h

DMS = 0.232

Alfa-Amilase (U) - 30h

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	8.25	7.89	10.89	19.87	7.53	11.53	22.63
	7.53	7.88	10.53	19.65	7.02	11.87	22.68
	7.98	7.87	10.38	19.76	8.07	11.46	22.49
TOTAL	23.76	23.64	31.80	59.28	22.62	34.86	67.80
MEDIA	7.920	7.880	10.600	19.760	7.540	11.620	22.600
S.D.	0.3637	0.0100	0.2620	0.1099	0.5251	0.2193	0.0982
S.E.	0.2100	0.0057	0.1513	0.0635	0.3031	0.1266	0.0567

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	21.00	17.96	19.72
	22.01	18.32	19.86
	20.29	17.78	19.97
TOTAL	63.30	54.06	59.55
MEDIA	21.100	18.020	19.850
S.D.	0.8644	0.2750	0.1250
S.E.	0.4990	0.1588	0.0722

	80	81	82	F
Tratamentos	1009.68	9	112.187	810.58***
Residuo	2.77	20	0.138	
Total	1012.45	29		

Desvio padrao residual (s): 0.372 C.V. = 2.5X

TUKEY 5X	
TRAT 7	22.600 a
TRAT 8	21.100 b
TRAT 10	19.850 c
TRAT 4	19.760 c
TRAT 9	18.020 d
TRAT 6	11.620 e
TRAT 3	10.600 e
TRAT 1	7.920 f
TRAT 2	7.880 f
TRAT 5	7.540 f
DMS=	1.076

1-FA-Qualidade (U) - 40L

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	9.15	9.58	10.98	21.92	11.36	12.56	23.72
	9.18	9.50	11.96	23.27	11.40	11.98	23.68
	9.15	9.48	12.58	22.73	11.38	13.02	23.70
TOTAL	27.48	28.56	35.52	67.92	34.14	37.56	71.10
MEDIA	9.160	9.520	11.840	22.640	11.380	12.520	23.700
S.D.	0.0163	0.0527	0.0067	0.6793	0.0175	0.5212	0.0135
S.E.	0.0094	0.0304	0.0650	0.3922	0.0113	0.3007	0.0070

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	28.70	20.06	21.20
	29.81	21.01	21.32
	27.59	18.99	21.20
TOTAL	86.10	60.06	63.72
MEDIA	28.700	20.020	21.240
S.D.	1.1101	1.0106	0.0699
S.E.	0.6409	0.5835	0.0403

	80	0L	0M	F
Tratamentos	1309.00	9	145.444	398.06***
Residuo	7.29	20	0.365	
Total	1316.29	29		

Desvio padrão residual (s): 0.604 C.V. = 3.5%

TUKEY 5%	
TRAT 8	28.700 a
TRAT 7	23.700 b
TRAT 4	22.640 bc
TRAT 10	21.240 cd
TRAT 9	20.020 d
TRAT 6	12.520 e
TRAT 3	11.840 e
TRAT 5	11.380 e
TRAT 2	9.520 f
TRAT 1	9.160 f
DMS=	1.747

Alpha-Amilase (U) - 55h

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	4.34	5.69	23.75	22.62	13.20	10.30	27.98
	4.46	5.73	23.98	22.95	13.30	10.46	29.00
	4.52	5.68	24.15	23.01	12.96	10.20	30.72
TOTAL	13.32	17.10	71.80	68.58	39.54	30.96	88.50
MEDIA	4.440	5.700	23.960	22.860	13.180	10.320	29.500
S.D.	0.0916	0.0265	0.2010	0.2101	0.2100	0.1011	1.3744
S.E.	0.0529	0.0153	0.1161	0.1213	0.1217	0.0757	0.8050

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	27.59	25.63	26.03
	27.59	25.93	26.99
	27.62	24.40	27.65
TOTAL	82.80	75.96	80.67
MEDIA	27.600	25.320	26.890
S.D.	0.0221	0.8100	0.8140
S.E.	0.0128	0.4681	0.4704

	SQ	QL	QM	F
Tratamentos	2472.00	9	274.666	802.79xxx
Residuo	6.84	20	0.342	
Total	2478.84	29		

Desvio padrao residual (s): 0.585 C.V. = 3.1%

TUKEY 5%

TRAT 7	29.500	a
TRAT 8	27.600	b
TRAT 10	26.890	bc
TRAT 9	25.320	cd
TRAT 3	23.960	de
TRAT 4	22.860	e
TRAT 5	13.180	f
TRAT 6	10.320	g
TRAT 2	5.700	h
TRAT 1	4.440	h

DMS = 1.692

Alfa-Amilase (U) - 12h - (cm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	4.72	3.35	2.01	3.05	2.92	0.59	2.95
	4.69	3.32	2.03	3.02	2.96	0.53	2.91
	4.75	3.41	2.03	3.05	3.00	0.56	3.02
TOTAL	14.16	10.08	6.07	9.12	8.88	1.68	8.88
MEDIA	4.720	3.360	2.023	3.040	2.960	0.560	2.960
S.D.	0.0300	0.0458	0.0115	0.0174	0.0400	0.0300	0.0557
S.E.	0.0173	0.0265	0.0067	0.0100	0.0231	0.0173	0.0232

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	2.75	2.39	5.02
	2.82	2.46	5.08
	2.77	2.35	5.07
TOTAL	8.34	7.20	15.17
MEDIA	2.780	2.400	5.057
S.D.	0.0360	0.0557	0.0320
S.E.	0.0208	0.0321	0.0185

	SO	GL	OM	F
Tratamentos	43.909900	9	4.870080	3379.74***
Residuo	0.028870	20	0.001443	
Total	43.938800	29		

Desvio padrao residual (s): 0.03799 C.V. = 1.3%

TUKEY 5%	
TRAT10	5.057 a
TRAT 1	4.720 b
TRAT 2	3.360 c
TRAT 4	3.040 d
TRAT 5	2.960 d
TRAT 7	2.960 d
TRAT 8	2.780 e
TRAT 9	2.400 f
TRAT 3	2.023 g
TRAT 6	0.560 h
DMS	0.110

Alfa-Amilase (U) - 10h - (Cm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	5.52	4.02	3.25	3.83	5.19	4.09	5.21
	5.59	4.21	3.51	3.61	5.36	4.10	5.30
	5.69	4.31	3.62	3.72	5.05	3.81	5.51
TOTAL	16.80	12.54	10.38	11.16	15.60	12.00	14.02
MEDIA	5.600	4.180	3.460	3.720	5.200	4.000	5.340
S.D.	0.0854	0.1473	0.1900	0.1100	0.1553	0.1646	0.1740
S.E.	0.0493	0.0850	0.1097	0.0635	0.0896	0.0950	0.0889

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	3.58	3.45	4.17
	3.56	3.40	4.15
	3.75	3.41	4.22
TOTAL	10.89	10.26	12.54
MEDIA	3.630	3.420	4.180
S.D.	0.1044	0.0265	0.0360
S.E.	0.0603	0.0153	0.0208

	BQ	GL	QM	F
Tratamentos	17.875300	9	1.986150	120.37***
Residuo	0.329956	20	0.016490	
Total	18.205300	29		

Desvio padrão residual (s): 0.12844 C.V. = 3.0%

TUKEY 5%

TRAT 1	5.600	a
TRAT 7	5.340	ab
TRAT 5	5.200	b
TRAT 2	4.180	c
TRAT 10	4.180	c
TRAT 6	4.000	cd
TRAT 4	3.720	de
TRAT 8	3.630	de
TRAT 3	3.460	e
TRAT 9	3.420	e

DHS= 0.372

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	13.30	11.20	18.01	11.56	16.50	13.20	25.60
	13.20	11.80	18.90	11.66	16.41	13.26	25.01
	13.16	11.32	17.39	11.34	16.41	13.28	24.57
TOTAL	39.66	34.32	54.90	34.56	49.32	39.04	77.10
MEDIA	13.220	11.440	18.100	11.520	16.440	13.280	25.060
S.D.	0.0722	0.3175	0.7590	0.1636	0.0518	0.0179	0.5169
S.E.	0.0417	0.1833	0.4382	0.0944	0.0299	0.0115	0.2984

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	21.30	14.90	16.90
	21.21	15.67	16.90
	21.27	14.01	17.08
TOTAL	63.78	44.58	50.88
MEDIA	21.260	14.860	16.960
S.D.	0.0442	0.8307	0.1038
S.E.	0.0255	0.4796	0.0599

	SO	OL	OH	F
Tratamentos	516.33	9	57.370	341.25***
Residuo	3.36	20	0.168	
Total	519.69	29		

Desvio padrao residual (s): 0.410 C.V. = 2.5%

TUKEY 5%	
TRAT 7	25.060 a
TRAT 8	21.260 b
TRAT 3	18.100 c
TRAT 10	16.960 cd
TRAT 5	16.440 d
TRAT 9	14.860 e
TRAT 6	13.280 f
TRAT 1	13.220 f
TRAT 4	11.520 g
TRAT 2	11.440 g
DMS	1.186

 Alfa-Amilase (U) - 30h - (Cm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	16.80	11.50	15.60	10.32	17.49	12.02	23.69
	16.01	11.47	15.93	10.62	17.56	13.15	24.98
	15.37	11.53	15.39	10.74	17.15	11.79	23.95
OTAL	48.18	34.50	46.92	31.60	52.20	36.96	72.62
EDIA	16.060	11.500	15.640	10.360	17.400	12.320	23.907
.D.	0.7163	0.0297	0.2722	0.2163	0.2192	0.7280	0.6923
.E.	0.4135	0.0172	0.1572	0.1249	0.1266	0.4203	0.3939

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	19.98	25.35	15.23
	20.30	25.22	15.62
	19.72	25.75	15.77
OTAL	60.00	76.32	46.62
EDIA	20.000	25.440	15.540
.D.	0.2904	0.2764	0.2787
.E.	0.1677	0.1596	0.1609

	SO	GL	OM	F
tratamentos	691.93	0	74.881	401.05***
resíduo	3.83	20	0.192	
total	695.76	29		

desvio padrão residual (s): 0.438 C.V. = 2.6%

alpha-Confidence (0.05) - 100% - (0.05)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	16.40	12.90	12.71	12.61	17.71	14.67	27.67
	16.51	12.81	12.68	12.63	17.61	14.78	27.31
	16.23	12.93	12.83	12.86	17.72	14.83	28.92
TOTAL	49.14	38.64	38.22	38.10	53.04	44.28	83.92
MEDIA	16.380	12.880	12.740	12.700	17.680	14.760	28.640
S.D.	0.1410	0.0618	0.0794	0.1389	0.0575	0.0816	0.0456
S.E.	0.0814	0.0357	0.0458	0.0802	0.0344	0.0471	0.4882

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	22.91	26.70	19.80
	22.95	27.31	19.75
	23.44	26.12	19.73
TOTAL	69.30	80.13	59.28
MEDIA	23.100	26.710	19.760
S.D.	0.2953	0.5950	0.0358
S.E.	0.1706	0.3435	0.0207

	SO	GL	QM	F
Tratamentos	931.54	9	103.505	050.29***
Residuo	2.43	20	0.122	
Total	933.98	29		

Desvio padrao residual (s): 0.347 C.V. = 1.9%

TUKEY 5%	
TRAT 7	28.640 a
TRAT 9	26.710 b
TRAT 8	23.100 c
TRAT 10	19.760 d
TRAT 5	17.680 e
TRAT 1	16.380 f
TRAT 6	14.760 g
TRAT 2	12.880 h
TRAT 3	12.740 h
TRAT 4	12.700 h
DMS=	1.009

ANALISA DE REGRESSÃO (U) - 551 - (Cm)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	10.86	8.56	9.36	7.22	12.13	8.76	30.12
	10.95	8.56	9.42	7.10	12.96	8.97	30.20
	10.74	8.62	9.42	7.10	13.67	9.15	30.34
TOTAL	32.55	25.74	28.20	21.42	38.76	26.88	90.66
MEDIA	10.850	8.580	9.400	7.140	12.920	8.960	30.220
S.D.	0.1053	0.0341	0.0345	0.0693	0.7700	0.1950	0.1121
S.E.	0.0608	0.0197	0.0199	0.0400	0.4450	0.1126	0.0647

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	19.62	28.97	19.73
	19.87	28.63	19.90
	20.39	28.34	19.89
TOTAL	59.88	85.94	59.52
MEDIA	19.960	28.647	19.840
S.D.	0.3988	0.3152	0.0947
S.E.	0.2268	0.1820	0.0547

	SS	GL	QM	F
Tratamentos	1962.140000	9	218.016000	2357.42***
Resíduo	1.849610	20	0.092480	
Total	1963.990000	29		

Desvio padrão residual (s): 0.30411 C.V. = 1.9%

	TUKEY	Sx
TRAT 7	30.220	a
TRAT 9	28.647	b
TRAT 8	19.960	c
TRAT 10	19.840	c
TRAT 5	12.920	d
TRAT 1	10.850	e
TRAT 3	9.400	f
TRAT 6	8.960	f
TRAT 2	8.580	f
TRAT 4	7.140	g
DMS=	0.880	

A.E. A1-PATAMILABE (CM) -- 121.

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	137.98	85.95	105.70	100.67	77.79	12.40	132.12
	139.96	84.96	105.78	100.01	77.63	12.41	133.23
	141.01	86.88	105.79	101.30	77.05	12.40	134.44
TOTAL	418.95	257.79	317.27	301.98	232.47	37.21	399.99
MEDIA	139.650	85.930	105.757	100.660	77.490	12.403	133.330
S.D.	1.5360	0.9586	0.0765	0.6450	0.3916	0.0055	1.2601
S.E.	0.8868	0.5535	0.0442	0.3724	0.2261	0.0032	0.7275

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	160.95	65.62	151.90
	161.92	65.86	151.96
	160.04	65.77	151.99
TOTAL	482.91	197.25	455.85
MEDIA	160.970	65.750	151.950
S.D.	0.9396	0.1036	0.0000
S.E.	0.5425	0.0598	0.0000

	BO	GL	QM	F
Tratamentos	55706.30	9	6189.590	9781.08***
Resíduo	12.66	20	0.633	
Total	55718.90	29		

Desvio padrão residual (s): 0.795 C.V. = 0.0X

TUKEY 5%	
TRAT 8	160.970 a
TRAT 10	151.950 b
TRAT 1	139.650 c
TRAT 7	133.330 d
TRAT 3	105.757 e
TRAT 4	100.660 f
TRAT 2	85.930 g
TRAT 5	77.490 h
TRAT 9	65.750 i
TRAT 6	12.403 j
DMS=	2.301

A.E. Alfa-Amilase (Cm) - 18h

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	46.65	26.51	35.46	34.76	37.07	27.06	49.20
	45.96	26.40	35.21	34.95	38.02	30.95	47.42
	47.40	26.35	35.47	34.87	38.85	30.99	49.04
TOTAL	140.01	79.26	106.14	104.58	113.94	91.00	147.66
MEDIA	46.670	26.420	35.380	34.860	37.980	30.600	47.880
S.D.	0.7203	0.0804	0.1474	0.0944	0.0905	0.6413	0.1914
S.E.	0.4159	0.0464	0.0851	0.0545	0.5141	0.3202	0.1105

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	37.07	25.98	39.57
	38.01	26.51	39.41
	36.16	26.56	39.36
TOTAL	111.24	79.05	118.53
MEDIA	37.080	26.350	39.510
S.D.	0.9250	0.3210	0.1326
S.E.	0.5341	0.1853	0.0765

	SO	GL	QM	F
Tratamentos	1560.34	9	173.371	624.67***
Residuo	5.55	20	0.278	
Total	1565.89	29		

Desvio padrao residual (s): 0.527 C.V. = 1.4%

TUKEY 5%	
TRAT 7	49.220 a
TRAT 1	46.670 b
TRAT 10	39.510 c
TRAT 5	37.980 d
TRAT 8	37.080 d
TRAT 3	35.380 e
TRAT 4	34.860 e
TRAT 6	30.600 f
TRAT 2	26.420 g
TRAT 9	26.350 g

DMS= 1.524

A.E. A1 Pa-Alililae (Cm) - 1271

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	110.96	85.36	112.96	96.01	105.86	85.36	147.82
	111.99	84.92	113.62	95.96	105.76	85.45	149.01
	113.02	87.18	112.81	96.03	105.54	85.39	149.02
TOTAL	335.97	257.46	339.39	288.00	317.16	256.20	445.85
MEDIA	111.990	85.820	113.130	96.000	105.720	85.400	148.550
S.D.	1.0289	1.1981	0.4283	0.0000	0.1593	0.0000	0.0077
S.E.	0.5940	0.6917	0.2474	0.0000	0.0920	0.0000	0.4663

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	165.01	98.36	158.17
	165.17	98.57	159.72
	165.39	98.12	158.96
TOTAL	495.57	295.05	476.85
MEDIA	165.190	98.350	158.950
S.D.	0.1654	0.0210	0.7756
S.E.	0.0955	0.1276	0.4478

	BO	GL	QM	F
Tratamentos	24012.90	9	2668.100	6670.25***
Residuo	8.00	20	0.400	
Total	24020.90	29		
Desvio padrao residual (s):	0.632		C.V. = 0.5%	

TUKEY 5%

TRAT 8	165.190 a
TRAT 10	158.950 b
TRAT 7	148.550 c
TRAT 3	113.130 d
TRAT 1	111.990 d
TRAT 5	105.720 e
TRAT 9	98.350 f
TRAT 4	96.000 g
TRAT 2	85.820 h
TRAT 6	85.400 h

DMS= 1.829

A.E. Alfa-Amilase (Cm) 30h

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	164.00	69.01	91.02	91.50	129.96	67.52	151.23
	163.91	69.08	90.01	91.00	130.03	67.95	151.30
	164.72	71.64	88.92	91.79	131.60	67.39	140.90
TOTAL	492.63	209.73	270.75	274.29	391.59	202.86	450.81
MEDIA	164.210	69.910	90.250	91.430	130.530	67.620	150.270
S.D.	0.4463	1.4985	1.1550	0.3940	0.9312	0.2906	1.7176
S.E.	0.2577	0.8652	0.6668	0.2275	0.5376	0.1678	0.9508

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	173.52	184.20	123.13
	171.69	183.95	121.93
	174.29	184.90	121.45
TOTAL	519.50	553.05	366.51
MEDIA	173.167	184.350	122.170
S.D.	1.3317	0.4961	0.8604
S.E.	0.7689	0.2864	0.4967

	SO	OL	OM	F
Tratamentos	50145.70	9	5571.750	5251.72***
Residuo	21.22	20	1.061	
		29		

Desvio padrao residual (s): 1.030 C.V. = 0.0%

TUKEY 5%

TRAT 9	184.350 a
TRAT 8	173.167 b
TRAT 1	164.210 c
TRAT 7	150.270 d
TRAT 5	130.530 e
TRAT 10	122.170 f
TRAT 4	91.430 g
TRAT 3	90.250 g
TRAT 2	69.910 h
TRAT 6	67.620 h

DMS= 2.979

O.E. Alfa-Amilase (Cm) - 411.

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	82.97	42.26	27.72	49.20	71.02	43.96	114.96
	83.96	43.36	27.86	49.35	71.00	44.98	115.86
	84.41	44.13	27.88	49.23	71.07	43.04	114.39
TOTAL	251.34	129.75	83.46	147.78	213.09	132.70	345.21
MEDIA	83.780	43.250	27.820	49.260	71.030	44.260	115.070
S.D.	0.7329	0.9400	0.0863	0.0765	0.0000	0.6270	0.7375
S.E.	0.4231	0.5427	0.0498	0.0442	0.0000	0.3620	0.4070

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	90.86	111.50	80.91
	91.65	112.98	80.05
	91.33	110.50	81.50
TOTAL	273.84	334.98	242.46
MEDIA	91.280	111.660	80.820
S.D.	0.3928	1.2445	0.7209
S.E.	0.2268	0.7105	0.4208

	SO	GL	OH	F
Tratamentos	24245.70	9	2693.970	5854.47***
Residuo	9.20	20	0.460	
Total	24254.90	29		

Desvio padrao residual (s): 0.678 C.V. = 0.9%

TRAT 7	115.070	a
TRAT 9	111.660	b
TRAT 8	91.280	c
TRAT 1	83.780	d
TRAT 10	80.820	e
TRAT 5	71.030	f
TRAT 4	49.260	g
TRAT 6	44.260	h
TRAT 2	43.250	h
TRAT 3	27.820	i

DMS = 1.962

A.E. Alfa-Amilase (CM) - 1981

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	56.22	29.02	30.96	23.98	31.90	27.07	28.07
	55.98	29.26	30.08	24.36	31.06	27.37	27.62
	50.59	29.47	29.60	24.60	31.97	27.36	29.27
TOTAL	170.79	87.75	90.66	73.02	95.73	81.78	86.28
MEDIA	56.930	29.250	30.220	24.340	31.910	27.260	28.760
S.D.	1.4421	0.2245	0.6808	0.3503	0.0590	0.1646	0.2447
S.E.	0.8326	0.1296	0.3931	0.2023	0.0706	0.0750	0.5170

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	83.83	102.96	60.42
	85.49	103.66	60.40
	84.96	103.88	60.14
TOTAL	254.28	310.50	180.96
MEDIA	84.760	103.500	60.320
S.D.	0.8484	0.4801	0.1515
S.E.	0.4898	0.2772	0.0875

	SO	GL	OM	I
Tratamentos	23952.60	9	2661.400	5730.10xxx
Residuo	9.29	20	0.464	
Total	23961.90	29		

Desvio padrao residual (s): 0.682 C.V. = 1.3%

TUKEY 5%	
TRAT 9	103.500 a
TRAT 7	89.760 b
TRAT 8	84.760 c
TRAT 10	60.320 d
TRAT 1	56.930 e
TRAT 5	31.910 f
TRAT 3	30.220 fg
TRAT 2	29.250 g
TRAT 6	27.260 h
TRAT 4	24.340 i

DMS = 1.971

1. E. 01 Pa-Outline (N=1) 121.

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	5.30	25.30	8.71	56.52	3.02	20.04	66.36
	5.20	25.51	8.81	56.61	3.21	20.60	66.54
	5.28	25.75	8.55	56.16	2.80	20.06	66.18
TOTAL	15.78	76.56	26.07	169.29	9.03	61.50	199.08
MEDIA	5.260	25.520	8.690	56.430	3.010	20.500	66.360
S.D.	0.0529	0.2252	0.1310	0.2380	0.2052	0.4170	0.1836
S.E.	0.0306	0.1300	0.0756	0.1374	0.1187	0.2419	0.1060

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	85.98	5.32	13.24
	86.40	5.49	13.30
	86.70	5.54	13.21
TOTAL	259.08	16.35	39.75
MEDIA	86.360	5.450	13.250
S.D.	0.3590	0.1153	0.0459
S.E.	0.2073	0.0666	0.0265

	SO	GL	QM	F
Tratamentos	23930.600000	9	2458.960000	51373.00***
Residuo	1.035160	20	0.051758	
Total	23931.600000	29		

Desvio padrao residual (s): 0.22750 C.V. = 0.8%

TUKEY 5%

TRAT 8	86.360 a
TRAT 7	66.360 b
TRAT 4	56.430 c
TRAT 2	25.520 d
TRAT 6	20.500 e
TRAT 10	13.250 f
TRAT 3	8.690 g
TRAT 9	5.450 h
TRAT 1	5.260 h
TRAT 5	3.010 i

DMS= 0.658

A.E. 01 Pa-Amil 1964 (CNC) 1964

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	12.45	11.30	27.30	26.69	10.31	0.01	22.95
	12.60	11.25	27.30	27.31	10.50	8.31	23.92
	12.45	11.62	27.27	27.00	10.40		
TOTAL	37.50	34.17	81.87	81.00	31.26	24.06	74.00
MEDIA	12.500	11.390	27.290	27.000	10.420	8.020	23.650
S.D.	0.0061	0.0007	0.0191	0.3103	0.0903	0.2951	0.6115
S.E.	0.0497	0.1159	0.0110	0.1792	0.0967	0.1646	0.3570

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	39.21	18.91	22.59
	39.75	18.99	23.07
	39.60	18.98	24.08
TOTAL	118.56	56.88	70.74
MEDIA	39.520	18.960	23.580
S.D.	0.2706	0.0435	0.8815
S.E.	0.1609	0.0251	0.5089

	SO	OL	OM	T
Tratamentos	2626.59	9	291.044	1971.65***
Residuo	2.93	20	0.147	
Total	2629.52	29		

Desvio padrao residual (s): 0.383 C.V. = 1.9%

TUKEY 5X	
TRAT 8	39.520 a
TRAT 3	27.290 b
TRAT 4	27.000 b
TRAT 7	23.650 c
TRAT 10	23.580 c
TRAT 9	18.960 d
TRAT 1	12.500 e
TRAT 2	11.390 f
TRAT 5	10.420 f
TRAT 6	8.020 g
DMS=	1.107

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	27.81	36.92	49.41	82.13	26.46	59.40	71.00
	27.86	36.86	49.91	82.41	26.62	59.52	72.01
	27.85	37.04	50.68	82.45	26.42	59.40	71.05
TOTAL	83.52	110.82	150.00	246.99	79.50	178.32	214.06
MEDIA	27.840	36.940	50.000	82.330	26.500	59.440	71.353
S.D.	0.0247	0.0944	0.6402	0.1624	0.1054	0.0663	0.0651
S.E.	0.0143	0.0545	0.3696	0.0938	0.0609	0.0383	0.0327

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	95.30	24.36	78.70
	95.38	24.95	78.61
	92.25	25.25	79.03
TOTAL	282.93	74.56	236.34
MEDIA	94.310	24.853	78.780
S.D.	1.7834	0.4529	0.2210
S.E.	1.0297	0.2615	0.1276

	SS	GL	QM	F
Tratamentos	17862.60	9	1984.730	4713.27***
Residuo	8.42	20	0.421	
Total	17871.00	29		

Desvio padrao residual (s): 0.649 C.V. = 1.2%

TUKEY 5%

TRAT 8	94.310 a
TRAT 4	82.330 b
TRAT 10	78.780 c
TRAT 7	71.353 d
TRAT 6	59.440 e
TRAT 3	50.000 f
TRAT 2	36.940 g
TRAT 1	27.840 h
TRAT 5	26.500 hi
TRAT 9	24.853 i

DMS = 1.077

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	18.32	29.53	45.67	59.90	25.60	24.57	59.45
	17.02	29.65	50.02	67.76	23.01	22.33	46.76
	22.74	29.56	46.36	66.27	31.05	29.03	47.31
TOTAL	58.08	88.74	142.05	194.01	77.74	75.93	157.72
MEDIA	19.360	29.580	47.350	64.670	26.580	25.310	51.240
S.D.	2.9984	0.0644	2.3777	4.1274	4.0717	3.4100	7.1122
S.E.	1.7318	0.0372	1.3498	2.0041	2.0342	1.8492	4.1042

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	77.86	39.57	33.96
	75.97	39.22	35.02
	81.52	38.96	33.47
TOTAL	235.35	117.75	102.45
MEDIA	78.450	39.250	34.150
S.D.	2.8220	0.3058	0.7921
S.E.	1.6293	0.1765	0.4573

	80	0L	0M	I
Tratamentos	9621.69	9	1067.000	02.70xxx
Residuo	238.37	80	11.918	
Total	9860.06	89		

Desvio padrao residual (s): 3.452 C.V. = 8.3%

TUKEY 5%

TRAT 8	78.450 a
TRAT 4	64.670 b
TRAT 7	51.240 c
TRAT 3	47.350 cd
TRAT 9	39.250 de
TRAT 10	34.150 ef
TRAT 2	29.580 ef
TRAT 5	26.580 fg
TRAT 6	25.310 fg
TRAT 1	19.360 g

DMS= 9.986

A.E. Alfa-Amilase (Nal) - 100.

181

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	16.20	13.26	28.30	34.24	23.00	17.60	36.24
	16.41	13.53	28.46	34.54	22.77	17.62	36.32
	16.08	12.87	28.26	34.48	23.14	17.61	36.19
TOTAL	48.69	39.66	85.02	103.26	67.21	52.83	108.75
MEDIA	16.230	13.220	28.340	34.420	23.070	17.610	36.250
S.D.	0.1667	0.3318	0.1060	0.1502	0.0745	0.0076	0.0575
S.E.	0.0964	0.1916	0.0612	0.0913	0.0430	0.0055	0.0344

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	59.07	31.36	33.52
	59.98	31.52	33.63
	60.56	31.59	33.47
TOTAL	179.61	94.47	100.62
MEDIA	59.870	31.490	33.540
S.D.	0.7503	0.1190	0.0812
S.E.	0.4332	0.0687	0.0469

	SO	GL	OM	F
Tratamentos	4912.460000	9	545.027000	7122.20000
Residuo	1.531250	20	0.076563	
Total	4913.990000	29		

Desvio padrao residual (s): 0.27670 C.V. = 0.9%

TUKEY 5%	
TRAT 8	59.870 a
TRAT 7	36.250 b
TRAT 4	34.420 c
TRAT 10	33.540 d
TRAT 9	31.490 e
TRAT 3	28.340 f
TRAT 5	23.070 g
TRAT 6	17.610 h
TRAT 1	16.230 i
TRAT 2	13.220 j
DMS=	0.800

G.E. Alfa-Oxilime (N=1)

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5	TRAT 6	TRAT 7
	4.85	10.56	26.33	42.15	26.96	19.47	30.02
	4.83	11.02	26.02	42.14	27.55	19.32	31.50
	4.93	8.96	26.90	42.19	28.14	19.26	31.55
TOTAL	14.61	30.54	79.25	126.48	82.65	58.05	93.07
MEDIA	4.870	10.180	26.417	42.160	27.550	19.350	31.690
S.D.	0.0529	1.0813	0.4463	0.0313	0.5099	0.1077	0.2060
S.E.	0.0305	0.6243	0.2577	0.0180	0.3406	0.0660	0.1456

	TRAT 8	TRAT 9	TRAT 10
	54.58	27.99	30.20
	55.60	28.90	30.26
	54.97	30.08	30.23
TOTAL	165.15	86.97	90.69
MEDIA	55.050	28.990	30.230
S.D.	0.5144	1.0479	0.0313
S.E.	0.2970	0.6050	0.0180

	BO	UL	OH	F
Tratamentos	5641.87	9	626.075	1772.10***
Residuo	6.36	20	0.310	
Total	5648.23	29		

Desvio padrao residual (s): 0.564 C.V. = 2.0%

TUKEY 5%	
TRAT 8	55.050 a
TRAT 4	42.160 b
TRAT 7	31.690 c
TRAT 10	30.230 cd
TRAT 9	28.990 de
TRAT 5	27.550 ef
TRAT 3	26.417 f
TRAT 6	19.350 g
TRAT 2	10.180 h
TRAT 1	4.870 i
DMS	1.631

Os apêndices de 25 à 29 referem-se aos testes estatísticos (Análise de Variância e Teste de Tukey) dos dados de produção de goma xantana pelas diferentes linhagens obtidas a partir de diferentes substratos, os quais estão indicados no títulos das tabelas.

As convenções utilizadas nestes testes foram as seguintes:

Trat 1 = dados em triplicata relativos à viscosidade da goma xantana produzida pela linhagem controle 280 Nal^r.

Trat 2 = idem para a linhagem N2.

Trat 3 = idem para a linhagem N23.

Trat 4 = idem para a linhagem N2X.

Trat 5 = idem para a linhagem N23X.

Estas mesmas convenções repetem-se para as linhagens REF^r e Cm^r, nesta mesma ordem.

Os símbolos ** e *** que aparecem ao lado dos valores obtidos para F indicam que os mesmos são significativos a nível de 1% e 0,1 %, respectivamente.

O teste estatístico para produção de goma xantana por linhagens Nal a partir de amido foi omitido pelo fato de não haver variância entre as triplicatas destes dados.

 U1ac. soma scattering 1% mac -- NAI

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5
	250.0	325.0	175.0	162.5	187.5
	262.5	300.0	250.0	212.5	150.0
	225.0	262.5	237.5	212.5	187.5
TOTAL	737.5	887.5	662.5	587.5	525.0
MEDIA	245.833	295.833	220.833	195.833	175.000
S.D.	19.0943	31.4576	40.1818	20.0673	21.6509
S.E.	11.0241	18.1620	23.1990	16.6667	12.5002

	sq	nl	qh	r
Tratamentos	26416.60	4	6604.160	7 7384
Residuo	8541.69	10	854.169	
Total	34958.30	14		

Desvio padrao residual (s): 29.226 C.V. = 12.9%

TUKEY 5%	
TRAT 2	295.833 a
TRAT 1	245.833 ab
TRAT 3	220.833 ab
TRAT 4	195.833 b
TRAT 5	175.000 b
DMS=	78.632

Visc. goma xantana - AMI+SAC - NaI

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5
	262.5	287.5	262.5	562.3	325.0
	800.0	325.0	262.5	337.5	350.0
	100.0	287.5	237.5	562.3	350.0
TOTAL	562.5	900.0	762.5	1462.0	1025.0
MEDIA	187.500	300.000	254.167	487.333	341.667
S.D.	81.9600	21.6510	14.4347	129.7600	14.4325
S.E.	47.3243	12.5002	8.3339	74.9167	8.3326

	SO	OL	QH	F
Tratamentos	151764.00	4	37941.100	7.76xx
Residuo	48883.50	10	4888.350	
Total	200648.00	14		

Desvio padrao residual (s): 69.917 C.V. = 22.3%

TUKEY 5%

TRAT 4	487.333 a
TRAT 5	341.667 ab
TRAT 2	300.000 ab
TRAT 3	254.167 b
TRAT 1	187.500 b

DMS= 188.108

Visc. goma xantana - 1% Sac. - Cm

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5
	50.0	50.0	25.0	50.0	75.0
	50.0	50.0	25.0	07.5	75.0
	62.5	50.0	37.5	07.5	62.5
TOTAL	162.5	150.0	87.5	225.0	212.5
MEDIA	54.167	50.000	29.167	75.000	70.833
S.D.	7.2169	0.0000	7.2169	21.6506	7.2171
S.E.	4.1667	0.0000	4.1667	12.5000	4.1668

	SO	OL	OM	T
Tratamentos	4020.83	4	1005.210	0.0124
Residuo	1250.00	10	125.000	
Total	5270.83	14		

Desvio padrao residual (s): 11.180 C.V. = 20.0%

TUKEY 5X	
TRAT 4	75.000 a
TRAT 5	70.833 a
TRAT 1	54.167 ab
TRAT 2	50.000 ab
TRAT 3	29.167 b
DMS=	30.080

Visc. goma xantana - 1% AHT Cm

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5
	37.5	25.0	12.5	25.0	25.0
	37.5	25.0	12.5	25.0	37.5
	50.0	25.0	12.5	25.0	37.5
TOTAL	125.0	75.0	37.5	75.0	100.0
MEDIA	41.667	25.000	12.500	25.000	33.333
S.D.	7.2169	0.0000	0.0068	0.0000	7.2169
S.E.	4.1667	0.0000	0.0039	0.0000	4.1667

	80	OL	OH	F
Tratamentos	1416.67	4	354.167	17.00***
Residuo	208.33	10	20.833	
Total	1625.00	14		

Desvio padrao residual (s): 4.564 C.V. = 16.6%

TUKEY 5%

TRAT 1	41.667 a
TRAT 5	33.333 ab
TRAT 2	25.000 b
TRAT 4	25.000 b
TRAT 3	12.500 c

DMS= 12.200

Visc. goma xantana - OHJ 1300 - CM

	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3	TRAT 4	TRAT 5
	112.5	75.0	50.0	112.5	50.0
	75.0	50.0	62.5	112.5	62.5
	75.0	37.5	87.5	112.5	62.5
TOTAL	262.5	162.5	200.0	337.5	175.0
MEDIA	87.500	54.167	66.667	112.500	58.333
S.D.	21.6507	19.0941	19.0941	0.0442	7.2170
S.E.	12.5000	11.0240	11.0240	0.0255	4.1667

	80	GL	QM	F
Tratamentos	7020.84	4	1755.210	7.02**
Residuo	2500.01	10	250.001	
Total	9520.84	14		

Desvio padrao residual (s): 15.811 C.V. = 20.7%

TUKEY 5%	
TRAT 4	112.500 a
TRAT 1	87.500 ab
TRAT 3	66.667 b
TRAT 5	58.333 b
TRAT 2	54.167 b
DMS=	42.540

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIRD, J. K.; SANDFORD, P. A. & CATTREL, I. W., 1983. Industrial applications of some new microbial polisaccharides. *Bio/Technol.*, 1: 778-783.
- BALBÁS, P.; SOBERÓN, X.; MERINO, E.; ZURITA, M.; LONELI, H.; VALLE, F. FLORES, N. & BOLIVAR, F., 1980. Plasmid vector pBR322 and its special derivatives - a review. *Gene*, 50: 3-40.
- BERGER, S. L. & KIMMEL, A. R., 1987. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Methods in Enzymology*, 152. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J., 1980. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7: 1513-1523.
- BOYER, H. W. & ROULLAND-DUSSOIX, D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 41: 459-472.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BRASIL. Decreto lei nº 55871, 1965. Legislação Federal do Setor Saúde. *Diário Oficial*, Brasília (DF), seção I, 498.
- BROSIUS, J., 1984. Plasmid vectors for selection of promoters. *Gene*, 27: 151-160.
- BUJARD, H., 1980. The interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters. *Trends in Biochem. Sci.*, 5: 274-278.
- BURGES, R.; TRAVERS, A.; DUNN, J. J. & BAUTZ, E. K. F., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221: 43-46.
- CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A. & JEANES, A., 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can. J. Microbiol.*, 22: 942-948.
- CARAWAY, W. T., 1959. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am. J. Clin. Path.*, 32: 97-99.
- CASTRO, M. E. B. Análise do gene da alfa-amilase de *Bacillus subtilis* visando o desenvolvimento de um vetor bifuncional de expressão-secreção. Brasília (DF), 1988. Tese (Mestrado). Universidade de Brasília, Deptº de Biologia Celular.

- CHAMBERLIN, M. J., 1974. The selectivity of transcription. *Ann. Rev. Biochem.*, 43: 721-776.
- CHANDRA, A. K.; MEDDA, S. & BHADRA, A. K., 1980. Production of extracellular thermostable alfa-amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.*, 58: 1-10.
- COREY, R. & STARR, P. M., 1957. Colony types of *Xanthomonas phaseoli*. *Phitopathology*, 74: 137-140.
- COTTRELL, I. W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDFORD & MATSUDA, eds. ACS Symposium Series, 126. 1979. p. 251-270.
- DANIELS, M. J.; BARBER, C. E.; TURNER, P. C.; SAWCZYK, M. K.; BYRD, R. J. W. & FIELDING, A. H., 1984. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. *EMBO J.*, 3: 3323-3328.
- DANIELS, M. J.; COLLINGE, D. B.; DOW, J. M.; OSBOURN, A. E. & ROBERTS, I. N., 1987. Molecular biology of the interaction of *Xanthomonas campestris* with plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 25: 1-7.
- DANIELS, M. J. Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* toward plants. In: HOPWOOD, D. A. & CHATER, K. F. ed. Genetic of bacterial diversity. 1989. Academic Press.

- DANNER, D. B., 1982. Recovery of DNA fragments from gels by transfer to DEAE-paper in a electrophoresis chamber. *Anal. Biochem.*, 125: 139-142.
- DOW, J. M.; SCOFIELD, G.; TRADFORD, K.; TURNER, P. C. & DANIELS, M. J., 1987. A cluster in *Xanthomonas campestris* pv *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalactolyase and other enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 261-271.
- DOWSON, W. J., 1939. On the systematic position and generic names of the gram-negative bacterial plant pathogens. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 2*, 100: 177-193.
- DRETZEN, G.; BELLARD, M.; SASSONE-CORSI, F. & CHAMBOM, P., 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 112: 295-298.
- DYE, D. W. & LELLIOTT, R. A. Genus II. *Xanthomonas* Dowson, 1939. In: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E., eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. p. 243.
- DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; GOTO, M.; HAYWARD, A. C.; LELLIOTT, R. A. & SCHOROTH, M. N., 1980. International standards for naming pathovar of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.*, 59: 153-168.

FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B., 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-13.

FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B., 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity - Addendum. *Biochem.*, 137: 266-267.

FIGURSKI, H. & HELINSKI, D. R., 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1648-1652.

FOGARTY, W. M. & KELLY, C. Developments in microbial extracellular enzymes. In: WILEY, J. ed. *Topics in enzyme and fermentation biotechnology - 3*. England, 1979. Cap. 3, p. 45-102.

FOGARTY, W. M. & KELLY, C. Amylases, amiloglucosidases and related glucanases. In: ROSE, A. H., ed. *Microbial Enzymes and Bioconversions*. Londres, Academic, 1980. Cap. 3. p.115-170.

FUKUDA, M. & YANO, K., 1985. Construction of broad host range cloning vectors for gram-negative bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 2719-2724.

GERDS, K.; LARSEN, J. E. L. & MOLIN, S., 1985. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J. Bacteriol.*, 161: 292-298.

- GERDS, K., 1988. The *parB* (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. *Biotechnol.* 6: 1402-1405.
- GERDS, K.; HELIN, K.; CHRISTENSEN, O. W. & LOBNER-OLSEN, A., 1988. Translational control and differential RNA decay are elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the *parB* locus of plasmid R1. *J. Mol. Biol.*, 203: 119-129.
- GILBERT, W. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: LOSICK, R. & CHAMBERLIN, M. J. eds. *RNA polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1976. p.193.
- GLENN, A. R., 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 30: 41-62.
- GOTO, M., 1982. Interrelationship between colony type, phage susceptibility and virulence in *Xanthomonas oryzae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 35: 505-515.
- GREEN, D. M. & COLARUSSO, L. J., 1964. The physical and genetical characteristics of a transformable enzyme: *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 89: 277-290.

- GERDS, K., 1988. The parB (*hok/sok*) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system. *Biotechnol.* 6: 1402-1405.
- GERDS, K.; HELIN, K.; CHRISTENSEN, O. W. & LOBNER-OLSEN, A., 1988. Translational control and differential RNA decay are elements regulating postsegregational expression of the killer protein encoded by the parB locus of plasmid R1. *J. Mol. Biol.*, 203: 119-129.
- GILBERT, W. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: LOSICK, R. & CHAMBERLIN, M. J. eds. *RNA polymerase*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1976. p.193.
- GLENN, A. R., 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 30: 41-62.
- GOTO, M., 1982. Interrelationship between colony type, phage susceptibility and virulence in *Xanthomonas oryzae*. *J. Appl. Bacteriol.*, 35: 505-515.
- GREEN, D. M. & COLARUSSO, L. J., 1964. The physical and genetical characteristics of a transformable enzyme: *Bacillus subtilis* alpha-amylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 89: 277-290.

- HARDING, E.; CLEARY, J. M.; CABANAS, D. K.; ROSEN, A. G. & KANG, K., 1987. Genetical and physical analysis of a cluster of genes essential for xantan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J. Bacteriol.*, 169: 2854-2861.
- HARLEY, C. B. & REYNOLDS, R. P., 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, 15: 2343-2361.
- HAWLEY, D. K. & McCLURE, W. R., 1983. Compilation and analysis of *E. coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, 11: 2237-2255.
- HEINEKEN, F. G. & O'CONNOR, R. J., 1972. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease and alpha-amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *J. Gen. Microbiol.*, 73: 35-44.
- IELPI, L.; COUSO, R. & DANKERT, M. A., 1981. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xantan gum. *FEBS Lett.*, 130: 253-256.
- IELPI, L.; COUSO, R.O. & DANKERT, M. A., 1983. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. *Biochem. Int.*, 6: 323-333.
- INGLE, M. B. & ERICKSON, K. J., 1978. Bacterial alpha-amylases. *Adv. Appl. Microbiol.*, 24:275-278.

INOUE, S.; NAKAZAWA, A. & NAKAZAWA, T., 1981. Molecular cloning of TOL genes *xyiB* and *xyiE* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 145: 1137.

ISHIHAMA, A., 1986. Citado em ISHIHAMA, 1988.

ISHIHAMA, A., 1988. Promoter selectivity of procaryotic RNA polymerases. *Trends in Genetics*, 4: 282-286.

JACQUET, M. A.; EHRICH, R. & REISS, C., 1989. *In vivo* gene expression directed by synthetic promoter constructions restricted to the -10 and -35 consensus hexamers of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.*, 17: 2933-2945.

JANSON, P.E.; KENNE, L. & LINDBERG, B., 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.*, 45: 275.

JEANES, A.; PITTSLEY, J. E. & SENTI, F. R., 1961. Polyssacharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *J. Appl. Polym. Sci.*, 5: 519-526.

KAMMERER, W.; DEUSCHLE, U.; GENTZ, R. & BUJARD, H., 1986. Functional dissection of *E. coli* promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process. *EMBO J.*, 5: 2995-3000.

- KELMAN, A., 1954. The relationship of patogenicity in *Pseudomonas solanaceum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phitopathol.*, 44: 693.
- KENNEDY, J. F. & BRADSHAW, I. J. In: BUSHELL, M. E. ed. *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam. 1984. Vol. 19.
- KINOSHITA, SH., 1980. Bacterial alfa-amilase. *Ann. Rep. Int. Center of Coop. Res. & Devel. in Microb. Eng.*, 3: 413-431.
- KUESITADZE, G. I. & DUALI, M. S. H., 1982. Immobilization of mold and bacterial amylases on silica carriers. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 1765-1772.
- LANZA, S. A. & ROSATO, Y. B. Produção de goma xantana por diferentes mutantes e recombinantes de *Xanthomonas campestris*. In: XIII Reunião Anual de Genética de Microorganismos. Ribeirão Preto, SP, Brasil. 1986. p. 84.
- LEACH, J. G.; LILLY, V. G.; WILSON, H. A. & FURVIS JR, M. R., 1957. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. *Phytopathology*, 47: 59-111.

LEWIN, B. M. In: Cell ed. Genes. New York, 1985. Cap. 12.

LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS, J. G. & DE LEY, J., 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.*, 50: 308-356.

LINARDI, V. B. Melhoramento de *Bacillus amyloliquefaciens* por transformação e fusão, para a produção de alfa-amilase e proteases. Campinas (SP), 1985. Tese (Doutorado). UNICAMP, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

LIEW, K. W. & ALVAREZ, A. M., 1981. Biological and morfological characterization of *Xanthomonas campestris* bacteriophages. *Phitopathology*, 71: 274-275.

LILLY, V. G.; WILSON, H. A. & LEACH, J. G., 1958. Bacterial polysaccharides II. Laboratory-scale production of polisaccharides by species of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*, 71: 274-275.

MAJORS, J., 1975. Initiation of *in vitro* mRNA synthesis from the wild type *lac* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4394-4398.

MANDEL, M. & HIGA, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53: 159.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBRROK, J., 1982. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA.

- MARMUR, J., 1961. A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-218.
- McCLURE, W. R.; HAWLEY, D. K.; YODERIAN, P. & SUSSKIND, M. M., 1982. DNA determinants of promoter selectivity in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 47: 477-482.
- MEYER, B. J.; KLEID, D. G. & PTASHNE, M., 1975. Lambda repressor turns off transcription of its own gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4785-4789.
- MORRIS, E. R.; REES, D. A.; YOUNG, G.; WALKINSHAW, M. D. & DARKE, A., 1977. Order-disorder transition for bacterial polysaccharide in solution - a role for polysaccharide conformation and recognition between *Xanthomonas* and its plant-host. *J. Mol. Biol.*, 110: 1-6.
- NICHOLSON, W. L. & CHAMBLISS, G. H., 1985. Isolation and characterization of a cis-acting mutation conferring catabolite repression resistance to alpha-amylase synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 161: 875-881.
- OSBOURN, A. E.; BARBER, C. E. & DANIELS, M. J., 1987. Identification of plant induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* using a promoter probe plasmid. *EMBO J.*, 6: 23-28.

- PINKNEY, M. & THOMAS, C. M., 1987. Replication and maintenance of promiscuous plasmids of gram-negative bacteria. *Microbiol. Sci.* 4: 186-191.
- PRIENOW, D., 1975. Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequence of two RNA polymerases binding sites. *J. Mol. Biol.*, 89: 419-443.
- PRICE, V. & GALLANT, J. A., 1983. *Bacillus subtilis* rel-G mutant: defect in glucose uptake. *J. Bacteriol.*, 153: 270-273.
- PRIEST, F. G., 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacter. Rev.*, 41: 711-753.
- RAIBAUD, O. & SCHWARTZ, M., 1984. Positive control of transcription initiation in Bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 173-206.
- RAMIREZ, M. G.; FUCIKOVSKY, L.; JIMENEZ, F. G.; QUINTERO, R. & GALINDO, E., 1988. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 5-10.
- RASMUSSEN, P. B.; GERDS, K. & MOLIN, S., 1987. Genetic analysis of the parB locus of plasmid R1. *Mol. Gen. Genet.*, 209: 122-128.

- RONALD, P. C. & STASKAWICZ, J., 1988. The avirulence gene *avrBs* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* encodes a 50 KD protein. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, *1*: 191-198.
- ROSEMBERG, M. & COURT, D., 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.*, *13*: 319-353.
- SANDFORD, P. A., 1979. Exocellular microbial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, *36*: 256-310.
- SANDFORD, P. A. & BAIRD, J., 1983. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G. O., ed. *The polysaccharides*, v.2. New York, Academic Press, 1983. p. 441-490.
- SANDVICK, E. I. & MAERKER, J. M., 1977. Application of xantan gum for enhanced oil recovery. SANDFORD, P. A. & LASKIN, A., eds. (ACS Symposium Series, 45, p. 242-264).
- SCHALLER, H., GRAY, C. & HERRMANN, K., 1975. Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *72*: 737-741.
- SCHNEIDER, K. & BECK, C. F., 1986. Promoter-probe vectors for the analysis of divergent arranged promoters. *Gene*, *42*: 37-48.

- SCHOLZ, P.; HARING, V.; LIEBOLD, B. W.; ASHMAN, K.; BAGDASARIAN, M. & SCHERZINGER, E., 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene*, 75: 271-288.
- SETLOW, P., 1973. Inability to detect cyclic-AMP in vegetative or sporulating cells or dormant spores of *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52: 365-372.
- SHAW, J. J. & KADO, C. J., 1986. Development of a *Vibrio* bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non-disruptive manner. *Bio/Technol.*, 4: 560-564.
- SHAW, J. J.; SETTLES, L. G. & KADO, C. J., 1987. Transposon Tn4431 mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*: characterization of a non pathogenic mutant and cloning of a locus of pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 1: 39-45.
- SCHENBERG, A. C. & COSTA, S. O. P., 1987. Molecular and genetic approaches to alcohol biotechnology in Brazil. *Crit. Rev. Biotechnol. Bioeng.*, 6: 323-355.
- SMITH, B. & ROE, J., 1949. A photometric method for the determination of alpha-amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine colour. *J. Biol. Chem.*, 179: 53-59.

SOLOMON, B., 1978. Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial applications. *Adv. Biochem. Eng.*, 10: 132-172.

SOUW, P. & DEMAIN, A. L., 1979. Nutritional studies on xantan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Appl. Env. Microbiol.*, 37: 1186-1192.

SOUZA, M. B. N. S. Clonagem Molecular e expressão do gene de alfa-amilase de *Bacillus* sp. Brasília (DF), 1986. Tese (Mestrado). Universidade de Brasília, Deptº de Biologia Celular.

STRIECKE, R. Expressão do gene da alfa-amilase de *Bacillus subtilis* em *Xanthomonas campestris*. Campinas (SP), 1988. Tese (Mestrado). UNICAMP, Deptº de Genética e Evolução, Inst. de Biologia.

STRIECKE, R. & ROSATO, Y. B., 1988. Variability in the electrophoretic pattern of alfa-esterases and plasmids in *Xanthomonas campestris*. *Fitopatol. Bras.*, 12: 358-361.

STRIECKE, R.; ROSATO Y. B. & ASTOLFI-FILHO, S., 1989. Subcloning and expression of the alpha-amylase gene from *Bacillus subtilis* in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 512-517.

- SUTHERLAND, I. W., 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39: 243-270.
- SUTTON, J. C. & WILLIAMS, P. H., 1970. Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Can. J. bot.*, 48: 391-401.
- SWANSON, J.; KEARNEY, B.; DALBECK, D. & STASKAWICZ, B., 1988. Cloned avirulence gene of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* complements spontaneous race-change mutants. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 1: 5-9.
- SZOKE, P. A.; TODD, L. A. & DE HASETH, P. L., 1987. Promoter recognition by *E. coli* RNA polymerase: effects of base substitutions in the -10 and -35 regions. *Biochem.*, 26: 6188-6194.
- TANG, J. L.; GOUGH, C. L.; BARBER, C. E.; DOW, J. M. & DANIELS, M. J., 1987. Molecular cloning of protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv *campestris*: expression in *E. coli* and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Gen.*, 210: 443-448.
- TONKOVA, A.; PAZLAROVÁ, J.; EMANUILOVA, E. & STOEVA, N., 1989. Functional half-life of the alpha-amylase mRNA of *Bacillus licheniformis*. *J. Basic Microbiol.*, 29: 55-60.

- TURNER, P.; BARBER, C. & DANIELS, M. J., 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in *Xanthomonas campestris* *Mol. Gen. Genet.*, 199: 338-343.
- ULMAN, A., 1974. Are cyclic AMP effects related to real physiological phenomena? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57: 348-352.
- VALÊNCIA, F. F.; FRAGOSO, S. P.; CASTRO, M. E. B.; TANURI, A. & ASTOLFI-FILHO, S., 1988. Sequência parcial de um gene de alfa-amilase de *Bacillus subtilis*: promotor e região codificadora do peptídeo sinal. In: Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 15, Piracicaba (SP). p. 88.
- VAN DJIL, J. M.; SMITH, H.; BRON, S. & VENEMA, G., 1988. Synthesis and processing of *E. coli* TEM - beta-lactamase and *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in *E. coli*: the role of signal peptidase I. *Mol. Gen. Genet.*, 214: 55-61.
- WALSH, P. M.; HAAS, M. J. & SOMKUTI, G. A., 1984. Genetic construction of lactose utilizing *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 253-257.
- WELLS, J., 1977. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A., eds. (ACS Symposium Series, 45, p. 299-325.

- YONEDA, Y.; YAMANE, K.; YAMAGUCHI, K.; NAGATA, Y. & MARUO, B., 1974. Transformation of *Bacillus subtilis* in alpha-amylase productivity by deoxiribonucleic acid from *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *J. Bacteriol.*, 120: 1144-1150.
- YOUDEIRIAN, P., 1988. Promoter strength: more is less. *Trends in Genetics*, 4: 327-328.
- YUKI, S., 1968. On the gene controlling the rate of amylase production in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31: 182-187.
- YUKI, S. & UEDA, Y., 1968. Fine mapping analysis of the amylase genes in *Bacillus subtilis* by transformation. *Jpn. J. Gen.*, 43: 121-128.