

UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE  
CAMPINAS

**BC/9832**  
**IB/80380**

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

*1988*



TESE DE MESTRADO

Expressão do Gene da Alfa-amilase  
de Bacillus subtilis em Xanthomonas campestris

Renata Stripecke

DR. STOR  
TX  
BO BC 9832  
1202

IB/80380  
BC/9832

Trabalho realizado no Departamento de Genética do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, com apoio financeiro das entidades: CAPES e CNPq.

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pela candidata Renata Striecke e aprovada pela Comissão Julgadora.

*Y. Bomura* 12/8/88

**Orientadora : Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato**

**Co-orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

Tese defendida na Universidade Estadual de Campinas,  
em sessão pública do dia  
12 de agosto de 1988

BANCA EXAMINADORA

Dra. YOKO BOMURA ROSATO, Professora Assistente Doutora da  
Universidade Estadual de Campinas

Dr. SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA, Professor Titular da Univer-  
sidade de São Paulo

Dr. PAULO ARRUDA, Professor Assistente Doutor da Universidade  
Estadual de Campinas

Dr. OCTAVIO HENRIQUE PAVAN, Professor Assistente Doutor da  
Universidade Estadual de Campinas (suplente)

Ao Werner Stripecke,  
meu grande amigo e,  
além de tudo,  
pai.

## PREFACIO

A etapa derradeira de um Mestrado é a redação de uma tese. Ei-la, pois!!!

Não encaro a confecção da tese, entretanto, como a fase mais importante deste degrau acadêmico, cujos principais objetivos são o aprendizado de como se usar os métodos de pesquisa e de como se ler trabalhos científicos. Apesar de minha ansiedade em finalizar rapidamente meu Mestrado, creio que estes objetivos que defini desde o início persistiram, e me proporcionaram importantes referenciais da vida acadêmica.

Também de incalculável valor foi meu relacionamento com minha orientadora, Dra. Yoko Bomura Rosato, que me "adotou" desde minha Iniciação Científica, há três anos e meio atrás. Durante este período de contato, ao vivo ou por cartas, a Dra. Yoko demonstrou-se sempre muito acessível, amiga, e com uma grande qualidade: classe. Sou-lhe muito grata por ter me orientado nas minhas primeiras "engatinhadas" no laboratório da UNICAMP e em muitas outras no laboratório da vida.

Indiscutivelmente, a experiência que obtive na minha estadia no Laboratório de Biologia Molecular da UnB, sob a fantástica orientação do Dr. Spartaco Astolfi Filho, foram de suma importância. Isto, porém, não apenas pelos aspectos profissionais ou científicos daquele ambiente, mas com grande peso devido às relações pessoais. Naquele laboratório aprendi a importância da solidariedade e da amizade que devem existir em uma equipe de trabalho, que consiste no final em uma grande "rede neural". Esta estrutura sináptica possui um valor incalculavelmente maior do que a soma das "partes" (indivíduos e equipamentos). Um fato notável daquela "rede neural" é que ela se formou e continua crescendo de modo espontâneo, livre e aberto. É esta concepção de grupo científico que pretendo defender doravante.

Campinas, Agosto de 1988.

*Renata F. F. F. F.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço e peço desculpas aos bilhões de bactérias que vieram ao mundo, mas que foram das formas mais brutas "abortadas", sem cumprirem o seu papel biológico.

Agradeço à Sociedade Brasileira, que financiou não somente este trabalho, mas também meus cursos de Mestrado e de Graduação. Sinto muito pelo fato desta Sociedade não ter consciência do significado deste ato.

Agradeço à Rosana, nossa técnica, por sua dedicação com as "Xantominhas" e pelos inúmeros quebra-galhos.

Agradeço ao Prof. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo apoio constante e pelas lições de princípios aos fins.

Agradeço ao Dr. Adilson Leite pela leitura do manuscrito, pelas sugestões e pelo inesgotável bom-humor.

Agradeço à Andrea, inseparável colega, pela leitura do manuscrito e produtivas discussões.

Agradeço ao Dr. Paulo Arruda e ao Dr. Octavio Henrique Pavan pelo acesso aos respectivos laboratórios.

Agradeço à D. Maria Tereza de Paula, técnica do Centro de Microscopia Eletrônica da UNICAMP, pelas reproduções fotográficas.

Agradeço à Sílvia, da secretaria da Pós-Graduação do Depto. de Genética, pela atenção e eficiência demonstradas.

Agradeço à D. Ana, da Biblioteca do Instituto de Biologia, pela correção das Referências Bibliográficas.

Agradeço ao Werner e à Tata pelo carinho fraternal e à Ivone pela nossa amizade.

Agradeço a todos os demais amigos e colegas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.



## DERAM UMA FORÇA

### Pessoal da UnB:

- Professores: Maristela, Sueli, Félix.
- Ovelhas: Cinderela, B.suzitilis, Cheirosa, Elita, Inês, Elza, Madame-Pepe, Bia-1, Bia-2, Marlene, Martha, Marcia, Letícia, Tereza.
- Lobos: F.F., Gatinho, Barão von Silva, Rei-Artur, Armando, Osvaldo.
- Assistência Técnica: Fátima e Peão.
- Amigos do Centro Olímpico (todos).

### Pessoal da UNICAMP:

- Yokodetes: Ione, Andrea, Rejane, Suzi.
- Assistência Técnica: Wilson e Sandra.
- Milharal: Laura, Luciane, Bia, Sílvia, Isa, Márcio, Rose, Cris, Fátima, Solange.
- Lagartal: Alejandra, Jaqueline, Carlos, Nanci.
- Bicheral: Rosângela, Jerson, Newton, Mario.
- Professores do Depto. de Genética: Renato, Ana Maria, Rolf, Prof. William.
- Secretaria do Barracão: Jurandir, Marcos, Helena, Creuza, Tereza, Sandra.
- I.B.: Marcos, Gilson, Zé, Evelyn, Ski.
- ATREFE: Johny, Doni, Adriano, Davi.

### Pessoal da USP:

- Professores: Sérgio Olavo e Ana Clara.
- Team: Gabi, Ciça, Aninha, Sandra.

AMIGOS HOMENAGEADOS

Ione e Édison,

minha segunda família,

pela agradável e harmoniosa com-vivência.

Sílvio, formidável companheiro e guru.

Luci, minha irmã do coração.

## ABREVIATURAS

<b>Abs</b>	- absorbância
<b>AMI</b>	- sequência codificadora da alfa-amilase
<b>Ap</b>	- ampicilina
<b>ATP</b>	- adenosina trifosfato
<b>Cb</b>	- carbicilina
<b>Cm</b>	- cloranfenicol
<b>cos</b>	- cosmídio
<b>CPS</b>	- centipoise
<b>Cu</b>	- cobre
<b>DNA</b>	- ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	- ácido etilenodiaminotetracético
<b>Inc</b>	- grupo de incompatibilidade plasmidial
<b>gal</b>	- sequência codificadora da galactosidase
<b>Kb</b>	- mil pares de bases
<b>Km</b>	- canamicina
<b>lac</b>	- lactose
<b>lux</b>	- sequência codificadora para bioluminescência
<b>mA</b>	- miliampere
<b>mob</b>	- sequência codificadora para mobilização plasmidial
<b>MOPS</b>	- ácido morfolinopropanosulfônico
<b>Nal</b>	- ácido nalidíxico
<b>nm</b>	- nanômetro
<b>ori</b>	- origem de replicação
<b>pb</b>	- pares de bases
<b>PEG</b>	- polietilenoglicol

p/v	- peso/volume
RNA	- ácido ribonucleico
RNAse	- ribonuclease
SDS	- dodecilsulfato de sódio
Sp	- espectomicina
Tc	- tetraciclina
tet	- sequência codificadora de resistência á tetraciclina
tra	- sequência codificadora para transferência plasmidial
TRIS	- tris (hidroximetil) aminometano
U	- unidade de atividade enzimática
UV	- ultravioleta
v/v	- volume/volume
X-gal	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosídio

## INDICE

<u>1.) INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</u> .....	01
<u>2.) REVISÃO DA LITERATURA</u> .....	02
2.1.) Aspectos Gerais de <u>Xanthomonas campestris</u> .....	02
2.2.) Fitopatogenicidade ao Nível Molecular.....	02
2.3.) Produção da Goma Xantana.....	04
2.3.1.) Goma Xantana e Fitopatogenicidade.....	04
2.3.2.) Importância Econômica da Goma Xantana.....	04
2.3.3.) Propriedades da Goma Xantana.....	05
2.3.4.) Aplicações da Goma Xantana.....	05
2.3.5.) Biossíntese da Goma Xantana.....	06
2.3.6.) Utilização da Engenharia Genética para o Melhoramento da Produção de Xantana.....	07
2.4.) Vetores de Clonagem de <u>X. campestris</u> .....	08
2.5.) Introdução de Plasmídios em <u>X. campestris</u> .....	11
2.5.1.) Conjugação.....	11
2.5.2.) A Transformação.....	12
2.6.) O Amido e sua Utilização.....	13
2.7.) As Amilases.....	14
<u>3.) MATERIAIS E MÉTODOS</u> .....	16
3.1.) Linhagens.....	16
3.2.) Meios de Cultura.....	17
3.3.) Reagentes, Soluções e Enzimas.....	18

3.4.)	Caracterização da Produção de Amilase em Meio Sólido por Diferentes Linhagens de <u>Xanthomonas campestris</u> .....	21
3.5.)	Purificação de DNA Plasmidial.....	21
3.5.1.)	Purificação em Grande Escala.....	21
3.5.2.)	Purificação em Pequena Escala.....	22
3.6.)	Digestão do DNA com Enzimas de Restrição e Análise dos Fragmentos.....	22
3.7.)	Construção de Moléculas Híbridas de DNA.....	23
3.8.)	Transformação de <u>E. coli</u> .....	23
3.9.)	Transformação de <u>X. campestris</u> .....	24
3.10.)	Conjugação .....	24
3.10.1.)	Primeira Etapa da Conjugação.....	24
3.10.2.)	Segunda Etapa da Conjugação.....	25
3.11.)	Análise da Estabilidade de pMFY40 em <u>X. campestris</u> .....	25
3.12.)	Análise da Produção de Amilase em Meio Sólido pelos Recombinantes Contendo pAP1.....	26
3.13.)	Avaliação da Atividade de Alfa-amilase em Meio Líquido.....	26
3.13.1.)	Consumo de Amido do Meio de Cultura.....	26
3.13.2.)	Formação de Açúcar Redutor no Meio de Cultura.....	26
3.14.)	Fermentação da Xantana.....	27
3.14.1.)	Preparo das Amostras.....	27
3.14.2.)	Medição da Viscosidade.....	27
4.)	<u>RESULTADOS</u> .....	28
4.1.)	Produção de Amilase em Meio Sólido por Diferentes Linhagens de <u>Xanthomonas campestris</u> ....	28

4.2.)	Introdução do Gene da Alfa-amilase no Plasmídio pMFY40.....	29
4.3.)	Introdução dos Plasmídios em <u>X.campestris</u> .....	38
4.3.1.)	Conjugação.....	38
4.3.2.)	Transformação.....	41
4.4.)	Estabilidade de pMFY40 em <u>X.campestris</u> .....	43
4.5.)	Produção de Amilase em Meio Sólido pelos Recombinantes Contendo pAP1.....	44
4.6.)	Atividade da Alfa-amilase em Meio Líquido.....	46
4.7.)	Produção da Xantana em Meio Contendo Amido.....	52
5.)	<u>DISCUSSÃO</u> .....	62
5.1.)	Produção de Amilase em Meio Sólido por Diferentes Linhagens de <u>Xanthomonas campestris</u> ....	62
5.2.)	O Sistema de Clonagem.....	62
5.2.1.)	O Plasmídio Vetor pMFY40.....	62
5.2.2.)	Introdução de pMFY40 em <u>X.campestris</u> .....	62
5.2.3.)	Estabilidade de pMFY40 em <u>X.campestris</u> .....	63
5.3.)	O Plasmídio Híbrido pMFY40-AMI: pAP1.....	64
5.4.)	Expressão de AMI em <u>E.coli</u> e em <u>X.campestris</u> .....	65
5.5.)	Produção de Xantana em Meio Contendo Amido.....	66
5.6.)	Conclusões e Perspectivas.....	68
6.)	<u>RESUMO</u> .....	70
7.)	<u>ABSTRACT</u> .....	71
8.)	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	72

## 1.) INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que produz a goma xantana, de ampla utilização na indústria de alimentos, na agricultura e na prospecção de petróleo.

O desenvolvimento de tecnologia para a produção de goma xantana é de grande importância econômica, devido ao potencial de utilização do biopolímero no Brasil.

Com o objetivo de viabilizar a produção nacional de goma xantana, foi criado um projeto conjunto entre a Faculdade de Engenharia de Alimentos e o Depto. de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP. Com este projeto pretende-se otimizar as condições de fermentação da goma, assim como obter linhagens melhoradas de Xanthomonas campestris, para se aumentar a produção de xantana.

Atualmente, com a utilização da Tecnologia do DNA Recombinante, também conhecida como Engenharia Genética, muito progresso tem sido obtido no melhoramento genético de organismos, amplificando-se o número de genes ou introduzindo-se novos genes de interesse, através de clonagem molecular. A clonagem molecular se faz através de um vetor, ou seja, um fragmento de DNA ao qual pode ser acoplado um gene especial, de modo que seja possível a introdução, replicação, manutenção e, eventualmente, a expressão deste na célula.

Diante destes fatos nos propusemos a:

1. Obter um vetor de clonagem funcional para Xanthomonas campestris, com as seguintes características: boa estabilidade na célula hospedeira; presença de genes de resistência a antibióticos para facilitar a seleção de recombinantes; possuir sítios que possibilitem a inserção de fragmentos de DNA, permitindo clonagens e, eventualmente, a construção de bancos genômicos de X. campestris;
2. Estabelecer técnicas para a introdução de vetores de clonagem em Xanthomonas campestris;
3. Inserir no vetor de clonagem um gene de fácil análise da expressão, no caso, o da alfa-amilase de Bacillus subtilis;
4. Verificar a expressão deste gene em duas linhagens de X. campestris produtoras de xantana, uma originalmente amilolítica e outra não amilolítica;
5. Verificar a potencialidade dos clones recombinantes em produzir goma xantana a partir de amido ou a partir de amido combinado com sacarose como substratos.



## 2.) REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1.) Aspectos Gerais de *Xanthomonas campestris*

*Xanthomonas* (DOWSON, 1939) compreende um gênero de bactérias gram-negativas e aeróbicas da família Pseudomonadaceae. As células crescem isoladas, têm dimensões aproximadas de 0.2-0.8 por 0.6-2.0  $\mu\text{m}$  e têm mobilidade devido a um flagelo polar (DYE & LELLIOTT, 1974). Todas as espécies conhecidas são patógenos de plantas, a saber: *X. albilineans*, *X. ampelina*, *X. axonopodis*, *X. fragariae* e *X. campestris*. As duas últimas espécies produzem uma goma polissacarídica, a xantana, em meio contendo glicose, e as colônias destas espécies são mucóides e brilhantes em meio nutriente ágar com glicose. A espécie *Xanthomonas campestris* é dividida em mais do que 120 grupos (BRADBURY, 1984), denominados de patovares (pv), de acordo com a especificidade à planta hospedeira. *X. campestris* pv *campestris*, pv *citri* e pv *vesicatoria*, por exemplo, infectam, respectivamente, crucíferas, citrus e solanáceas. Os patovares *cassavae* e *manihotis* habitam ambas plantas de mandioca, porém o pv *manihotis* é o único, entre as *Xanthomonas* que não produz o pigmento amarelo da goma.

Devido ao seu caráter fitopatogênico, *Xanthomonas campestris* recebe atenção especial, pelos danos causados às várias lavouras agrícolas.

### 2.2.) Fitopatogenicidade ao nível molecular

As pesquisas recentes sobre patógenos bacterianos de plantas exemplificam muito bem o poder das técnicas de biologia molecular para se investigar sistemas que, até pouco tempo atrás, eram de difícil abordagem. A interação parasita-hospedeiro sempre foi um tema importante, não só do ponto de vista econômico, mas também por envolver um alto grau de complexidade na relação entre dois organismos diferentes.

A biologia molecular da interação de *Xanthomonas campestris* com plantas tem seu modelo principal no patovar *campestris* (DANIELS *et al.*, 1987), no qual já foram descritos genes de fitopatogenicidade, genes estruturais de enzimas relacionadas à degradação de tecidos vegetais - celobiases, ligninases e amilases - e genes que controlam a síntese e secreção destas enzimas.

A definição de "genes de fitopatogenicidade" tem causado algumas controvérsias. Apesar do consenso geral que genes que determinam a síntese de toxinas e a produção de enzimas degradativas da parede celular vegetal pertençam a esta categoria, alguns genes identificados a partir de mutantes não patogênicos também foram descritos, cujo fenótipo poderia estar relacionado ao metabolismo intermediário, e não diretamente relacionados à fitopatogenicidade. Segundo DANIELS *et al.* (1987), um mutante de fitopatogenicidade é aquele que não possui nenhum defeito discernível no crescimento fora da planta, ou seja, é prototrófico e cresce em taxas normais, porém possui, de algum modo, alterações

em sua interação com plantas, as quais se manifestam como sintomas modificados da doença. Segundo esta definição, não devem ser considerados somente os genes que codificam fatores de fitopatogenicidade no sentido estrito, porém também aqueles que atuam na interação hospede-parasita.

Para a detecção dos genes de fitopatogenicidade, portanto, duas estratégias tem sido usadas: usando-se mutantes para posterior identificação das porções do DNA modificadas, ou postulando-se a priori fatores que estariam relacionados com a fitopatogenicidade (enzimas degradativas, produção de goma) e que poderiam ser regulados diferencialmente, in e ex planta.

Para a localização de genes de fitopatogenicidade por mutação DANIELS et al (1984a) submeteram X.c. pv campestris a mutagênicos químicos e os sobreviventes prototróficos que deram respostas anormais in planta foram caracterizados quanto: 1) à capacidade de produzir certas enzimas extra-celulares (pectato-liase, pectina-esterase, amilase, carboximetilcelulase e protease); 2) à virulência e 3) à habilidade de produzir uma resposta de hipersensibilidade no hospedeiro. Em uma etapa posterior, DANIELS et al (1984b) construíram um banco genômico de uma linhagem selvagem patogênica, o qual foi transferido en masse para mutantes não patogênicos. Os recombinantes foram testados quanto à recuperação do fenótipo patogênico e pôde-se isolar um plasmídeo recombinante, o pIJ3000, que capacitava tal recuperação. A seguir, TURNER et al (1985) mapearam o grupo de genes de fitopatogenicidade através de inserções do transposon Tn5 no plasmídeo pIJ3000.

Com o mesmo tipo de aproximação ao problema, porém clonando genes de enzimas relacionadas à fitopatogenicidade, SAWCZYC & DANIELS (vide DANIELS, 1987) transferiram um banco genômico de X.c. pv campestris para X.c. pv translucens. O patovar translucens não produz pectato-liase, carboximetil-celulase e amilase, porém contém os genes de controle e excreção destas enzimas. Logo, selecionando-se os clones de X.c. pv translucens produtores das enzimas, isolou os fragmentos contendo os genes estruturais dos plasmídios recombinantes.

TANG et al (1987) isolaram fragmentos de DNA de um banco genômico de Xanthomonas campestris pv campestris, contendo sequências gênicas de protease, cuja expressão pode ser verificada em E. coli. Análises de fitopatogenicidade com mutantes das sequências genéticas, às quais foi inserido o transposon Tn5, demonstraram que a protease não demonstra uma importância crítica para a patogenicidade de X.c. campestris em plantas de nabo, mas que pode ter certo significado no desenvolvimento da doença.

Quanto à estratégia de localizar genes expressos diferencialmente pela bactéria, dentro e fora do hospedeiro, OSBOURN et al (1987), realizaram um experimento utilizando um plasmídeo contendo o gene da cloranfenicol-acetil-transferase (CAT) desprovido de promotor. Este gene proporciona a resistência ao cloranfenicol, e à montante ("upstream") do gene foram introduzidos fragmentos do DNA total de Xanthomonas campestris. Os plasmídios recombinantes foram introduzidos em linhagens bacterianas sensíveis ao cloranfenicol e estas, posteriormente, foram inoculadas

em plantas tratadas com este mesmo antibiótico. Somente as bactérias que expressaram a atividade de CAT puderam sobreviver e destas, posteriormente, foram selecionados em placas os clones que possuíam a atividade de CAT apenas in planta. Deste modo, foram isolados fragmentos de DNA que contém promotores funcionais quando a bactéria infecta a planta.

Com estes exemplos citados e alguns mais da curta história da biologia molecular da interação parasita-hospedeiro, considerável progresso tem sido conseguido: novos conceitos estão emergindo e questões estão sendo formuladas, dando novo ímpeto ao estudo fisiológico da fitopatogenicidade de X. campestris.

## 2.3.) Produção da Goma Xantana

### 2.3.1.) Goma Xantana e Fitopatogenicidade

Muitas bactérias fitopatogênicas produzem o polissacarídeo extracelular (EPS) e é sugerido por vários autores que estes polímeros possam ser fatores da patogenicidade, principalmente porque linhagens deficientes em EPS são, geralmente, não virulentas (KELMAN, 1954).

A função biológica específica da goma produzida por Xanthomonas é até hoje desconhecida, podendo estar relacionada: 1. com a proteção da bactéria a condições ambientais adversas, tais como, dessecação, altas temperaturas, luz ultra-violeta (LEACH et al, 1957); 2. com a adesão da bactéria à superfície da planta, previamente à infecção (MORRIS et al, 1977) e 3. com a obstrução de vasos da planta acarretando necroses (LEACH et al, 1957).

BARRERE et al (1957), procurando verificar o papel da goma xantana na fitopatogenicidade, clonaram alguns genes envolvidos em sua biossíntese. Alguns plasmídios recombinantes, contendo fragmentos do genoma de X.c. pv campestris selvagem restabeleceram a produção de goma em mutantes não mucóides. A mutagenese do DNA clonado com o transposon Tn5 foi então usada para se localizar a região de complementação genômica, resultando em evidências de que os genes envolvidos na produção de EPS estariam agrupados. Apesar destes resultados, a questão da relação EPS-patogenicidade não está ainda esclarecida, pois os mutantes EPS-deficientes retiveram seu caráter virulento.

### 2.3.2) Importância Econômica da Goma Xantana

Além da atividade biológica da goma xantana, pesquisas tem sido conduzidas para se obter altos níveis de produção deste biopolímero, cuja estrutura consiste em 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 (JANSSON et al, 1975).

A goma xantana é o primeiro polissacarídeo microbiano de significado comercial e a tecnologia de produção foi inicialmente desenvolvida pelo Departamento de Agricultura (NRRL, Peo-

ria, IL ) dos Estados Unidos da América, em 1959, produzida comercialmente a partir de 1961, e aprovada para uso em alimentação humana em 1969.

### 2.3.3.) Propriedades da Goma Xantana

A goma xantana se dissolve em água fria ou quente e produz soluções de alta viscosidade a baixas concentrações. As soluções da goma xantana são altamente pseudoplásticas, isto é, a viscosidade diminui rapidamente com o aumento de tensão de cisalhamento e esta diminuição é instantânea e reversível. A viscosidade é muito resistente à degradação térmica e na presença de sais esta resistência é aumentada. A viscosidade das soluções aquosas de goma xantana é essencialmente independente do pH entre 6 e 9 e ocorrem apenas pequenas mudanças entre pH 1 e 11 (ROCKS, 1971). A goma xantana tem excelente estabilidade e compatibilidade com altas concentrações de muitos sais. Por exemplo, é compatível com soluções de 15% de NaCl e soluções de 25% de CaCl<sub>2</sub>. Uma das propriedades mais relevantes da goma xantana é a capacidade de interagir com galactomanas, tais como, goma locusta e goma guar, proporcionando a formação de géis (COTTRELL, 1979).

### 2.3.4.) Aplicações da Goma Xantana

Dentre as áreas com grande potencial de aplicação da goma xantana, destacam-se:

- Alimentos: a goma xantana é bastante utilizada na indústria de alimentos devido às propriedades de alta estabilidade ao pH e temperatura. Dentre as aplicações destacam-se a utilização em conservas, laticínios e produtos de panificação (COTTRELL, 1979). A adição de goma em vários tipos de alimentos é permitida nos E.U.A. desde 1969. No Brasil a adição de xantana em alimentos foi permitida pelo Decreto Lei Nº 55.871 (BRASIL, 1965); as concentrações máximas de goma xantana permitidas nos diferentes tipos de alimentos estão especificadas na Resolução 15/75 (ASSOCIAÇÃO..., 1975).

- Produção de petróleo: os quatro polímeros atualmente utilizados em lamas de perfuração são goma xantana, poliácridamidas, amidos modificados e derivados de celulose, particularmente carboximetilcelulose. Devido à estabilidade ao pH, calor, cátions e íons divalentes associada ao comportamento pseudoplástico sob condições de alta tensão de cisalhamento, a goma xantana é tecnicamente o polímero preferido para a perfuração de poços de petróleo (WELLS, 1977). Outro setor com grande potencial de utilização de goma xantana é o de projetos de recuperação melhorada de óleos (SANDVIK E MAERKER, 1977).

- Outras aplicações: na área industrial, a goma xantana é usada como espessante de pastas de impressão de têxteis, removedores ácidos ou alcalinos, formulações de explosivos e outras utilidades (SANDFORD, 1979). Na área de pecuária, a goma xantana é utilizada como agente de suspensão de vitaminas e minerais para suplementos líquidos em alimentos de animais, e também para suspender proteínas nos substitutos de leite para bezerros (BETZ, 1979).

As propriedades reológicas da goma aumentam a capacidade de dispersão das suspensões de fungicidas, herbicidas e inseticidas, aumentando também a capacidade de aderência à vegetação (COTTRELL, 1979).

### 2.3.5.) Biossíntese da Xantana

Pouco é conhecido à respeito dos genes envolvidos na via metabólica da xantana, a qual pode ser dividida em três etapas: 1. a incorporação de açúcares simples e sua conversão em derivados nucleotídicos; 2. a construção das subunidades pentassacarídicas ligadas ao carreador isopentenil-pirofosfato e 3. a polimerização das unidades repetitivas de pentassacarídeos e sua secreção.

Alguns estudos detalhados realizados *in vitro* por IELPI *et al* (1981, 1983) demonstraram que uma subunidade pentassacarídica é sintetizada acoplada a um carreador lipídico (prenil-difosfato), de uma maneira sequencial, à partir dos precursores UDP-glicose, GDP-manose, UDP-ácido glucurônico, acetil coenzima A e fosfoenolpiruvato. As unidades pentassacarídicas são subsequentemente polimerizadas em moléculas polissacarídicas de alto peso molecular e que são então excretadas da célula. Logo, como pode ser observado na figura 2.1., a biossíntese da xantana é um processo complexo e preciso, o qual deve requerer várias enzimas e controles regulatórios.

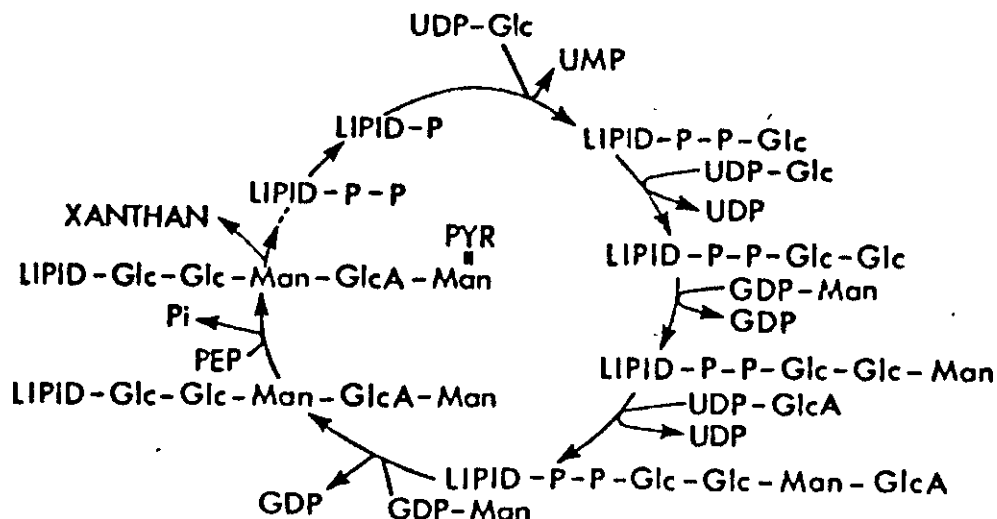


FIGURA 2.1.: Biossíntese da xantana: mecanismo de adição de monossacarídeos para formar a unidade pentassacarídica. Reproduzido de IELPI *et al* (1983).

Quanto aos substratos utilizados na biossíntese da xantana, LEACH *et al* (1957) e LILLY *et al* (1958) estudaram a produção de polissacarídeos por espécies de *Xanthomonas* usando várias

fontes de carbono, tais como, maltose, glicose, sacarose, amido solúvel, amido de milho e amido hidrolisado, e definiram um meio para a produção da xantana, consistindo de glicose, sacarose ou amido como fontes de carbono, caseína hidrolisada e minerais. SOUW & DEMAIN (1979) pesquisaram os requerimentos nutricionais de *Xanthomonas campestris* NRRL-B1459 para a otimização da produção de goma xantana em um meio quimicamente definido. Segundo eles, a utilização de 4% de sacarose, e em segundo lugar 4% de glicose, produzia o maior título de xantana. A posterior adição de alguns ácidos orgânicos, tais como succinato, piruvato e alfa-cetoglutarato, estimulavam a produção de xantana, porém a inibiam em concentrações elevadas. Este mesmo resultado foi notado em relação à frutose.

CRUZ (1983), estudou alguns fatores envolvidos na produção de goma xantana por uma linhagem de *X.c. pv manihotis* e concluiu que: 1. a sacarose a 4% foi a melhor fonte de carbono; 2. a adição de ácidos orgânicos estimularam a produção; 3. a limitação de nitrogênio favoreceu a produção e 4. quantidades de fosfato inorgânico acima de 25 mM/l no caldo de fermentação causam uma diminuição da goma produzida.

As quantidades de acetato e piruvato presentes na estrutura da xantana interferem em sua viscosidade, como foi verificado por CADMUS *et al* (1976) e SANDFORD & BAIRD (1983).

A conclusão de vários grupos que pesquisam a produção da goma é que a elucidação das vias metabólicas e os mecanismos de biossíntese do polímero são etapas fundamentais para se aumentar a produção de xantana. Com este objetivo está trabalhando a empresa Synergen Inc. (Boulder, Colo, E.U.A.), filial da Texaco, com seu grupo de cientistas liderados pelo Dr. Rebecca W. Vanderslice. Interrupções no processo de biossíntese da goma permitiram ao grupo produzir unidades repetitivas defeituosas da xantana, as quais, ao se polimerizarem, resultam em moléculas de goma variantes, algumas com viscosidade superior à da goma original (YALPANI, 1987).

Futuramente, com o descobrimento dos passos-chave da biossíntese da goma, o melhoramento genético das linhagens produtoras será facilitado.

### 2.3.6.) A Utilização da Engenharia Genética para o Melhoramento da Produção da Xantana.

Além do trabalho de BARRERE *et al* (1987) citado anteriormente, onde foram clonados genes relacionados com a biossíntese da xantana para se analisar seu papel na fitopatogenicidade, dois outros trabalhos recentes relatam também a clonagem desses genes, porém com objetivo de se aumentar a produção industrial de xantana. HARDING *et al* (1987) introduziram um banco genômico de *X. campestris* selvagem em mutantes não mucóides, e selecionaram os transconjugantes capazes de produzir colônias mucóides. Após a localização por subclonagens e por mutação com transposons do grupo genômico relacionado com a biossíntese da goma, avaliou-se o efeito destes genes na produção da xantana. Um plasmídeo contendo uma inserção de 12,4 Kb foi isolado, e verificou-se que es-

te possuía um grupo de pelo menos quatro genes ligados, relacionados com a biossíntese da xantana. Este plasmídeo, ao ser introduzido na linhagem NRRL-B1459, aumentou a produção de goma em 10% e a piruvatação das cadeias laterais em 45%. Estes resultados confirmaram a observação de que o conteúdo de piruvato tem influência na viscosidade da solução e, além disto, na termoestabilidade e na resistência do polímero a sais.

No segundo trabalho, executado por THORNE et al (1987), também foi descrita a clonagem e a expressão de fragmentos de DNA de uma linhagem selvagem de Xanthomonas campestris NRRL-B1459, os quais complementaram várias mutações que bloqueavam a síntese da xantana. O DNA clonado foi mapeado por análise de restrição, por sequenciamento de DNA e por complementação de mutações específicas (Tn5), e foi, posteriormente, ordenado em grupos de complementação funcionais. Três loci foram identificados contendo, respectivamente, um, dois e três grupos de complementação. Por fim, a produção de xantana foi medida para a linhagem contendo múltiplas cópias de genes de xantana clonados. Verificou-se mudanças na taxa de acumulação de xantana superiores a 20% nos recombinantes, havendo inclusive um caso em que a produção dobrou.

Como exemplo de um trabalho realizado para se investigar substratos alternativos para a produção de xantana, temos o de WALSH et al (1984), no qual se introduziu um transposon de lactose (Tn 951) em X. campestris. Os transconjugantes obtiveram uma atividade específica de beta-galactosidase mais de 200 vezes superior à dos selvagens, entretanto, a capacidade dos recombinantes para produzir xantana a partir de lactose, que é um dejetos da indústria de laticínios não foi testada.

#### 2.4.) Vetores de Clonagem de X. campestris

Os vetores de clonagem usados em X. campestris são plasmídios e cosmídios e, embora alguns bacteriófagos que se multiplicam em Xanthomonas tenham sido descritos (LIEW & ALVAREZ, 1981), eles ainda não foram usados como vetores, pois não se tem todavia comunicações a respeito de transdução especializada ou generalizada na espécie.

Apesar dos transposons poderem ser empregados como vetores para se inserir na bactéria genes de resistência a antibióticos, devido ao seu comportamento imprevisível no genoma do hospedeiro, apenas alguns exemplos são conhecidos para Xanthomonas (WALSH et al, 1984; TURNER et al, 1984).

A maioria das clonagens em X. campestris é feita com plasmídios, dos quais a maioria funcional na espécie pertence à classe dos plasmídios promíscuos (vide Tabela 2.1.), pois os plasmídios restritos, como por exemplo, os derivados de ColE1, pACYC184 e pBR325, além de só poderem ser transferidos em frequências baixíssimas, da ordem de  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ , em geral não se mantêm em Xanthomonas (TURNER, 1984).

Os plasmídios promíscuos se replicam e se mantêm estáveis em uma grande gama de espécies bacterianas. Entre as Gram-

negativas estes plasmídios geralmente pertencem aos grupos de incompatibilidade C, N, P, Q e W de Escherichia coli. Embora alguns destes plasmídios sejam também auto-transmissíveis entre as diversas espécies, é principalmente seu sistema de manutenção dentro da célula que os distingue como promíscuos. Isto apóia-se no fato que alguns plasmídios restritos, como os do grupo F, transferem-se também para várias espécies, porém não se mantêm (GUINEY, 1982).

PINKNEY & THOMAS (1987) investigaram dois grupos de plasmídios promíscuos, que vieram a ser os mais empregados em Xanthomonas campestris, a saber, o Inc-P e o Inc-Q, que possuem diferentes estratégias para a manutenção na célula. Plasmídios do grupo Inc-P são grandes (53-87 Kb), auto-transmissíveis, têm pequeno número de cópias por célula, se duplicam unidirecionalmente e apenas um único gene é essencial para a ativação da origem de replicação. Já os plasmídios pertencentes ao grupo Inc-Q são menores (8.7-9.5 Kb), não são auto-transmissíveis, têm maior número de cópias, duplicam-se uni- e bidirecionalmente, e possuem três genes essenciais à replicação. Segundo os autores, os plasmídios do grupo Inc-P, apesar de serem replicons relativamente simples, teriam uma série de genes adicionais e circuitos controladores, os quais os ajudariam a se manter em algumas espécies, mesmo que o processo de replicação destas fosse ineficiente. Por outro lado, os plasmídios do grupo Inc-Q utilizariam pelo menos três de suas proteínas de replicação, o que permitiria um maior grau de independência do hospedeiro, possibilitando uma replicação eficiente, e, portanto, grande número de cópias na maioria das espécies.

Apesar da maioria dos plasmídios potencialmente utilizáveis em Xanthomonas serem promíscuos, uma exceção à regra foi inesperadamente reportada por MUROOKA et al (1987), que introduziram o plasmídio pBR328 em X.c. pv citri sob condições melhoradas de transformação, embora já houvesse sido reportado que o replicon de pBR325 não fosse funcional em X.campestris (TURNER, 1984).

Uma alternativa para a construção de vetores de clonagem para X.campestris que vem se tornando cada vez mais promissora é a utilização de plasmídios nativos da bactéria. Na maioria dos casos, até então divulgados, desconhecem-se os caracteres fenotípicos codificados nestes plasmídios, sendo então denominados de crípticos (LIN et al, 1979; RODRIGUES-NETO et al, 1986; SILVEIRA et al, 1986; STRIPECKE & ROSATO, 1986; LAZO & GABRIEL, 1987). Entretanto, STALL et al (1986) reportaram a presença de um loci de resistência a cobre e um loci de avirulência em um plasmídio auto-transmissível de X.c. pv vesicatoria. MUROOKA et al (1987) isolaram um fragmento de plasmídios de X.c. pv citri, o qual contém uma região de transferência (mob). Este fragmento foi ligado ao plasmídio pBR328, resultando no pBXC12. O plasmídio pBXC12 é estável em X.c. pv citri e confere um bom sistema para a construção de um banco genômico bacteriano em Xanthomonas ou em E.coli.

Futuramente, o isolamento de origens de replicação e de genes com marcas seletivas oriundos de Xanthomonas poderá permiti-



tir a construção de vetores com maior estabilidade e eficiência para esta bactéria.

TABELA 2.1.: Relação de alguns plasmídios funcionais em Xanthomonas campestris, suas características principais e fontes. As abreviaturas encontram-se no início deste trabalho.

PLASMÍDIO	CARACTERÍSTICAS	DESCRIÇÃO/CONSTRUÇÃO	INTRODUÇÃO EM Xc
RP4	Inc-P, 56.4Kb, Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup>	DATTA <u>et al</u> , 1971	LAI <u>et al</u> , 1977ab
R68.45	Inc-P, Km <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	HAAS & HOLLOWAY, 1976	TURNER <u>et al</u> , 1984
pJB4J1	pPH1J1::Mu::Tn5 Inc-P, Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	BERINGER <u>et al</u> , 1978	"
pLAFRI	Inc-P, cosmídio, 21.6Kb, ori RK2, Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup> , Tc <sup>r</sup>	FRIEDMAN <u>et al</u> , 1982	"
pKT230	Inc-Q, 11.9Kb, ori RSF1010 Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	BAGDASIARAN <u>et al</u> , 1981	"
pNJ1020	Tc <sup>r</sup>	GRINTER	"
pUCD607	Lux <sup>+</sup> , 20.3Kb Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	SHAW & KADO, 1986	SHAW & KADO, 1986
pBXC12	Mob de <u>Xccitri</u> ori pBR328 7.8Kb Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup>	MUROOKA <u>et al</u> , 1987	MUROOKA <u>et al</u> , 1987
pBR328	4.9Kb, Cm <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	SOBERON <u>et al</u> , 1980	"
pXvCu	nativo de <u>Xc</u> <u>vesic.</u> Cu <sup>r</sup> Mob <sup>+</sup> Tra <sup>+</sup> , ca.193Kb	STALL <u>et al</u> , 1986	STALL <u>et al</u> , 1987
5002 5003	Gal <sup>+</sup>	HEMMING, 1984	KAWALEK & SHAAD, 1985
pRK311	Inc-P ori RK2 λcos LacZ Tra <sup>+</sup> Mob <sup>-</sup> Tc <sup>r</sup>	DITTA <u>et al</u> , 1985	THORNE <u>et al</u> , 1987

## 2.5.) Introdução de Plasmídios em X.campestris

As populações bacterianas desenvolveram três diferentes modos de recombinação genética, distinguíveis pelo agente-vetor da transferência do DNA: conjugação, transformação e transdução. A conjugação é mediada por plasmídios e pode envolver a transferência de uma cópia de fita-simples de todo ou de parte do cromossomo da célula doadora. A transformação resulta do recebimento do DNA presente em solução pelas células, e foi o primeiro mecanismo descrito para bactérias (GRIFFITH, 1928). A transdução é a transferência, via bacteriófagos, de pequenos pedaços do cromossomo bacteriano para outras células infectadas. Por serem os dois primeiros casos os mais estudados em Xanthomonas, estes serão discutidos a seguir.

### 2.5.1) Conjugação

A conjugação bacteriana, descoberta em 1946 por LEDEBERG & TATUM em E.coli K12, é um processo de recombinação onde há a necessidade de contato físico entre as células doadoras e receptoras e depende da presença de plasmídios chamados de conjugativos. Atualmente é conhecido grande número de plasmídios conjugativos em bactérias Gram-negativas e alguma em Gram-positivas. É comum a transferência interespecífica e mesmo intergenérica (SOUZA & COSTA, 1987).

Os primeiros trabalhos que relatam o processo de conjugação em Xanthomonas foram publicados por LAI *et al* (1977), no qual plasmídios promíscuos como o RK2 e o RP4 foram introduzidos em X.c. pv vesicatoria. Testou-se a estabilidade destes plasmídios em várias condições de crescimento e verificou-se se a fitopatogenicidade era prejudicada. STALL *et al* (1986) verificaram que a resistência ao cobre em linhagens de X.c. pv vesicatoria era transferida por conjugação às linhagens sensíveis. TURNER *et al* (1984) testaram a habilidade de X.c. pv campestris em manter vários plasmídios transferidos por conjugação oriundos de linhagens de E.coli doadoras.

Além da conjugação tradicional há ainda a triparental. Até recentemente, os vetores de clonagem eram introduzidos em Xanthomonas apenas por este tipo de conjugação. O processo envolve a presença de um plasmídio denominado de "helper", capaz de mobilizar um outro plasmídio que não contenha o operon de transferência (tra). Os "helpers" utilizados em Xanthomonas estão listados na Tabela 2.2. O plasmídio pRK2013 (FIGURSKI & HELINSKI, 1979), que é um dos mais usados, contém um eficiente sistema de transferência plasmidial proveniente do plasmídio promíscuo RK2 e um replicon ColE1 funcional em uma pequena gama de hospedeiros. Deste modo, o pRK2013 é capaz de se mobilizar e de mobilizar outros plasmídios, porém é incapaz de se replicar em Xanthomonas.

TABELA 2.2.: Plasmídios "helper" usados em conjugação triparental em Xanthomonas, características principais e fontes.

PLASMÍDIO	CARACTERÍSTICAS	DESCRIÇÃO/CONSTRUÇÃO	CONJUGAÇÃO DE <u>Xc</u>
RP4	Inc-P 56.4 Kb Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cb <sup>r</sup> Tra <sup>+</sup>	DATTA <u>et al.</u> , 1971	MUROOKA <u>et al.</u> , 1987
pRK2013	ori ColE1 Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	FIGURSKI & HELINSKI 1979	KAWALEK & SCHAAD 1985
pRK2073	pRK2013 Km <sup>r</sup> ::Tn7	LEONG <u>et al.</u> , 1982	TURNER <u>et al.</u> , 1984

### 2.5.2) Transformação

A transformação pode ser considerada de dois tipos: a natural e a artificial. A transformação natural faz parte da fisiologia normal da célula, e a competência, ou seja, a capacidade da bactéria em ligar-se e incorporar o DNA em uma forma resistente à DNase exógena, é um caráter herdável sujeito à pressão seletiva (STEWART & CARLSON, 1986). Na transformação artificial, as células receptoras adquirem a competência como resultado de tratamentos químicos, físicos ou enzimáticos, realizados em laboratório. Este tipo de transformação é um dos mais importantes elementos da tecnologia do DNA recombinante, e vários procedimentos foram otimizados para se obter alta eficiência de transformação (SAUNDERS et al., 1984).

A transformação artificial com DNA cromossômico foi o primeiro processo de recombinação gênica descrito em Xanthomonas (COREY & STARR, 1957a,b), onde se transferiu a informação genética de resistência à estreptomicina e do tipo de colônia a linhagens de X.c. pv phaseoli. Outros trabalhos nesta linha foram o de YAMASAKI et al. (1966) e o de COSTA (1968), nos quais foram transferidos, respectivamente, o caráter de virulência e a resistência aos antibióticos estreptomicina e eritromicina.

A introdução de DNA plasmidial por transformação em Xanthomonas, entretanto, foi reportada pela primeira vez apenas em 1984 por GABRIEL, onde X.c. pv malvacearum foi transformada por um plasmídio nativo. Quanto à transformação por vetores plasmidiais, dois artigos de 1987 reportam as dificuldades e as técnicas utilizadas para a obtenção de transformantes (MUROOKA et al., 1987; ATKINS et al., 1987). MUROOKA et al., usando o plasmídio pBR328 e um derivado deste, o pBXC12, após tentativas de transformação por alguns métodos descritos, tais como, o de DAVIS et al. (1980) e o de HANAHAN (1983), só conseguiram transformar através de modificações das técnicas de KUSHNER (1978) e de HIMENO (1984), obtendo-se eficiência de até  $3 \times 10^4$  transf./ $\mu$ g DNA. Dentre os principais problemas e respectivas soluções apontados como significativos na eficiência de transformação foram citados: 1. presença de sistemas de restrição em Xanthomonas, o que pode ser

evitado usando-se vetores protegidos, ou seja, que tenham sido introduzidos em X.campestris e que tenham subsistido por terem sido metilados ou não sofrido restrição; 2. os polissacarídeos capsulares atrapalham o processo da transformação, logo devem ser usadas células que tenham crescido somente até a fase logarítmica média; 3. Xanthomonas tem o tempo de geração muito longo, por isso requer um período maior de incubação (estipulado para 5h aproximadamente), para que fique capaz de expressar resistência aos marcadores seletivos.

ATKINS et al (1987) testaram os métodos de indução de competência por  $\text{CaCl}_2$  (COHEN et al, 1972), por incorporação de solução de  $\text{RbCl}$  (BAGDASIARAM & TIMMIS, 1981) e por congelamento e descongelamento (HOLSTERS et al, 1978), e obtiveram transformantes nas três técnicas, porém somente quando o plasmídeo tinha sido isolado de X. campestris. Por ser o mais simples, a técnica tradicional de  $\text{CaCl}_2$  foi otimizada, resultando numa eficiência de 850 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. Os autores também comentaram que a barreira de restrição do DNA por nucleases de X.campestris seria um dos pontos cruciais para a baixa eficiência de transformação e, para resolver este problema, isolaram um mutante de X.campestris deficiente em restrição.

## 2.6.) O Amido e sua Utilização

O amido ocorre sob a forma de grânulos insolúveis em água e é o principal carboidrato de reserva das plantas superiores. Ele é produzido comercialmente a partir de sementes, tubérculos e raízes de plantas. A maior fonte de amido é o milho, e outras culturas brasileiras produtoras são: mandioca, inhame e batata, entre outras.

O amido é composto por amilose e amilopectina, dois componentes de alto peso molecular que diferem entre si no tamanho da molécula, na solubilidade em água, na capacidade de se corar por iodo e na susceptibilidade à hidrólise enzimática. A amilose é uma molécula linear composta de cadeias de resíduos de glicose ligados de forma alfa-1,4, enquanto que a amilopectina é um polímero ramificado com ligações do tipo alfa-1,6 e alfa-1,4. A amilose, em geral, representa de 20 a 25% do amido, dependendo da fonte do polímero.

O amido é utilizado na alimentação, tanto na forma natural como manufaturada. Além disto, nas indústrias de alimentos, o amido pode ser empregado como fonte de carbono de microorganismos de interesse econômico.

A utilização do amido como substrato para a produção de xantana foi reportada por LEACH et al (1957) e, mais recentemente, por SOUW & DEMAÏN (1979), entretanto, apesar do amido ser um substrato de maior disponibilidade e de menor preço que a sacarose, pelo fato desta fornecer ainda a maior produção de xantana, esta é a tradicionalmente usada.

Um bom exemplo da introdução do caráter amilolítico em microorganismos de interesse industrial foi desenvolvido na levedura. O etanol pode ser obtido do amido após fermentação alcoóli-

ca, entretanto, como o agente fermentador, a levedura Saccharomyces cerevisiae, não degrada o amido a açúcares fermentescíveis, é necessário hidrolizar o amido por métodos químicos e físicos, antes da fermentação pela levedura. Com o objetivo de eliminar esta etapa do processo fermentativo, ASTOLFI-FILHO *et al* (1986) introduziram o gene da alfa-amilase de camundongo em S. cerevisiae, criando possibilidades futuras de produção de etanol a partir do amido da mandioca, ao invés da sacarose da cana-de-açúcar. Segundo SCHENBERG & COSTA (1987), as vantagens nacionais da cultura da mandioca sobre a da cana são: 1. maior produção de etanol por área cultivada; 2. menores exigências de fertilidade do solo; 3. menor susceptibilidade de ataque a pragas; 4. maior tolerância a variações climáticas; 5. menor necessidade de água.

Além de seu uso como fonte de carbono e de substrato para a fermentação, o amido também tem outras aplicações industriais: na produção de xaropes de maltose e glicose, na panificação e na indústria de tecidos, sendo que, para tal, é imprescindível a atuação das enzimas amilolíticas.

## 2.7.) As Amilases

As enzimas que degradam amido distribuem-se amplamente nos reinos microbiano, vegetal e animal. Elas degradam amido e polímeros correlatos, originando produtos característicos de cada enzima amilolítica específica. Inicialmente, o termo amilase foi usado para denominar enzimas que hidrolisavam as ligações alfa-1,4 glicosídicas, porém, recentemente outras enzimas foram descobertas, com outros tipos de atividade catalítica. Segundo FORGARTY & KELLY (1980), as amilases podem ser divididas em: 1. exo-amilases, tais como amiloglucosidases ou glucoamilases e beta-amilases; 2. endoamilases, como as alfa-amilases; 3. enzimas desramificadoras, por exemplo a pululanase; 4. enzimas produtoras de ciclodextrinas.

A alfa-amilase (Alfa-1,4-glucan 4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1, endo-amilase) ocorre em muitos microorganismos. Ela hidrolisa as ligações alfa-1,4 da amilose, amilopectina e glicogênio, porém as ligações alfa-1,6 glicosídicas dos polímeros ramificados não são hidrolisadas. As propriedades e mecanismos de ação dependem da fonte da enzima. Elas são todas enzimas que atuam hidrolizando ligações alfa-1,4 internas da molécula de amido, e esta característica causa uma rápida diminuição do poder de coloração pelo iodo, juntamente com um rápido decréscimo da viscosidade de soluções de amido. Os produtos finais da digestão do amido por alfa-amilases são: glicose, maltose e uma série de dextrinas ramificadas, que contém quatro ou mais resíduos de glicose.

Alfa-amilases de diferentes fontes já foram purificadas e muitas cristalizadas. As bactérias do gênero Bacillus possuem um grande número de publicações a respeito de suas alfa-amilases, e linhagens têm sido desenvolvidas para a produção de enzimas amilolíticas específicas. A seleção para uma amilase particular pode ser difícil, pois uma linhagem pode produzir diferentes ami-

lases com diferentes especificidades, ou porque a enzima produzida é pouca (PRIEST, 1987). Sendo assim, a clonagem de um gene que comanda a síntese de uma amilase em um hospedeiro bem conhecido, por exemplo E.coli ou B.subtilis, pode ajudar na caracterização da amilase e no aumento de produção. Neste contexto, SOUZA (1986) clonou o gene de alfa-amilase (AMI) de um Bacillus isolado em Brasília (DF) e estudou a expressão deste gene em E.coli e em B.subtilis, através de um plasmídeo bifuncional, denominado de pABC1. A expressão do gene da alfa-amilase foi analisada dosando-se o consumo de amido e a produção de açúcar redutor pelos recombinantes.

Posteriormente, outros estudos foram feitos com este gene da amilase, a saber: a análise de restrição do fragmento de DNA contendo o gene AMI e a relação da orientação deste com a expressão gênica (CASTRO, 1988) e o sequenciamento parcial do promotor e da região codificadora do peptídeo sinal (VALÊNCIA et al, 1988).

Quanto às amilases de Xanthomonas, a maioria dos patógenos são capazes de hidrolisar amido (DYE & LELLIOT, 1974), porém estudos aprofundados quanto às características destas enzimas são desconhecidos. SAWCZYC & DANIELS (vide DANIELS, 1987), clonaram o gene da amilase de X.campestris para verificar a relação desta enzima com a fitopatogenicidade, porém maiores informações a respeito não foram ainda relatadas.

### 3.) MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1.) Linhagens

As linhagens de Xanthomonas campestris utilizadas foram obtidas da coleção de bactérias fitopatogênicas do Instituto Biológico de Campinas, e cedidas pelo Sr. Júlio Rodrigues Neto (Tabela 3.1.). Estas linhagens foram selecionadas por CANHOS & SCAMPARINI (UNICAMP, FEAA - resultados não publicados), por se revelarem boas produtoras de goma xantana. A linhagem de referência (REF) é proveniente da Northern Regional Research Lab. (NRRL-B1459) Peoria IL, E.U.A., e é a linhagem tradicionalmente usada para os estudos envolvendo a xantana. O clone resistente ao cloranfenicol, derivado da linhagem REF, foi obtido através de mutação com luz ultra-violeta (LANZA & ROSATO, 1986). A linhagem 280 resistente ao ácido nalidíxico é um mutante espontâneo obtido em nosso laboratório (Tabela 3.2.).

Estas linhagens foram analisadas quanto à presença de plasmídios (STRIPECKE & ROSATO, 1986). A linhagem REF não apresentou plasmídios, enquanto que a 280 apresentou três bandas plasmidiais.

TABELA 3.1.: Proveniência das linhagens de X. campestris.

LIN	PATOVAR	HOSPEDEIRO	PROCEDÊNCIA	PAÍS/ANO
REF	<u>campestris</u>	<u>Brassica oleracea</u>	NRRL-B1459	E.U.A.
104	"	"	Campinas - SP	BRA/1980
247	"	"	Sumaré - SP	BRA/1980
254	"	"	Valinhos - SP	BRA/1980
472	"	"	Diadema - SP	BRA/1983
485	"	"	Campinas - SP	BRA/1983
220	<u>citri</u>	<u>Citrus reticulata</u>	Monte Alto - SP	BRA/1980
222	"	<u>Citrus sinensis</u>	Guararapes - SP	"
223	"	"	Bataguacu - MS	"
245	"	<u>Citrus reticulata</u>	Palmital - SP	"
256	"	"	Assis - SP	"
283	"	<u>Citrus aurantifolia</u>	Araçatuba - SP	"
280	<u>manihotis</u>	<u>Manihot esculenta</u>	-	BRA/1973
285	"	"	-	NIG/1975
287	"	"	-	BRA/ -
289	"	"	-	"
290	"	"	-	"
320	"	"	-	BRA/1974
272	<u>cassavae</u>	"	Carimagua	COL/1976
275	"	"	Carimagua	COL/1977
310	<u>vesicatoria</u>	<u>Capsicum annuum</u>	-	BRA/ -
317	"	<u>Nicotiana tabacum</u>	-	"

TABELA 3.2.: Linhagens mutantes de X.campestris utilizadas.

LINHAGEM	MARCA SELETIVA	MUTAGÊNESE	FONTE
REF	Cm <sup>r</sup>	ultra-violeta	LANZA & ROSATO, 1987
280	Nal <sup>r</sup>	espontâneo	este trabalho

Linhagens de Escherichia coli utilizadas neste trabalho: HB101 (pro leu thi lacY hsd R end A rec A rps120 ara14 gal K2 xyl15 mt11 sup E44) (BOYER & ROULLAND-DUSSOIX, 1969); utilizada como linhagem controle e como amplificadora de plasmídios; 5K (leu pro thi thr ser) (HUBACECK & GLOVER, 1970); utilizada como receptora em experimentos de transformação. As linhagens contendo plasmídios estão enumeradas na Tabela 3.3.

TABELA 3.3.: Linhagens de E.coli portadoras de plasmídios empregadas.

LINHAGEM	PLASMÍDIO	MARCAS GENÉTICAS	PROCEDÊNCIA
HB101	pABC1	Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> AMI <sup>+</sup>	SOUZA, 1986
HB101	pMFY40	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> replicon RSF1010 Inc-Q	FUKUDA, 1985
HB101	pRK2013	Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup> replicon ColE1	FIGURSKI & HELINSKI, 1979

### 3.2.) Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados estão descritos abaixo. O meio empregado para a manutenção e propagação de Xanthomonas campestris foi o "Yeast-medium" (YM) de HAYNES et al (1955). Para o cultivo de Escherichia coli e para a preparação de inóculos de extração plasmídial utilizou-se o meio L complexo. A fermentação de xantana foi feita em Solução Basal I (SOUW & DEMAÏN, 1979), acrescida de sacarose e/ou amido em concentrações específicas.

Meios de Cultura (gramas/litro):

- Meio YM	
extrato de malte	3
extrato de leveduras	3
peptona	5
glicose	10
agar	15



- Meio Complexo L	
peptona	10
extrato de leveduras	5
NaCl	10
agar	15
pH 7.2	
- Solução Basal I	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
Ac. cítrico	2.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.006
ZnO	0.006
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0024
CaCO <sub>3</sub>	0.02
pH 7.0	

Para a análise da atividade amilolítica em placas e em meio líquido utilizou-se o meio complexo-L contendo 0.4% de amido. Para a preparação de meios contendo amido, este era dissolvido previamente em um pouco de água bidestilada fria, até se formar uma pasta, adicionava-se aos poucos água quente, fervendo-se a seguir por 2 min. Acrescentava-se a solução do meio de cultura, acertava-se o pH e completava-se para o volume final.

Os meios foram esterilizados autoclavando-se a 120°C por 20 min.

Os antibióticos foram utilizados nos meios L ou YM nas seguintes concentrações (µg/ml): ampicilina - 100; tetraciclina - 10; cloranfenicol - 20; kanamicina - 20 e ácido nalidíxico - 25.

### 3.3.) Reagentes, Soluções e Enzimas

Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico. As soluções empregadas foram as seguintes:

\* Soluções utilizadas nas extrações plasmidiais:

- Solução I:	
Tris-HCl	25mM (pH 8.0)
EDTA	10mM
Glicose	50mM
- Solução II:	
NaOH	0.2M
SDS	1,0% (p/v)
- Solução III:	
Acetato de Sódio	3M
Ácido Acético	2M (pH 4.8)

- Solução de PEG:
 

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

fenol:clorofórmio	(1V/1V)
8-hidroxiquinolina	0.05% (p/v)
solução saturada com: Tris-HCl 20mM, pH 8.0, NaCl 100mM e EDTA 1mM	
- 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 10 min.	
- Tampão TE:
 

Tris-HCl	25mM	pH 8.0
EDTA	10mM	
- Tampão R:
 

Tris-HCl	20mM	pH 7.5
EDTA	0.1mM	

\* Soluções utilizadas nas eletroforeses:

- Tampão de Eletroforese (TEB) 10X:
 

Tris-base	108 g/l
Ácido Bórico	55 g/l
EDTA	20mM
pH 8.0 - 8.4	
- Tampão de Amostra de Eletroforese (TA) 3X:
 

TEB 3X	
Ficoll tipo 400	20% (p/v)
Azul de Bromofenol	0.1% (p/v)

\* Solução utilizada na transformação de E. coli:

- Solução de Tris-Ca:
 

Tris-HCl	20mM	(pH 7.0)
Ca Cl <sub>2</sub>	100mM	
filtrar antes de usar em Millipore		

\* Soluções utilizadas na transformação de X. campestris:

- Solução de MOPS-Ca:
 

MOPS	100mM	(pH 6.5)
CaCl <sub>2</sub>	50mM	
filtrar antes de usar em Millipore		

- Solução de MOPS-PEG:
 

MOPS	100mM (pH 7.2)
PEG 4000	10% (p/v)

 filtrar antes de usar em Millipore

\* Soluções utilizadas na avaliação da atividade da alfa-amilase:

- Solução de Iodo 0.1N:
 

Iodato de Potássio	0.36% (p/v)
Iodeto de Potássio	4.5% (p/v)
Ácido clorídrico concentrado	0.9% (v/v)

 guardar em frasco escuro e em geladeira
- Solução de Iodo 0.01N:
 

Fluoreto de Potássio	5% (p/v)
----------------------	----------

 em solução 0.01N de Iodo  
 guardar em frasco escuro e em geladeira
- Reativo de DNS (ácido dinitrosalicílico):
  - dissolver 5g de DNS em 100 ml de NaOH 2N
  - colocar 150 g de tartarato de Na e K em 250 ml de H<sub>2</sub>O
  - aquecer para dissolver
  - misturar as 2 soluções e completar com H<sub>2</sub>O para 500 ml
  - guardar em frasco escuro e em geladeira

As enzimas de restrição usadas (Eco RI, Bam HI, Hind III, Pst I e Hpa I) e T4 ligase foram provenientes da New England Biolabs (E.U.A.) e da Bethesda Research Laboratories (E.U.A.). A RNase proveio da Sigma Chemical Company (E.U.A.). A lisozima foi preparada a partir de clara de ovos, de acordo com o método descrito por ALDERTON *et al* (1945).

Os tampões utilizados para as digestões do DNA com enzimas de restrições foram:

- React 2 (para HindIII e PstI)
 

Tris-HCl	50mM (pH 8.0)
MgCl <sub>2</sub>	10mM
NaCl	50mM
- React 3 (para Bam HI e Eco RI)
 

Tris-HCl	50mM (pH 8.0)
MgCl <sub>2</sub>	10mM
NaCl	100mM
- React 4 (para Hpa I)
 

Tris-HCl	20mM (pH 7.4)
MgCl <sub>2</sub>	5mM
KCl	50mM

### 3.4.) Caracterização da Produção de Amilase em Meio Sólido por diferentes Linhagens de X.campestris

Para a verificação preliminar da produção de amilase pelas linhagens de Xanthomonas, cada cepa foi inoculada em três pontos de placas contendo 20 ml de meio L complexo sólido, adicionado de 0.4% de amido. O crescimento procedeu-se a 30°C por 24, 36 e 48h. Para a revelação usou-se lugol diluído (1:10), colocando-se 3ml por placa e retirando-se o excesso. Os halos de hidrólise de amido e o diâmetro das colônias foram medidos imediatamente, pois o iodo volatiliza, e as médias foram a seguir calculadas.

### 3.5.) Purificação do DNA Plasmidial

#### 3.5.1.) Extração em Grande Escala

O método utilizado para a purificação de plasmídios a partir de culturas de bactérias foi uma adaptação da técnica de extração alcalina, descrita por BIRNBOIM & DOLY(1980).

Células utilizadas como inóculo foram cultivadas em 5ml de meio L contendo o antibiótico adequado, a partir de clones isolados, a 37°C durante a noite para E.coli e a 30°C durante 24 horas para Xanthomonas. Inóculo de 2ml foi transferido em 200ml de meio L (contendo o antibiótico adequado) em frasco erlenmeyer de 500ml, e o crescimento se processou a 37°C com agitação, durante 24 horas.

As células foram coletadas através de centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C, e lavadas com 10ml de salina 0.9% (p/v) para E.coli e 3.0% para X.campestris.

Ressuspendeu-se as células em 2.5ml de solução I, agitando-se vigorosamente por alguns segundos em agitador tipo Vortex, em seguida adicionou-se 2.5 ml desta mesma solução contendo 4mg/ml de lisozima recém preparada. O material foi colocado no gelo por 30 minutos, agitando-se de vez em quando. Adicionou-se 10ml de solução II, invertendo-se o tubo várias vezes para misturar e colocando-se no gelo por mais 15 minutos. A seguir foram adicionados 7.5 ml de solução III, misturando-se suavemente por inversão do tubo, e o material foi deixado por 40 minutos no gelo.

O precipitado contendo o DNA cromossomal foi coletado por centrifugação a 12000g por 30 minutos. Ao sobrenadante, contendo plasmídios, adicionou-se igual volume de isopropanol e, após 5 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 12000g por 20 minutos e o sedimento secado a vácuo. O material foi ressuspendido em 3ml de tampão TE e mais 30 µl de RNase A, deixado a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida foram adicionados 1,5 ml de solução PEG, incubando-se no gelo novamente por 30 minutos.

O precipitado foi coletado por centrifugação a 12000g por 20 minutos e redissolvido em 1,0 ml de tampão TE, a seguir a solução ajustada para 100mM de NaAc pH 7.5 e 0.5% de sarcosil, em

seguida adicionou-se igual volume de clorofane, agitou-se e centrifugou-se a 2000g por 10 minutos. A fase aquosa foi recuperada e a extração com clorofane repetida mais duas vezes.

A última fase aquosa, ajustou-se a concentração de NaCl par 300mM e adicionou-se 2.5 volumes de etanol 100%, deixando-se precipitar durante a noite.

O precipitado foi coletado através de centrifugação a 15000g, em microcentrífuga resfriada em câmara fria, por 15 minutos, e a seguir lavado com etanol 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sem ressuspensão, centrifugando-se novamente a 15000g por 2 minutos. O material, após secagem a vácuo, foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{l}$  de tampão R, e estocados em alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A estimativa da concentração do DNA, foi realizada através de espectrofotometria, medindo-se a absorbância a 260 e 280 nm, e obtendo-se a concentração de ácidos nucleicos por meio da tabela de Warburg (WARBURG & CHRISTIAN, 1912).

### 3.5.2.) Extração em Pequena Escala

As extrações em pequena escala também foram feitas segundo o método de BIRBOIM & DOLY (1980), com as seguintes modificações para X. campestris:

- partiu-se de 3ml iniciais de suspensão bacteriana para cada amostra;
- a lavagem das células foi efetuada energeticamente com NaCl 3.0% para se retirar o polissacarídeo extra-celular (EPS) aderido à parede bacteriana;
- após a ressuspensão final em tampão R (50  $\mu\text{l}$ ), centrifugou-se a 12000g por 30 segundos para a sedimentação dos restos celulares.

### 3.6.) Digestão do DNA com Enzimas de Restrição e Análise dos Fragmentos

Para a digestão com enzimas de restrição foram utilizados sistemas de 15- 50  $\mu\text{l}$ , aos quais os tampões das enzimas foram adicionados a partir de estoques cinco vezes concentrados (5X). Os sistemas continham 5-10 U de enzimas de restrição por  $\mu\text{g}$  de DNA. As digestões se processaram por 2-3 hs a  $37^{\circ}\text{C}$ , e foram interrompidas, quando necessário, ou por aquecimento a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos ou por extração da enzima com clorofane.

As amostras digeridas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O gel foi preparado, dissolvendo-se a agarose em tampão TEB 1X, fervendo-se a mistura e colocando-se para solidificar em placas de vidro formando uma camada de aproximadamente 0.5cm de espessura.

As amostras foram aplicadas em "slots" feitos no gel. Para tanto, era retirada uma alíquota de cada sistema de digestão, com aproximadamente 0.5-1.0  $\mu\text{g}$  de DNA, misturada com 1/3V de TA 3X. A seguir, o gel foi colocado em uma cuba, submerso em tampão TEB 1X. A eletroforese se processou à temperatura ambiente,

aplicando-se uma amperagem inicial de 10-20 mA, que foi aumentada para 40-50 mA, após as amostras terem penetrado no gel. Após a corrida, o gel foi corado com 1.0 µg por ml de brometo de etídeo dissolvido em tampão TEB 1X por 30 minutos e descorado com o mesmo tampão por 10 minutos. Em seguida, o gel foi analisado sob luz ultra-violeta, utilizando-se um transiluminador GT-300-8 da Germetec Ltda, e fotografado com filme Kodak Plus-X, usando-se filtro laranja.

### 3.7.) Construção das moléculas Híbridas de DNA

O material clivado com enzimas de restrição, foi colocado para ligar após a inativação da enzima, na presença de 40 U de T4-DNA-ligase, 60mM de Tris-HCl pH 7.8, 5mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de DTT e 1mM de ATP. A mistura de ligação foi então incubada a 37°C por 30 minutos e a 16°C por uma noite. O sistema foi utilizado posteriormente para transformar E.coli HB101 e/ou 5K.

### 3.8.) Transformação de Escherichia coli

O método utilizado para transformação de E.coli foi o descrito por DARGET & EHRLICH (1979), com algumas modificações. Células utilizadas como inóculo foram cultivadas em 5 ml de meio L a partir de uma colônia isolada e incubadas a 37°C com agitação durante a noite. Inoculou-se em seguida 0.5ml em 50ml de meio L. A cultura foi incubada a 37°C com agitação, até se atingir uma densidade populacional de aproximadamente  $2 \times 10^7$  células por ml, o que equivale aproximadamente a 0.3-0.4 unidades de absorbância a 540nm.

As células foram coletadas por centrifugação a 2000g por 15 minutos a 4°C, ressuspensas em 15 ml de solução Tris-Ca a 4°C. As células foram mantidas em banho água-gelo por 30 minutos, e em seguida coletadas a 2000g por 15 minutos e ressuspensas em 1ml de solução Tris-Ca gelada. A suspensão era utilizada após 60 minutos de incubação em banho água-gelo ou até no máximo 24 horas.

Para a transformação, as células competentes foram misturadas com DNA em tubos de vidro esterilizados, numa proporção de 100 µl de suspensão de células para 20 µl de DNA diluído em tampão TR, ou no próprio sistema de ligação. A seguir o sistema era incubado a 0°C por 30 minutos, após o que foi submetido a um choque térmico a 42°C por 5 minutos. Adicionou-se a seguir 1ml de meio L por 100 µl de células, incubando-se por mais uma hora a 37°C. As células foram então espalhadas em placas contendo o meio de seleção adequado, na proporção de 10-100 µl da suspensão de células por placa. As placas foram incubadas a 37°C por uma noite e os transformantes analisados para se detectar a presença de plasmídios recombinantes.

### 3.9.) Transformação de X.campestris

A transformação de X.campestris foi baseada nas técnicas da MUROOKA *et al* (1987), com algumas modificações.

As bactérias a serem utilizadas como inóculo foram crescidas em 5 ml de meio L complexo com o devido antibiótico. Incubou-se a 30°C por 24h, com agitação aproximada de 180 rpm.

Inoculou-se 4ml em 40 ml de meio L e acompanhou-se o crescimento em unidades Klett. Quando atingiu-se 80-90 unidades Klett, correspondendo à fase logarítmica média, as células foram coletadas por centrifugação a 0°C, a 2.500g, 10 min e lavadas com 20 ml de MOPS 10mM (pH6.5). Após serem ressuspendidas em 20 ml de MOPS 100mM (pH 6.5) + CaCl<sub>2</sub> 50 mM, as bactérias foram incubadas no gelo por 60 minutos. Centrifugou-se a 2000g, 10 minutos e a 0°C, ressuspendeu-se em 1ml da solução anterior e incubou-se por 2 horas em gelo. Colocou-se em tubinhos de vidro estéreis 100 µl da solução de MOPS-PEG e adicionou-se os plasmídios em quantidade variando de 1 a 4 µg. Colocou-se as células competentes em volume de 200 µl e incubou-se no gelo por 1 hora. O choque térmico se deu a 37°C por 2 minutos, após o que acrescentou-se 0.7 ml de YM líquido. As células foram incubadas durante 5 horas para permitir a expressão dos genes de resistência a antibióticos, a 30°C com agitação branda. Volumes de 100 e 200 µl foram espalhados em placas contendo os antibióticos adequados. As placas foram colocadas em estufa a 30°C e observou-se os transformantes após 3 a 4 dias.

### 3.10) Conjugação

A transferência de plasmídios para X.campestris por conjugação processou-se em duas etapas. A primeira consistiu no cruzamento de linhagens de E.coli, uma delas contendo o plasmídio "helper" (pRK2013) e a outra o plasmídio a ser mobilizado (pMFY40 ou pAP1). Na segunda etapa realizou-se a conjugação de uma E.coli, contendo o "helper" e o plasmídio de interesse, com uma X.campestris, contendo marca seletiva cromossômica.

#### 3.10.1) Primeira Etapa de Conjugação

Em uma placa contendo meio L sólido foram estriadas bactérias da linhagem contendo o "helper" e sobre esta alguns clones da linhagem contendo o pMFY40 ou o pAP1, espalhando-se exaustivamente. Incubou-se durante 3h a 37°C. Do crescimento bacteriano raspou-se a placa com uma alça de platina, transferindo, pela técnica de esgotamento um pouco da massa celular para placas contendo os marcadores seletivos (Km, Ap, Tc). Para controle, as linhagens parentais também foram estriadas em placas seletivas. Incubou-se a 37°C por 24 horas. Os clones resultantes foram analisados por extração em pequena escala de DNA plasmidial e eletroforese.

### 3.10.2.) Segunda Etapa de Conjugação

As linhagens de X.campestris receptoras e de E.coli doadoras foram cultivadas em 5 ml de meio L, contendo os antibióticos específicos, por 24 horas a 30°C. Semeou-se 0.2ml da cultura de Xanthomonas e 0.1ml da de E.coli em uma placa de meio L e espalhou-se muito bem. A placa foi incubada a 30°C por 6 horas. Em seguida, com a alça de platina, espalhou-se por esgotamento um pouco da massa celular em placas contendo os antibióticos para a seleção dos conjugantes (Ap, Tc e Cm ou Nal). As placas foram deixadas em estufa a 30°C por 3-4 dias, e dos clones resultantes foram extraídos os plasmídios, os quais foram digeridos com enzimas de restrição e as bandas analisadas por eletroforese.

### 3.11.) Teste de Estabilidade do pMFY40 em X.campestris

A estabilidade do plasmídio pMFY40 foi analisada nas linhagens REF Cm<sup>r</sup> e 280 Nal<sup>r</sup>, através da comparação do crescimento de bactérias recombinantes mantidas com e sem a pressão de seleção para a manutenção do vetor (resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina). Para tanto, um clone da linhagem REF Cm<sup>r</sup> e um da linhagem 280 Nal<sup>r</sup>, ambos contendo pMFY40, foram inoculados em 5 ml de meio L adicionado dos antibióticos, cujas marcas genéticas de resistência estavam localizadas no plasmídio e no cromossomo. Após 24 horas de incubação a 30°C a 180 rpm, 0.5 ml da suspensão celular era transferida para outros 2 tubos de meio L, um deles contendo apenas o antibiótico correspondente à marca genética cromossômica (Cm ou Nal) e o outro, além deste, os antibióticos cujos genes de resistência são plasmidiais (Ap e Tc). Este procedimento foi repetido a cada 24 horas. No primeiro dia de passagem, e a seguir a cada 2 dias, as células após cada tratamento foram plaqueadas em meio contendo as duas variações da composição de antibióticos, em triplicatas e em diluições de 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-8</sup>. Após incubação das placas a 30°C por 3 dias, as colônias foram contadas e as médias tabuladas. Os coeficientes de sobrevivência do teste (TST) e do controle (CTL) correspondem, respectivamente, ao crescimento das culturas mantidas em meio líquido sem e com a presença de ampicilina e tetraciclina. O coeficiente de sobrevivência de cada passagem analisada foi resultante da razão entre a média ( $\bar{M}$ ) do número de colônias obtida do crescimento no meio contendo os três antibióticos e da média ( $\bar{M}$ ) obtida do crescimento no meio com apenas o antibiótico correspondente à marca genética cromossomal.

Os coeficientes foram calculados segundo as fórmulas:

$$CTL = \frac{\bar{M} \text{ cels. cultivadas c/ seleção, plaqueadas c/ seleção}}{\bar{M} \text{ cels. cultivadas c/ seleção, plaqueadas s/ seleção}}$$

$$TST = \frac{\bar{M} \text{ cels. cultivadas s/ seleção, plaqueadas c/ seleção}}{\bar{M} \text{ cels. cultivadas s/ seleção, plaqueadas s/ seleção}}$$



DBS: seleção = presença dos antibióticos correspondentes às marcas genéticas plasmidiais;  $\bar{M}$  = média.

Estes coeficientes foram multiplicados por 100 para se obter a porcentagem de células mantendo os plasmídios, nas condições de controle e de teste.

### 3.12.) Análise dos Halos de Amilólise em Meio Sólido dos Recombinantes Contendo pAP1.

Para a análise da secreção da alfa-amilase de B. subtilis pelos recombinantes utilizou-se meio L contendo 0.4% de amido, adicionado dos antibióticos Ap e Tc, para a manutenção dos plasmídios. Os clones foram inoculados por pontos na placa, e estas foram incubadas a 30°C por 3 dias. A revelação foi feita deixando as placas invertidas sobre outra placa contendo cristais de iodo. O vapor de iodo interage com o amido do meio de cultura, resultando numa coloração azulada. Pode-se observar um halo típico ao redor dos clones nas regiões onde ocorreu hidrólise.

### 3.13.) Avaliação da Atividade da Amilase em Meio Líquido.

Os clones recombinantes e controles foram inoculados em 5 ml de meio L, contendo os antibióticos adequados, e incubados durante 24h a 30°C. Inoculou-se 1.0 ml da suspensão bacteriana em 50 ml de meio L contendo 0.4% de amido, adicionado de 5 µg/ml de Tc no caso dos recombinantes.

O crescimento das culturas foi estimado através de medidas de absorbância a 500nm em intervalos de 2 horas para E. coli e de 4 horas para Xanthomonas. Sempre que o crescimento foi estimado, alíquotas de meio de cultura foram utilizadas para a detecção do teor de amido e de açúcar redutor.

#### 3.13.1.) Consumo de Amido do Meio de Cultura

A dosagem de amido do meio de cultura foi baseado no método de CARAWAY(1959). As amostras de 250 µl de sobrenadante do meio de cultura foram adicionados 250 µl de solução de iodo 0.01N e 2 ml de água destilada para perfazer um volume de 2,5 ml. A seguir, mediu-se a absorbância a 660nm e com isso estimava-se o teor de amido através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de substrato.

#### 3.13.2.) Formação de Açúcar Redutor no Meio de Cultura

A formação de açúcar redutor no meio de cultura foi acompanhada segundo o método descrito por SUMNER (1925).

As amostras de 1 ml de sobrenadante do meio de cultura adicionou-se 1 ml de Reativo de DNS. Após agitar-se a solução, esta foi colocada em banho de água fervente por 5 minutos. A seguir, completou-se o volume para 10 ml e mediu-se a absorbância a

550nm, estimando-se o teor de açúcar redutor através de uma curva padrão de glicose.

### **3.14.) Fermentação da Xantana**

#### **3.14.1.) Preparo das Amostras**

A partir de placas contendo bactérias de 3 dias de crescimento, aproximadamente, as células foram inoculadas em erlenmeyers de 125 ml contendo meio YM líquido com os antibióticos adequados. Incubou-se a 28°C a 180 rpm por 24 horas.

Alíquotas de 2 ml foram inoculadas, em quadruplicatas, em erlenmeyers de 125 ml, contendo 20 ml da Solução Basal I acrescida da fonte de carbono, sacarose e/ou amido, nas concentrações adequadas. As amostras foram incubadas a 28°C, a 180 rpm por 72h.

#### **3.14.2) Medição da Viscosidade**

A viscosidade da goma produzida pelas amostras foi estimada por duas técnicas: tempo de escorrimento e análise em viscosímetro.

Para a medida do tempo de escorrimento, empregou-se uma pipeta de 5 ml, na qual o tempo de escorrimento de 5 ml de H<sub>2</sub>O fosse de aproximadamente 7 segundos. A medida consistiu no tempo em que o menisco da amostra fosse da marca zero à marca quatro da pipeta.

Para a medição da viscosidade em viscosímetro, utilizou-se um aparelho Brookfields (RV Series Viscometers) com adaptador para pequenas amostras e um "spindle" número 21. Foram tomadas as medidas das rotações de 5, 20 e 100 rpm, as quais foram convertidas nos valores finais (CPS = centipoise), multiplicando-se, respectivamente, por 100, 25 e 5, conforme as especificações do fabricante.

#### 4.) RESULTADOS

##### 4.1.) Caracterização da Produção de Amilase em Meio Sólido por Diferentes Linhagens de Xanthomonas campestris

Os resultados obtidos quanto ao tamanho das colônias e dos halos de amilólise das linhagens de Xanthomonas encontram-se na Tabela 4.1. Segundo estes resultados, a maioria das linhagens testadas apresentaram a capacidade de degradar o amido.

Verificou-se uma certa correlação entre os halos de amilólise e os tamanhos das colônias em relação ao patovar ao qual a linhagem pertencia.

Tabela 4.1.: Caracterização da produção de halos de amilólise por diferentes linhagens de X. campestris. As medidas (em mm) foram obtidas da média de três repetições.

	DIAM. MÉDIO DAS COLÔNIAS			DIAM. MÉDIO DOS HALOS		
	24h	36h	48h	24h	36h	48h
<b>LINHAGENS:</b>						
<u>X.c.cam.</u> REF	3.00	5.83	7.67	12.67	19.00	20.83
" 104	3.50	6.67	7.00	13.37	18.00	20.83
" 247	2.67	7.17	7.50	12.17	19.67	23.33
" 254	3.33	6.67	7.67	12.83	19.17	23.17
" 472	3.17	6.50	6.67	12.50	18.33	22.50
" 485	2.00	6.83	7.83	11.50	18.67	23.00
<u>X.c.cit.</u> 220	1.50	3.33	3.33	6.00	15.00	13.83
" 222	1.67	3.17	3.83	7.50	14.33	13.83
" 223	1.83	3.33	4.16	6.33	14.33	13.66
" 245	1.00	3.33	4.50	3.67	11.33	14.50
" 256	2.00	2.67	3.83	6.33	11.00	14.16
" 283	1.75	3.17	4.00	7.00	12.00	15.00
<u>X.c.man.</u> 280	2.50	7.00	4.25	*	*	*
" 285	2.50	6.00	7.50	4.67	7.00	8.50
" 287	2.25	4.83	5.25	*	*	*
" 289	3.25	5.00	5.25	*	*	*
" 290	2.00	4.25	4.00	2.50	7.00	7.83
" 320	3.00	5.33	6.00	*	*	*
<u>X.c.cas.</u> 272	2.83	8.67	8.17	10.00	17.67	18.67
" 275	2.33	6.83	7.67	7.17	14.50	18.67
<u>X.c.ves.</u> 310	1.67	3.17	4.50	-	-	-
" 317	2.67	4.67	5.67	7.33	13.67	16.83
(-): ausência total de halo (x): ausência de halo típico						

Os patovares campestris, citri e cassavae apresentaram linhagens amilolíticas, sendo que tanto os halos de hidrólise de amido quanto os diâmetros das colônias do patovar campestris são sensivelmente maiores do que os do patovar citri. O patovar vesicatoria apresentou uma linhagem amilolítica e outra sem nenhum traço de amilólise (310). Do patovar manihotis apenas duas linhagens apresentaram halos típicos, os quais, entretanto, foram pequenos. As demais linhagens do patovar manihotis apresentaram apenas um clareamento sutil ao redor e/ou sob a colônia.

A partir destes resultados foram escolhidas duas linhagens para o prosseguimento deste trabalho, que são:

REF: pv campestris; linhagem bem caracterizada (NRRL-B1459); amilolítica; plasmídios não detectados (STRIPECKE & ROSATO, 1986).

280: pv manihotis; uma das melhores produtoras de xantana do laboratório (ROSATO - comunicação pessoal); não amilolítica; apresenta três bandas plasmidiais (STRIPECKE & ROSATO, 1986).

#### 4.2.) Clonagem do Gene da Alfa-amilase no Plasmídio pMFY40

O plasmídio contendo o gene da alfa-amilase empregado neste trabalho foi construído segundo o esquema apresentado na Figura 4.2., a partir do plasmídio pABC1 contendo o gene da alfa-amilase de Bacillus subtilis (SOUZA, 1986) e do plasmídio pMFY40 (FUKUDA & YANO, 1985), o qual possui a origem de replicação do RSF1010, funcional em uma grande gama de bactérias gram-negativas, ligada ao plasmídio pBR313. Os plasmídios encontram-se esquematizados na Figura 4.1.

Aproximadamente 3.0 µg dos plasmídios purificados foram digeridos com 20 U de Eco RI (Figura 4.2.). Juntou-se o material dos dois sistemas de digestão e, após a extração da enzima, ressuspendeu-se em 10 µl de solução tampão TR. A este sistema adicionou-se o tampão de ligação e 40 U de ligase de T4. Após a ligação, este sistema foi usado para se transformar E.coli HB101; a seleção foi feita em placas contendo 1.5% de amido e 10 µg/ml de Tc. Foram obtidos vários transformantes, os quais foram transferidos para placas contendo amido (1,5%) e Tc (10 µg/ml), para se comparar a atividade amilolítica entre os clones (Figura 4.4.). A priori se deduziu que os clones que contivessem o gene da alfa-amilase na orientação correta no plasmídio, a qual possibilitaria maior expressão gênica, produziriam maior halo de amilólise. Os clones mais amilolíticos foram então transferidos para placas contendo 10 µg/ml de Km, para se eliminar os possíveis pABC1 remanescentes ou recombinantes do fragmento maior do pABC1. Seis clones Km<sup>r</sup> foram selecionados. Foi realizada uma extração plasmidial em pequena escala, e os plasmídios foram analisados, intactos e digeridos com Eco RI, por eletroforese. Um dos clones foi selecionado, do qual se fez uma extração plasmidial em grande escala. Os plasmídios foram clivados com as enzimas de restrição

EcoRI e HindIII, e os fragmentos analisados em gel de agarose 1% (Figura 4.5.). Verificou-se que dois fragmentos foram liberados com a digestão com EcoRI, um deles correspondente ao plasmídeo pMFY40, e o outro ao fragmento AMI do pABC1; no gel estes fragmentos foram estimados para cerca de 11.9 e 2.4 Kb, respectivamente. Da clivagem com HindIII, obteve-se uma banda de menor migração eletroforética que o pMFY40, estimada por eletroforese para 14.4 Kb.

O plasmídeo recombinante foi denominado de pAP1 (plasmídeo com Alfa-amilase Promíscuo 1), e foi posteriormente submetido a duas duplas digestões, a saber, com as enzimas HpaI/BamHI e HpaI/PstI, para se verificar a orientação da inserção do fragmento AMI. Segundo CASTRO (1988), que analisou a orientação do fragmento de AMI no plasmídeo pABC1, há um sítio de HpaI a aproximadamente 200 pb depois do sítio de EcoRI, na extremidade em que se inicia a transcrição do gene. A digestão de pAP1 com HpaI resultou em dois fragmentos de pesos moleculares de aproximadamente 9.0 e 5.0Kb (Figura 4.6.), demonstrando a presença de dois sítios para esta enzima: um deles dentro da porção contendo AMI e o outro no plasmídeo pMFY40. A digestão com HpaI/PstI produziu três bandas de aproximadamente 8.0, 5.0 e 1.0 Kb, significando que o sítio de HpaI no fragmento contendo AMI estava próximo ao sítio de PstI. Isto foi comprovado com a digestão com HpaI/BamHI, que produziu dois fragmentos de cerca de 9.0 e 2.5 Kb. Como eram esperadas três bandas, deduziu-se que duas delas tenham o mesmo tamanho de 2.5 Kb, das quais uma equivalente a uma parte do fragmento contendo AMI. Logo, o sítio de HpaI neste fragmento situa-se mais próximo ao sítio de PstI do que ao de BamHI do plasmídeo pMFY40. A partir destas informações e de dados da literatura, construiu-se um esquema do pAP1, o qual encontra-se na Figura 4.7.

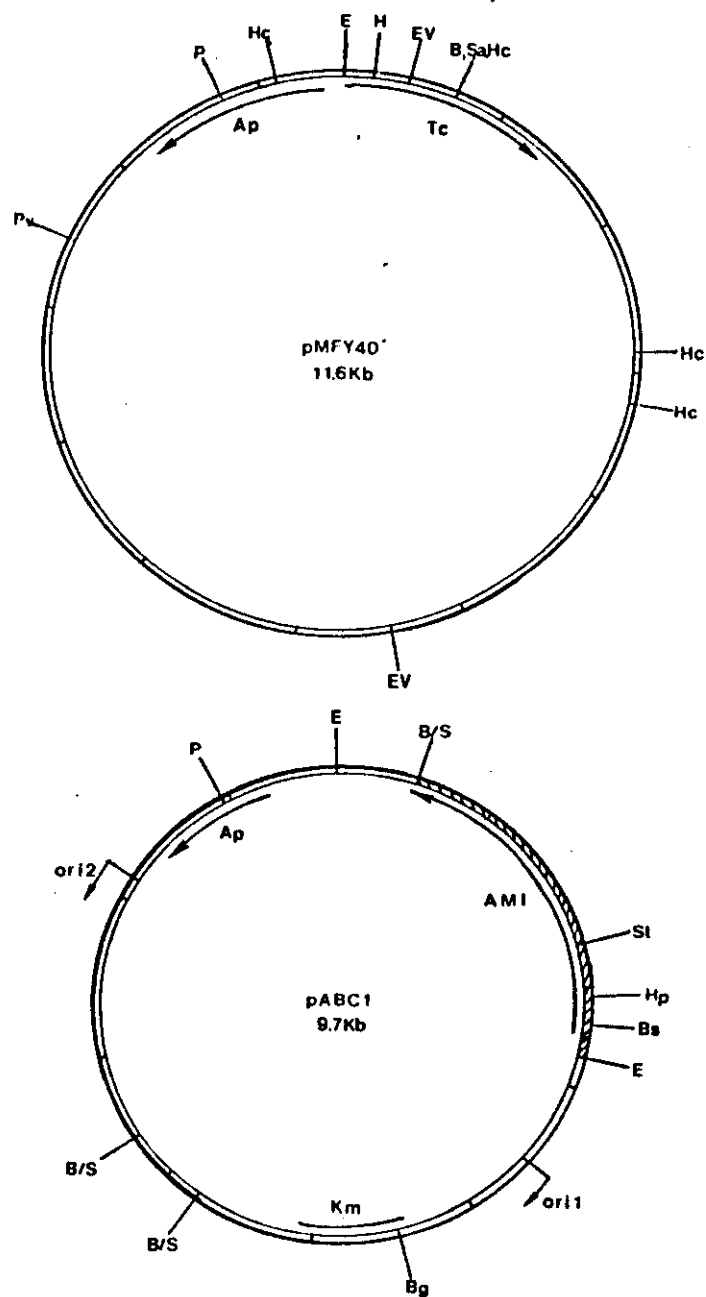


Figura 4.1.: Plasmídios usados para a introdução do gene da alfa-amilase (AMI) de *B. subtilis* no plasmídio promíscuo pMFY40.

Localização de sítios de enzimas de restrição: E = EcoRI, H = HindIII, H = HpaI, P = PstI, B = BamHI, S = Sau3A, EV = EcoRV, Sa = SalI, Hc = HincII, Pv = PvuII, St = StuI, Bs = BstEII, Bg = BglII.

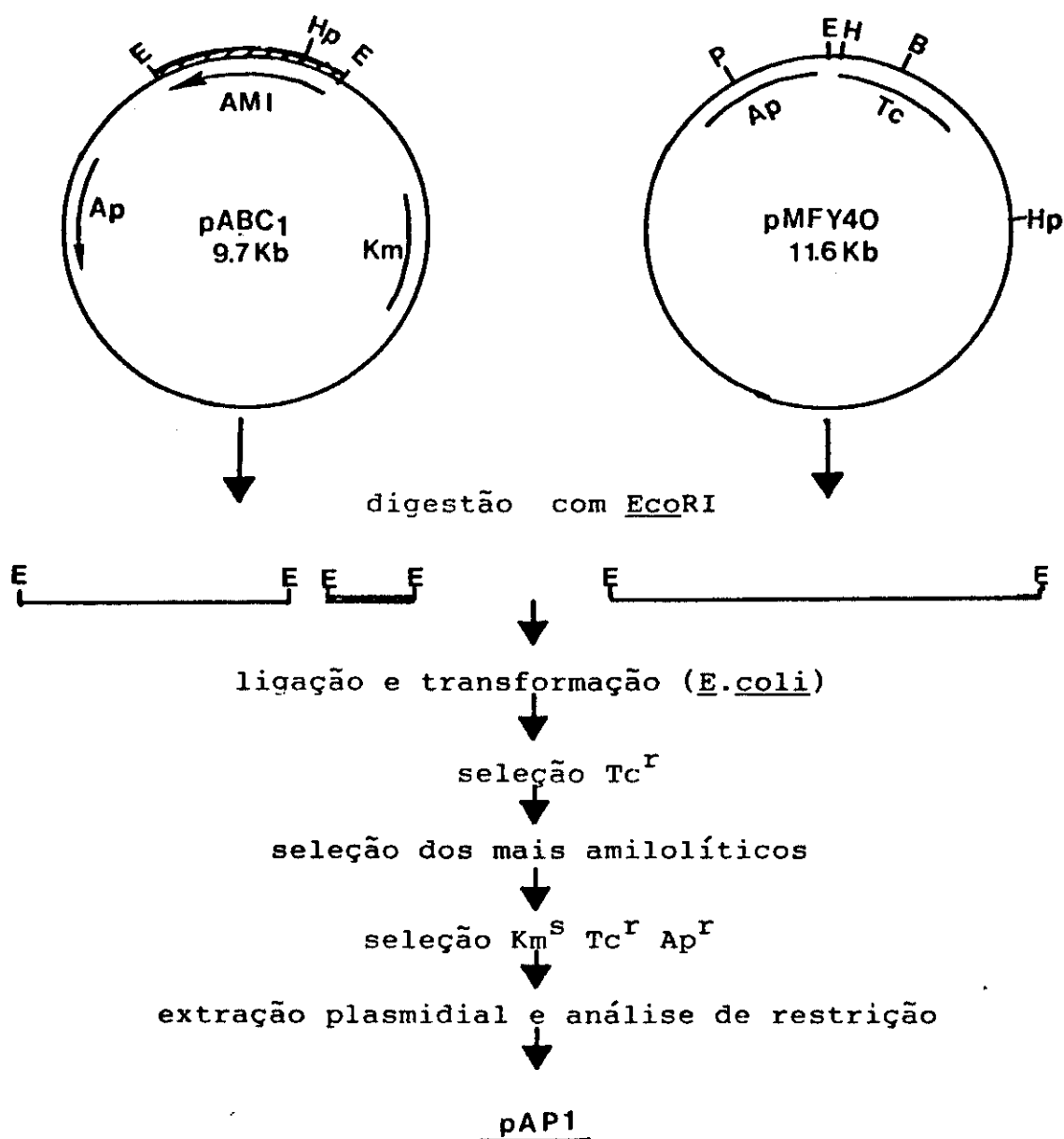


FIGURA 4.2.: Estratégia para se inserir o gene da alfa-amilase no plasmídeo pMFY40. Os esquemas dos plasmídios apresentam apenas os sítios de restrição empregados no trabalho: E = EcoRI, Hp = HpaI, P = PstI, H = HindIII e B = BamHI.

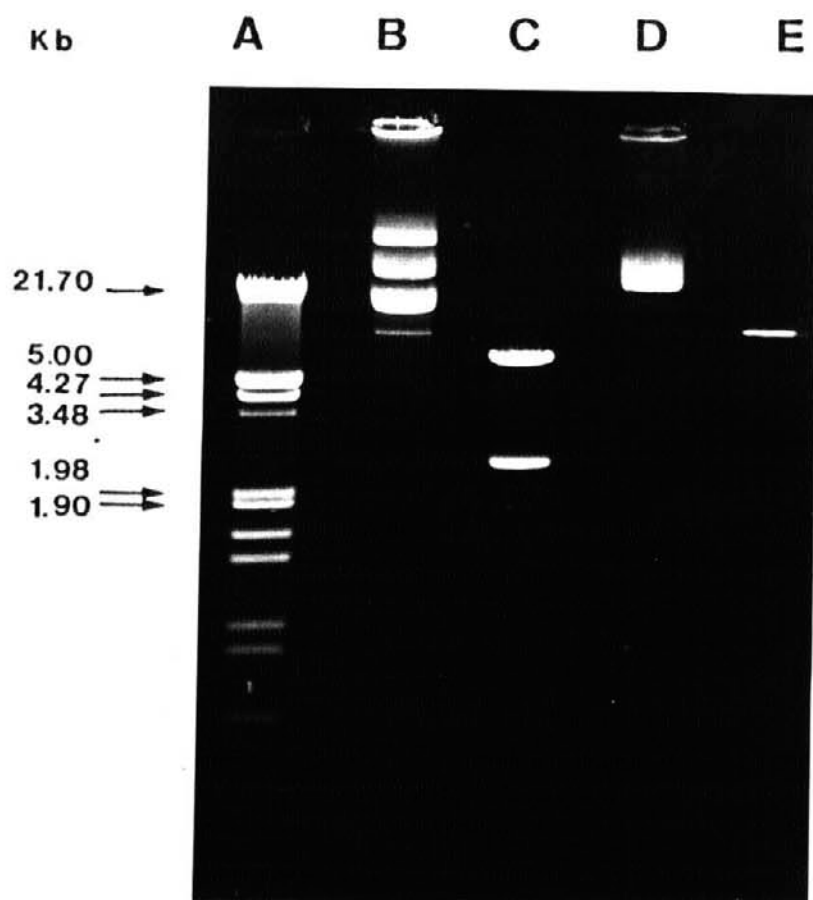


FIGURA 4.3.: Análise eletroforética da restrição com EcoRI dos plasmídios pABC1 e pMFY40 . A: DNA de  $\lambda$  /HindIII e EcoRI; B: pABC1 intacto; C: pABC1/EcoRI; D: pMFY40 intacto; E: pMFY40/EcoRI.



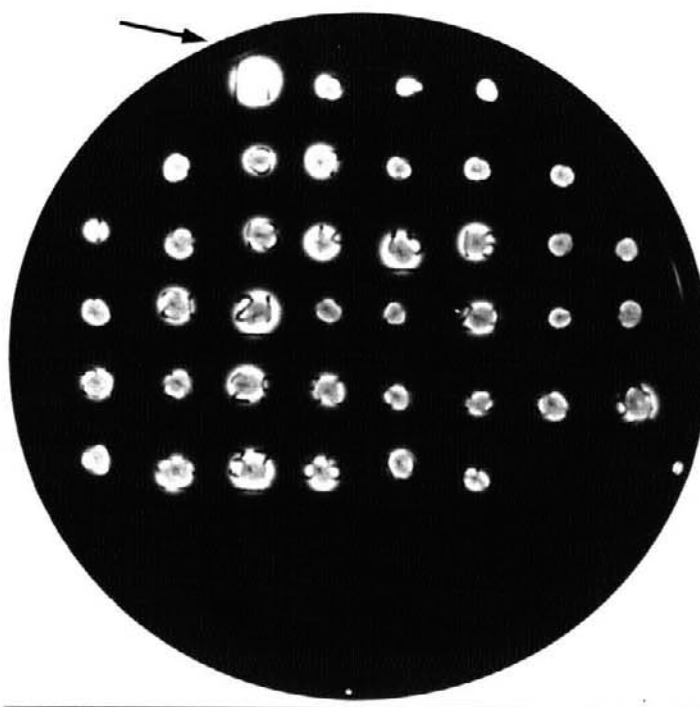


FIGURA 4.4.: Placa contendo Tc (10  $\mu\text{g}$  /Ml) e 1.5% de amido, corada com iodo, para se selecionar os clones contendo moléculas recombinantes pMFY40-AMI de maior capacidade de amilólise. O clone escolhido foi o Nº 1 (seta).

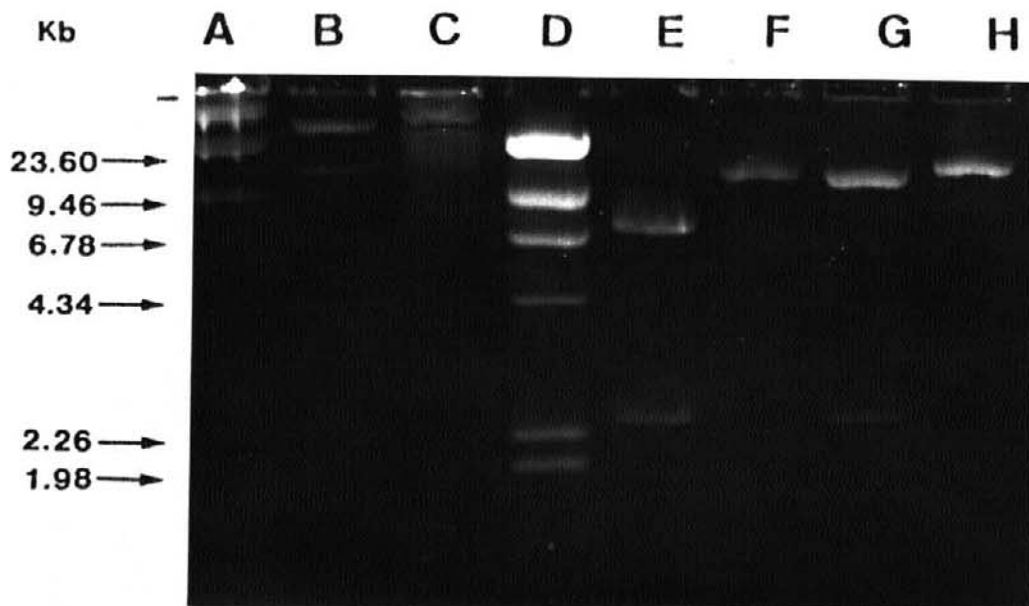


FIGURA 4.5.: Análise eletroforética de restrição do plasmídeo recombinante produzido pela ligação do fragmento AMI de pABC1 com o plasmídeo pMFY40. A: pABC1 intacto; B: pMFY40 intacto; C: pAP1 intacto; D: DNA de  $\lambda$  / HindIII; E: pABC1/ EcoRI; F: pMFY40 / EcoRI; G: pAP1/ EcoRI; H: pAP1/ HindIII.

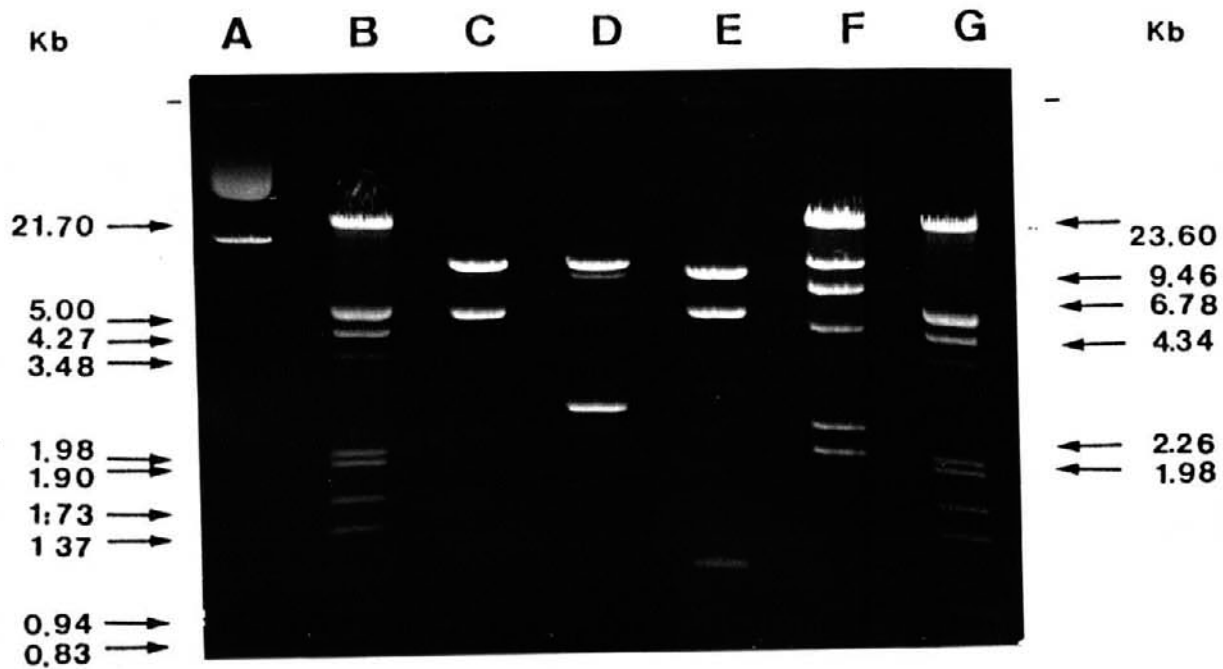


FIGURA 4.6.: Análise de restrição do pAP1 para verificação da orientação do inserto contendo AM1. A: pAP1 intacto; B: DNA de  $\lambda$  / EcoRI-HindIII; C: pAP1/ HpaI; D: pAP1 / HpaI-BamHI; E: pAP1/ HpaI-PstI; F: DNA de  $\lambda$  /HindIII; G: DNA de  $\lambda$  /EcoRI-HindIII.

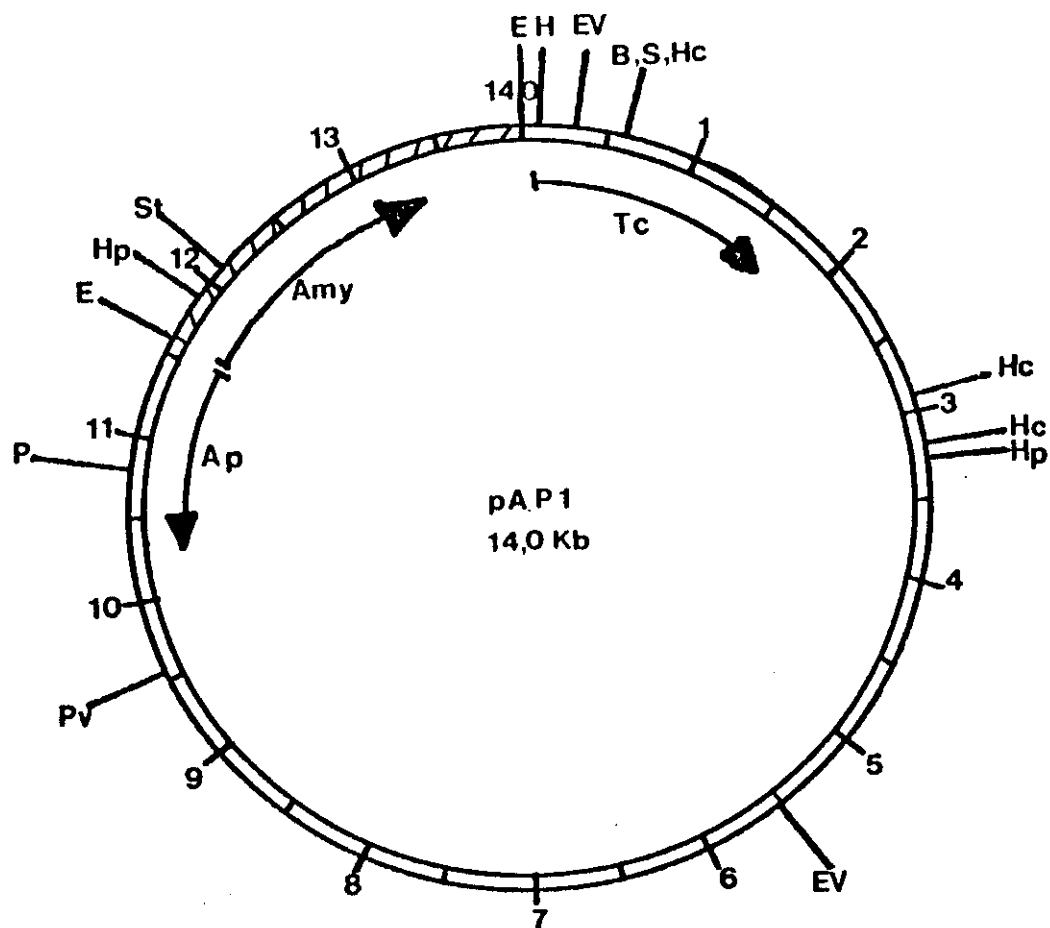


FIGURA 4.7.: Mapa de restrição do plasmídeo pAP1 (plasmídeo com Alfa-amilase Promíscuo 1). Fragmento originário do plasmídeo pABC1, contendo AMI (▨); fragmento originário do plasmídeo pMFY40 (▤). Os códigos usados para os sítios de restrição encontram-se na Fig. 4.2.

#### 4.3.) Introdução de Plasmídios em X.campestris

Os plasmídios pMFY40 e pAP1 puderam ser introduzidos nas linhagens de Xanthomonas campestris 280 Nal<sup>r</sup> e REF CM<sup>r</sup>, tanto por conjugação, quanto por transformação.

##### 4.3.1.) Conjugação

As duas etapas da conjugação estão esquematizadas na Figura 4.8. Na primeira etapa o plasmídio "helper" foi transferido para a célula contendo o plasmídio vetor, e a seleção foi feita através dos antibióticos correspondentes às marcas seletivas dos dois plasmídios. Na segunda etapa o plasmídio vetor foi mobilizado para X.campestris pelo plasmídio "helper", e a seleção foi feita através dos antibióticos correspondentes às marcas plasmidiais do vetor e às marcas cromossômicas da bactéria receptora.

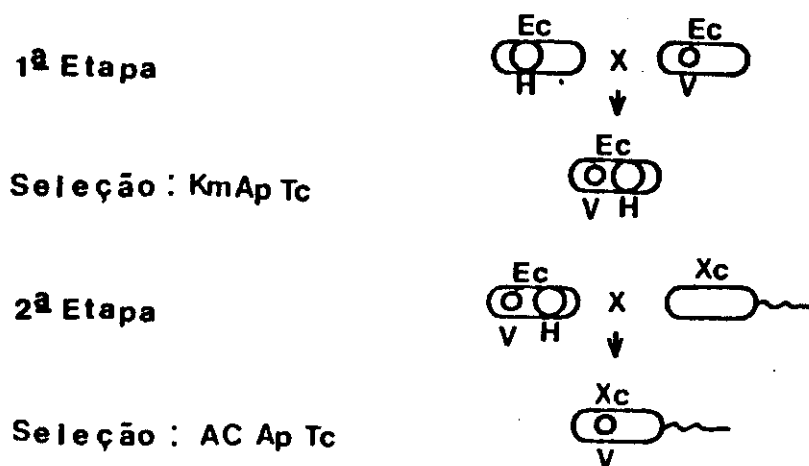


FIGURA 4.8.: Representação esquemática da conjugação para a introdução de pMFY40 ou pAP1 em X.campestris. (H) plasmídio "helper", pRK2013; (V) plasmídio vetor, pMFY40 ou pAP1; AC = antibiótico correspondente ao marcador genético cromossômico; Ec = E.coli HB101; Xc = X.campestris.

Na primeira etapa da conjugação, os transconjugantes selecionados em Km Ap Tc foram obtidos em grande quantidade, enquanto que as linhagens parentais não demonstraram crescimento na presença destes antibióticos. Após o isolamento dos plasmídios das linhagens parentais e transconjugantes, efetuou-se a restrição com *EcoRI* e analisou-se os fragmentos em eletroforese; constatou-se a presença simultânea de pMFY40 e de pRK2013 nos transconjugantes (Figura 4.9.).

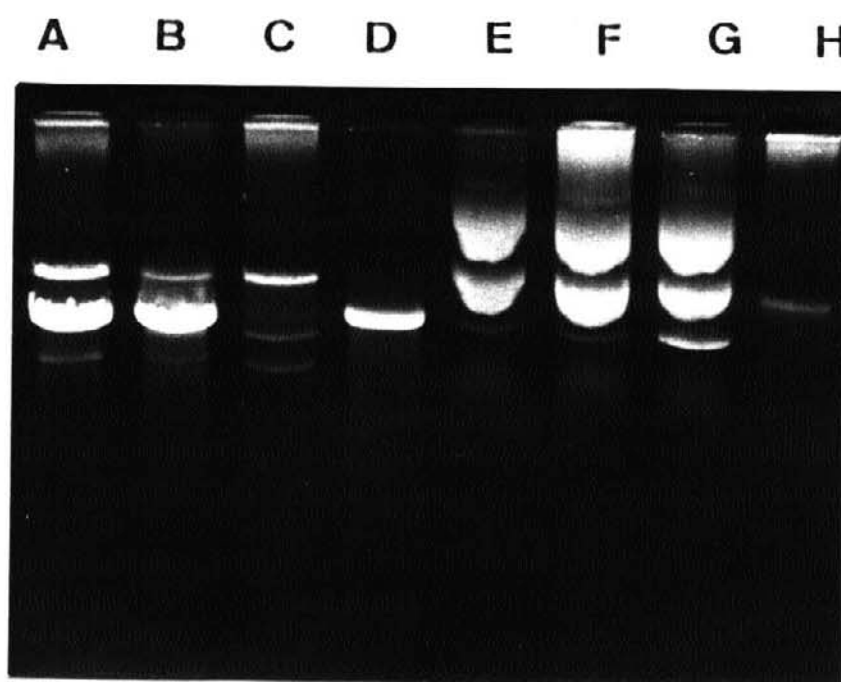


FIGURA 4.9.: Análise eletroforética dos plasmídios isolados dos clones Ap<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> e Km<sup>r</sup> resultantes da primeira etapa da conjugação. A e B: plasmídios de dois transconjugantes /*EcoRI*; C: pRK2013/*EcoRI*; D: pMFY40 / *EcoRI*; E: pMFY40 intacto; F e G: plasmídios intactos de dois transconjugantes; H: pRK2013 intacto.

Na segunda etapa da conjugação, os clones obtidos de X.campestris resistentes a Ap e Tc, além do antibiótico cuja marca era cromossômica, foram examinados quanto à presença de plasmídios.

Os transconjugantes de X.campestris demonstraram-se sensíveis à Km (10 µg/ml). Além disso, a análise eletroforética do DNA isolado desses clones indicou somente a presença do pMFY40, constatando a infuncionalidade de pRK2013 em X.campestris (Fig. 4.10. colunas E e F). Como também pode ser observado na Figuras 4.10. e 4.11., os plasmídios pAP1 e pMFY40 extraídos de X.campestris e linearizados, não indicaram variações no comportamento de migração eletroforética em relação aos extraídos de E.coli.

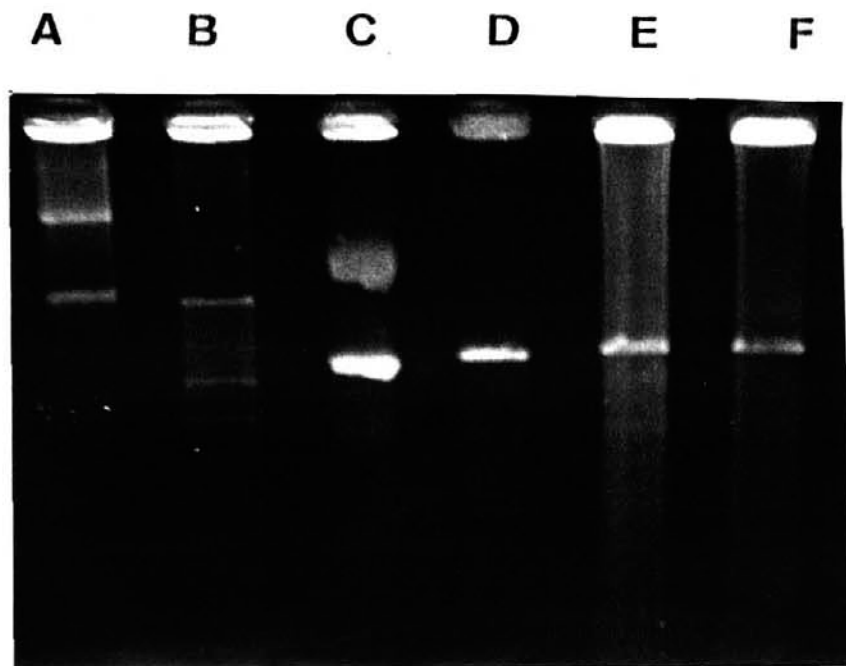


FIGURA 4.10: Análise eletroforética de restrição dos plasmídios dos transconjugantes de X.campestris e das doadoras. A: HB101/pRK2013 intacto; B: HB101/pRK2013 - digestão com EcoRI; C: HB101/pMFY40 intacto; D: HB101/pMFY40 - digestão com EcoRI; E e F: transconjugantes REFCm<sup>r</sup>/pMFY40 - digestão com EcoRI.

#### 4.3.2.) Transformação

As técnicas experimentadas para se transformar Xanthomonas foram as de HANAHAN (1985), CHAKRABARTY *et al* (1975), COHEN *et al* (1972) e MUROOKA *et al* (1987). Destas, apenas obtivemos sucesso com a última, transformando-se as linhagens REF Cm<sup>r</sup> e 280 NaI<sup>r</sup>, tanto com o pMFY40 como com o pAP1. Não apenas os plasmídios isolados de X.campestris, mas também os isolados de E.coli, foram capazes de transformar as linhagens utilizadas de Xanthomonas.

A eficiência de transformação obtida foi baixa, oscilando, em alguns casos, entre zero e aproximadamente 160 transformantes/  $\mu$ g de DNA. Pelos experimentos não pudemos concluir se a eficiência de transformação com plasmídios oriundos de X.campestris teria sido maior do que se provenientes de E.coli.

A análise dos plasmídios isolados das linhagens de X.campestris transformadas também não revelou alteração de tamanho quando comparados com plasmídios isolados de E.coli (Fig. 4.11.).

A linhagem 280 que contém plasmídios crípticos, quando transformada com pAP1 revelou, sob análise de restrição dos seus plasmídios com EcoRI, além de vários fragmentos derivados dos plasmídios nativos, a presença do fragmento contendo AMI (Fig. 4.11., colunas H e I).



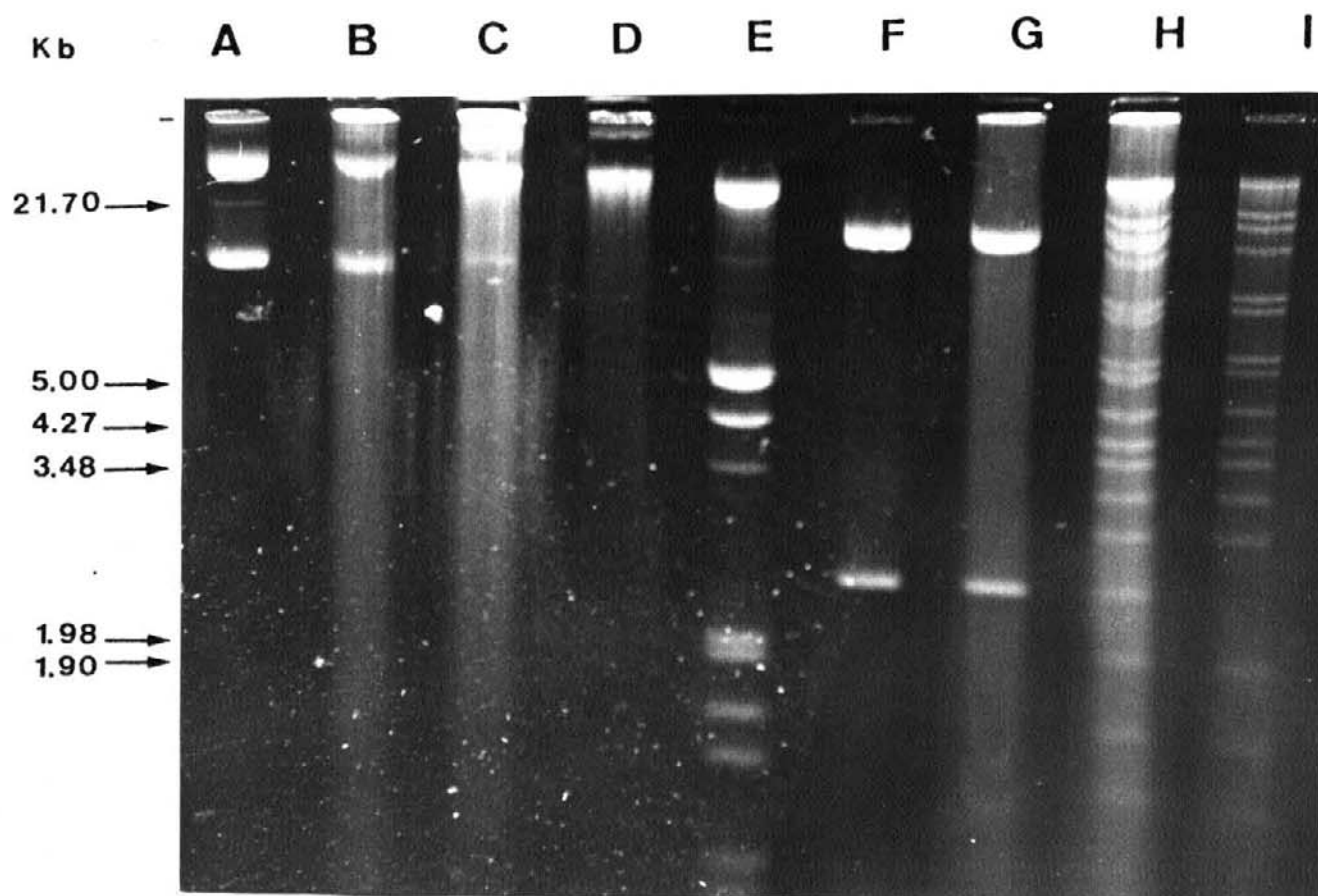


FIGURA 4.11: Análise do plasmídeo pAP1 e dos plasmídios nativos da linhagem 280 de *X. campestris*. A: HB101/pAP1; B: REF Cm<sup>r</sup>/pAP1; C: 280 NaI<sup>r</sup>/pAP1; D: 280 NaI<sup>r</sup>; E: DNA de *A* digerido com HindIII e EcoRI; F, G, H e I: plasmídios isolados, respectivamente, de HB101/pAP1, REF Cm<sup>r</sup>/pAP1, 280 NaI<sup>r</sup>/pAP1 e 280 NaI<sup>r</sup> e digeridos com EcoRI. A flexa indica o fragmento contendo AMI.

#### 4.4.) Estabilidade de pMFY40 em Xanthomonas campestris

O plasmídio pMFY40 revelou-se bastante estável na linhagem REF Cm<sup>r</sup>, como pode ser verificado na Figura 4.12. Na linhagem 280 NaI<sup>r</sup>, entretanto, observou-se uma alta frequência de perda de plasmídios, que se manifestou logo durante as primeiras passagens sem os antibióticos cujas marcas eram plasmidiais (Figura 4.13.).

O plasmídio pAP1 também teve sua manutenção na linhagem 280 observada (resultados não apresentados), e verificou-se que ele também era eliminado da população em alta frequência (maior que 50%), logo nas primeiras passagens.

A partir destes resultados procurou-se verificar a estabilidade de pMFY40 e de pAP1 na linhagem 280 em condições de fermentação da xantana, cujo tempo é de 72h (vide ítem 4.7.).

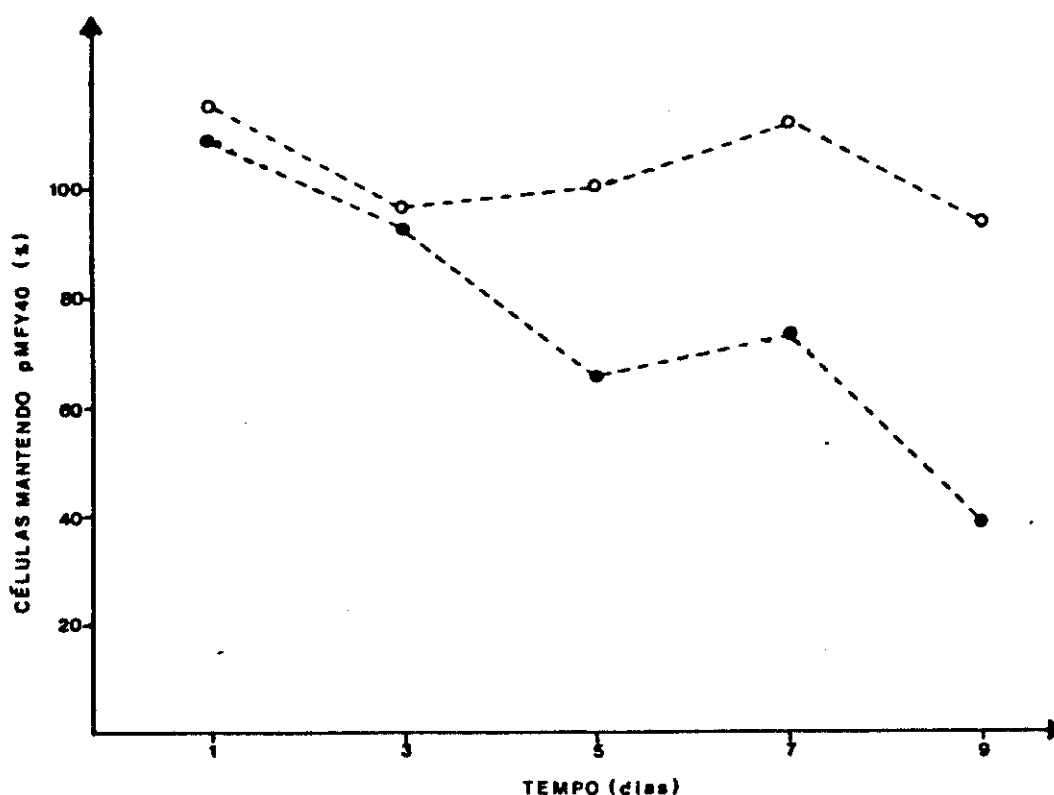


FIGURA 4.12: Estabilidade do plasmídio pMFY40 em X. campestris REF Cm<sup>r</sup>. (O) população controle, mantida sob pressão seletiva; (●) população teste, mantida na ausência de pressão seletiva.

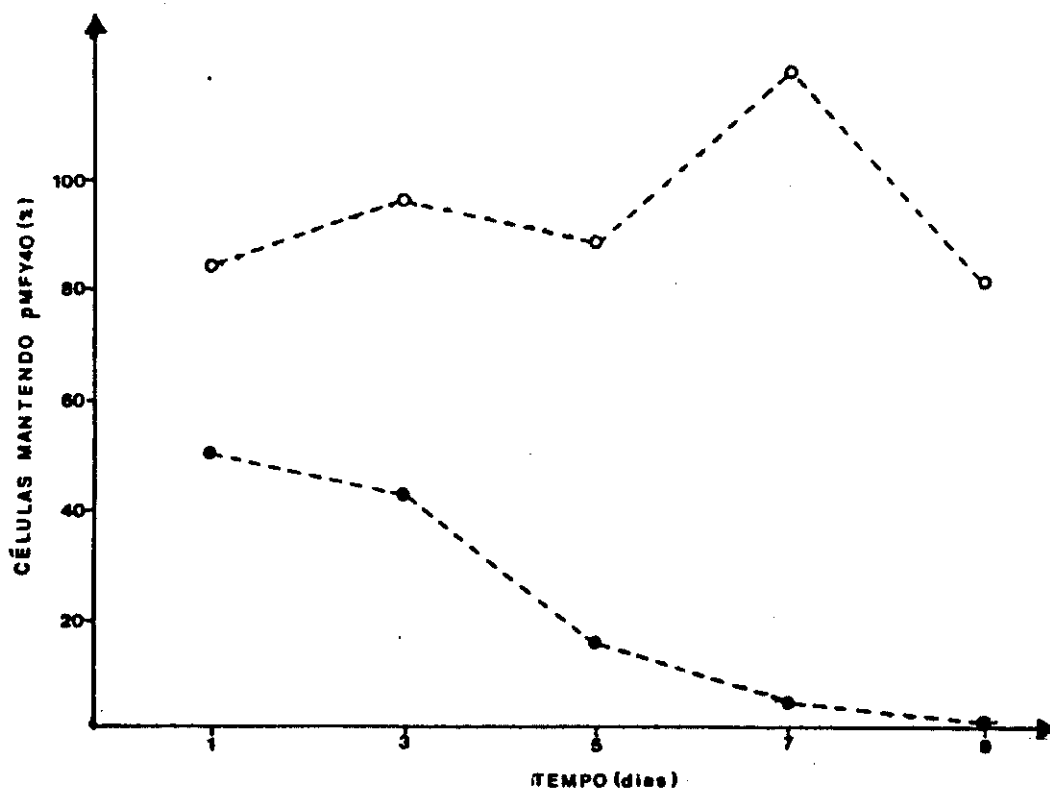


FIGURA 4.13: Estabilidade do plasmídeo pMFY40 em *X. campestris* 280 NaI<sup>F</sup>. (○) população controle, mantida sob pressão seletiva. (●) população teste, mantida na ausência de pressão seletiva.

#### 4.5.) Produção de Amilase em Meio Sólido pelos Recombinantes Contendo pAP1

A presença de um halo típico de amilólise, com exceção à linhagem REF que é originalmente amilolítica, só foi observada nas linhagens recombinantes contendo o plasmídeo pAP1 (Figuras 4.14 e 4.15.).

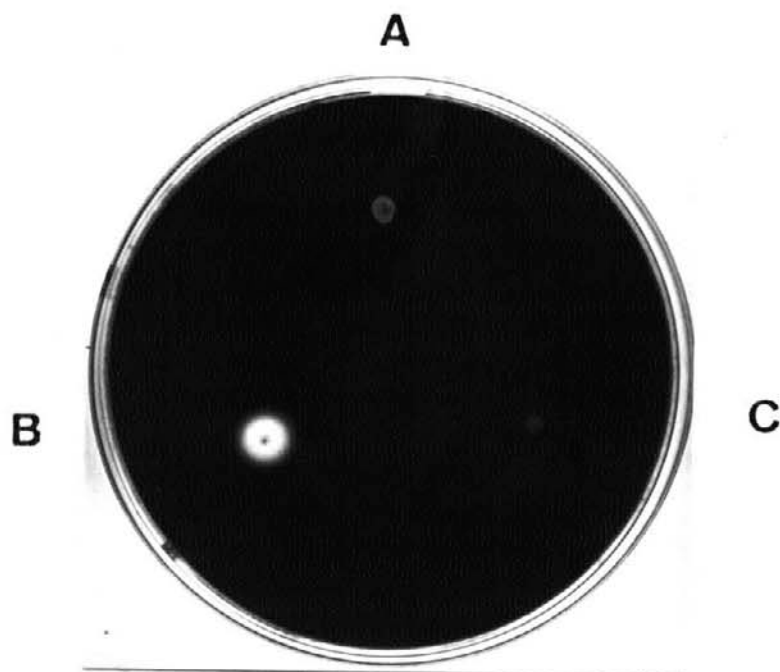


FIGURA 4.14: Placa corada com vapor de iodo, contendo colônias de (A):HB101, (B):REF Cm<sup>r</sup>, e (C):280 Nal<sup>r</sup>, crescidas em meio L sólido contendo amido.

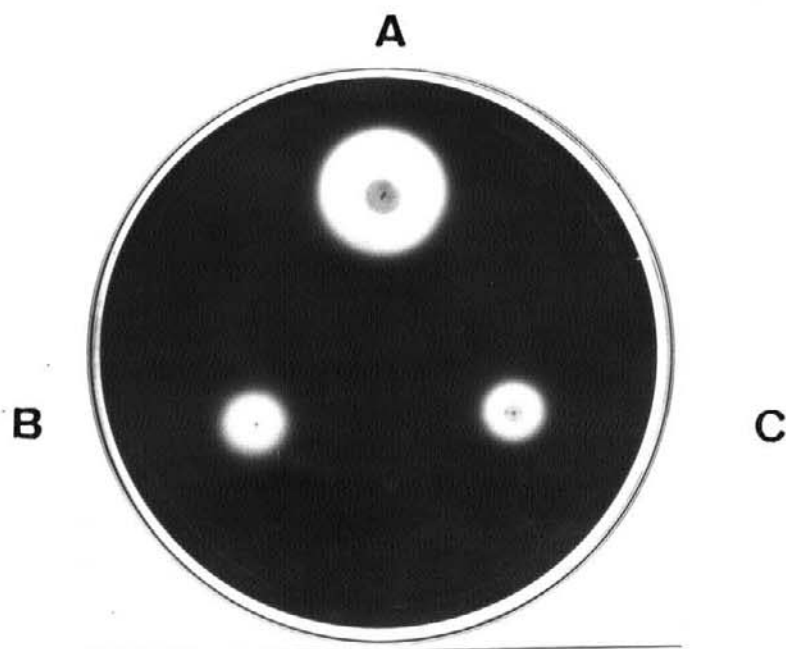


FIGURA 4.15: Placa corada com vapor de iodo, contendo colônias de (A):HB101/pAP1; (B):REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 e (C):280 Nal<sup>r</sup>/pAP1, crescidas em meio L sólido contendo amido.

#### 4.6.) Atividade da Alfa-amilase em Meio Líquido.

O consumo de amido e a produção de açúcar redutor pelas linhagens HB101, REF e 280 originais e as derivadas destas, contendo pMFY40 ou pAP1, estão nas Figuras 4.16., 4.17 e 4.18, respectivamente.

Como pode ser observado nas Figs. 4.16. e 4.17., as linhagens originalmente não amilolíticas HB101 e 280 contendo pAP1 foram capazes de degradar o amido do meio e de produzir açúcar redutor.

A linhagem REF originalmente amilolítica portando pAP1 não demonstrou, em função do tempo, um aumento da degradação do amido e da produção do açúcar redutor, se comparada com a mesma linhagem original ou contendo o vetor pMFY40 (Fig.4.18.). Analisando-se esses resultados em função da densidade celular (Abs 500 nm) entretanto, verificou-se que a linhagem REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 tem a maior taxa de degradação de amido (Fig. 4.19.) e de produção de açúcar redutor (Fig. 4.20). Segundo estas figuras, traçando-se uma linha perpendicular ao eixo das ordenadas onde o consumo de amido e a produção de açúcar redutor equivalem a 50% dos valores máximos, verificou-se no eixo das abscissas valores crescentes de densidade celular, na ordem REF/pAP1, REF/pMFY40 e REF Cm<sup>r</sup>.

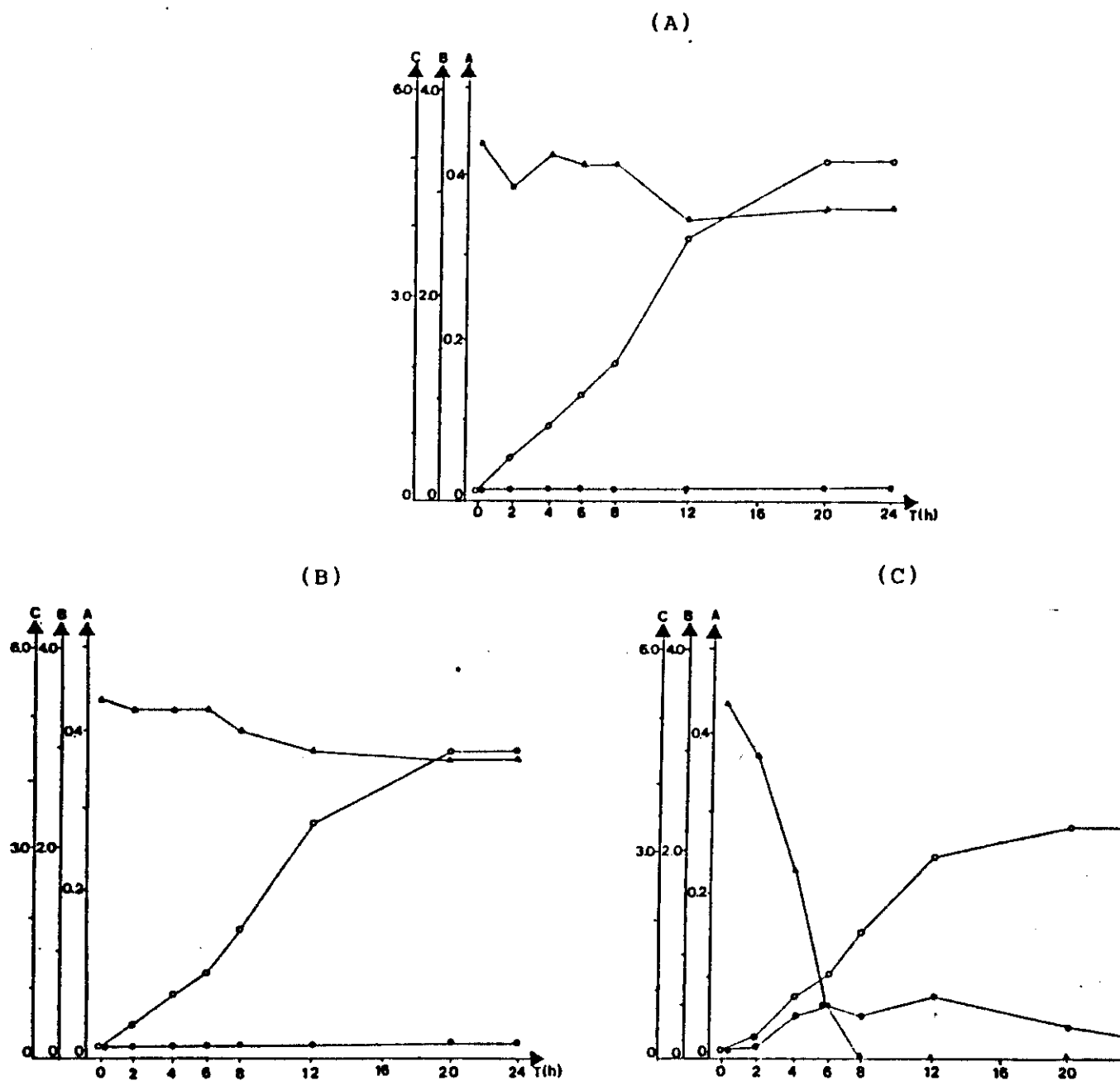


FIGURA 4.16: Degradação de amido e formação de açúcar redutor no sobrenadante de culturas de *E. coli* HB101: (A) *E. coli* receptora; (B) e (C) transformada com os plasmídios pMFY40 e pAP1, respectivamente. C = crescimento, indicado pela medida da absorbância a 500 nm.; B = concentração de açúcar redutor em  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; A = concentração de amido em  $\text{g}/100 \text{ ml}$ . Curva de crescimento (o—o); formação de açúcar redutor (●—●) e concentração de amido ( $\Delta$ — $\Delta$ ).

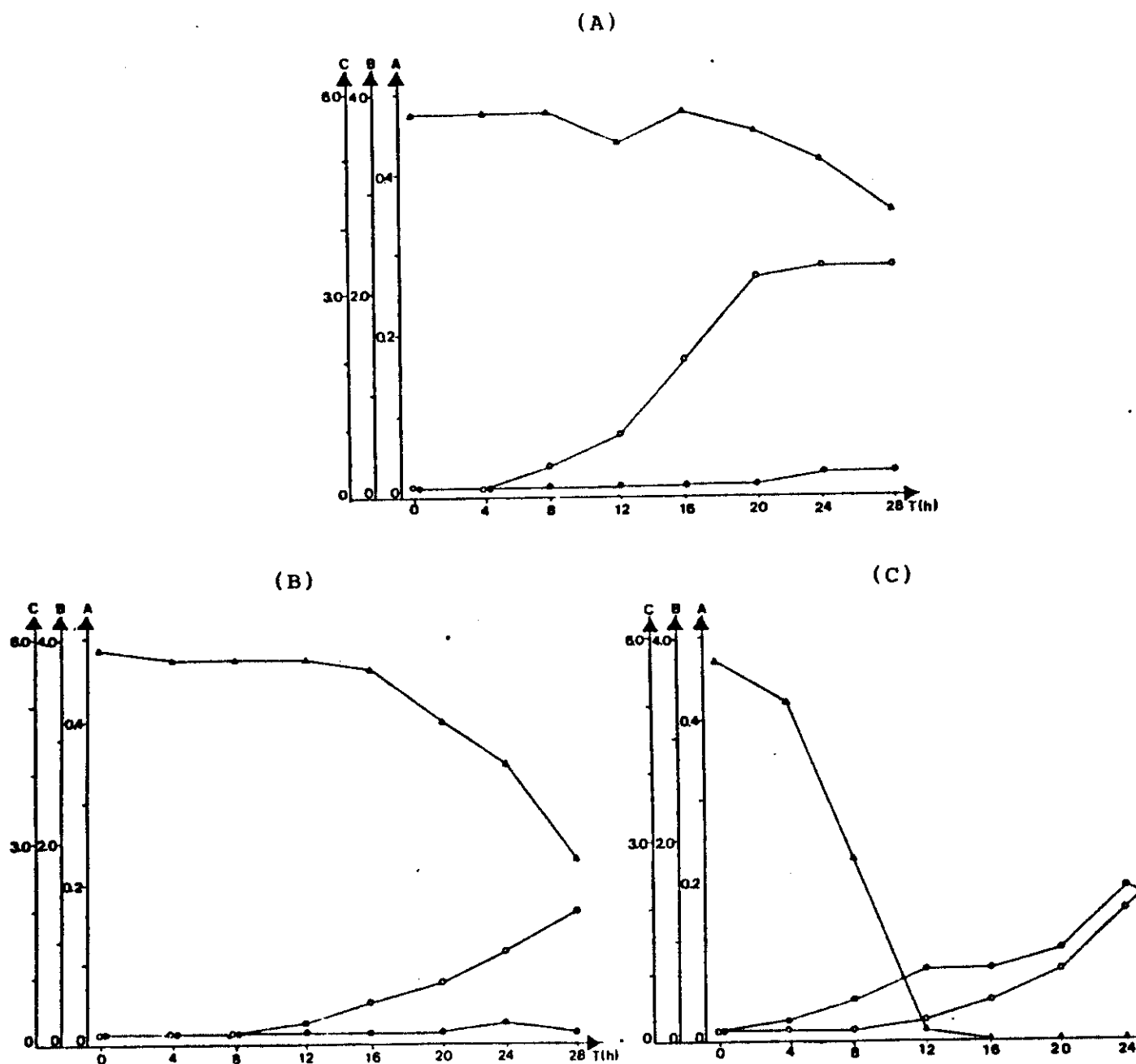


FIGURA 4.17: Análise da degradação de amido e formação de açúcar redutor no sobrenadante de cultura de *X. campestris*, linhagem 280: (A) 280 NaI $\Gamma$ ; (B) e (C) contendo, respectivamente, os plasmídios pMFY40 e pAP1. C = crescimento, indicado pela medida da absorbância a 500 nm; B = concentração de açúcar redutor em  $\mu\text{g/ml}$ ; A = concentração de amido em g/100 ml. Curva de crescimento (O—O); formação de açúcar redutor (●—●) e concentração de amido (▲—▲).

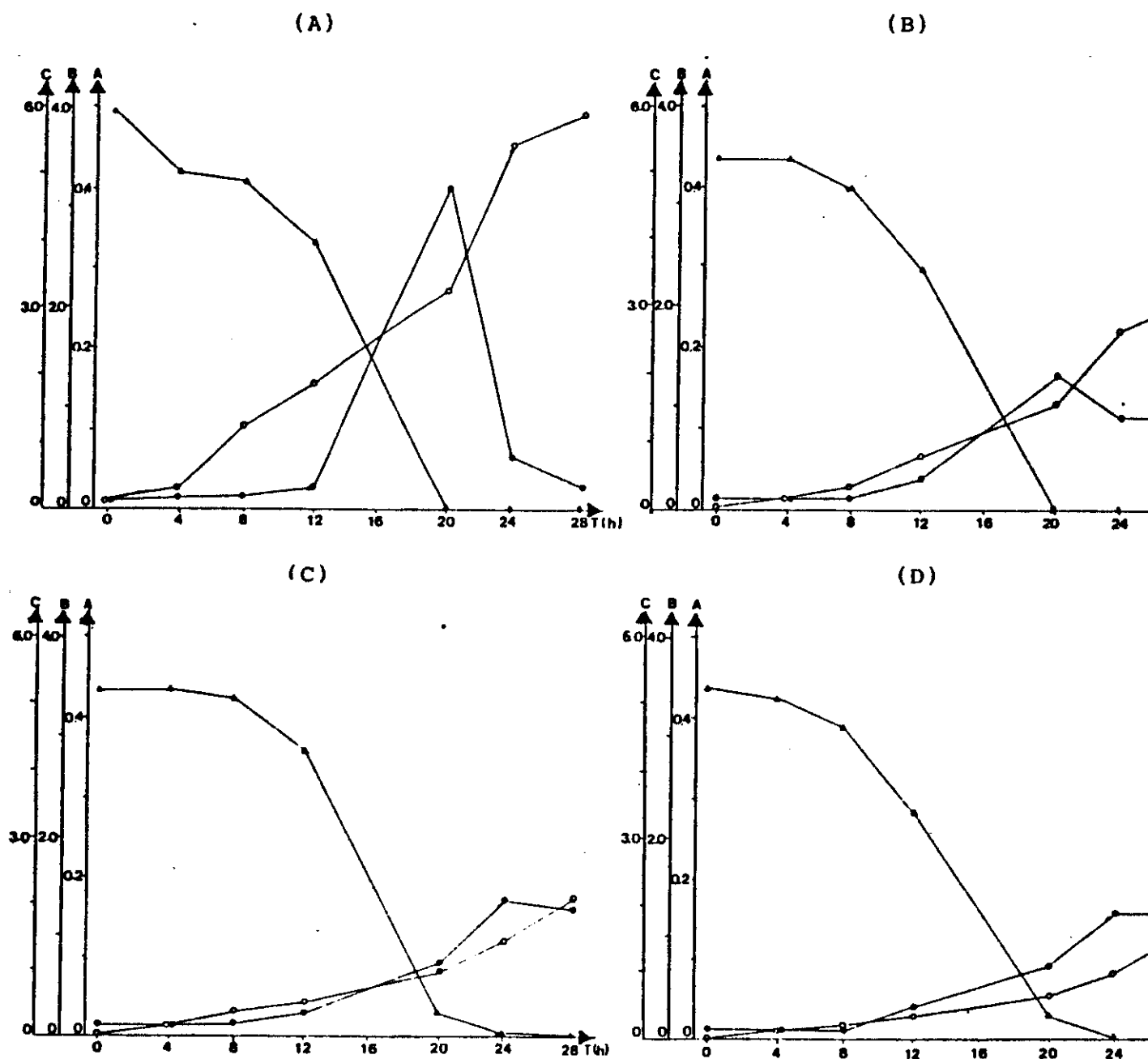


FIGURA 4.18: Análise da degradação de amido e formação de açúcar redutor no sobrenadante de cultura de *X. campestris*, linhagem REF. (A) REF; (B) REF Cm<sup>r</sup>; (C) e (D) contendo, respectivamente, os plasmídios pMFY40 e pAP1. C = crescimento, indicado pela medida da absorbância a 500 nm; B = concentração de açúcar redutor em µg/ml; A = concentração de amido em g/100 ml. Curva de crescimento (O—O); formação de açúcar redutor (●—●) e concentração de amido (△—△).



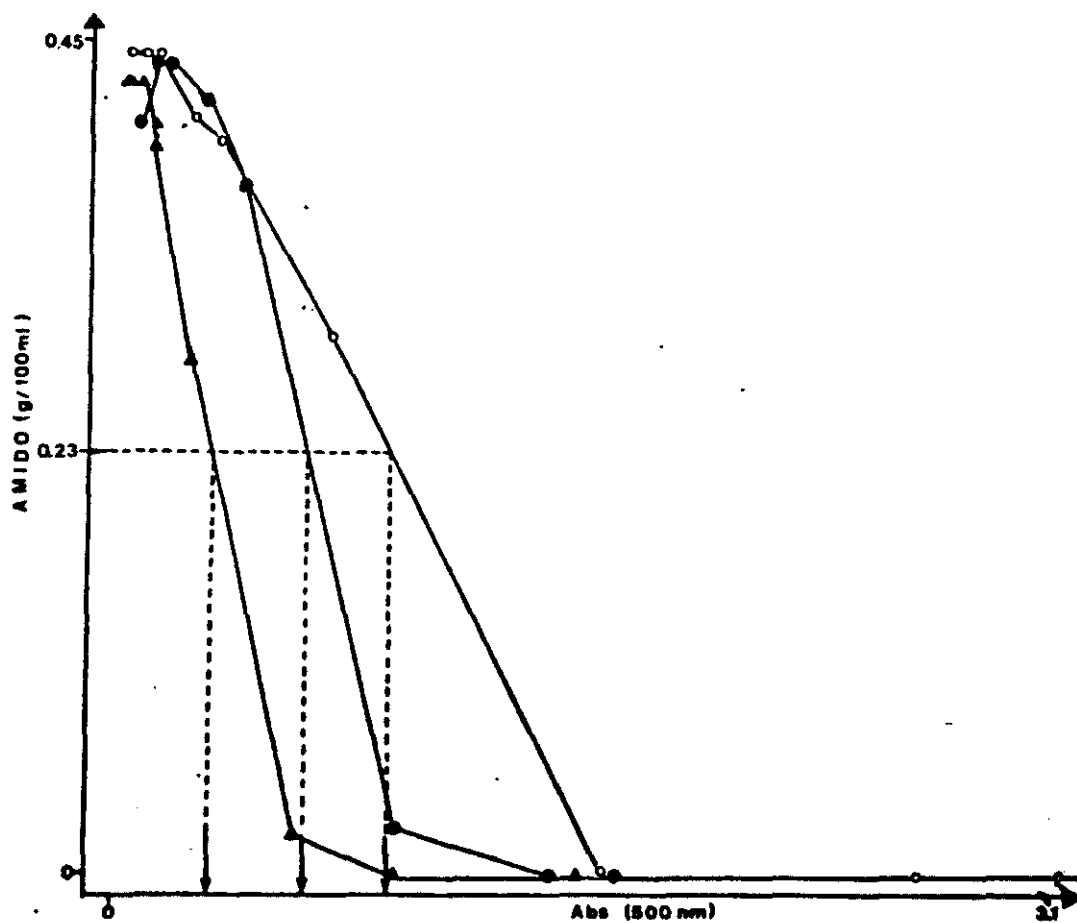


FIGURA 4.19: Efeito da presença de plasmídios na atividade amilolítica de REF Cm<sup>R</sup>; consumo de amido versus turbidez do meio (Abs 500nm). As linhagens estão representadas por: (○—○) REF Cm<sup>R</sup>; (●—●) REF Cm<sup>R</sup>/pMFY40; (▲—▲) REF Cm<sup>R</sup>/pAP1.

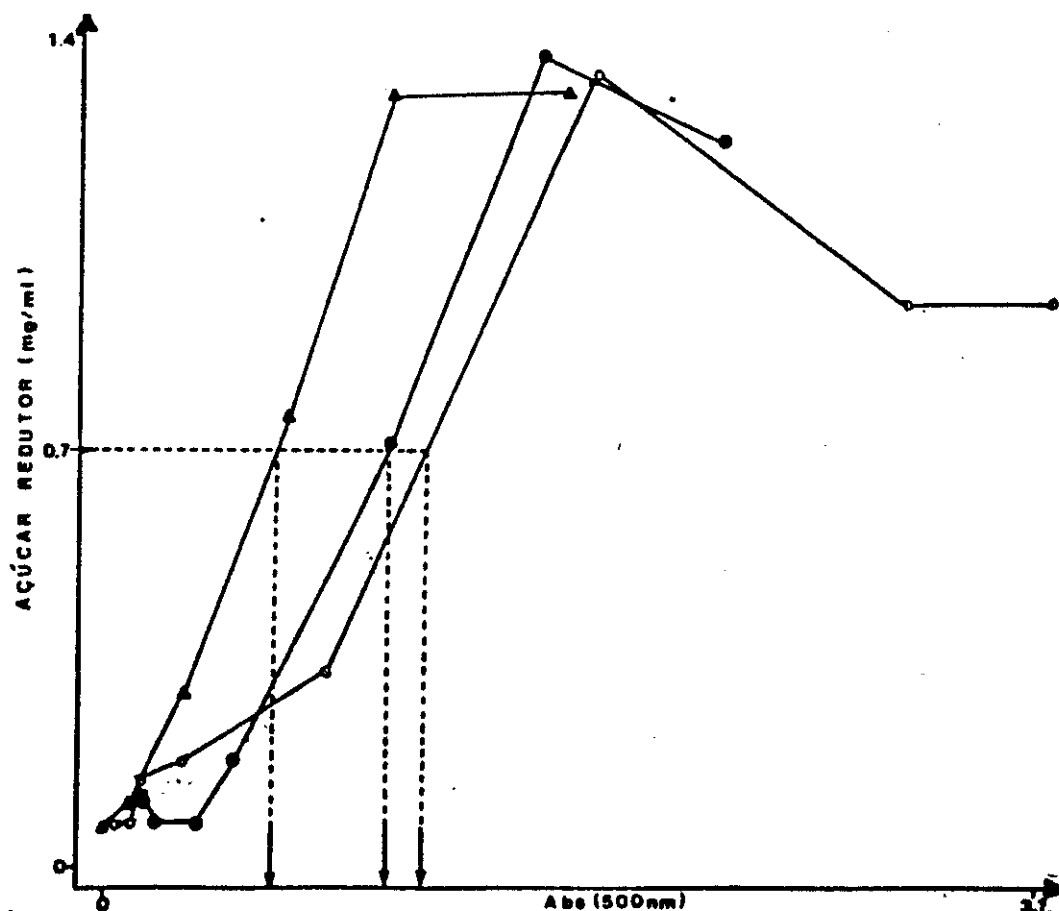


FIGURA 4.20: Efeito da presença de plasmídios na atividade amilo-  
lítica de REF Cm<sup>R</sup>; produção de açúcar redutor versus  
turbidez do meio (Abs 500nm). As linhagens estão re-  
presentadas por: (O—O) REF Cm<sup>R</sup>; (●—●) REF Cm<sup>R</sup>/  
pMFY40; (▲—▲) REF Cm<sup>R</sup>/pAP1.

#### 4.7.) Produção de Xantana em Meio contendo Amido

A produção de xantana, verificada pela viscosidade do caldo de fermentação, foi observada para as linhagens REF e 280, e suas respectivas derivadas contendo resistência cromossômica a antibióticos e os plasmídios PMFY40 ou pAP1.

Após ensaios preliminares, as concentrações das fontes de carbono a serem testadas foram estabelecidas para: sacarose 2%, sacarose 1%, sacarose 1% + amido 1% e amido 2%. Os resultados obtidos para estes quatro tratamentos para cada linhagem encontram-se nas Figuras 4.21.(A, B, C e D) e 4.22.(A, B, C, D e E), onde se observa a viscosidade produzida nos caldos de fermentação, usando-se as diferentes combinações de açúcar e de amido. A utilização de sacarose a 2% propicia os maiores valores de viscosidade, indicando a melhor utilização desta fonte de carbono quando comparada ao amido, principalmente para a linhagem 280, porém também para a linhagem REF que é naturalmente amilolítica.

Na Fig. 4.21. pode se observar que:

- \* Tanto a linhagem REF mutante (Cm<sup>r</sup>), quanto as recombinantes de REF produziram goma mais viscosa do que a linhagem original;
- \* Em meio com amido 2% a produção de goma por REF Cm<sup>r</sup> e por REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 foi mais ou menos equivalente, enquanto que a produção por REF Cm<sup>r</sup>/pMFY40 foi menor;
- \* Em meio contendo 1% de amido + 1% de sacarose, porém não em meio contendo somente amido, a linhagem REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 produziu goma mais viscosa do que a linhagem REF Cm<sup>r</sup>.

Na Fig. 4.22. pode se observar que:

- \* A linhagem 280 mutante (Nal<sup>r</sup>), e as linhagens 280 recombinantes produziram goma mais viscosa do que a linhagem original;
- \* A linhagem 280 Nal<sup>r</sup>/pAP1 foi a que produziu goma mais viscosa nos meios com 2% de amido e com 1% de amido + 1% de sacarose;
- \* A adição de 1% de amido ao meio contendo 1% de sacarose causa um aumento na viscosidade do meio fermentado pela linhagem 280 Nal<sup>r</sup>/pAP1.

Após o tempo de fermentação (72h), verificou-se a porcentagem de perda plasmidial dos recombinantes de 280, na qual se havia detectado instabilidade do plasmídio vetor. Para tanto, plaqueou-se amostras, em triplicatas e em diferentes diluições, de 280 Nal<sup>r</sup>/pMFY40 e de 280 Nal<sup>r</sup>/pAP1, que realizaram a fermentação em meio com 2% de amido, em placas com e sem os agentes seletivos plasmidiais. Da média de três placas foi obtida a porcentagem de manutenção plasmidial de 57%(±13) para a linhagem com o pMFY40 e de 80%(±15) para a linhagem com o pAP1.

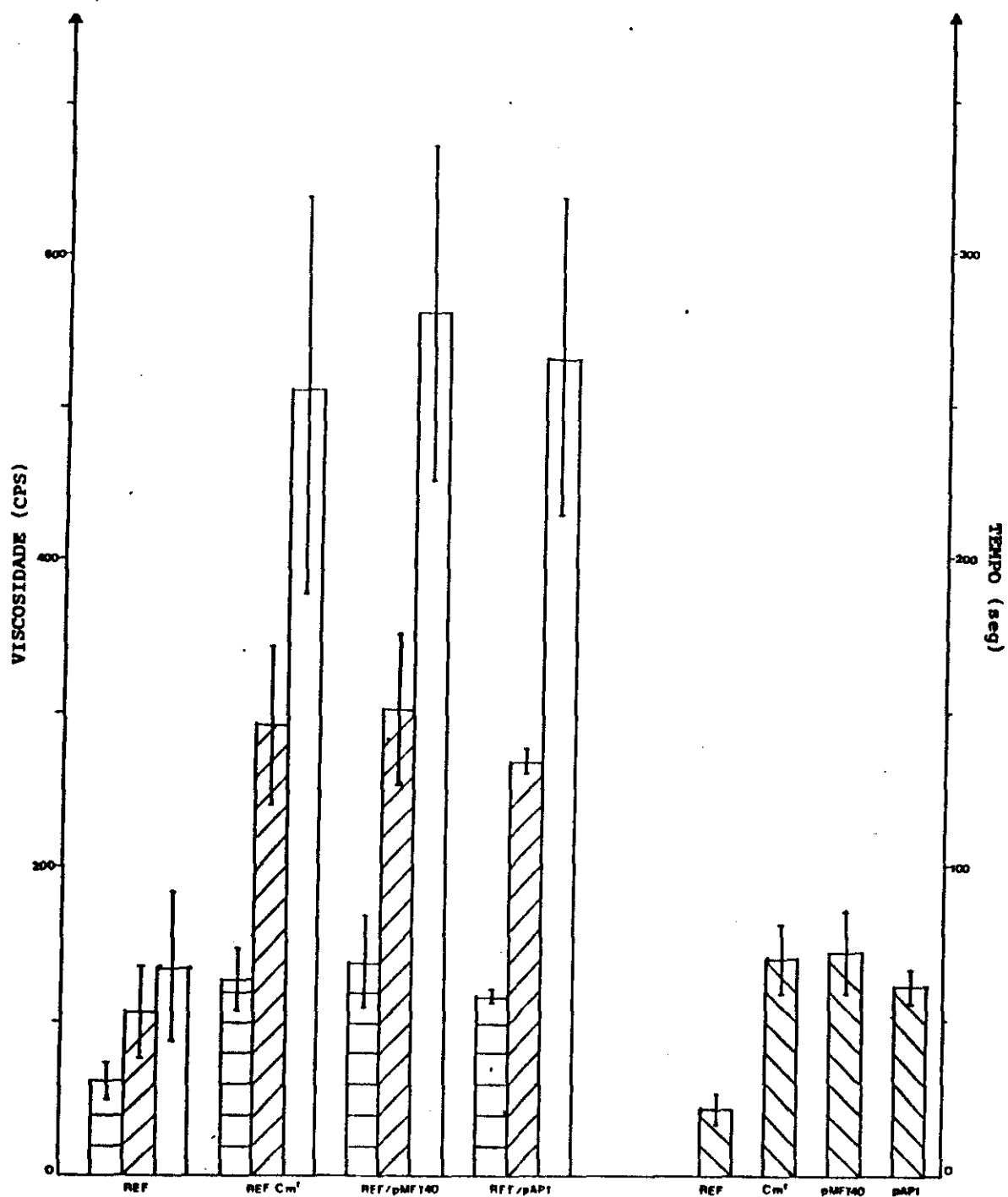


FIGURA 4.21: Viscosidade do caldo de fermentação produzida pela linhagem REF e derivadas em Solução Basal I. Barras à esquerda: medições em viscosímetro a 100 rpm (▨), 20 rpm (▧) e 5 rpm (□). Barras à direita: tempo de escorrimento do caldo de fermentação em pipeta (▩).

FIGURA 4.21. (A) com adição de 2% de sacarose ao meio.

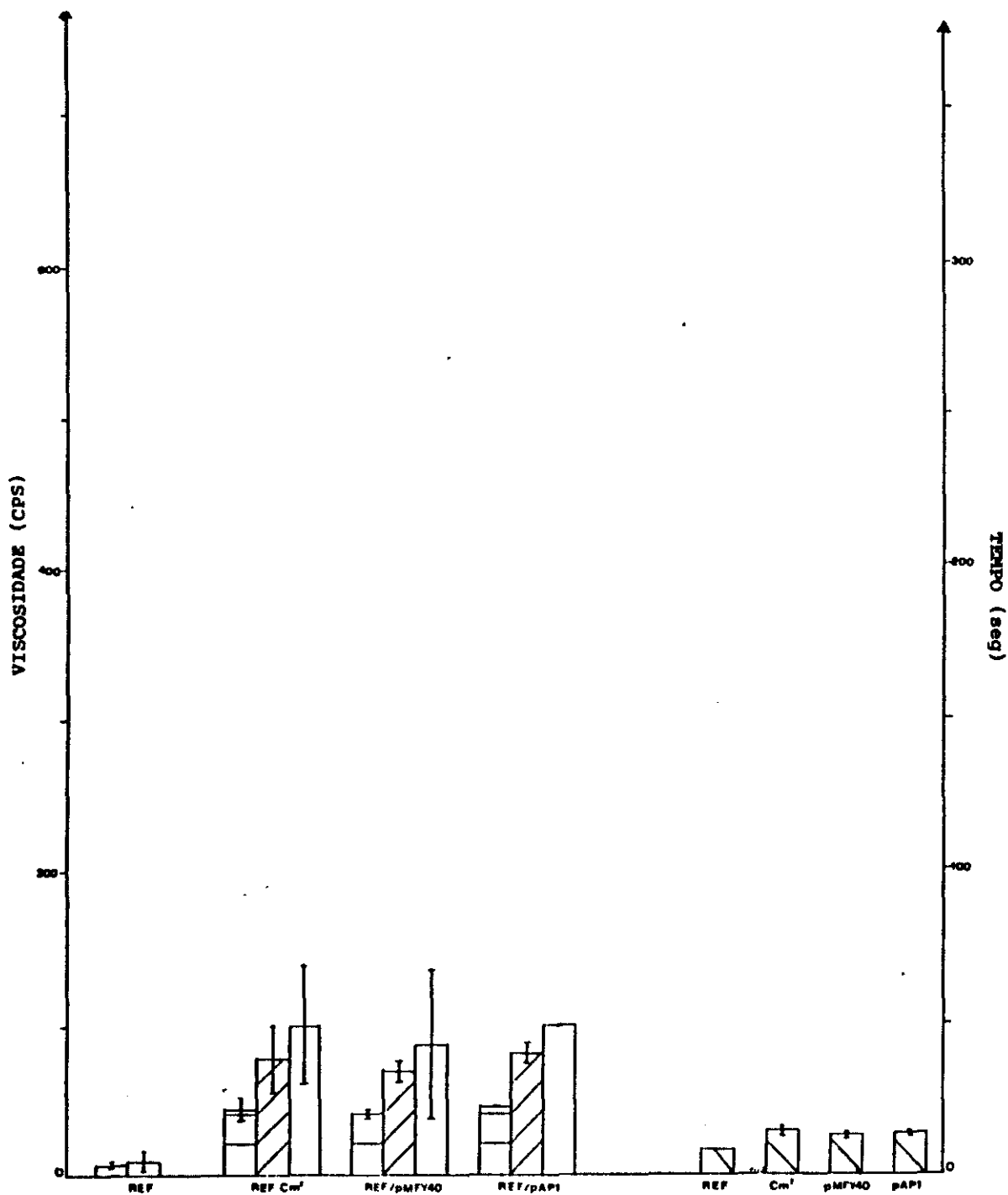


FIGURA 4.21. (B) com adição de 1% de sacarose ao meio.

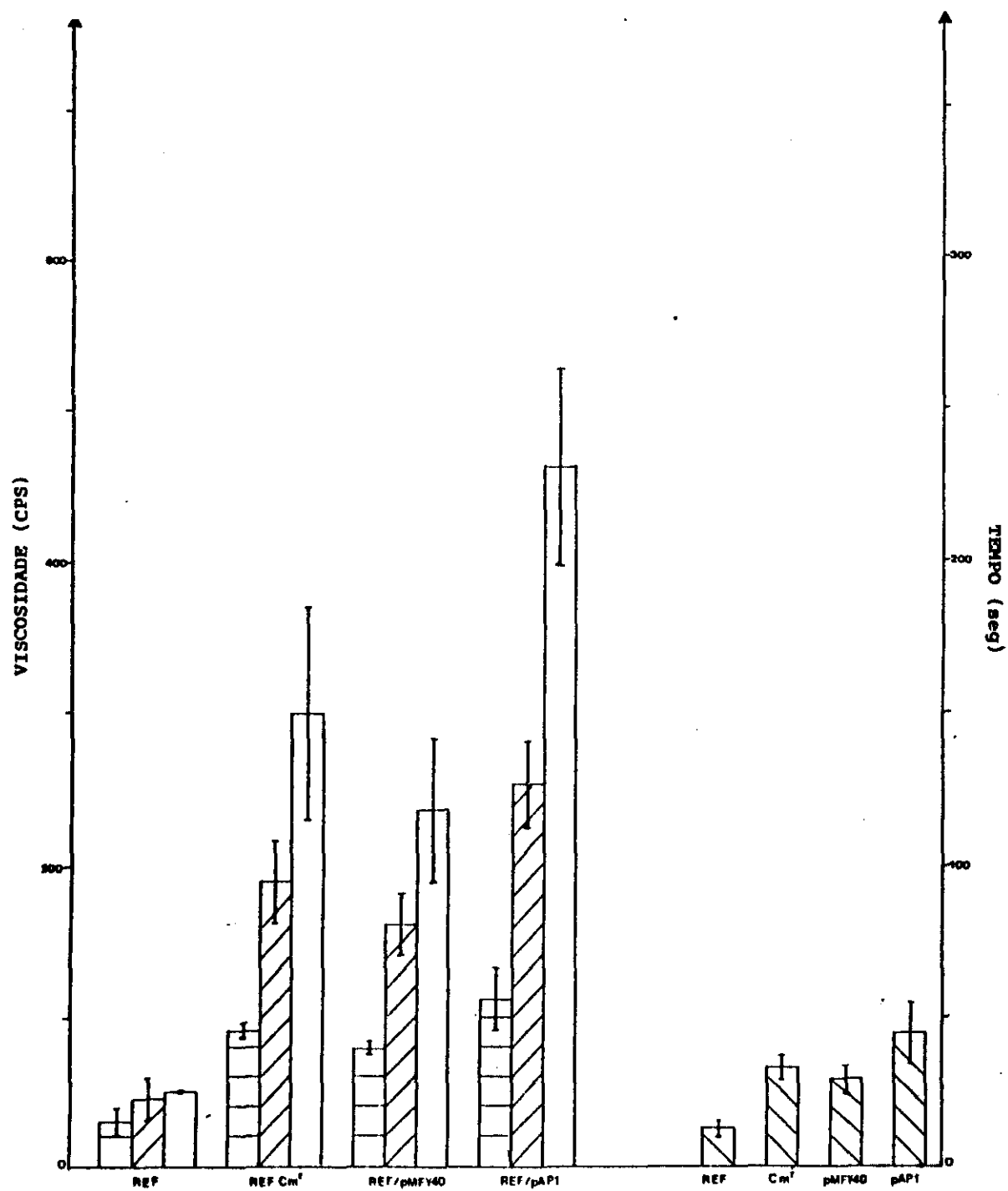


FIGURA 4.21. (C) com adição de 1% de sacarose e de 1% de amido ao meio.

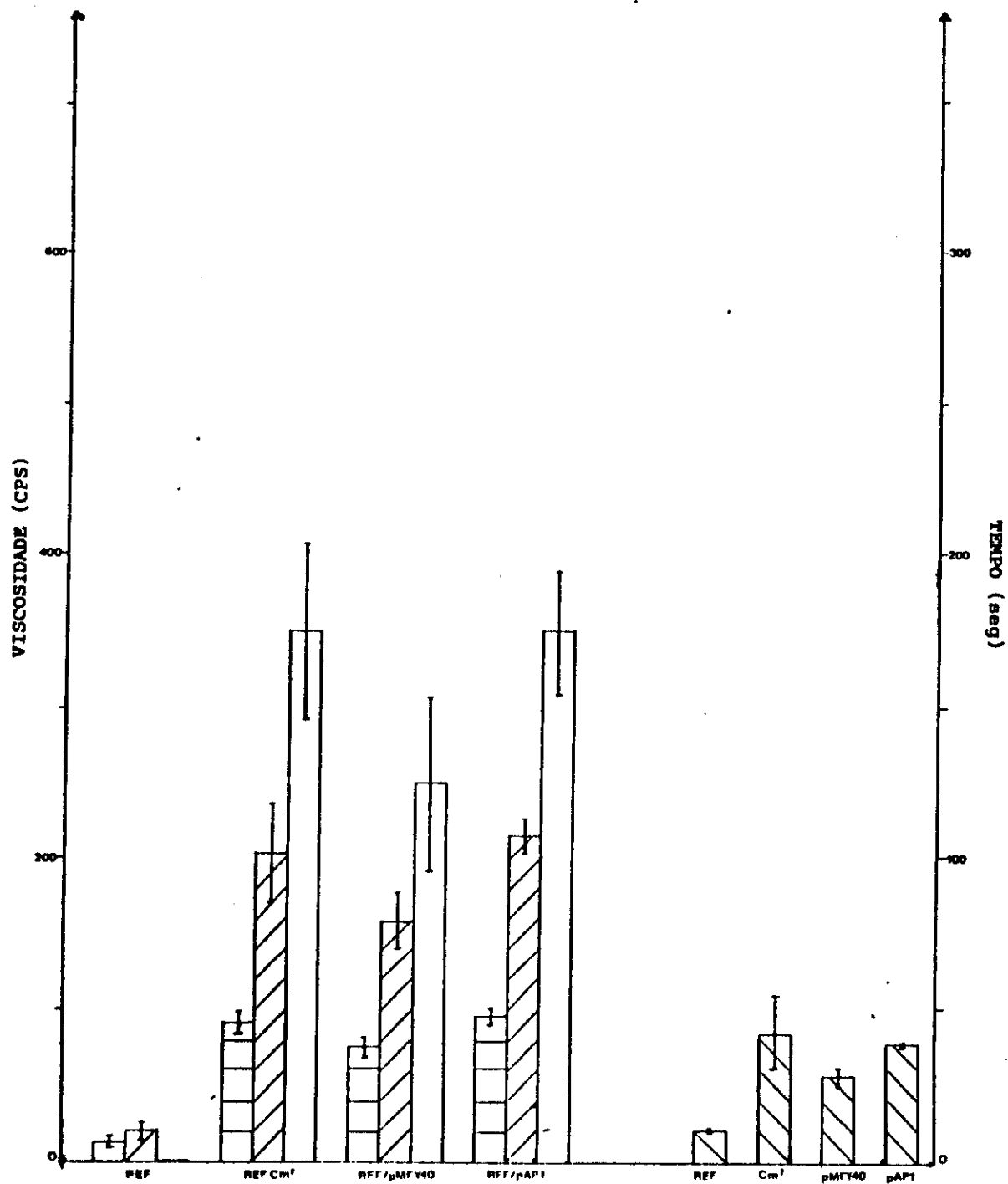


FIGURA 4.21. (D) com adição de 2% de amido ao meio.

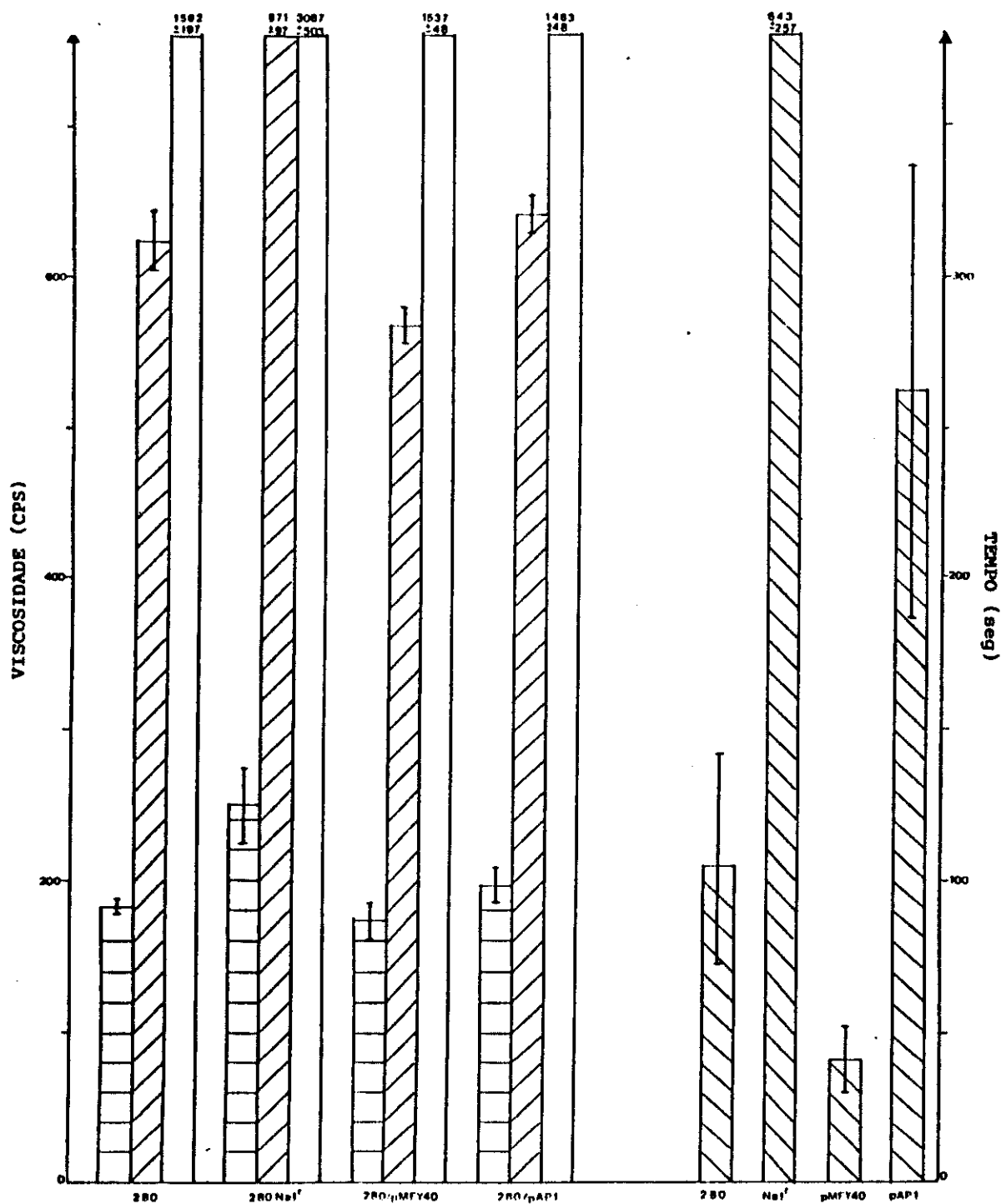


FIGURA 4.22: Viscosidade do caldo de fermentação produzida pela linhagem 280 e derivadas em Solução Basal I. Barras à esquerda: medidas em viscosímetro a 100 rpm (▨), 20 rpm (▧) e 5 rpm (□). Barras à direita: tempo de escorrimento do caldo de fermentação em pipeta (▩).

FIGURA 4.22. (A) com adição de 2% de sacarose ao meio.



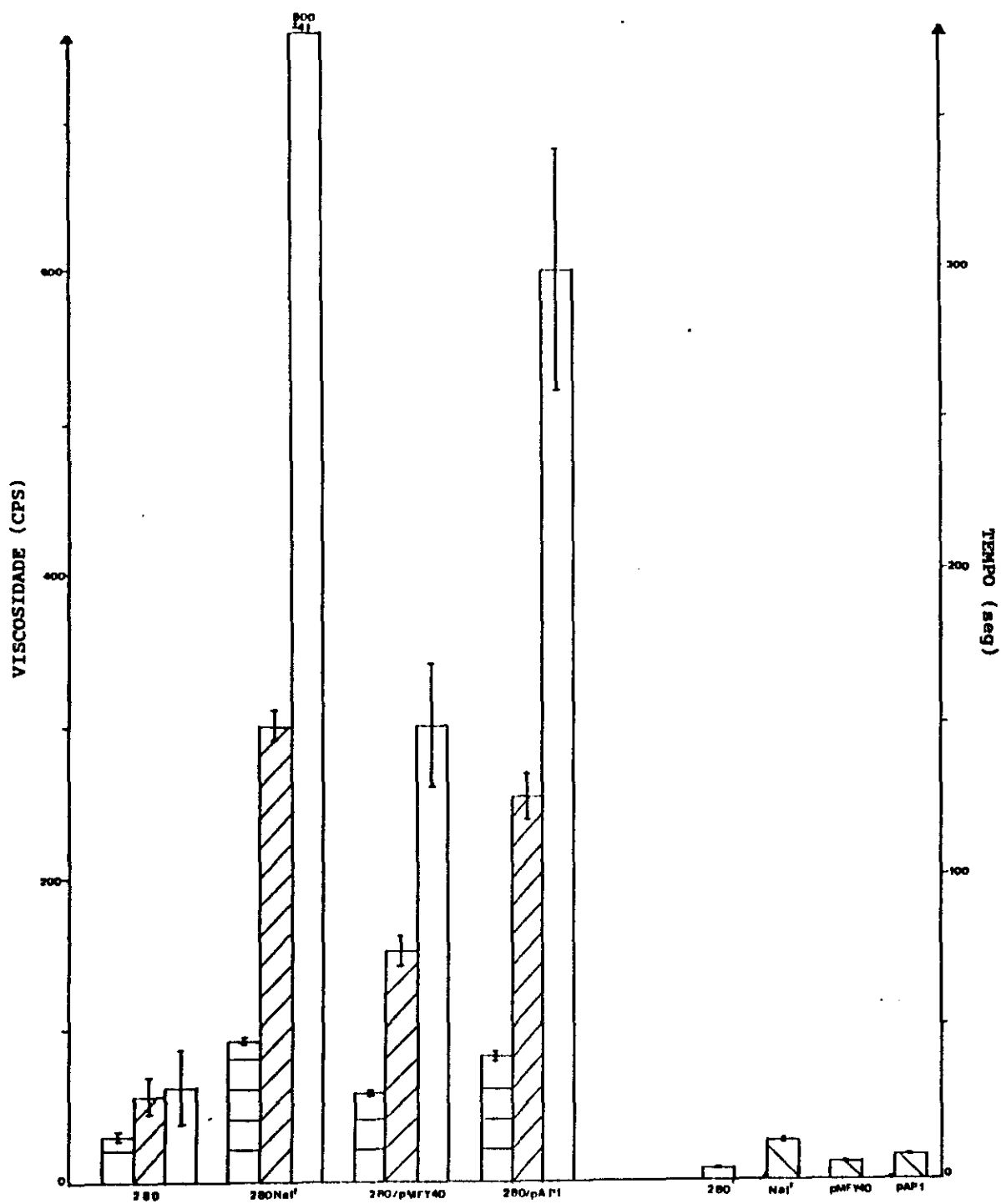


FIGURA 4.22. (B) com adição de 1% de sacarose ao meio.

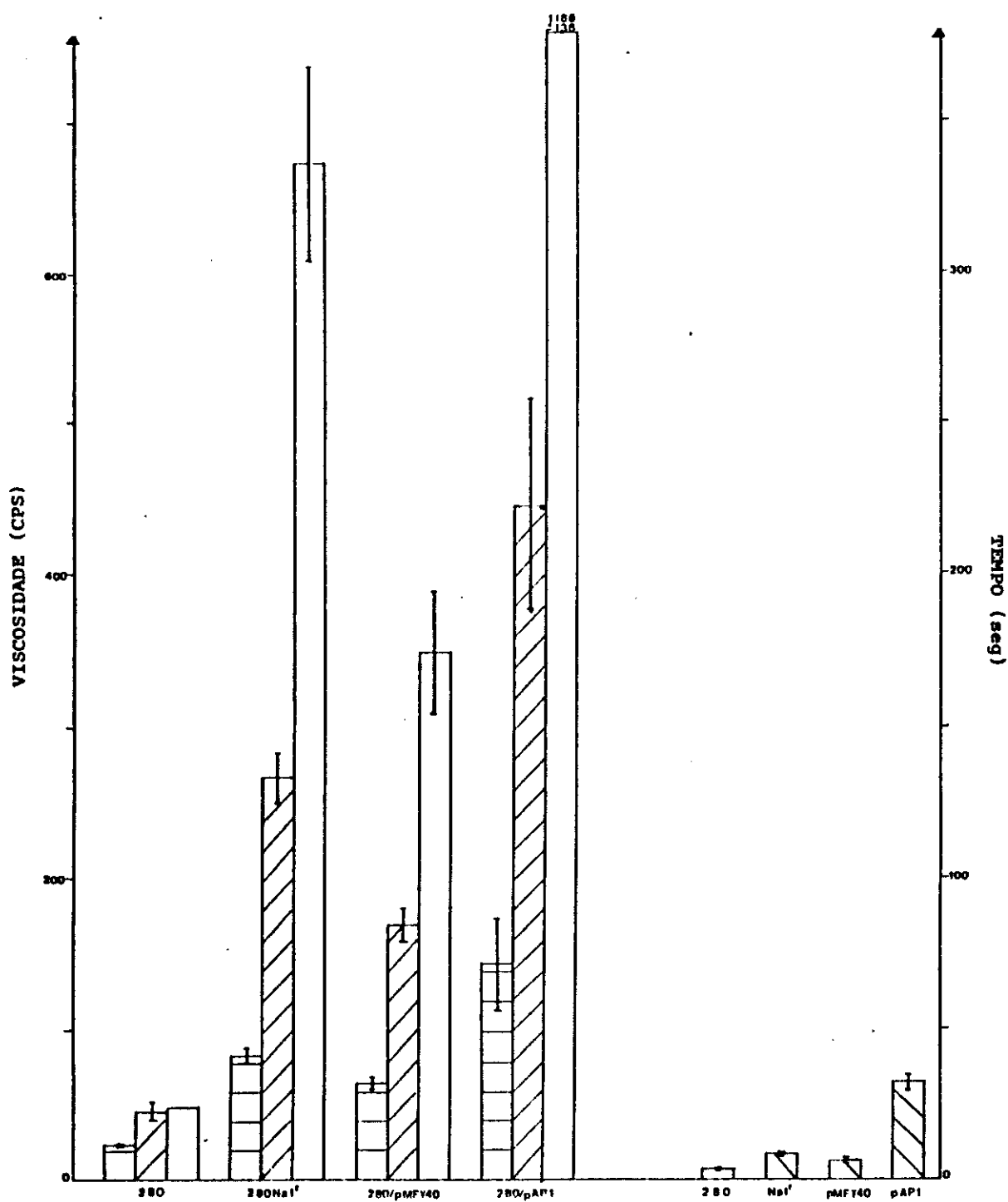


FIGURA 4.22. (C) com adição de 1% de sacarose e de 1% de amido ao meio.

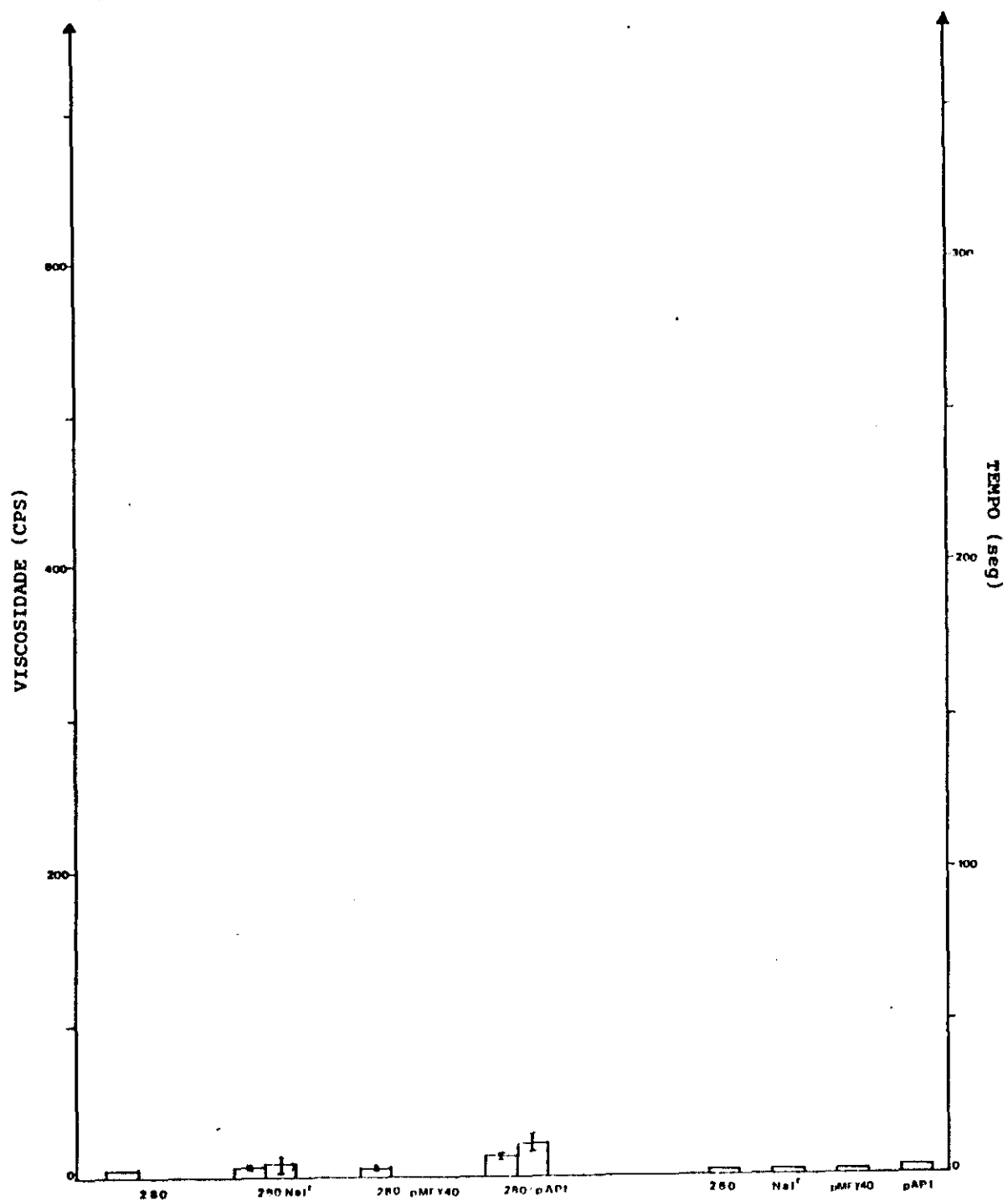


FIGURA 4.22. (D) com adiç3o de 2% de amido ao meio.

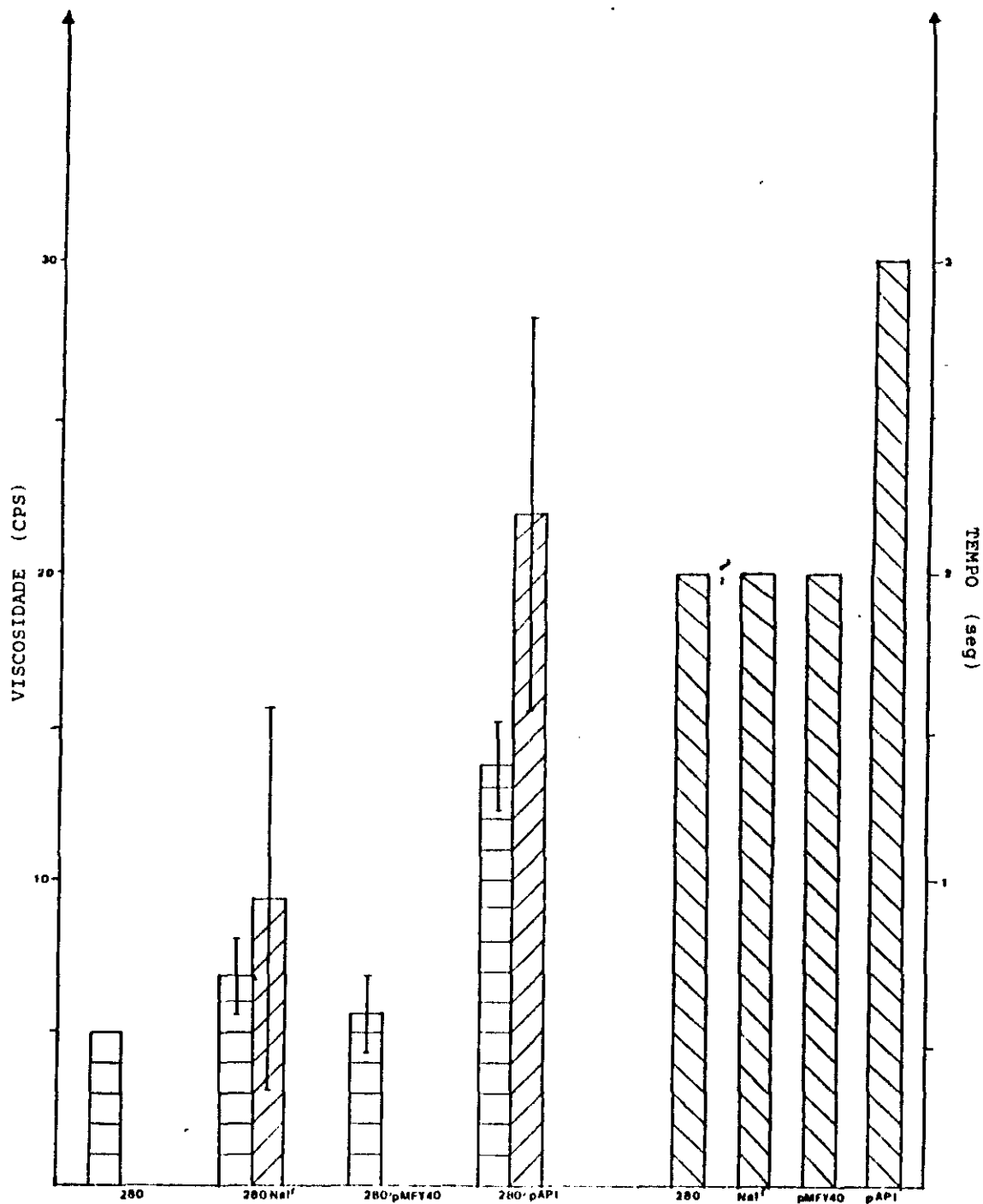


FIGURA 4.22. (E) ídem à Figura 4.22.(D), porém com as escalas modificadas.

## 5.) DISCUSSÃO

O presente trabalho foi iniciado com o objetivo de ser desenvolvido um sistema de clonagem molecular para Xanthomonas campestris, para posteriormente se inserir um gene de alfa-amilase nesta bactéria.

### 5.1.) Produção de Amilase em Meio Sólido por Diferentes Linhagens de Xanthomonas campestris

Conforme se verificou na caracterização da produção de amilase por vários membros da espécie (Tabela 4.1.), o caráter amilolítico parece estar ligado ao patovar em que a linhagem se encontra. Este resultado é interessante, pois pode estar relacionado com a interação da bactéria com a planta hospedeira. Destes resultados e de outros obtidos quanto à produção de goma xantana por estas linhagens analisadas (ROSATO - comunicação pessoal), foram escolhidas as linhagens REF e 280 para o prosseguimento do trabalho. A linhagem REF do pv campestris (NRRL-B1459) é uma linhagem bem estudada por vários grupos que interessam-se pela xantana e é originalmente amilolítica. A linhagem 280 é uma das melhores produtoras de goma do laboratório e produz quantidades de amilase insignificantes, somente nas últimas fases do crescimento bacteriano, podendo ser, para efeitos práticos, considerada não amilolítica.

### 5.2.) O Sistema de Clonagem

#### 5.2.1.) O Plasmídio Vetor pMFY40

Apesar de serem citados na literatura alguns plasmídios já testados como vetores de clonagem para X.campestris, resolvemos experimentar o plasmídio pMFY40 (FUKUDA & YANO, 1985), o qual possui um tamanho razoável para se clonar genes de procariotos (11.6 Kb), é multicópia, funcional em uma grande gama de bactérias Gram-negativas, não auto-transmissível embora mobilizável por plasmídios "helper", possui marcas de resistência à Ap e Tc, e contém sítios de restrição únicos para várias enzimas.

O fato do plasmídio pMFY40 não ser auto-transmissível é um caráter importante do ponto de vista ambiental, devido à propriedade fitopatogênica de Xanthomonas campestris.

#### 5.2.2.) Introdução de pMFY40 em X.campestris

A introdução do pMFY40 em Xanthomonas foi feita por conjugação através do plasmídio "helper" pRK2013, construído por FIGURSKI & HELINSKI (1979), e por transformação.

A conjugação consiste em um método simples, envolvendo um bom sistema de seleção dos transconjugantes. Neste trabalho, a conjugação sempre foi feita em duas etapas, na primeira o "hel-

per" foi transferido à célula contendo o vetor, e na segunda o vetor foi mobilizado pelo helper à Xanthomonas. Quando tentou-se realizar o processo em uma etapa, pela mesma técnica, não obtivemos transconjugantes. A conjugação em duas etapas requer, portanto, mais tempo para se obter os recombinantes, porém na maioria dos experimentos obtivemos bons resultados.

A transformação é um método que consiste apenas em uma etapa, entretanto, para Xanthomonas é mais trabalhosa e, por enquanto, com resultados relativamente imprevisíveis. Com relação à eficiência de transformação, repetições de um mesmo experimento, com as mesmas linhagens e plasmídios, forneceram resultados diferentes. Além do mais, a eficiência de transformação obtida é ainda inexpressiva, para se contar com esta técnica na construção de bancos genômicos e outros procedimentos de clonagem em X.campestris. MUROOKA *et al* (1987) relata que obteve eficiência de até  $3 \times 10^4$  transformantes/  $\mu\text{g}$  de DNA, porém o seu sistema contava com uma linhagem diferente, pertencente ao pv citri, e de um plasmídio menor, contendo 7.8 Kb. A técnica deverá ser melhorada, entretanto, para se poder introduzir nestas linhagens de Xanthomonas vetores de clonagem específicos, não mobilizáveis. De maneira análoga a MUROOKA *et al* (1987), também conseguimos introduzir em Xanthomonas plasmídios que foram extraídos de E.coli. Este resultado difere do obtido por ATKINS *et al* (1987), cuja técnica permitiu introduzir apenas plasmídios que haviam sido extraídos do próprio fitopatógeno. Estes dois grupos atribuíram à existência de sistemas de restrição o fato da não permanência de plasmídios exógenos na bactéria. Mesmo assim, a técnica empregada para a transformação também é um ítem importante, e as técnicas descritas por ambos os autores deveriam ser comparadas experimentalmente. Os tratamentos diferem totalmente quanto às soluções empregadas, que são MOPS, PEG e  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{RbCl}$  no primeiro e  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , Tris e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  no segundo caso. Apesar de introduzirem em X.campestris plasmídios oriundos de E.coli, MUROOKA *et al* ratificaram a hipótese da existência de sistemas de restrição, pois verificaram um aumento de  $10^3$  a  $10^4$  na eficiência de transformação, quando do uso de plasmídios isolados de Xanthomonas. Além destes resultados, é conhecida a presença de endonucleases de restrição no gênero (KESSLER & HOELTKE, 1986). E como se explicaria o fato deste sistema de restrição não interferir tanto na conjugação quanto na transformação? A possível explicação é que, na transformação o DNA é transferido por fita dupla e na conjugação por fita simples. Sendo as enzimas de restrição específicas para fitas duplas, por conjugação o DNA ficaria menos sujeito à degradação. Os sistemas de restrição não têm uma explicação definitiva quanto à sua utilidade na célula. Além de proteger as bactérias da invasão de fagos, supõe-se que a restrição desempenharia importante papel na recombinação gênica (PRICE & BICKLE, 1986).

### 5.2.3.) Estabilidade de pMFY40 em X.campestris

Após a introdução do pMFY40 nas linhagens REF  $\text{Cm}^r$  e 280  $\text{NaI}^r$ , o próximo passo foi verificar a estabilidade do vetor nas mesmas. Observou-se que o pMFY40 mantém-se estável em REF  $\text{Cm}^r$

(Figura 4.12.), sendo que, mesmo após 9 dias de passagem em meio líquido sem os antibióticos seletivos, cerca de 40% da população bacteriana ainda o manteve. Por outro lado, na linhagem 280 NaI<sup>r</sup>, o pMFY40 mostrou-se bastante instável (Figura 4.13.), sendo que aproximadamente 50% da população o perdeu logo na primeira passagem sem a pressão de seleção. Esta instabilidade deve-se, provavelmente, à presença de outros plasmídios nativos nesta bactéria (STRIPPECKE & ROSATO, 1985; Fig. 4.11.), o que poderia criar processos de incompatibilidade plasmidial. Esta hipótese poderia ser testada com isolados os quais sofreram cura de plasmídios (STRIPPECKE & ROSATO, 1987). A estabilidade do plasmídio pAP1 na linhagem 280 também foi analisada, dando resultados semelhantes ao comportamento do plasmídio pMFY40 (resultados não apresentados). Para se verificar se nas condições de fermentação da xantana esta instabilidade também ocorria, plaqueou-se amostras de 280 NaI<sup>r</sup>/pMFY40 e de 280 NaI<sup>r</sup>/pAP1, crescidas durante 72 horas em meio Basal-1 com 2% de amido. Foram obtidas as porcentagens de manutenção plasmidial da ordem de 57%(±13) para pMFY40 e de 80%(±15) para pAP1. A explicação para a maior estabilidade dos plasmídios nestas condições, é que a Solução Basal 1 é específica para a produção de goma, e não para o crescimento celular, o qual é um dos fatores da perda plasmidial. Outro ponto interessante, é que, aparentemente, o amido também serviu de fonte de carbono e, portanto, de pressão seletiva para a manutenção do plasmídio pAP1.

### 5.3.) O Plasmídio Híbrido pMFY40-AMI: pAP1

O objetivo seguinte deste trabalho foi o de inserir no plasmídio pMFY40 o gene da amilase, o qual, além de ter no caso um interesse prático, também é de fácil análise de expressão. O gene escolhido foi o da alfa-amilase de Bacillus subtilis, isolado em Brasília (DF), e que foi tema da tese de mestrado de SOUZA (1986). Este gene pode ser isolado facilmente do plasmídio pABC1, pois situa-se entre dois sítios de restrição de EcoRI. A estratégia utilizada para a introdução de AMI no pMFY40 encontra-se esquematizada na Figura 4.2., onde o fragmento contendo o gene foi inserido no sítio de EcoRI do pMFY40. O plasmídio recombinante selecionado foi denominado de pAP1 (plasmídio com Alfa-amilase Promiscuo 1), o qual contém cerca de 14.0Kb.

Conforme se observou na análise de restrição do pAP1 (Figura 4.6.) e baseando-se em dados da restrição do pABC1 (CASTRO, 1988) e do sequenciamento do gene AMI (VALÊNCIA et al, 1988), concluiu-se que o gene da alfa-amilase é transcrito no mesmo sentido que o gene que expressa resistência à tetraciclina (tet). Se o gene da amilase for inserido no sítio de restrição de EcoRI segundo a orientação inversa da transcrição de tet, somente o promotor original do gene, o qual provém de B. subtilis, é operante, e a produção de amilase é pequena. Porém, se o gene é inserido no mesmo sentido da transcrição de tet, um suposto promotor residual deste gene, que teria ficado à montante ("upstream") do gene da amilase seria capaz de aumentar notavelmente a

expressão de produção da enzima. Foi esse o efeito que se observou dentre os clones Km<sup>B</sup> Ap<sup>r</sup> Tc<sup>r</sup> selecionados: alguns clones produziam maiores e outros menores halos de amilólise, ratificando a observação de CASTRO (1988), que a orientação do gene AMI no plasmídeo exerce influência na expressão gênica.

#### 5.4.) Expressão de AMI em E.coli e em X.campestris

Após se inserir o gene da alfa-amilase em pMFY40, a próxima etapa foi introduzir o plasmídeo recombinante em Xanthomonas campestris. O pAP1 foi introduzido nas linhagens REF Cm<sup>r</sup> e 280 Nal<sup>r</sup>, por conjugação e por transformação (Figura 4.11.).

A formação de halos de amilólise em meio sólido (Figuras 4.14. e 4.15.) demonstrou que, com exceção aos resultados obtidos para a linhagem REF Cm<sup>r</sup> que já era originalmente amilolítica, os resultados obtidos para as linhagens HB101 e 280 contendo pAP1 diferiram drasticamente das linhagens originais.

A hidrólise de amido e a formação de açúcar redutor em meio líquido foram verificadas nas linhagens originais de E.coli e de X.campestris e nas linhagens contendo pMFY40 ou pAP1 (Figuras 4.16., 4.17. e 4.18.).

O plasmídeo pAP1 expressou o caráter amilolítico nas linhagens HB101 e 280 Nal<sup>r</sup> e amplificou este caráter na linhagem REF Cm<sup>r</sup> (Figuras 4.19. e 4.20.).

A produção de halos de amilólise em placas e a degradação do amido em meio de cultura líquido pelos recombinantes contendo pAP1 poderiam ser explicados: pela secreção da amilase, ou pela lise celular e conseqüente liberação da enzima ao meio. Apesar de exames citológicos não terem sido realizados para se testar estas hipóteses, informações da literatura apóiam o primeiro caso. CORNELIS et al (1982) clonou o gene da alfa-amilase de B.coagulans em E.coli, e mostrou que a sequência sinal de uma bactéria gram-positiva era eficiente para promover o transporte de proteínas através da membrana de E.coli. O gene da amilase de B.subtilis, ora introduzido em E.coli e em X.campestris, possui a sequência codificadora do peptídeo sinal (VALÊNCIA et al, 1988), responsável pela secreção do produto. Logo, é provável que este peptídeo sinal promova a secreção de amilase no meio de cultura.

Segundo as medidas espectrofotométricas, a linhagem 280 consumiu o amido do meio 16h após a inoculação. Entretanto, uma observação importante é que, visualmente, antes de se diluir as amostras das últimas leituras para se fazer a dosagem espectrofotométrica, ainda se detectava uma coloração mais forte do que a do "Branco". A explicação para isso é que, pelo fato da enzima clivada tratar-se de uma alfa-amilase, lembrando-se que esta cliva apenas as ligações alfa-1,4, o amido não deve ter sido totalmente degradado. Alguns oligossacarídeos podem ter restado na amostra, os quais ainda se coraram fracamente com o iodo. Quanto aos resultados da produção de açúcar redutor pela 280 Nal<sup>r</sup>, deve ser considerado que não somente a glicose, mas também os oligossacarídeos com terminações redutoras são capazes de se reagirem com o DNS.



Um fato observado, por enquanto sem explicação, é que a simples presença do plasmídeo pMFY40, especialmente nas duas linhagens de X.campestris, aumentou a atividade amilolítica das estirpes, mesmo no caso da 280 que é apenas residual.

A presença de plasmídios nas linhagens analisadas interferiu no crescimento celular, conforme se observou nas curvas de crescimento. Isto pode estar relacionado com a administração do antibiótico Tc ao meio, que foi utilizado como pressão seletiva para a manutenção do plasmídeo, ou com a presença dos plasmídios, propriamente. Os plasmídios requerem um sistema replicativo para sua manutenção na bactéria, o que envolve gasto energético.

Um problema que se tem observado na clonagem do gene de alfa-amilase em E.coli é a interferência deste gene no crescimento celular. Esta observação está de acordo com o que foi ora verificado. Um trabalho que demonstra a alteração do crescimento foi realizado por WILLEMOT & CORNELIS (1983), que observaram que células de E.coli recombinantes contendo o gene da alfa-amilase de B.coagulans apresentam inibição de crescimento quando a única fonte de carbono era maltose ou glicerol, permanecendo normal quando se utilizava glicose. Um aumento da síntese de alfa-amilase podia ser observado no meio contendo um desses dois primeiros açúcares, indicando que estes afetavam a síntese da enzima. Dois tipos de mutação espontânea revertiam este processo; uma mutação localizada no plasmídeo, que acarretava a inativação do gene da alfa-amilase, e outra no cromossomo da célula hospedeira. Isto sugere que a expressão acentuada desse gene interfira de alguma forma no crescimento celular. No presente trabalho, a presença de AMI em E.coli HB101 e em X.campestris REF também causou uma redução da taxa de crescimento celular. Porém, comparando-se a presença de pMFY40 e de pAP1 na linhagem 280 de X.c.pv manihotis, verificou-se uma correlação positiva entre a presença de AMI e o crescimento. Este resultado poderia estar relacionado com a utilização do amido como fonte de carbono adicional pela bactéria.

### 5.5.) Produção de Xantana em Meio Contendo Amido

Chegamos, finalmente, ao último tópico, que é a comparação da produção de xantana entre as linhagens recombinantes e não.

Neste trabalho, a produção de xantana foi verificada através da viscosidade do caldo de fermentação, conforme foi descrito na literatura (SILMAN & ROGOVIN, 1970; JEANES *et al*, 1976). Entretanto, é importante se ressaltar dois aspectos desvantajosos do método, que são: 1.) a viscosidade pode refletir o grau de polimerização da xantana, que pode estar sujeita a fatores diferentes aos da produção do biopolímero; 2.) em situações em que o caldo de fermentação encontra-se em extremos de viscosidade as medidas tornam-se menos precisas. Para se obter resultados mais seguros da produção de xantana, portanto, uma alternativa seria verificá-la através de medidas de peso seco da goma purificada a partir de um volume fixo da amostra. Esta metodologia forneceria dados quantitativos da produção. Para se avaliar a qualidade da

goma, diferentes soluções da goma purificada seriam feitas com base em diferentes concentrações da mesma, determinando-se a seguir as respectivas viscosidades. Devido ao caráter preliminar desta etapa do trabalho, esses experimentos não foram realizados. Nestas condições, portanto, o termo "produção" referir-se-á apenas à viscosidade do caldo de fermentação.

Foram testados quatro meios de fermentação: com 2% de sacarose; com 1% de sacarose; com 1% de sacarose mais 1 % de amido e com 2% de amido. Segundo os resultados obtidos, várias considerações devem ser feitas:

(1) Quanto à linhagem REF e derivadas (Figura 4.21. A, B, C e D):

\* Foi notado nos quatro tratamentos que a linhagem mutante REF Cm<sup>r</sup> e as recombinantes produziram mais goma do que a linhagem original. Estes resultados são concordantes com os obtidos por LANZA & ROSATO (1986), que observaram o mesmo comportamento.

\* Em meio com amido 2% a produção de goma por REF Cm<sup>r</sup> e REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 foi mais ou menos equivalente, enquanto que a produção de REF Cm<sup>r</sup>/pMFY40 foi menor. A presença do plasmídeo vetor, sem o gene da amilase, na célula que estava crescendo somente com amido como fonte de carbono, provavelmente poderia estar causando um gasto energético à bactéria para a sua manutenção, sem contudo trazer nenhuma vantagem ao metabolismo celular. Já no caso de pAP1, quiçá a amplificação da produção de amilase deva compensar a energia gasta para se manter o plasmídeo na célula.

\* Em meio com 1% de amido + 1% de sacarose, a linhagem contendo pAP1 fermentou mais do que a REF Cm<sup>r</sup>, resultado que diverge do que se verificou em meio com 2% de amido. Isto poderia sugerir algum mecanismo de regulação gênica diferencial entre a produção da amilase clonada e a originalmente produzida por X.campestris. Na presença de sacarose, o gene original de produção de amilase poderia estar sendo reprimido, diminuindo a degradação do amido, e conseqüentemente o fornecimento de substrato para a célula. O gene da amilase de B.subtilis, por sua vez, poderia ser insensível a esta regulação, propiciando um melhor aproveitamento do substrato.

(2) Quanto à linhagem 280 e derivadas (Figura 4.22.A,B,C,D e E):

\* Assim como ocorreu em REF, a linhagem 280 mutante Na1<sup>r</sup> e as recombinantes, também produziram mais goma do que a linhagem original, em todos os tratamentos.

\* Em meio com sacarose 2% e com sacarose 1%, a linhagem Na1<sup>r</sup> produziu mais goma do que as bactérias recombinantes, mostrando que os plasmídios podem interferir na fisiologia bacteriana.

\* Em meio com sacarose 1% mais amido 1%, a linhagem 280 Na1<sup>r</sup>/pAP1 produziu mais goma do que a 280 Na1<sup>r</sup> e 280 Na1<sup>r</sup>/pMFY40. Isto demonstra mais uma vez a relação da presença de amilase e a produção da goma em meio com amido.

\* No meio com amido a 2%, a produção de goma é muito pequena, porém a viscosidade da goma produzida pelo recombinante contendo pAP1, é pelo menos o dobro das demais. Conforme foi verificado na análise da expressão da alfa-amilase em meio líquido, a alfa-amilase exógena deve quebrar o amido parcialmente, resultando em muitos oligossacarídeos ramificados e alguns monossacarídeos. Pelo fato de ser a glicose o substrato que entra na via

biossintética da xantana, os oligossacarídeos seriam de pouco ou nenhum uso nesta via. Outra possibilidade para se explicar a discrepância da produção de xantana em meio contendo só amido e em meio com amido e sacarose, é que, a sacarose, ao ser clivada resulta em glicose e frutose. Segundo SOUW & DEMAÏN (1979), a frutose, a baixas concentrações estimula a produção de xantana. A linhagem 280, portanto, poderia estar necessitando de frutose, a qual é produzida juntamente com a glicose, como resultado da clivagem da sacarose.

- \* Nos caldos de fermentação contendo apenas a sacarose como fonte de carbono a linhagem 280 NaI<sup>r</sup>/pAP1 verificou-se viscosidade ligeiramente superior do que a da linhagem 280 NaI<sup>r</sup>/pMFY40. Este resultado pode ser efeito ou da presença de AMI em pAP1 ou da ausência deste gene em pMFY40. Para a primeira sugestão é difícil se ter uma explicação a priori. A segunda sugestão poderia ser explicada pelo maior número de cópias que poderiam ser produzidas do plasmídio pMFY40, pelo fato deste ser menor, o que poderia causar um gasto energético à bactéria, o qual refletiria na menor produção de goma.

### 3.6.) Conclusão e Perspectivas

Concluindo, podemos dizer que o gene da alfa-amilase de B. subtilis clonado em Xanthomonas campestris aumenta a capacidade desta em produzir a xantana a partir do amido.

Apesar de se verificar que a substituição total de sacarose por amido não seja vantajosa para REF Cm<sup>r</sup>/pAP1 e inviável para 280 NaI<sup>r</sup>/pAP1, a substituição de 50% da sacarose pelo amido já fornece resultados razoáveis.

Com este trabalho, assim como o de WALSH et al (1984), esperamos ter fornecido subsídios para se repensar a utilização dos substratos tradicionalmente usados na produção da xantana. Além disto, outras perspectivas foram abertas, tais como:

- \* Usar o plasmídio pMFY40 para se construir bancos genômicos ou para se clonar genes em Xanthomonas campestris;
- \* Verificar a expressão da alfa-amilase de Bacillus subtilis em várias bactérias gram-negativas, usando-se o plasmídio pAP1;
- \* Empregar o gene da alfa-amilase do pAP1 como marcador para se selecionar plasmídios com inserções neste gene, a exemplo do que se faz com o gene da beta-galactosidase dos plasmídios da família pUC. Entretanto, este recurso só será viável na análise de bactérias originalmente não amilolíticas e que possam expressar o gene B. subtilis. Oferece, por outro lado, a vantagem de ser um método mais barato, pois o amido é bem mais acessível do que o X-gal. Este item já foi realizado por IKUTA et al (1987) com o gene da alfa-amilase do plasmídio pABC1, digerindo-se o plasmídio com BstEII e introduzindo-se fragmentos de DNA do fago Lambda. Demonstrou-se que o gene da alfa-amilase é um bom marcador de seleção direta para a clonagem molecular de genes;
- \* Introduzir na linhagem 280 além da alfa-amilase, outra enzima amilolítica (por exemplo, beta-amilase ou glucoamilase) com ca-

pacidade de desramificar o amido, decompondo-o até monossacarídeos. Desta forma, talvez a produção da xantana, por esta linhagem, a partir do amido, torne-se mais viável;

- \* Introduzir ou amplificar outros genes em X.campestris, para se possibilitar a produção da goma a partir de outros substratos, tais como a celulose e a lignina. Várias Xanthomonas produzem originalmente a celulase e a ligninase, e existe inclusive uma linhagem de Xanthomonas sp, que é considerada a melhor bactéria produtora de ligninase (KERN & KIRK, 1987);
- \* Verificar o papel da frutose na produção de xantana pela linhagem 280/pAP1 em meio contendo somente amido adicionado de concentrações específicas da frutose;
- \* Verificar o papel da amilase exógena que foi clonada em X.campestris na fitopatogenicidade de linhagens originalmente amilolíticas e não. Para que isso seja possível, devem ser estabelecidos os bioensaios adequados aos respectivos patovares.

## 6.) RESUMO

A bactéria Xanthomonas campestris é um fitopatógeno que produz a goma xantana, de grande importância econômica, devido ao seu variado potencial de utilização na indústria e na agricultura.

Com o objetivo de se verificar a expressão de um gene de amilase exógeno em X. campestris, estabeleceu-se um sistema de clonagem para esta bactéria. Este sistema constituiu-se no plasmídeo promiscuo pMFY40 ao qual se inseriu o gene da alfa-amilase de Bacillus subtilis, resultando no plasmídeo pAP1. Este plasmídeo possui aproximadamente 14.0 Kb, é mobilizável por plasmídios "helper" e é razoavelmente estável, em condições de fermentação, em X. campestris.

O pAP1 foi introduzido por transformação e por conjugação em duas linhagens de X. campestris, uma delas originalmente amilolítica (REF) e outra não-amilolítica (280) mas que é uma boa produtora de goma.

Após se verificar a secreção da enzima em meio sólido pelos recombinantes, analisou-se o consumo de amido e a produção de açúcar redutor em meio líquido. Verificou-se que a linhagem 280/pAP1 foi capaz de degradar o amido do meio e que a linhagem REF/pAP1 teve seu caráter amilolítico amplificado.

A produção de xantana em meios contendo diferentes composições de substratos foi verificada através da viscosidade da goma, para se analisar as potencialidades da substituição do substrato tradicional, que é a sacarose, pelo amido. Foi observado um acréscimo de produção nas linhagens contendo o pAP1 em meio com 2% de amido e em meio com 1% de amido e 1% de sacarose. Apesar da substituição total da sacarose pelo amido ser inviável para a fermentação pela linhagem 280/pAP1, verificou-se que a composição de 1% de sacarose e de 1% de amido já fornece bons resultados.

## 8.) ABSTRACT

Xanthomonas campestris is a phytopathogenic bacteria, which produces the xanthan-gum, a biopolimer of economical importance due to its great possibilities of utilization in the industry and in the agriculture.

A cloning system for the analysis of expression of the extracellular amylase was established. The alfa-amylase gene from Bacillus subtilis was introduced in the promiscuous plasmid pMFY40, giving rise to the hybrid plasmid pAP1. This plasmid contains approximately 14.0 Kb, is mobilizable by helper plasmids and is reasonably stable, in fermenting conditions, in X.campestris.

The plasmid pAP1 has been introduced by transformation and by conjugation into two strains of X. campestris, one of them originally amylolytic (REF), and the other not-amylolytic (280) but a very good gum producer.

Besides the observation of the enzyme production by the recombinants in solid media, the starch consumption and the reducing-sugar production in liquid media were also analysed. It was verified that the strain 280/pAP1 was able to degradate the starch of the media and that the strain REF/pAP1 had its amylolytic character amplified.

The xanthan production in media containing different substrates compositions was analysed, to evaluate the potencialities of the substitution of the traditional substrate, sucrose, by starch. The strains bearing the plasmid pAP1 showed viscosity enhancement of the media containing 2% starch and also 1% starch plus 1% sucrose. Although the total substitution of sucrose by starch was not successful for the fermentation of 280/pAP1, good results were observed in the media containing 1% starch plus 1% sucrose.

## B.) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALDERTON, G.; WARD, W.H. & FEVOLD, H.L., 1945. Isolation of lysozyme from egg white. J. Biol. Chem., 157: 43-58.
- ASSOCIAÇÃO Brasileira das Indústrias de Alimentação. Compêndio de normas e padrões para alimentos. Resolução nº 15/75. 1975.
- ASTOLFI-FILHO, S.; GALEMBECK, E.V.; FARIA, J.B. & FRASCINO, A.C. S., 1986. Stable yeast transformants that secrete functional alfa-amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. Bio/Technology, 4: 311-5.
- ATKINS, D.T.; BARBER, C.E. & DANIELS, M.J., 1987. Transformation of Xanthomonas campestris pathovar campestris with plasmid DNA. J.Gen.Microbiol., 133: 2727-31.
- BACKMAN, K. & BOYER, H., 1983. Tetracycline resistance determined by pBR322 is mediated by one polypeptide. Gene, 26: 197-203.
- BAGDASIARAN, M.; LURZ, R.; RUECKERT, B.; FRANKLIN, F.C.H.; BAGDASIARAN, M.M.; FREY, J. & TIMMIS, K.N., 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010 - derived vectors, and host-vector system for gene cloning in Pseudomonas. Gene, 16: 237-47.
- BAGDASIARAN, M. & TIMMIS, K.N., 1981 Host-vector systems for gene cloning in Pseudomonas. Curr.Topics Microbiol.Immunol., 47-67.
- BAIRD J.K.; SANDFORD P.A. & COTTRELL I.W., 1983. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. Bio/Technology, 1: 778-83.
- BARRERE G.C.; BARBER C.E. & DANIELS M.J., 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by Xanthomonas campestris pv campestris. Int. J. Biol. Macromol., 8: 372-4.
- BERINGER, J.E.; BEYNON, J.L.; BUCHANAN-WOLLASTON, A.V. & JOHNSTON, A.W.B., 1978. Transfer of the drug resistance transposon Tn5 to Rhizobium. Nature, 276: 633-4.
- BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J., 1980. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl.Ac.Res., 7: 1513-23.
- BOYER, H.W. & ROULLAND-DUSSOIX, D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification in Escherichia coli. J.Mol.Biol., 41: 459-72.

- BRADBURY, J.F. Xanthomonas. Dowson, 1939. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984, v. 1. p. 199-210.
- BRASIL. Lei. Decreto n. 55871, 1965. Legislação Federal do Setor Saúde. Diário Oficial, Brasília, seção 1, 498, 1965.
- 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: 942-8.
- CASTRO, M.E.B.. Análise do gene de alfa-amilase de Bacillus subtilis visando o desenvolvimento de um vetor bifuncional de expressão-secreção. Brasília, 1988. Tese (Mestrado). Universidade de Brasília, Depto. de Biologia Celular.
- CARAWAY, W.T., 1959. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. Am.J.Clin.Path., 32: 97-9.
- CHAKRABARTY, A.M.; MYLROIE, J.R.; FRIELLO, D.A. & VACCA, J.G., 1975. Transformation of Pseudomonas putida and Escherichia coli with plasmid-linked drug-resistance factor DNA. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 72(9): 3647-51.
- COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y. & HSU L., 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 69: 2110-4.
- COREY R.R. & STARR M.P., 1957a. Genetic transformation of colony type in Xanthomonas phaseoli. J.Bacteriol., 74(2): 141-5.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_, 1957b. Genetic transformation of streptomycin resistance in Xanthomonas phaseoli. J.Bacteriol., 74: 146-50.
- CORNELIS, P.; DIGNEFFE, C. & WILLEMOT, K., 1982. Cloning and expression of a Bacillus coagulans amilase gene in Escherichia coli. Mol.Gen.Genet., 186: 507-11.
- COSTA, S.O.P., 1968. Transformação genética de Xanthomonas campestris para a resistência à estreptomomicina e à eritromicina. Rev. Fac.Med.Vet.S.Paulo, 7(4): 760-73.
- COTTRELL, I.W., 1979. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDFORD & MATSUDA, eds. p 251-70. (ACS Symposium Series, 126).
- CRUZ, C.H.G. Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis. Campinas, 1983. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.



- DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; CLEARY, W.G. & SAWCZYC, M.K., 1984a. Isolation of mutants of Xanthomonas campestris pv campestris showing altered pathogenicity. J.Gen.Microbiol., 130, 2447-55.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; SAWCZYC M.K.; BYRDE R.J.W. & FIELDING A.H., 1984b. Cloning of genes involved in pathogenicity of Xanthomonas campestris pv campestris using the broad host range cosmid pLAFR1. EMBO J., 3, 3323-8.
- \_\_\_\_\_, 1986. Recent advances in the molecular genetics of bacterial plant pathogens. Oxf.Surv.Plant Mol.Cell Biol., 3: 448-55.
- \_\_\_\_\_; COLLINGE, D.B.; MAXWELL-DOW, J.; OUSBOURN, A.E. & ROBERTS, I.N., 1987. Molecular biology of the interaction of Xanthomonas campestris with plants. Plant Physiol. Biochem., 25(3):1-7.
- DATTA, N.; HEDGES, R.U.; SHAW, E.J.; SYKES, R.B. & RICHMOND, M. H., 1971. Properties of an R-factor from Pseudomonas aeruginosa. J.Bacteriol., 108:1244-9.
- DAVIS, R.W.; BOTSTEIN, D. & ROTH, J.R., 1980. Advanced bacterial genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, p.140-1.
- DITTA, G.; SCHMIDHAUSER, E.; YAKOBSEN, P.; LU, P.; LIANG, X.-W.; FINLAY, D.R.; GUINEY, D. & HELINSKI D.R., 1985. Plasmids related to the broad host range vector pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. Plasmid, 13: 149-53.
- 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: 177-93.
- DYE, D.W. & LELLIOTT, R.A. Genus 11. Xanthomonas Dowson, 1939. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E., eds. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins. 1974. p.243-249.
- 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: 1648-52.
- FRIEDMAN, A.M.; LONG, S.R.; BROWN, S.E.; BUIKEMA, W.J. & AUSUBEL, F.M., 1982. Construction of a broad host range cloning vector and its use in the genetic analysis of Rhizobium mutants. Gene, 18: 289-96.
- FOGARTY, W.M. & KELLY, C. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: ROSE, A.H., ed. Microbial Enzymes and Bio-

- conversions. Londres , Academic , 1980. Cap.3. p.115-70.
- FUKUDA, M. & YANO, K., 1985. Construction of broad host range cloning vectors for Gram-negative bacteria. Agric.Biol.Chem., 49(9): 2719-24.
- GABRIEL, D.W., 1984. Plasmid transformation of Xanthomonas campestris pv malvacearum. Phytopatology., 74: 837.
- GRIFFITH, F., 1928. The significance of pneumococcal types. J.Hyg., 27: 113-59
- GUINEY, D.G., 1982. Host range of conjugation and replication functions of the Escherichia coli sex plasmid. Flac.J.Mol. Biol., 162: 699-703.
- HAAS, D. & HOLLOWAY, B.W., 1986. R-factors variants with enhanced sex factor activity in Pseudomonas aeruginosa. Mol.gen.Genet., 144: 243-51.
- HANAHAN, D., 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J.Mol.Biol., 166: 557-80.
- 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 xanthan gum biosynthesis in Xanthomonas campestris. J.Bacteriol., 169(6):2854-61.
- HAYNES, W.C.; WICKERHAM, L.J. & HESSELTINE, C.W., 1955. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Appl.Microbiol., 3: 361-8.
- HEMING, B.C., 1984. J.Cellular Biochem. Suppl. 8B 252.
- HIMENO, M.; SHIBATA, T.; KAWAMURA, Y.; HAMAOKA, Y. & KOMANO, T., 1984. Effect of polyethylene glycol in plasmid DNA solution on transformation of CaCl<sub>2</sub>-treated Escherichia coli cells. Agric. Biol.Chem., 48: 657-62.
- HOLSTERS, M.; DE WAELE, D.; DEPICKER, A.; MESSENS, E.; VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J., 1978. Transfection and transformation of Agrobacterium tumefaciens. Mol.gen.Genet., 163, 181-7.
- HUBACEK, J. & GLOVER, S.W., 1970. Complementation analysis of temperature-sensitive host specificity mutations in Escherichia coli. J.Mol.Biol., 50: 111-27.
- IELPI, L.; COUSO, R.O. & DANKERT, M.A., 1983. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. Biochem. Int., 6: 323-33.
- IKUTA, N.; VALENCIA, F.F.; CASTRO, M.E.B.de; SOUZA, M.B.N.S. & ASTOLFI-FILHO, S., 1987. O gene de alfa-amilase como marcador

- genético para clonagem molecular. In: Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 14<sup>o</sup>, Goiânia .
- JANSSON, P.E.; KENNE, L. & LINDBERG, B., 1975. Structure of the extracellular polysaccharide from Xanthomonas campestris. Carbohydr. Res. , 45, 275.
- JEANES, A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M.C.; SILMAN, R.W. & KNUTSON, C.A., 1976. Polysaccharide (xanthan) of Xanthomonas campestris NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. U.S. Department of Agriculture. (NCR publication, ARS-NC-51, novembro, 1976).
- KAWALEK, M. & SCHAAD, N.W., 1985. B-galactosidase as a metabolic marker in Xanthomonas campestris pv campestris. Phytopathology, 75(11): 1326 .
- KELMAN, A., 1954. The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology, 44: 693.
- KERN, H.W. & KIRK, T.K., 1987. Influence of molecular size and ligninase pretreatment on degradation of lignins by Xanthomonas sp strain 99. Appl. Environ. Microbiol., 53(9): 2242-5.
- KESSLER, C. & HOELTKE, H.-J., 1986. Specificity of restriction endonucleases and methylases ; a review . Gene, 47: 1-153.
- LAI, M.; PANOPOULOS, N.J. & SHAFFER, S., 1977a. Transmission of R plasmids among Xanthomonas spp and other plant pathogenic bacteria. Phytopathology, 67: 1044-50.
- \_\_\_\_\_ ; SHAFFER S. & PANOPOULOS N.J., 1977b. Stability of plasmid borne antibiotic resistance in Xanthomonas vesicatoria in infected tomato leaves. Phytopathology, 67:1527-30.
- LANZA, S.A. & ROSATO, Y.B., 1986. Produção de goma xantana por diferentes mutantes e recombinantes de Xanthomonas campestris. In: Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 13 , Ribeirão Preto .
- LAZO, G.R. & GABRIEL, D.W., 1987. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of Xanthomonas campestris. Phytopathology, 77(3) 448-53.
- LEACH, J.G.; LILLY, V.G.; WILSON, H.A. & PURVIS JR, M.R., 1957. Bacterial polysaccharides: the nature and function of the exudate produced by Xanthomonas phaseoli. Phytopathology, 47: 59-111.
- LEONG, S.A.; DITTA, G.S. & HELINSKI, D.R., 1982. Heme biosynthesis in Rhizobium: identification of cloned gene coding for gam-

- ma-amino-levulinic acid synthetase from Rhizobium meliloti. J.Biol. Chem., 257 :8724-30.
- LIEW, K.W. & ALVAREZ, A.M., 1981a. Biological and morphological characterization of Xanthomonas campestris bacteriophages. Phytopathology, 71(3): 269-73.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_, 1981b. Phage typing and lysotype distribution of Xanthomonas campestris. Phytopathology, 71(3): 274-5.
- LILLY, V.G.; WILSON, H.A. & LEACH, J.G., 1958. Bacterial polysaccharides II. Laboratory-scale production of polysaccharides by species of Xanthomonas. Appl.Microbiol., 6: 105-8.
- LIN, B.C.; DAY, H.J.; CHEN, S.J. & CHIEN, M.C., 1979. Isolation and characterization of plasmids in Xanthomonas manihotis. Bot. Bull. Acad.Sin., 20, 157-71.
- 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: 1-16.
- MUROOKA, Y.; IWAMOTO, H.; HAMAMOTO, A. & TATSUSHI, Y., 1987. Efficient transformation of phytopathogenic strains of Xanthomonas species. J.Bacteriol., 169(9): 4406-9.
- 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(1): 23-8.
- PALVA, I., 1982. Molecular cloning of alfa-amylase gene from Bacillus amyloliquefaciens and its expression in Bacillus subtilis. Gene, 19: 81-7.
- PRICE, C. & BICKLE, T.A., 1986. A possible role for DNA restriction in bacterial evolution. Microbiol.Sci., 3(10): 296-9.
- PRIEST, F., 1977. Extracelular enzyme synthesis in the genus Bacillus. Bacteriol.Rev., 41: 711-53.
- ROCKS, J.K., 1971 Xanthan gum. Food Technol., 25: 22-31.
- RODRIGUES-NETO, J.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. & SILVEIRA, W.D., 1986. DNA plasmidial característico para isolados de X.campestris pv citri. Summa Phytopathol., 12(1-2):31 .
- SANDFORD, P.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A.; WATSON, P.R.; CADMUS, M.C. & JEANES, A. Variation in Xanthomonas campestris NRRL-B1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P.A. & LASKIN, A., eds. Extracelular Microbial Polysaccharides. Washington , D.C., Ame-

- rican Chemical Society, 1977. p.192-210.
- \_\_\_\_\_, 1979. Exocellular microbial polysaccharides. Adv. Carbohydr.Chem.Biochem., 36: 256-310.
- \_\_\_\_\_ & BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O., ed. The polysaccharides, v.2. New York, Academic Press, 1983. p. 411-490.
- SANDVICK, E.I. & MAERKER, J.M., 1977. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. SANDFORD, P.A. & LASKIN, A., eds. (ACS Symposium Series, 45, p.242-264).
- SAUNDERS, J.R.; DOCHERTY, A. & HUMPHREYS, G.O., 1984. Transformation of bacteria by plasmid DNA. Meth.Microbiol., 17: 61-95.
- SCHENBERG, A.C. & COSTA, S.O.P., 1987. Molecular and genetic approaches to alcohol biotechnology in Brazil. Crit.Rev.Biothechnol., 6(4): 323-55.
- SILMAN, R.W. & ROGOVIN, P., 1970. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. Biotechnol. Bioeng., 12: 75-83.
- SILVEIRA, W.D.; VICENTE, A.; OLIVEIRA, A.R., 1986. Visualização plasmidial em amostras de Xanthomonas campestris pv cassavae e pv manihotis. In: Reunião Anual de Genética de Microorganismos, 13, Rib. Preto.
- SHAW, J.J. & KADO, I., 1986. Development of a Vibrio bioluminescence gene -set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a non disruptive manner. Bio/Technology, 4: 560-4.
- SIBAKOV, M. & PALVA, I., 1984. Isolation and 5'-end nucleotide sequence of Bacillus licheniformis alfa-amilase gene. Eur.J. Biochem., 145: 567-72.
- SOBERON, X.; COVARRUBIAS, L. & BOLIVAR, F., 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene, 9: 287-305.
- SOUZA, E.C. & COSTA, S.O.P. Recombinação em bactérias. In: COSTA, S.O.P.. Genética Molecular e de Microorganismos. São Paulo, Manole, 1987. Cap. 15
- SOUZA, M.B.N.S. Clonagem molecular e expressão do gene da alfa-amilase de Bacillus sp. Brasília, 1986. Tese (Mestrado). Universidade de Brasília, Depto. de Biologia Celular.
- SOUW, P. & DEMAINE, A.L., 1979. Nutritional studies on xanthan production by Xanthomonas campestris NRRL B-1459. Appl.Env.Microbiol., 37: 1186-92.

- STALL, R.E.; LOSCHKE, D.C. & JONES, J.B., 1986. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in Xanthomonas campestris pv vesicatoria. Phytopathology, 76(2): 240-3.
- STEWART, G.J. & CARLSON, C.A., 1986. The biology of natural transformation. Ann.Rev.Microbiol., 40: 211-35.
- STRIPECKE, R. & ROSATO, Y.B., 1986. Detecção e caracterização de plasmídios em várias linhagens de Xanthomonas campestris. Ciênc.Cult., S.Paulo, 38 (7 suppl): 947.
- \_\_\_\_\_, & \_\_\_\_\_, 1987. Eliminação de plasmídeos de Xanthomonas campestris. In: Reunião Anual de Microorganismos, 14, Goiânia .
- SUMNER, J.B., 1925. The determination of sugar in diabetic urine using dinitrisalicylic acid. J.Biol.Chem., 62: 287-90.
- SUTHERLAND, I.W., 1985 . Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol., 39: 243-70.
- TAIT, R.C.; CLOSE, T.J.; LUNDQUIST, R.C.; HAGIYA, M.; RODRIGUEZ, R.L. & KADO, C.I., 1983. Bio/Technology, 1: 269-75.
- THORNE, L.; TANSEY, L. & POLLOCK, T.J., 1987. Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by Xanthomonas campestris. J.Bacteriol., 169(8): 3593-600.
- TURNER, P.; BARBER, C. & DANIELS, M., 1984. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in Xanthomonas campestris pv campestris. Mol.gen.Genet., 195, 101-7.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_, 1985. Evidence for clustered pathogenicity genes in Xanthomonas campestris pv campestris. Mol.gen.Genet., 199: 338-43.
- VALÊNCIA, F.F.; FRAGOSO, S.P.; CASTRO, M.E.B.; TANURI, A. & AS-TOLFI-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
- WALSH, P.M.; HAAS, M.J. & SOMKUTI, G.A., 1984. Genetic construction of lactose-utilizing Xanthomonas campestris. Appl. Environ. Microbiol., 47 (2):253-7.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W., 1912. Isolierung und Kristallisation des Gaerungsferments Enolase. Biochem.Z., 310: 384.

- WELLS, J., 1977. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. In: SANDFORD, P.A. & LASKIN, A., eds. (ACS Symposium Series, 45, p. 299-325).
- WILLEMOT, K. & CORNELIS, P., 1983. Growth defects of Escherichia coli cells which contain the gene of an alfa-amylase from Bacillus coagulans on a multicopy plasmid. J.gen.Microbiol., 129: 311-9.
- YALPANI M., 1987. Conference emphacizes genetic engineering of polysaccharides. Genet.Eng.News, 7(6):34-5.
- YAMASAKI, Y.; MURATA, N. & SUWA, T., 1966. Restoration of lost virulence of leucine requiring mutants of Xanthomonas oryzae by DNA-mediated transformation. Proc.Jap.Acad., 42: 946-9.