

PRODUÇÃO DE DEXTRANAS E ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR
DE *Leuconostoc mesenteroides*

MARIA HELENA SANTINI CAMPOS
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 1992

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

C198p Campos, Maria Helena Santini
Produção de dextranas e aspectos da biologia
molecular de Leuconostoc mesenteroides. Piracicaba, 1992.
131p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Bactéria produtora de açúcar - Biologia molecular
2. Bactéria produtora de açúcar - Melhoramento
3. Dextrana microbiana - Produção I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.9015

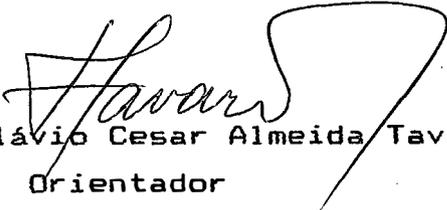
PRODUÇÃO DE DEXTRANAS E ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR
DE *Leuconostoc mesenteroides*

MARIA HELENA SANTINI CAMPOS

Aprovada em: 10/09/1992

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares	ESALQ/USP
Prof ^ª Dr ^ª Marney Pascoli Cereda	UNESP/Botucatu
Prof. Dr. Geraldo Antonio Tosello	ESALQ/USP


Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares
Orientador

Aos Professores e Orientadores

*Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares e
Prof. Dr. Yousef Haj-Ahmad*

*Pela orientação segura em todas as
etapas deste trabalho,
todo meu carinho, respeito
e Homenagem.*

*Aos meus pais,
aos meus irmãos e
à Carol,
com muito amor*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização desse trabalho. De maneira especial quero agradecer.

- Ao Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares pela amizade, dedicação e estímulo.

- Ao Prof. Dr. Yousef Haj-Ahmad, que possibilitou a execução de parte desse trabalho, no Laboratório de Biologia Molecular da Brock University, Canadá, pela orientação e confiança recebida.

- À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Canadá.

- Aos colegas Dirce, Adriana, Luciana, Eder-son, Gonçalo, Fernando e Amadeu.

- Aos funcionários do Laboratório de Genética de Leveduras, Ana Maria B. Giacomelli, Paulo Ortolan Filho, Luiz Humberto Gomes, Francisco A. Pelissari, pela amizade, carinho e assistência prestadas.

- Aos colegas da Brock University: Mabrouk, Kirsty e Nezar.

- À bibliotecária Kátia Maria de Andrade Ferraz, pela atenção e ajuda recebida.

- Ao desenhista Evandro Frederico Magnusson, pela gentileza e colaboração na execução dos desenhos.

INDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xvii
SUMMARY	ixx
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Histórico	05
2.2. Dextrana	07
2.2.1. Produção de dextrana	07
2.2.2. Propriedades	15
2.2.3. Aplicações	22
2.3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	28
2.3.1. Biologia do <i>Leuconostoc mesenteroi-</i> <i>des</i>	32
2.3.2. Métodos de melhoramento de bacté- rias	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Microrganismos utilizados	35
3.2. Plasmídios utilizados	35
3.3. Meios de isolamento e purificação de <i>Leu-</i> <i>conostoc</i> sp. (Jeanes, 1965a)	33
3.4. Produção de dextrana por <i>Leuconostoc me-</i> <i>senteroides</i> NRRLB-512F (Jeanes, 1965b) ...	39
3.5. Isolamento e purificação da dextrana (Jea- nes, 1965a)	40
3.6. Avaliação de parâmetros da fermentação ...	41
3.7. Meios de cultura	42

	Página
3.7.1. Meio seletivo para produção de dextrana	42
3.7.2. Meio de crescimento de <i>Leuconostoc</i> , para produção de dextrana	43
3.7.3. Meio de crescimento de <i>Leuconostoc</i> , para extração de DNA	44
3.7.4. Meio Luria e Bertani (LB) (Maniatis et alii, 1982)	45
3.7.5. Meio complexo 2XYT	45
3.7.6. Meio S.O.C. (Anônimo, 1990a)	46
3.8. Soluções tampões	47
3.8.1. Solução de púrpura de bromocresol	47
3.8.2. Solução estoque de ampicilina (500x)	47
3.8.3. Solução estoque de tetraciclina (1000x)	47
3.8.4. Solução estoque de cloranfenicol (1000x)	48
3.8.5. Solução estoque de kanamicina (1000x)	48
3.8.6. Solução estoque de rifampicina (1000x)	48
3.8.7. Solução estoque de eritromicina (1000x)	49
3.8.8. Solução estoque de cefatoxina (1000x)	49
3.8.9. Solução de X-Gal (100x)	49
3.8.10. Solução salina - EDTA	50
3.8.11. Solução de lisozima	50
3.8.12. Solução de SDS	50
3.8.13. Solução de perclorato de sódio ...	51
3.8.14. Solução de clorofórmio e álcool isoamílico	51

	Página
3.8.15. Solução de etanol	51
3.8.16. SDS alcalino	51
3.8.17. Solução de acetato de sódio	52
3.8.18. Solução SSC (20x)	52
3.8.19. Solução pronase-SDS 0,8%	53
3.8.20. Solução pronase	53
3.8.21. Solução de brometo de etídio	53
3.8.22. Solução de agarose 0,8%	53
3.8.23. Fenol saturado	54
3.8.24. Tampão Tris-EDTA (TE)	54
3.8.25. Tampão Tris-acetato (20x)	55
3.8.26. Tampão de lise	55
3.8.27. Tampão da amostra	55
3.8.28. Tampão de transformação	56
3.9. Extração de DNA genômico de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	56
3.10. Extração de DNA plasmidial de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	57
3.11. Purificação de DNA plasmidial por bandamento em cloreto de cézio	59
3.12. Extração de DNA plasmidial dos transformantes (<i>E. coli</i> DH5 α)	60
3.13. Análises com Endonucleases de Restrição ..	62
3.14. Ligação do DNA	63
3.15. Preparo de células competentes � transforma�o (An�nimo, 1990a, BRL Life Technologies, Inc.)	63
3.16. Transforma�o	64
3.17. Eletroforese em gel de agarose	65
3.18. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios naturais e recombinantes	66
3.19. Uso do "Kit Gene Clean" (An�nimo, 1990a, BRL Life Technologies, Inc.	67

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1. Isolamento e purificação de linhagens produtoras de dextrana	70
4.2. Avaliação da produção de dextrana	73
4.3. Avaliação do processo de produção de dextrana, em fermentador com sistema simplificado de aeração	75
4.4. Desenvolvimento de metodologia de extração de DNA genômico e plasmidial de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	81
4.5. Transformabilidade do material genético de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	88
4.6. Mapeamento de sítios de enzima de restrição no plasmídeo 52 Kb da linhagem MH4.1 de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	102
4.6.1. Caracterização do plasmídeo 52 Kb da linhagem MH4.1 (pLm 52)	102
4.6.2. Subclonagem dos fragmentos EcoRI do plasmídeo 52 Kb	102
4.6.3. Caracterização dos plasmídios recombinantes	104
4.7. Identificação de marcadores genéticos nas linhagens de <i>L. mesenteroides</i> e nos transformantes obtidos	112
5. CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

LISTA DE TABELAS

TABELA N°		Página
1	Viscosidade intrínseca para frações de dextrana NRRL-B512 (Senti, 1955)	18
2	Viscosidade intrínseca de soluções de dextrana com outros componentes	19
3	Calores de solução de dextrana (\bar{M}_x -101.000) expressos em joules por grama (J/g)	20
4	Aplicações de frações de dextrana de peso molecular definido	25
5	Distribuição dos tipos de murein (glicoproteínas de parede celular) no gênero <i>Leuconostoc</i>	29
6	Avaliação de linhagens quanto a produção de dextrana	74
7	Avaliação de parâmetros da fermentação da linhagem MH4.1 em fermentador com aeração facilitada (Fig. 5)	78
8	Transformações efetuadas com fragmentos do plasmídeo 52 Kb após digestão com EcoRI e ligação no plasmídeo pUC19 e transformação em <i>E. coli</i> DH5 α	95

TABELA N.º		Página
9	Digestão do plasmídeo pEB 36 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 19,2 Kb	105
10	Digestão do plasmídeo pEC 51 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 15,3 Kb	108
11	Digestão do plasmídeo pED 19 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 6,6 Kb	110
12	Digestão do plasmídeo pEE 28 com enzimas de restrição e tamanho médio do plasmídeo 5,7 Kb	110
13	Antibiograma das linhagens de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	114
14	Antibiograma para os transformantes (DH-5 α), com fragmentos do plasmídeo pLm 52.	115

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°		Página
1	Reação para a produção de dextrana	10
2	Estrutura da dextrana com ramificação 1-3	15
3	Protótipo de fermentador adaptado em câmara de vidro com um microaspersor acionado por bomba centrífuga	44
4	Meio seletivo para linhagens produtoras de dextrana com 5% sacarose e 30 mg/l de púrpura de bromocresol, em contraste com o mesmo meio sem sacarose. Os números correspondem às linhagens <i>E. coli</i> , DH5 α (1); <i>Leuconostoc mesenteroides</i> MH4.1 (2); <i>L.m.</i> M.HB.1 (3); <i>L. m.</i> M.HB.2 (4); <i>L. m.</i> Lz (5); <i>L. m.</i> Zz (6); <i>L. m.</i> B (7) e não inoculado (Branco) (8)	72
5	Quantidade de dextrana produzida (g/l) por diferentes linhagens selecionadas. Processo clássico de fermentação (Jeanes, 1965a)	74
6	Curva de crescimento da linhagem M.H4.1. Os valores entre parênteses correspondem ao número de células por ml $\times 10^{+7}$ para os respectivos pontos medidos na curva nos tempos em que foi feita a determinação. Coeficiente de correlação entre D.O. e n° de células - $r = +0,9867$	77

FIGURA n°		Página
7	Densidade óptica (absorbância), durante o processo de produção de dextrana pela linhagem MH4.1	79
8	Variação da temperatura (°C) e do pH, durante o processo de produção de dextrana pela linhagem MH4.1	79
09	Variação da taxa de oxigênio (ppm) dissolvido no meio durante o processo de produção da dextrana pela linhagem MH4.1.	80
10	Produção de dextrana pela linhagem MH4.1, no processo de fermentação com aeração facilitada desenvolvido no protótipo de fermentador (Fig. 3)	80
11	Eletoforese em gel de agarose das amostras obtidas através do método de extração de DNA genômico de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . 1 - linhagem 8; 2 - linhagem M.H8.1; 3 - linhagem MH8.2; 4 - linhagem Z2; 5 - linhagem MH4.1; 6 - linhagem L2; m - marcador vírus AD5 digerido com a enzima HindIII, gerando fragmentos de tamanhos 8,5 Kilobases (Kb), 5,8 Kb; 4,6 Kb; 3,4 Kb; 2,9 Kb; 2,0 Kb e 1,0 Kb	85
12	Eletoforese em gel de agarose. 1 - método de extração de DNA plasmidial da linhagem MH4.1, mostrando a presença de dois plasmídios: superior 52,0 Kb e inferior 2,1 Kb; 2 - método de extração de	

FIGURA N°

Página

- DNA genômico da linhagem MH4.1; m - marcador; fago λ digerido com a enzima Hind-III, gerando fragmentos de tamanhos 23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,4 Kb; 2,3 Kb e 2,0 Kb 86
- 13 A-Purificação do DNA plasmidial por gradiente de densidade com cloreto de césio. 1 - linhagem MH4.1; 2 - linhagem MH8.1; 3 - linhagem MH8.2; 4 - linhagem L2; 5 - linhagem Z2; 6- linhagem 8. B-Perfil eletroforético de plasmídios obtidos na banda inferior da purificação com cloreto de césio para as diferentes linhagens analisadas 87
- 14 Análise do plasmídio de *Leuconostoc mesenteroides* 52 Kb (pLm 52). m - marcador AD5 digerido com HindIII; 1 - pLm 52 digerido com EcoRI; 2 - pLm 52 digerido com BamHI; 3 - pLm 52 digerido com HindIII; 4 - pLm 52 não digerido (banda superior) e plasmídio 2,1 Kb (banda inferior); os dois plasmídios da linhagem MH4.1 93
- 15 Perfil eletroforético dos plasmídios recombinantes de alguns transformantes. 1 - transformante (T20), contendo os fragmentos B, C e D do pLm 52, e pUC19, onde pode se evidenciar que o fragmento D possui intensidade menor que B e C e pUC19 (digeridos com EcoRI); 2 - transformante T50; 3 - transformante T33; 4 - transfor-

FIGURA N.º

Página

- mante T₃₆; 5 - transformante T₅₁; 6 - T₅₄; m - marcador fago λ digerido com HindIII 98
- 16 Perfil eletroforético dos plasmídios recombinantes de alguns transformantes resistentes à tetraciclina, sendo que a seta indica o transformante T₄₁ contendo o fragmento 550 bp; m - marcador (fago λ) . 101
- 17 A - Perfil eletroforético do plasmídio pEB36; m - marcador (fago λ digerido com HindIII; 2 - pUC19; 2 - pEB36 digerido com EcoRI; 3 - pEB36 digerido com PVuII; 4 - pEB36 digerido com HindIII; 5 - pEB36 digerido com pstI; 6 - pEB36 digerido com Sall; 7 - pEB36 digerido com BamHI; 8 - pEB36 digerido com XbaI; e 9 - pEB36 digerido com ClaI. B - Mapa de restrição para algumas enzimas do plasmídio pEB36 . 106
- 18 A - Perfil eletroforético do plasmídio pEC51; m - marcador (fago λ digerido com HindIII); 1 - pUC19; os números 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, mostram o plasmídio pEC51 digerido com EcoRI, PVuII, HindIII, PstI, Sall, BamHI, XbaI e ClaI respectivamente. B - Mapa de restrição do plasmídio pEC51. 107
- 19 A - Perfil eletroforético do plasmídio pED19. m - marcador (fago λ digerido com HindIII); 1 - pUC19 digerido com EcoRI; 2 - pUC 19 digerido com PVuII; 3 - pED19 digerido com PVuII; 4 - pED19 digerido

FIGURA N°

Página

	com EcoRI; 5- pED19 digerido com HindIII;	
	6 - pED19 digerido com HindIII e PstI;	
	7 - pED19 digerido com PstI; 8 - pED19	
	digerido com Sali; 9 - pED19 digerido com	
	BamHI; 10 - pED19 digerido com XbaI; 11 -	
	pED19 digerido com ClaI e 12 - pED19 não	
	digerido. B - Mapa de restrição para o	
	plasmídeo pED19	109
20	A - Perfil eletroforético do plasmídeo	
	PEE28. m - marcador (fago λ digerido com	
	HindIII); 1 - pUC19 digerido com EcoRI;	
	números 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 se referem	
	ao pEE28 digerido com as enzimas EcoRI,	
	PvuII, HindIII, PstI, Sali, BamHI, XbaI e	
	ClaI. B. Mapa de restrição do plasmídeo	
	pEE28	111

PRODUÇÃO DE DEXTRANAS E ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR
DE *Leuconostoc mesenteroides*

Autora: Maria Helena Santini Campos

Orientador: Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares

RÉSUMO

A tecnologia da produção de dextrana desenvolveu-se com uma única linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* (B-512F) dando-se ênfase aos estudos de propriedades físico-químicas do produto e à atividade da dextrana-sacarase. No presente trabalho estudaram-se aspectos da biologia da espécie, seleção de linhagens, avaliação da produção de dextrana e de parâmetros da fermentação aeróbia. Foi possível desenvolver metodologias para extração de DNA genômico e plasmidial, investigar quanto a métodos de transferência de material genético, identificar e mapear plasmídios, bem como caracterizar linhagens de interesse quanto a marcas de resistência a antibióticos.

As linhagens MH4.1, MH8.1, MH8.2, L2, Z2 e 8 foram identificadas como linhagens produtoras de dextrana através de seleção em meio seletivo desenvolvido para esta finalidade. Através de processo de fermentação com recirculação do meio líquido para seu arejamento contínuo,

em protótipo de fermentador, conseguiu-se otimizar a produção nesta escala, superando-se valores registrados na literatura como elevados.

A eficiência de extração e purificação de DNA obtidas neste trabalho, bem como do meio de crescimento especial, possibilitam obter preparações de DNA genômico ou plasmidial em quantidades adequadas a estudos moleculares, clonagem e transformação de *L. mesenteroides*, efetuar transferência de genes para outras espécies, bem como isolar destas, genes para a transformação de *L. mesenteroides*. A linhagem MH4.1 possui dois plasmídios com tamanhos de 52 Kb e 2,1 Kb. O plasmídio de 52 Kb foi mapeado e nele identificado o gene de resistência a tetraciclina. Fragmentos deste plasmídio, foram circularizados e engenheirados para a construção de vetor plasmidial bifuncional com características apropriadas à transformação, incluindo-se marca seletiva e origem de replicação para *L. mesenteroides* e *E. coli*.

DEXTRAN PRODUCTIVITY AND MOLECULAR BIOLOGY ASPECTS
OF *Leuconostoc mesenteroids*

Author: Maria Helena Santini Campos
Adviser: Prof. Dr. Flávio Cesar Almeida Tavares

SUMMARY

Dextran production technology has been developed based in a single strain of *Leuconostoc mesenteroides* (B-512F). Physical and chemical properties of the product and dextran-sucrase activity were the main subject of studies. In the present work it was studied aspects of the biology of the species, strain selection, evaluation of dextran production and aerobic fermentation parameters. It was possible to develop methodologies for genomic and plasmid DNA extraction and to test methods for the transfer of genetic material, to identify and map plasmids and to characterize drug resistance in selected strains.

The strains MH4.1, MH8.1, MH8.2, L2, and 8 were found as high producers of dextran throughout selection in a selective medium developed with this aim. In a fermenter prototype a process was conducted with recycle of the liquid mass for continuous aeration and production was optimized reaching values above those found in the literature.

The efficiency of DNA extraction and purification obtained in this work and the special growth medium have provided adequate amount of DNA for molecular studies, cloning and transformation. Transformation was proved to be viable, and to transfer genes to other bacteria and to recover genes from them and re-transform *L. mesenteroides*. The strain MH4.1 has two plasmids of 52 Kb and 2,1 Kb. The 52 Kb plasmid was mapped and the tetracyclin resistance gene identified on it. Fragments from this plasmid were circularized and engineered for construction of a bifunctional vector adequate for transformation, bearing a selective marker and origin of replication for *L. mesenteroides* and *E. coli*.

1. INTRODUÇÃO

A dextrana é um polissacarídeo formado por unidades de D-glicopiranosil, com tipos de ligações que variam segundo o microrganismo produtor. A dextrana produzida pela bactéria *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, industrialmente o microrganismo mais utilizado, apresenta somente 2 tipos de ligações: $\alpha(1,6)$ e $\alpha(1,3)$. O tamanho das moléculas pode variar dependendo da temperatura, concentração de sacarose e presença de outros açúcares durante a reação de síntese. A dextrana nativa apresenta em média um peso molecular entre 40 e 50 milhões de daltons, nas condições industriais atualmente utilizadas. As propriedades deste polímero são bastante específicas fazendo com que a dextrana encontre grande aplicabilidade em diferentes ramos da atividade industrial como expensor de plasma sanguíneo, anti-coagulante, medicamentos para tratamento de anemias e descalcificação, redes moleculares usadas em separação e purificação de compostos, lama de perfuração em poços de petróleo, entre outros.

(A produção de dextrana é feita tradicionalmente durante o crescimento de *L. mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose e enriquecido com outros nutrientes. As condições de cultura estabelecidas por alguns pesquisadores alcançaram bons rendimentos e têm servido de base para a produção industrial. Nestas condições a dextrana possui alto peso molecular e tem que sofrer hidrólise controlada para certos usos consagrados. Outra forma de produção é fazer a enzima dextrana-sacarase, purificada ou em forma de extrato enzimático bruto, agir "in vitro", sintetizando a dextrana a partir de uma solução de sacarose. Este último processo possui uma série de vantagens, pois possibilita o controle e otimização, tanto na obtenção da enzima por *L. mesenteroides*, quanto na produção da dextrana. O peso molecular do produto pode desta forma ser controlado não necessitando hidrólise posterior. A dextrana-sacarase é produzida tradicionalmente por fermentação em batelada alimentada, com controle de pH, temperatura, aeração em meio extremamente rico. Alguns autores estudaram a utilização de meios mais pobres, para tentar diminuir os custos de produção, mas não obtiveram resultados encorajadores.

Embora a tecnologia de produção de dextrana esteja totalmente dominada em vários países desenvolvidos, basicamente emprega-se uma única linhagem de bactéria (B-512F). Os trabalhos científicos se concentram na análise e propriedades físico-químicas do produto e na atividade da

dextrana-sacarase, pouco se investigando quanto ao microrganismo. A genética da produção de dextrana é pouco conhecida, não se tendo informações sobre a constituição genômica, sobre a natureza genética do caráter, ocorrência de plasmídios, transformabilidade das linhagens, obtenção de mutantes e desenvolvimento de metodologia de seleção, recombinação, etc... Assim o melhoramento da produção de dextrana carece de informações sobre a biologia do microrganismo, que possibilitem o melhoramento genético da linhagem, complementando os progressos tecnológicos empregados no processo de produção. Considerando estes aspectos, este trabalho teve como objetivos:

- Isolamento e purificação de linhagens produtoras de dextrana.

- Avaliação da produção de dextrana das linhagens isoladas pelos métodos convencionais de crescimento, extração, purificação e dosagem da dextrana, conforme Jeanes et alii (1948 e 1954).

- Testar o processo de produção de dextranas em fermentador com sistema de aeração simplificado, avaliando-se a cinética da multiplicação celular e parâmetros da fermentação como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, densidade óptica e produção de dextrana.

- Desenvolver a metodologia para extração de DNA genômico e DNA plasmidial de *Leuconostoc mesenteroides*.

- Investigar os métodos de transferência de material genético.

- Identificação de marcadores genéticos e mapeamento dos plasmídios.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico

O interesse em polissacarídeos biossintéticos originou-se há mais de um século, com um inoportuno problema no processamento industrial do açúcar. Em 1822, um relatório foi feito mostrando que o suco da cana-de-açúcar, depois de estocado, tinha se modificado em uma mucilagem espessa e se tornado inadequado para o uso. Pasteur em 1861, descreveu uma fermentação viscosa para dois fermentadores organizados. Scheibler em 1869, citado por McNEELY (1967), nomeou de goma "dextrana", devido à similaridade com a dextrina. Ele achava que a dextrana produzia somente D-glicose na hidrólise ácida.

HUCKER & PEDERSON (1930), classificaram três espécies diferentes de *Leuconostoc*: *L. mesenteroides*, *L. dextranicum* e *L. citrovorum*, como produtores de dextrana.

TARR & HILBERT (1931), relataram as condições ótimas para a produção da dextrana de sacarose, HEHRE

(1941), relatou a biossíntese de dextrana e de dextrans por *Acetobacter viscosum* e *Acetobacter capsulatum*.

BAILEY & OWEN (1944) e OWEN (1950) promoveram o uso da dextrana na extração de petróleo, como um aditivo fluído para as brocas de perfuração e impermeabilizante dos poços de petróleo.

Em 1952, JEANES do Northern Regional Research Laboratory, do Departamento de Agricultura, publicou uma bibliografia de 410 referências mostrando o uso da dextrana como um substituto do plasma do sangue.

Nos Estados Unidos, duas indústrias foram construídas para produção de dextrana como substituto do plasma sanguíneo. Muitas outras empresas construíram usinas pilotos para testes de produção. Nesta época, a Inglaterra e a Suécia também mostraram interesse comercial na produção da dextrana.

O mercado para a dextrana entrou em colapso em 1955, com o cancelamento da compra de dextrana como substituto de plasma do sangue, pelo exército americano. A produção de dextrana como substituto do plasma do sangue, a partir desta época, foi relativamente de pequena escala. Uma classe de dextrana para uso em perfuração de poços de petróleo, foi produzida durante alguns anos em escala industrial, sendo que posteriormente, essa produção foi interrompida por ser economicamente inviável. Mais recentemente essa produção voltou a ser viável, devido aos

progressos conseguidos por MARIBONA & BELLO (1966), MURPHY & WHISTLER (1973), ALSOP (1983) e SANDFORD & BAIRD (1983) no processo de produção.

Um produtor sueco desenvolveu um mercado limitado para dextranas como adsorventes seletivos para operações laboratoriais, assim como o emprego da dextrana na indústria farmacêutica, como veículo de medicamentos, na sua forma de dextrana sulfato (anticoagulante) ou como ferro-dextrana, usada pelo americano Pond citado por JEANES (1973) para combater a anemia. Exceto pelas aplicações da dextrana na indústria farmacêutica, o substancial investimento em laboratórios de pesquisa e as facilidades de produção comercial, não foram suficientes para estabelecer a dextrana como uma goma biossintética no mercado até essa época.

2.2. Dextrana

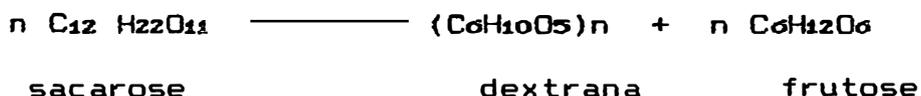
2.2.1. Produção de Dextrana

JEANES (1973), constatou que a dextrana se desenvolve naturalmente em soluções contendo sacarose que tenha sido inoculada com bactérias provenientes do ar, plantas ou solos. Outros polissacarídeos também resultam da ação microbiana em sucos açucarados, mas a dextrana parece ser aquele mais frequentemente obtido por este processo de fermentação.

O desenvolvimento de dextranas ocorre rapidamente no caldo da cana-de-açúcar, no mel e nos xaropes quer sejam puros ou contaminados por outros microrganismos. Até em amostras de sacarose cristalina refinada alguns testes já indicaram presença da dextrana.

Dextranas produzidas por *Leuconostoc* também foram isoladas de fontes tais como cerveja não pasteurizada, vinhos caseiros, sucos concentrados de laranjas e muitos vegetais.

A reação para a produção de dextrana da sacarose é mostrada na equação:



O mecanismo envolve uma enzima que catalisa a transferência de uma glicose de uma molécula de sacarose, para uma crescente cadeia molecular de dextrana e liberação de aproximadamente 1 mol de frutose (Figura 1).

Duas enzimas podem participar da síntese da dextrana. Uma é a enzima polimerizante denominada "dextrana-sacarase" que é responsável pela síntese da cadeia linear. A outra é a enzima da ramificação que ataca as hidroxilas em C-2, C-3 ou C-4.

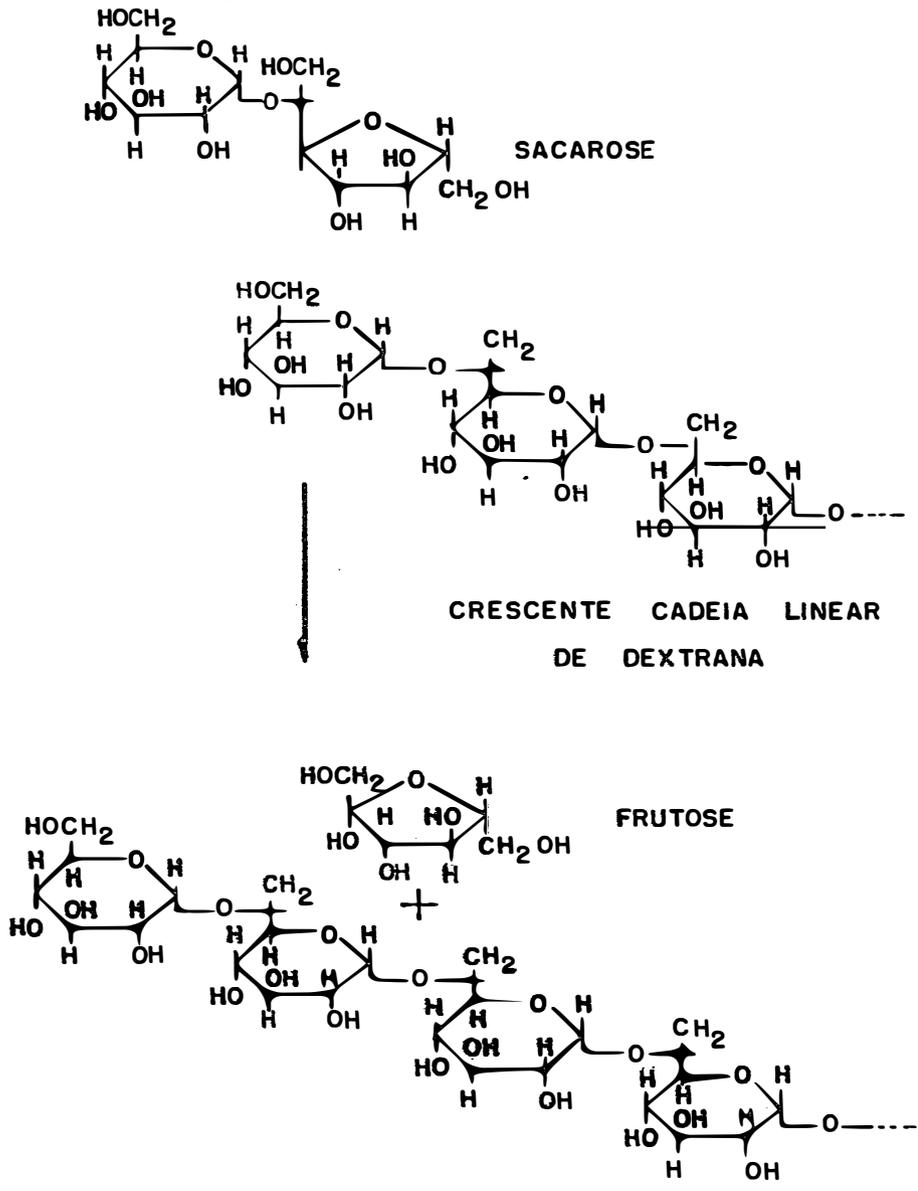


Figura 1. Reação para a produção de dextrana.

A produção de dextrana em larga escala foi iniciada por volta de 1942-1944. No início, foram utilizados meios de crescimento diferentes em vários países. JEANES (1952) & JEANES et alii (1954), identificaram um grande número de linhagens produtoras de dextrana, entretanto, aquela denominada NRRL-B512 F começou a ser produzida e até hoje é a mais intensivamente estudada. A dextrana pode ser produzida por fermentação em batelada ou indiretamente pela utilização da dextrana sacarase. A conversão direta apresenta a vantagem de ser simples, porém produz dextranas de vários pesos moleculares, havendo por isso, necessidade de reduzi-las por hidrólise, conforme especificações desejadas. O processo enzimático, por outro lado, oferece condições de melhor controle da reação, produzindo material uniforme com peso molecular médio. JEANES et alii (1948) estudaram a influência de vários fatores na fermentação em batelada e recomendaram um meio especial de produção. Muitas publicações e patentes divulgaram a composição do meio e os aditivos utilizados para fermentação da dextrana em batelada, como pode se observar no livro de BAKER (1959). Neste livro destaca-se que a dextrana-sacarase é uma enzima indutiva, só produzida na presença de sacarose, a qual servirá, além do papel de indutor da enzima, também como fonte de carbono e energia para os microrganismo. É igualmente imprescindível a presença de nitrogênio amínico no meio para a produção desta enzima, o que eleva os custos de produção

pois normalmente é usado extrato de levedura para suprir esta necessidade (OLMO, 1983).

Além, da sacarose, meios alternativos mais pobres, usando água de maceração de milho como fonte de vitaminas e nitrogênio foram propostos por HEHRE (1941) e TSUCHIYA et alii (1955), não obtendo bons resultados. Em trabalho mais recente, foi proposto a produção da enzima dextrana-sacarase, a partir de matéria-prima de baixo custo, melaço e água de maceração de milho, como fonte de carbono, vitaminas e nitrogênio; os resultados obtidos foram de uma produção enzimática similar a produção com meios enriquecidos, QUEIROZ & MANGERI (1989).

BIXLER et alii (1953) descreveu os processos usados na produção comercial de dextranas, como substituto do plasma do sangue. No processo comercial o inóculo é obtido em diversos estágios, por transferência em série sucessivamente de 5% do inóculo m/v (massa/volume), em meio de crescimento mantido a 25°C e, posteriormente, ao meio de fermentação mantido na mesma temperatura. A agitação e aeração podem ser dispensadas no início da fermentação, mas em grandes reatores, a agitação mecânica é importante auxiliando como meio de controle de temperatura. Durante a transformação, o pH decresce em virtude da formação de ácidos orgânicos, e, após 24 horas, quando se completa o processo, atinge 4,5. A viscosidade alcança valores entre

400 a 700 centipoises. A dextrana é recuperada por precipitação com álcool e purificada para uso clínico.

HEHRE em 1941 acompanhou a síntese enzimática da dextrana de sacarose em extrato livre de células de *Leuconostoc mesenteroides*.

TSUCHIYA et alii (1951), pesquisaram as propriedades da enzima transglicosidase (dextrana-sacarase). Os valores ótimos de pH para a produção da enzima e para a síntese de dextrana foram 6,7 e 5,1, respectivamente.

DWORSCHACK et alii (1954) estabeleceu que o melhor meio para a produção da enzima é constituído de 2,0% de sacarose, 2,0% de milhocina, 0,1% de fosfato ácido dipotássico e sais minerais. A temperatura foi mantida a 24°C e padronizado o tempo para a produção da enzima em seis horas. Concluída a fermentação, separam-se as células da bactéria por centrifugação e filtração. O filtrado pode ser utilizado diretamente ou a enzima pode ser precipitada com álcool em pH 5,1, podendo ficar armazenada por 30 dias à temperatura de 15°C.

Para a conversão da sacarose em dextrana, utilizou-se 10% (m/v) do substrato, incubando a 30°C por cerca de 8 horas. Esse processo resultou em uma dextrana de peso molecular acima de 100 milhões.

Como a dextrana de interesse comercial na substituição de plasma do sangue é de baixo peso-molecular, descobriu-se que um acréscimo nas concentrações de sacarose

do meio de 5 para 20% diminuiu o peso molecular da dextrana formada como também, a redução da concentração da enzima em meios com menor teor de açúcar. Do mesmo modo, baixa concentração da enzima, geralmente resulta em dextranas com peso molecular mais baixo.

A dextrana-sacarase incorpora somente a glucose da sacarose na síntese da dextrana, ficando cerca de 50% do peso da sacarose em solução, como frutose. KOEPSEL (1956), desenvolveu um método para a recuperação da frutose, de forma que esse subproduto seja utilizado comercialmente.

PRAT et alii (1987), estudaram o efeito dos íons borato na produção de dextrana pelo processo enzimático, com a dextrana-sacarase produzida por *L. mesenteroides* B-512F. Nesse processo, a frutose liberada no meio, atua como acceptor do complexo enzima-glicosil, provocando o final do crescimento da cadeia de dextrana e síntese de leucrose e isomaltulose, resultando na diminuição da produção de dextrana. Quando a frutose se liga aos íons borato, ela perde a capacidade de se ligar ao complexo enzima-glicosil, diminuindo a produção dos subprodutos indesejados (leucrose e isomaltulose) e, conseqüentemente, aumentando a produção de dextrana.

KOBAYASHI et alii (1985a, 1985b) fizeram uma série de estudos com enfoque químico, sobre a produção de dextrana e as enzimas envolvidas neste processo. Em 1984, publicaram os estudos sobre características estruturais da

dextrana solúvel em água, produzida por uma linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* (NRRL-B-1298), sendo que esse estudo foi conduzido por degradação enzimática e subsequente análise comparativa com a dextrana nativa. No mesmo ano, através da filtração em gel da dextrana produzida por seis linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* em estágio recente de cultura, foi observada uma distribuição bimodal do peso molecular. Foi feita a preparação das enzimas parcialmente purificadas, e essas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, evidenciando-se dois tipos distintos de dextranas sacarases. Assim, das seis linhagens analisadas, pode-se formar dois grupos distintos, de acordo com o tipo de enzima que produzem.

Em 1985, KOBAYASHI et alii, conseguiram a purificação da forma dimérica das dextranas-sacarases produzidas por *L. mesenteroides* de linhagens pertencentes a grupos distintos.

KOBAYASHI et alii (1986) estudaram os sítios de ligação para o substrato da dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides*, através da inibição cinética dessa enzima. Este estudo mostrou que os sítios de ligação para inibidores competitivos e não competitivos estão distantes um do outro.

MARTIN (1985) descreveram a cinética básica da dextrana sacarase pelo modelo de inibição pelo substrato,

onde condições ótimas para maximização da produtividade foram experimentalmente e teoricamente determinadas.

Para os processos descritos, a oxigenação eficiente se constitui em um dos principais problemas, devido ao aumento de viscosidade ao longo do tempo e demanda de oxigênio elevada necessária à transformação eficiente do substrato. Estes fatores precisam ser considerados quando se pretende avaliar diferentes linhagens e também otimizar a sua produtividade e rendimentos.

2.2.2. Propriedades

Dextranas são polissacarídeos constituídos de monômeros de D-glicopiranosose unidas principalmente através de ligações 1-6, tendo algumas vezes ramificações que formam ligações 1-3 e 1-4 (SMITH & SCHILLER, 1965) (Figura 2).

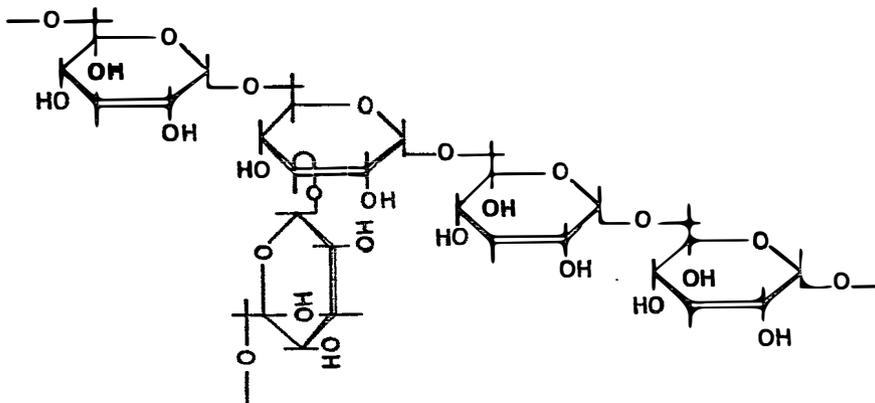


Figura 2. Estrutura da dextrana com ramificação 1-3.

O meio de cultura exerce uma grande influência na estrutura das dextranas. Tanto suas estruturas como suas propriedades são determinadas primariamente pela linhagem que as produz (JEANES, 1973).

Dextranas isoladas do meio de cultura que as produzem são extremamente polidispersas e contém moléculas de todos os tamanhos, desde oligómeros até dextranas de peso molecular de centenas de milhões. Esta variação de peso molecular pode ser reduzida por hidrólise ácida parcial, para produzir dextranas de peso molecular bem definidos.

Existem muitos métodos de degradação que são aplicados, embora a hidrólise (SZEJTLI, 1965 e BASEDOW & EBERT, 1979) seja o método mais geral. São estes, degradação por hidrólise alcalina (BREMNER et alii, 1969) por peróxido de hidrogênio, por enzimas, por ultra-som, por tratamento térmico, etc... (LIPTAK & JANOSSY, 1969-70).

Dextranas de uso clínico são em geral preparadas por hidrólise ácida. Foi observado que durante a hidrólise ácida as ramificações 1-4 e 1-3 são mais sensíveis que as ligações 1-6 da cadeia principal. O que é uma vantagem para o uso farmacêutico, pois facilita a linearidade da cadeia.

Estudos de metilação (SLOAN & SENTI, 1964) e oxidação com periodato (SENTI & SLOAN, 1955) mostraram que aproximadamente 95% das unidades de glicose de dextranas nativas produzidas por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512 F

estão unidas através de ligações adjacentes -1-6, as outras 5% restantes estão presentes como ramificações. Portanto, ramificações trifuncionais podem ocorrer em média para cada 20 resíduos de glicose (SENTI & SLOAN, 1955).

A caracterização de uma determinada fração de dextrana deve ser específica e rigorosa, pois é muito grande a variação nas propriedades do polímero, mesmo quando obtido pelo mesmo tipo de microrganismo. O tamanho, a forma, a distribuição de peso molecular e ramificação portanto, não podem ser generalizados.

As frações de dextranas obtidas pela degradação em meio ácido de dextrana NRRL-B512 F foram caracterizadas por viscosidade intrínseca, constante de sedimentação e espalhamento de luz (SENTI & SLOAN, 1955).

Os resultados das medidas de viscosidade intrínseca são mostrados na Tabela 1 e de acordo com os valores dessas medidas de viscosidade e análises com periodato. SENTI & SLOAN (1955) conclui que a dextrana NRRL-B512F consiste de uma cadeia linear com ramificações uniformemente distribuídas ao longo da cadeia.

BASEDOW & EBERT (1979) estudaram as propriedades de várias soluções de dextrana de peso molecular conhecido e as caracterizaram através de medidas de viscosidade e medidas calorimétricas em vários solventes. Os resultados indicam que dextranas de pesos moleculares maiores que 2.000 estão perfeitamente "enroladas" na solução e que as

interações entre as moléculas na solução são pequenas. Até peso molecular aproximadamente 2.000 as moléculas de dextrana apresentam-se em forma de bastão.

Tabela 1. Viscosidade intrínseca para frações de dextrana NRRL-B512F (SENTI & SLOAN, 1955).

Fração	$M_w \times 10^{-3}$	$M_n \times 10^{-3}$	(n)	Fração	$M_w \times 10^{-3}$	$M_n \times 10^{-3}$	(n)
1	17,7	14,5	0,129	13	254	-	0,417
2	18,4	16,7	0,133	14	445	-	0,450
3	31,4	29,4	0,182	15	422	-	0,458
4	37,7	25,4	0,197	16	603	-	0,522
5	49,9	47,2	0,214	17	746	-	0,610
6	62,8	51,6	0,237	18	975	-	0,633
7	65,5	57,6	0,252	19	1040	-	0,619
8	78,8	67,5	0,280	20	2700	-	0,800
9	92,6	71,3	0,284	21	4900	-	0,785
10	109,0	90,6	0,332	22	6940	-	0,850
11	153,0	-	0,332	23	8200	-	0,935
12	185,0	-	0,378	24	9500	-	0,935

M_w = peso molecular; M_n = peso molecular médio, determinado por medidas do poder de redução; (n) viscosidade intrínseca (ml/g).

Em soluções de sais diluídos as cadeias de dextrana são mais expandidas do que em água, o que pode ser concluído pelo aumento na viscosidade intrínseca como podemos observar na Tabela 2.

Tabela 2. Viscosidade intrínseca de soluções de dextrana com outros componentes.

Solução aquosa	Viscosidade intrínseca (ml/g)
Água	27,1
10% glicose	27,2
10% NaCl	27,6
10% uréia	27,9
10% MgSO ₄	28,1
20% metanol	22,1

O aumento na viscosidade intrínseca com a presença de um terceiro componente, indica a expansão das cadeias na solução. No caso do metanol, que é um agente precipitante, ocorre diminuição da viscosidade intrínseca das cadeias das dextranas.

Esses valores estão de acordo com os dados de ANTONINI et alii (1964), que mostraram através de medidas de espalhamento modificações da conformação molecular das dextranas em soluções de sais, uréia e glicose.

O processo de dissolução de dextrana, em todos os solventes conhecidos, é altamente exotérmico, e pode ser explicado pela formação de fortes ligações de hidrogênio entre o solvente e a dextrana. Os calores de solução de dextrana em alguns solventes são dados na Tabela 3. Os mais altos calores correspondem aos melhores solventes. Os valores de solução da dextrana são praticamente independentes para dextranas de pesos moleculares maiores que 2.000 mas diminui fortemente para oligômeros.

Tabela 3. Calores de solução de dextrana ($\bar{M}_x = 101.000$) expressos em joules por grama (J/g).

Solvente	Calor de solução (J/g)
Glicol	- 98
Água	-150
Dimetil Sulfóxido	-167
Formamida	-228

Soluções de dextrana são fortemente dextrorrotatórias. $[\alpha]_d^{25} = +200^\circ$. Para dextranas obtidas da linhagem NRRL 512 a $[\alpha]_d^{25}$ é dependente do número de ligações (1-3) (BOLETIM INFORMATION, 1974).

Estudos de dispersão ótica rotatória (ORD) realizados por HENRYK (1968), indicam que soluções de dextrana em mistura etanol - H₂O ou em H₂O tem O.R.D. posi-

tiva. Na faixa de comprimento de onda de 300-700 nm a dextrana apresenta uma curva normal.

Algumas propriedades são comuns a todas as dextranas, por exemplo, todas elas são brancas e sólidos cristalinos (quando purificados). Outras propriedades podem diferir de acordo com o tipo de linhagem utilizada para sua obtenção.

Em geral dextranas que tem alto teor de ligações 1-6 são prontamente solúveis em água, enquanto que outras, apresentam alguma dificuldade em se dispersarem.

Quanto a reatividade das dextranas pode-se dizer que a grande propagação de ligações (1-6) na dextrana fornece a cadeia excelente estabilidade à hidrólise ácida e alcalina. Os grupos redutores terminais são altamente reativos, no entanto são poucos nas dextranas de alto peso molecular. A reatividade da dextrana é portanto, grandemente determinada pelos grupos hidroxila, dos quais existem 3 por resíduo de glicose, excetuando nos pontos de ramificações e nos resíduos terminais desta.

Uma variedade de substituintes podem ser introduzidas via grupos hidroxilas e um grande número de derivados tem sido sintetizados, sendo em sua grande maioria patenteados.

Dentre estes derivados são conhecidos: ácidos alifáticos, ácidos dibásicos, aminoácidos, ácido nítrico, sulfúrico e fosfórico. O grande número de éteres que tem

sido descritos incluem os alquilas, carboximetilas, cianometilas, arilas e aqueles de aldeídos bifuncionais e reagentes apóxicos (FLODIN, 1989).

2.2.3. Aplicações

A utilização da dextrana como substituto do plasma sanguíneo, foi muito intensa no período de 1948 a 1955, quando se realizaram a maioria dos trabalhos de pesquisas, entre eles, destaca-se o trabalho de GRONWELL (1957), onde se estabeleceu o peso molecular entre 50.000 a 100.000 para a dextrana utilizada na constituição do plasma sanguíneo.

Baseados na sua grande habilidade para estabilizar xaropes, dextransas tem sido utilizadas na indústria de alimentos (HALANDER, 1986). Devido ao efeito estabilizador de suas soluções coloidais atuam contra a cristalização e têm alta especificidade para estabilizar a consistência de sorvetes.

Dextransas e seus derivados também tem tido significativas aplicações nas indústrias de cosméticos, resinas sintéticas, polarografia, etc., além de serem muito úteis como absorventes, floculantes, adesivos, nas separações de parafinas entre outros (JEANES, 1973).

Algumas propriedades biológicas da dextrana merecem especial atenção. Dextranas são inertes em muitos sistemas biológicos e portanto não afetam o comportamento da maioria dos tipos de células. O efeito estabilizador de suas soluções coloidais podem ser de boa utilidade no isolamento de películas subcelulares.

Estudos quantitativos de permeabilidade celular e passagem macromolecular através da barreira de vasos linfáticos são feitos usando dextranas marcadas com isotiocianato de fluoresceína. Comparações entre o volume das suspensões mitocondriais acessíveis a dextrana e a sacarose proporcionam informações acerca do volume do compartimento intermembranal de mitocôndria. Dextranas com semelhantes propriedades coloidais tem sido usadas para estimar o volume da parede celular bacteriana.

Dextranas tem muitas aplicações na área da medicina, a mais importante delas talvez seja sua utilização como substituto do plasma sanguíneo (MARTIN, 1985). Além disso podem ser usadas como estimuladores da circulação sanguínea no tratamento de trombozes e edemas cerebrais, como anti-inflamatórios, etc.

Complexos metálicos de dextranas também tem sido bastante úteis na prática clínica, principalmente os compostos de ferro-dextrana que tem sido usados na prevenção de anemia (TAKAOKA, 1956). Combinada com outros metais como o antimônio por exemplo, forma uma droga de grande valor

para o tratamento da Leishmaniose (calazar), equistossomose e no tratamento da arteriosclerose.

Em estudos realizados por Selye, citado por JEANES (1973) concluiu-se que quelatos de ferro, cromo, e alumínio-dextrana podem atuar contra o efeito letal ou de calcificação esplênica em ratos por intoxicação com vários metais como chumbo, escândio e cloretos de terras raras ($TbCl_3$, $SmCl_3$, $YbCl_3$, $PrCl_3$...). Em trabalhos anteriores foi observado que tanto ferro, alumínio e cromo, na forma de sais inorgânicos não eram tão bem tolerados como na forma de quelatos de dextrana. O mecanismo de proteção não é bem calculado, no entanto, desde que dextrana isoladamente não oferece proteção significativa contra a mortalidade ou calcificação esplênica, pode-se pensar que esse efeito profilático é devido a porção metálica competitiva dos quelatos.

Como foi mencionado, a atividade biológica e a aplicação industrial para a dextrana é grandemente dependente da distribuição de seu peso molecular. A tabela seguinte, apresentada por JEANES (1973) relaciona algumas de suas utilizações (entre as quais já foram citadas algumas) com a distribuição do seu peso molecular (Tabela 4).

Tabela 4. Aplicações de frações de dextrana de peso molecular definido (JEANES, 1973)

Peso molecular ou variação de peso molecular	Forma empregada (modo de uso)	Função
FARMACÊUTICA		
75.000	Solução de concentração 6% em	"Dextrana clínica" padronizada para
25.000	0,9% de sol. de NaCl; infusão intravenosa.	utilização como substituto do san- gue.
75.000	Solução de concentração 10-12%	Tratamento de hipoproteïnemia.
25.000	em água ou dextrose; infusão intravenosa.	
40.000	Solução de concentração 10% em	Reduz agregação de eritrócitos,
20.000	9% de solução de NaCl; infusão intravenosa.	aumenta a fluidez do sangue; usado nos procedimentos clínicos e cirúrgicos.
25.000	Solução aquosa, o peso molecu-	Meio de suspensão para agentes de
70.000, 200.000	lar é escolhido dependendo da localidade a ser examinada.	contraste destinados aos exames radio- lógicos de vasos sanguíneos, órgãos ou cavidades do corpo.

Tabela 4. Continuação

Peso molecular ou variação de peso molecular	Forma empregada (modo de uso)	Função
10.000-30.000	-	Estabilizador na liofilização de materiais tais como vacinas e bactérias
7.000-10.000	Sulfato de sódio dextrana	Anticoagulante do sangue.
2.000-10.000	Solução de complexo Fe-dextrana em 0,9% de cloreto de sódio, injeção intramuscular.	Tratamento das deficiências de ferro, anemias, etc...
18.000, 74.000 228.000, 7.400.000 100.000-3	INDUSTRIAL Solução aquosa diluída.	Meio superior de suspensão para polimerização de monômeros insaturados.
100.000-300.000	12% de dextrana e 0,5-3,0% de solução aquosa de sais de cromo	Material preservado fotosensitivo para revestimento de placas usadas no processo de estampagem de tecidos.
10.000	5-50% por peso de sólido total em emulsões gelatinosas de heletos de prata.	Emulsões para filmes radiológicos.

Continua

Tabela 4. Continuação.

Peso molecular ou variação de peso molecular	Forma empregada (modo de uso)	Função
40.000, 180.000	Dextrana, sulfato de sódio-dex- trana dietil aminoetil-dextrana	Separação macromoleculares em sistemas líquidos de duas fases.
30.000 - 2×10^6	Derivados de dietilaminoetil e carboximetil de géis de dextrana	Fracionamento de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos.
250.000, 500.000	-	Separação e concentração de plaquetas do sangue. Preservação de leucócitos.
7.000-8.000	Sulfato de dextrana em baixa relação para proteínas.	Estabilização seletiva de globulina e fibrinogênio no calor.

2.3. *Leuconostoc mesenteroides*

2.3.1. *Biologia do Leuconostoc mesenteroides*

Esta é uma bactéria pertencente à família Lactobacillaceae, tais como *Streptococcus* e *Lactobacillus*. O gênero *Leuconostoc* é formado por bactérias gram positivas, geralmente com a forma cocci alongados. Esse gênero é taxonomicamente e ecologicamente, pertencente ao grupo N Streptococci (GARVIE, 1986 e ORBERG & SANDINE, 1984a). A taxonomia do gênero *Leuconostoc* não está ainda muito clara, sendo seguidas as descrições propostas por WHITTENBURY (1966). Os principais critérios no qual se baseiam as definições de espécies, são dadas na Tabela 5, junto com os tipos de peptidoglicanas (murein), encontradas por KANDLER (1970).

O estudo de plasmídios tem se tornado essencial para o entendimento da genética e fisiologia do grupo N *Streptococcus*, assim como tem sido de grande valor para ajudar na identificação das linhagens.

DAVIES & GASSON (1981), demonstrou a importância de se conhecer o arquivo de plasmídios na identificação de bactérias do grupo streptococcus lácticos. ORBERG & SANDINE, (1984b), fez uma análise de várias linhagens de *Leuconostoc*, investigando a presença de plasmídios, concluindo que a maioria das linhagens possuem no mínimo dois e frequentemente mais plasmídios da espécie.

Tabela 5. Distribuição dos tipos de murein (glicoproteínas de parede celular) no gênero *Leocornostoc*.

Espécies	Fermentação de:						Tipos de murein (glicoproteínas de parede celular)
	Arabinose	Xylose	Celobiose	Lactose	Sacarose	Melibiose	
<i>L. cremous</i>	-	-	-	-	-	-	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2
<i>L. lactis</i>	-	-	-	+	+	+	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2+L-Lys-(L-Ala)2
<i>L. paramesenteroides</i>	+	+	+	-	+	+	L-Lys-(L-Ala)2
ssp. <i>lactophilum</i>	-	+	+	+	+	-	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2
<i>L. dextranicum</i>	-	+	-	-	+	+	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2
<i>L. mesenteroides</i>	+	+	+	-	+	+	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2
ssp. <i>amelibiosus</i>	+	+	+	-	+	+	L-Lys-L-Ser-(L-Ala)2
<i>L. gracile</i> (syn. <i>L. oenos</i>)	+	-	-	-	+	+	L-Lys-L-Ala-L-Ser+L-Lys-(L-Ser)2

Infelizmente a genética de plasmídios de lactobacilos não tem acompanhado os avanços da genética molecular. Poucas informações estão disponíveis quanto a determinantes plasmidiais ou mecanismos de transferência genética, para um gênero de bactérias de importância para muitas indústrias de alimentos e farmacêuticas.

Recente progresso na genética do grupo N *Streptococcus* tem estabelecido o envolvimento de DNA plasmidial em inúmeras atividades relacionadas com a performance de fermentação. CHASSY et alii (1978), evidenciou a relação entre plasmídios e o metabolismo da lactose em *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. DAVIES et alii (1981), fez um estudo da genética das bactérias ácido lácticas, fornecendo informações valiosas para a indústria de laticínios. Algumas das mais importantes propriedades metabólicas de bactérias lácticas, utilização de citrato e resistência à antibióticos são frequentemente determinadas por genes plasmidiais.

KEMPLER & MCKAY (1981), fez um estudo da bioquímica e genética da utilização do citrato pela bactéria *Streptococcus lactis*, logo após ter conseguido caracterizar o DNA plasmidial da bactéria e evidenciar a relação entre plasmídios e utilização de citrato.

PUCCI et alii (1988), ORBERG & SANDINE (1984b) e TOBIAN & MACRINA (1982), realizaram estudos referentes à resistência à antibióticos em várias bactérias do grupo N *Streptococcus*, inclusive do gênero *Leuconostoc*, não

conseguindo estabelecer um relacionamento entre resistência ao antibiótico e presença de plasmídios.

A presença da cápsula de polissacarídeos ao redor das células de *Leuconostoc* é tida por JEANES (1952, 1973) e JEANES et alii (1954), como a causa da dificuldade nos processos de lise celular. A resistência à lise com lisozima (enzima lítica amplamente utilizada na lise de bactérias), nas bactérias do grupo N *Streptococcus* gram positiva, foi estudada por CHASSY & GIUFFRIDA (1980).

ORBERG & SANDINE (1984b) propuseram a lise das células com solução de mutanolysin depois do tratamento com a lisozima. MONSEN et alii (1983) tinha proposto uma metodologia para lise das células do grupo N *Streptococcus* e preparação do DNA para extração, mas não teve boa aceitação.

A quantidade de células usadas para a lise é importante para que a extração do DNA plasmidial e cromossômico, sejam bem sucedidas. KLAENHAMMER et alii (1978) demonstrou que um excesso de células frequentemente leva a uma lise insuficiente, devido a digestão parcial da parede celular pela lisozima, em um período curto de incubação. A escassez de células também é indesejável porque leva à recuperação de pequena quantidade de DNA plasmidial ou cromossômico.

Estudos relacionando taxa de crescimento celular e quantidades de material genético extraídos foram realizados por COLLINS et alii (1973), ENGBERG & NORDSTRÖM

(1975), PRITCHARD et alii(1975) e KORNBERG (1980), sugerem que uma taxa de crescimento mais lenta, favorece em pelo menos algumas espécies, a um aumento na quantidade de DNA plasmidial em relação ao DNA total extraído.

2.3.2. Métodos de melhoramento de bactérias

O isolamento de linhagens se constitui em importante método visando dispor a variabilidade genética necessária à seleção. A futura manipulação genética, seja através da mutação ou de recombinação dependem desta etapa do trabalho. Na mutagênese em geral são considerados o tipo de agente mutagênico a ser utilizado e o método de seleção que permite isolar tipos mais produtivos. Os métodos recombinacionais dependem da identificação de processos conjugativos e da ocorrência de genes nucleares ou plasmidiais envolvidos na expressão de caracteres de importância.

Visando ao isolamento da bactéria *L. mesenteroides* foram propostos meios seletivos por JEANES (1973) e por MEYERS et alii (1976), mas nenhum deles se mostrou eficiente para uma rápida e significativa identificação da produção de dextrana. Como métodos de melhoramento, o isolamento de linhagens da natureza, têm provado ser eficiente em muitos casos, principalmente por permitir a seleção e futura manipulação genética.

MEYERS et alii (1976) e WILLSHAW et alii (1979) propuseram um método simples de eletroforese em gel de agarose como método para identificação e caracterização de DNA plasmidial. Os métodos gerais de extração de DNA genômico e DNA plasmidial, purificação e identificação são propostos por SAMBROOK et alii (1989).

LEBLANC & LEE(1979), elaborou um método para obtenção e detecção de plasmídios em *Streptococcus KLAENHAMMER* (1984), desenvolveu um método geral para o isolamento de plasmídios em *Lactobacilli*.

Quanto a capacidade de recombinação, PUCCI et alii (1988) mostrou que é possível a transformação intergenérica e intragenética entre *Leuconostoc* e *Streptococcus* e entre *Leuconostoc dextranicum* e *Leuconostoc cremonis*. Ele conseguiu transferir o caráter de resistência a vancomicina, e usou como meio seletivo, 200 µg/ml de hidrocloreto de vancomicina.

TOBIAM & MACRINA (1982) conseguiu comprovar a existência de um plasmídio que permite a clonagem de genes estranhos em *Streptococcus sanguis* ("Helper Plasmid Cloning"). Ele transformou um plasmídio que contém homologia com o plasmídio "helper", com o gene de resistência a tetraciclina do cromossomo de *Streptococcus mutans*. Quando este plasmídeo transformado, foi transferido para um *Streptococcus sanguis* contendo o plasmídio "helper" a característica de resistência à tetraciclina foi incorporada; quando

transferido para um *Streptococcus sanguis* que não possuía plasmídeo "helper", a característica de resistência foi perdida.

LIN et alii (1991) fez estudos com a única linhagem mutante conhecida de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, a qual possui a característica de ser citrato negativa. O mutante citrato negativo não possui um plasmídeo de 22 Kb comum à espécie. Mas os estudos não oferecem provas de que a capacidade de utilizar o citrato do meio, ou seja, de produzir a enzima citrato liase esteja ligada à presença do plasmídeo 22 Kb.

Quanto ao melhoramento de *Leuconostoc mesenteroides*, pode-se dizer que muito pouco foi realizado. A maioria dos trabalhos faz referência a outras espécies do grupo N *Streptococcus*, que por terem várias características em comum podem servir de base para novos estudos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

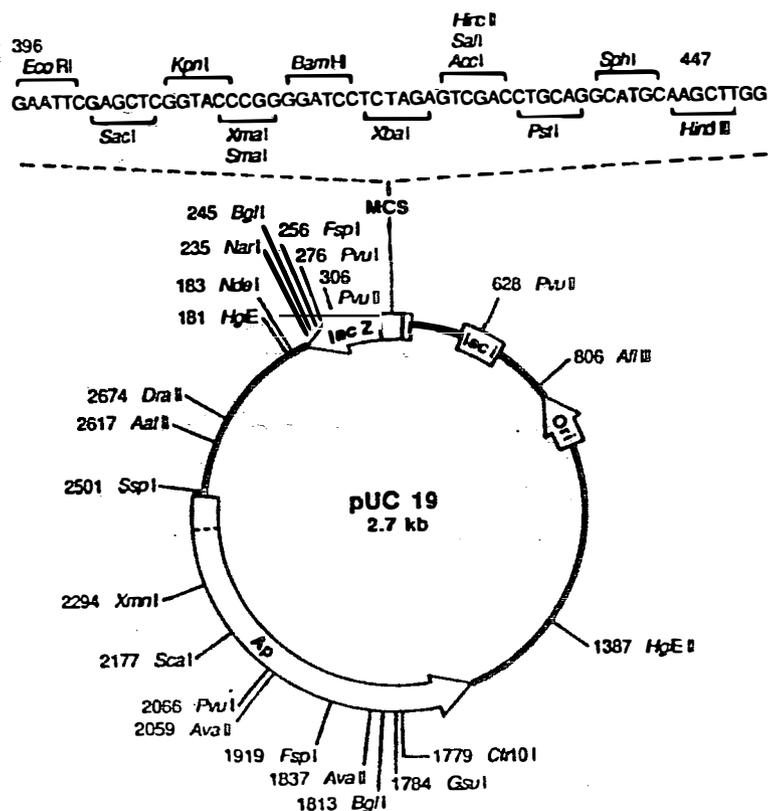
As linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* foram isoladas de usinas de açúcar e álcool da região de Piracicaba. Dentre todas as isoladas utilizaram-se no presente trabalho as linhagens denominadas MH4.1, MH8.1, MH8.2, L2 e 8. Também foi utilizada a linhagem IZ/1983 cedida pelo Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", referida neste trabalho como Z2.

Nos experimentos de transformação foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli* do laboratório de Biologia Molecular da Brock University - St. Catharines - Canadá, como LE 392B, JM83 e DH5 α (procedente da BRL Life Technologies, Inc.).

3.2. Plasmídios utilizados

Para os processos de clonagem do gene da dextrana-sacarase foram testados os plasmídios pBR322 (BOLIVAR et alii, 1977), pUC18 e pUC19 (YANISH-PERRON et alii,

1985), para transformar DH5 α (*E. coli*). Devido a maior eficiência de transformação obtida com o plasmídeo pUC19, este foi o vetor escolhido para este trabalho. O plasmídeo pUC19 possui o gene de resistência a ampicilina e o gene lac Z (*B. galactosidase*) o que facilita a identificação dos transformantes em meio seletivo com ampicilina e X-Gal. Além disso, é um vetor pequeno de 2,7 Kb, possibilitando a inserção de vários fragmentos exógenos em sítios conhecidos para várias enzimas de restrição, como mostrado abaixo:



O plasmídeo pLm52, foi isolado da linhagem MH4.1, onde ocorre naturalmente, possuindo o tamanho de 52 Kb. Este plasmídeo foi mapeado para os sítios de restrição de várias enzimas, graças a obtenção de subclones, contendo um plasmídeo recombinante, originados da inserção de um fragmento do pLm52 no vetor pUC19. São estes plasmídios recombinantes o pEB36, pEC51, pED19 e pEE28 mostrados nas Figuras 18, 19, 20 e 21, respectivamente.

3.3. Meios de isolamento e purificação de *Leuconostoc* sp. (JEANES, 1965)

Para obter linhagens isoladas e purificadas de *Leuconostoc*, a partir de diferentes substratos contendo várias espécies bacterianas, JEANES et alii (1954) desenvolveram três meios, que quando utilizados sucessivamente, favorecem o crescimento de espécies de *Leuconostoc* em relação as demais bactérias. São eles;

Meio A

- Extrato de fígado	1,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- Triptona	1,0%
- K ₂ HPO ₄	0,2%
- Dextrose	0,5%
- Água destilada	

O pH do meio foi ajustado para 7,4 com NaOH 10N e o meio foi distribuído em tubos de ensaio, até um terço do volume total do tubo, fechado com algodão e esterilizado à 121°C por 15 minutos.

Após o resfriamento dos tubos, foi feita a inoculação em condições assépticas. Os tubos foram incubados à 25°C por 12 horas. Após o crescimento, 100 µl da cultura líquida foram transferidos para o meio B.

Meio B (meio sacarose-ágar)

- Sacarose	2,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- Triptona	0,25%
- K ₂ HPO ₄	0,25%
- Ágar	2,0%
- Água destilada	

O pH do meio foi ajustado para 7,4 com NaOH 10N, e o meio foi distribuído em tubos de ensaio, até um terço do volume total do tubo. Após esterilizado à 121°C por 15 minutos, os tubos foram inclinados a 15°, para resfriamento e endurecimento do ágar inclinado. Procedeu-se a inoculação com alça de platina, incubou-se por 12 h à 25°C. e após o crescimento, transferiu-se em condições assépticas uma alçada da cultura, para placas de petri contendo o meio C.

Meio C

- Sacarose	10,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- Triptona	1,0%
- K ₂ HPO ₄	0,2%
- Ágar	2,0%
- Água destilada	

O pH do meio foi ajustado para 7,4 com NaOH 10N, e o meio foi esterilizado à 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento foi transferido para placas de petri em condições assépticas. A inoculação foi feita como descrito acima e as placas foram incubadas à 25°C por 1 à 2 dias, até evidenciar o crescimento de colônias com aspecto viscoso, devido a produção da dextrana.

3.4. Produção de dextrana por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (JEANES, 1965a)

O meio para a obtenção do inóculo e para a produção de dextrana, pelo processo biológico, é constituído por:

- Sacarose	10,0%
- Extrato de levedura	0,25%
- MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2%
- K ₂ HPO ₄	0,5%
- Água destilada	

O fosfato foi esterilizado separadamente, e adicionado assépticamente ao meio esterilizado e frio. O pH não precisa ser ajustado, ficando por volta de 7,0.

Para a obtenção do inóculo foi transferida, uma pequena quantidade de células de uma cultura vigorosa, para um tubo de ensaio contendo 3 ml do meio de produção de dextrana. O tubo foi então incubado a 25°C, com agitação, por 12 horas. O bom crescimento, foi indicado pela turbidez e aumento da viscosidade do meio, além de um acentuado decréscimo do pH para 4,5. Transferiu-se 3 ml do inóculo para um Erlenmeyer contendo 500 ml do mesmo meio, em condições assépticas. A mistura foi incubada por 20 horas a 25°C, com agitação constante. A produção de dextrana foi monitorada, pela medida de pH ou viscosidade, indicando o final do processo fermentativo.

3.5. Isolamento e purificação da dextrana (JEANES, 1965a)

Quando o processo biológico de produção de dextrana foi completado, segundo o item 3.4, diluiu-se o meio de cultura viscoso, devido a presença da dextrana, com igual volume de água. À essa mistura, acrescentou-se 35% do volume de etanol, lentamente e com agitação ininterrupta. A solução de etanol foi centrifugada, separando-se as células, da dextrana solúvel no sobrenadante. Ao sobrenadante acrescentou-se etanol lentamente e com agitação

contínua, até que a dextrana foi precipitada, o que ocorre quando a concentração de etanol atinge por volta de 40 a 45%. Para precipitar a dextrana a mistura foi deixada para decantar por 1 hora. Para remover o líquido da massa de dextrana, esta foi amassada e ressuspensa em 5% de água e precipitada com a adição do mesmo volume de etanol. O processo foi repetido duas vezes mais, obtendo-se uma massa de dextrana para secagem a vácuo à temperatura ambiente por 16 horas, seguido de aquecimento por 4 horas a 100°C. Segundo este processo JEANES (1965a) determinou a retenção de 0,3% de água e pode selecionar a linhagem NRRL-B512F com uma produção equivalente a 25% do peso inicial da sacarose.

3.6. Avaliação de parâmetros da fermentação

O processo de fermentação foi conduzido em fermentador adaptado com sistema de aeração especial (Figura 3). O protótipo foi adaptado em câmara de vidro com 60 cm de altura e 30 cm de diâmetro. Em suporte acentado ao fundo da câmara foi adaptado um microaspersor do tipo nebulizador (As-Brasil S/A), acionado por bomba centrífuga (Equilabor). Através dessa bomba procedeu-se a recirculação do meio que aspergido era arejado. A quantidade de oxigênio dissolvido pode ser mantida em níveis suficientes para o crescimento celular, até o consumo total do substrato. O volume útil de fermentação foi de 4 litros, a temperatura ambiental de 30°C, a vazão da bomba centrífuga estimada em 10 litros por

minutos e o processo foi monitorado durante o período de 30 horas.

Durante o processo fermentativo foram feitas medições da temperatura, oxigênio dissolvido, pH, densidade óptica e número de células a cada hora durante o processo fermentativo.

A temperatura e oxigênio dissolvido, foram medidos através de sonda imersa no meio no aparelho "Oxigen Meter - YSI Model 57" e o pH foi medido em potenciômetro "Analion P600".

A densidade óptica foi determinada no colorímetro "Micronal 8340", comprimento de onda de 520 nm através de amostras de 5 ml, retiradas com intervalos de 1 hora, sendo que foram retornadas ao fermentador após a dosagem.

O número de células foi avaliado pela contagem em câmara de Neubauer de amostras retiradas também com intervalo de 1 hora.

3.7. Meios de cultura

3.7.1. Meio seletivo para produção de dextrana

- Triptona	1,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- NaCl	1,0%
- Sacarose	5,0%
- Púrpura de bromo cresol	0,003%
- Ágar	2,0%
- Água destilada	

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. Este meio utilizado para selecionar linhagens produtoras de dextrana-sacarase foi adaptado a partir do meio LB com adição da sacarose e corante, especialmente para este trabalho. Quando as linhagens produzem a enzima, ocorre a mudança do pH ao redor das colônias, resultando um halo de cor amarela, contrastando com o meio de cor púrpura.

3.7.2. Meio de crescimento de *Leuconostoc*, para produção de dextrana

- Triptona	1,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- NaCl	1,0%
- Sacarose	5,0%
- Água destilada	

Meio adaptado a partir do meio B com adição de sacarose. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. O meio foi esterilizado em vapor fluente a 100°C por 60 minutos, para evitar a hidrólise da sacarose. Este meio foi utilizado tanto para o preparo do inóculo (em tubo de ensaio contendo 5 ml do meio, inoculado com uma pequena quantidade de células e incubado à 30°C por 12 horas), como para o crescimento e fermentação da linhagem MH4.1 na produção de dextrana (Figura 3).

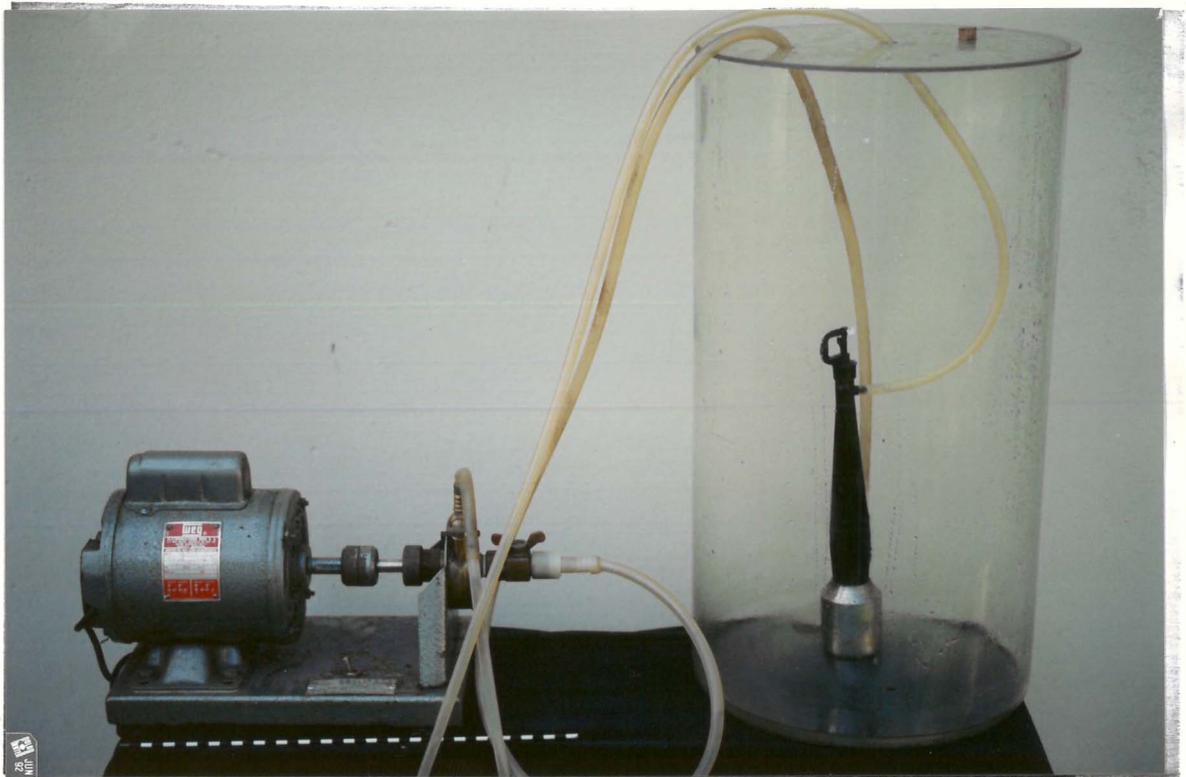


Figura 3. Protótipo de fermentador adaptado em câmara de vidro, com um microaspersor acionado por bomba centrífuga.

3.7.3. Meio de crescimento de *Leuconostoc* para extração de DNA

O meio LURIA e BERTANI (LB), acrescido de soluções de antibióticos, de acordo com a resistência de cada linhagem, foi adequado para promover o crescimento de

linhagens de *Leuconostoc*. O meio foi inoculado com 0,3% de células frescas, incubado durante a noite (12 horas), a temperatura de 30°C, com agitação constante.

3.7.4. Meio Luria e Bertani (LB)

(MANIATIS et alii, 1982)

- Triptona	1,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- NaCl	1,0%
- Ágar (opcional)	2,0%
- Água destilada	

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. Este meio foi utilizado para crescimento de *E. coli* (DH5 α) usadas na transformação, crescimento e seleção dos transformantes, acrescentando-se ao meio as soluções de antibióticos e X-gal, quando necessário.

3.7.5. Meio completo 2XYT

- Triptona	2,0%
- Extrato de levedura	1,0%
- NaCl	2,0%
- Ágar (opcional)	2,0%
- Água destilada	

Meio de LURIA e BERTANI (LB) com o dobro da concentração. O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH 1N. Este meio foi utilizado para o crescimento de transformantes que não contém marcas seletivas. Foi também o meio mais favorável ao crescimento de DH5 α , sendo utilizado na produção de células competentes.

3.7.6. Meio S.O.C. (ANÔNIMO, 1990)

- Triptona	2,0%
- Extrato de levedura	0,5%
- NaCl	10,0mM
- KCl	2,5mM
- MgCl ₂ , MgSO ₄	20,0mM (10mM cada)
- Dextrose	20,0mM
- Água destilada	

Dissolveu-se em 97 ml de água destilada, triptona, extrato de levedura, NaCl e KCl seguido de autoclavagem à 121°C por 15 minutos. Ao esfriar à temperatura ambiente, preparou-se a solução estoque de Mg⁺⁺ com 1M MgCl₂.6H₂O + 1M MgSO₄.7H₂O filtrou-se e adicionou-se ao meio juntamente com solução de dextrose (2M e filtrada), até a concentração final de 20mM.

Não houve necessidade de ajustar o pH, o qual se mantém neutro (7,0 \pm 0,1). Este meio foi utilizado no

procedimento de obtenção de células competentes para a transformação.

3.8. Soluções e tampões

As soluções contendo antibióticos foram filtradas em membranas milipores com porosidade de 0,4 μm .

3.8.1. Solução de Púrpura de Bromocresol

Solução estoque a 1%

- Púrpura de bromocresol 0,05g
- Água bidestilada 5 ml

3.8.2. Solução estoque de ampicilina (500x)

- Ampicilina 250 mg
- Água destilada 10 ml

A solução foi mantida a -20°C e utilizada na concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.3. Solução estoque de tetraciclina (1000x)

- Tetraciclina 125 mg
- Etanol 5 ml
- Água destilada 5 ml

A solução foi mantida a -20°C em recipiente escuro e utilizada na concentração final de 12,5 a 15 $\mu\text{g/ml}$, após o resfriamento do meio

3.8.4. Solução estoque de cloranfenicol (1000x)

- Cloranfenicol 250 mg
- Água destilada 10 ml

A solução foi esterilizada por filtração, mantida a -20°C e utilizada na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.5. Solução estoque de kanamicina (1000x)

- Kanamicina 250 mg
- Água destilada 10 ml

A solução foi mantida a -20°C e utilizada na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.6. Solução estoque de rifampicina (1000x)

- Rifampicina 500 mg
- Água destilada 10 ml

A solução foi mantida a -20°C e utilizada na concentração final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.8.7. Solução estoque de eritromicina (1000x)

- Eritromicina 500 mg
- Etanol 5 ml
- Água destilada 5 ml

A solução foi mantida a -20°C e utilizada na concentração final de $50\ \mu\text{g/ml}$.

3.8.8. Solução estoque de cefatoxina (1000x)

- Cefatoxina 500 mg
- Etanol 5 ml
- Água destilada 5 ml

A solução foi mantida a -20°C e utilizada na concentração final de $50\ \mu\text{g/ml}$.

3.8.9. Solução de X-Gal (100x)

Solução utilizada em meio para seleção de transformantes com o vetor pUC19. Para cada placa de petri contendo cerca de 20 ml de LB agar (solidificado) e ampicilina, espalhou-se cerca de $10\ \mu\text{l}$ de solução de X-Gal. Deixou-se na estufa à 37°C por 2 horas. Após esse tempo a placa estava pronta para ser inoculada.

3.8.10. Solução salina - EDTA

- EDTA 0,01M
- NaCl 0,15M

O pH da solução deve ser 8,0. A solução foi utilizada para a extração de DNA genômico de *Leuconostoc* sp.

3.8.11. Solução de lisozima

- EDTA 10mM
- Tris HCl 24mM
- Dextrose 50mM

O pH foi ajustado para 8,0 pela adição de HCl 37% e a esterilização foi realizada por filtração. A lisozima foi adicionada no momento do uso a uma concentração de 5 mg/ml.

A solução foi utilizada na lise celular por digestão da parede celular de bactérias (*Leuconostoc mesenteroides* e *E. coli*), indispensável para os processos de extração de DNA genômico e plasmidial.

3.8.12. Solução de SDS

- SDS 20%
- Água destilada

3.8.13. Solução de perclorato de sódio

- Perclorato de sódio 5M
- Água destilada

A solução foi autoclavada e utilizada para extração de DNA genômico.

3.8.14. Solução de clorofórmio e álcool isoamílico

- Clorofórmio 24ml
- Álcool isoamílico 1ml

A solução foi utilizada para extração de DNA genômico.

3.8.15. Solução de etanol

- Etanol 95%

A solução foi utilizada gelada (-20°C), para a precipitação de DNA, tanto genômico como plasmidial.

3.8.16. SDS alcalino

- NaOH 0,2N
- SDS 1,0%
- Água destilada 9,0ml

A solução foi preparada no momento do uso e utilizada para extração de DNA plasmidial.

3.8.17. Solução de acetato de sódio

- NaAc 3M

O pH foi ajustado para 4,8 com ácido acético glacial e a solução foi utilizada para extração de DNA plasmidial.

3.8.18. Solução SSC (20x)

- NaCl 3M

- Citrato de sódio 0,3M

O pH da solução foi 7,5. A solução foi autoclavada e utilizada para extração de DNA plasmidial de *Leuconostoc* sp., com a finalidade de purificação com cloreto de céσιο.

3.8.19. Solução pronase - SDS 0,8%

- Tampão de lise 1,8ml

- Solução de pronase 200 ml

A solução com concentração final de pronase 1 mg por ml, foi utilizada para remover as proteínas das amostras de DNA plasmidial de *Leuconostoc* sp., para posterior purificação com cloreto de céσιο.

3.8.20. Solução de pronase

- Pronase (Sigma P6911) 5 mg/ml
- Tris base 10 mM

O pH foi 7,5. A solução foi incubada por 15 minutos à temperatura de 56°C e 1 hora à 37°C à -20°C. Essa solução foi utilizada no preparo da solução pronase SDS 0,8% descrita no item 3.7.18.

3.8.21. Solução de brometo de etídio

- Brometo de etídio 1,0g
- Água destilada 100,0ml

A solução foi agitada até a completa dissolução, estocada a temperatura ambiente e utilizada nos tampões de eletroforese e no bandamento de DNA com cloreto de céσιο (diluída para uma concentração de 6 mg/ml).

3.8.22. Solução de agarose 0,8%

- Agarose 1,2g
- Tampão Tris-Acetato (1x) ... 150ml

A agarose foi dissolvida completamente em tampão de eletroforese em forno de microondas, após o que a solução foi resfriada até 50°C e colocada lentamente nas "bandejas" das cubas de eletroforese, evitando a formação de bolhas. Após a solidificação o gel foi transferido para a cuba de eletroforese contendo o tampão.

3.8.23. Fenol saturado

Para cada 100 ml de fenol adicionou-se 500 mg de hidroxiquinoleína. Para que houvesse a saturação, adicionou-se TE, sob agitação até obter-se duas fases. Foi utilizado para precipitação de proteínas nas extrações de DNA e para inativação de enzimas de restrição.

3.8.24. Tampão Tris-EDTA (TE)

(MANIATIS et alii, 1982)

- Tris base 10mM
- EDTA 1mM

Utilizado na ressuspensão de células e de DNA.

3.8.25. Tampão Tris-acetato (20x)

- Tris base 800mM
- Acetato de sódio 100mM
- EDTA 20mM

Ajustado o pH para 7,9 com ácido acético glacial. O tampão foi utilizado nos géis de agarose e nas cubas eletroforéticas.

3.8.26. Tampão de lise

- Tris base	10mM
- EDTA	10mM
- SDS	5%

O pH foi 7,4. Esse tampão foi utilizado para preparar a solução de pronase - SDS 8%, utilizada no preparo das amostras de DNA plasmidial para purificação com cloreto de céσιο.

3.8.27. Tampão da amostra

- Glicerol ou Ficol	20,0%
- SDS	2,0%
- Azul de bromefenol	0,05%
- Água destilada	

A solução foi aquecida, sem atingir o ponto de ebulição, até completa mistura dos componentes, estocada à temperatura ambiente e utilizada nas amostras de DNA a serem corridas em gel de agarose. O volume da solução foi no mínimo 10% do volume total da amostra.

3.8.28. Tampão de transformação

- Tris-HCl 5mM
- CaCl₂ (dihidratado) 75mM

O tampão foi autoclavado e estocado em refrigerador. O pH foi 7,0.

3.9. Extração de DNA genômico de *Leuconostoc mesenteroides*

As células foram cultivadas em 50 ml de L.B. (item 3.7.4.), durante a noite (12 horas), a temperatura de 37°C, com agitação constante. Foram centrifugadas em tubo de polipropileno a 3000 r.p.m., por 15 minutos a temperatura de 4°C. O centrifugado foi transferido para tubos eppendorf e resuspendido em 100 µl de EDTA - salina (item 3.8.10.). As células foram incubadas por 10 minutos em banho-maria, com agitação à 37°C. Foi adicionada a solução de lisozima (item 3.8.11.) (5 mg/ml de lisozima) e incubado à 37°C com agitação por 30 minutos. Seguiu-se a adição de 100 µl de SDS 20% (item 3.8.12.), e incubação em banho-maria à 50°C, por 10 minutos com ocasional agitação. O aspecto leitoso da suspensão mudou para opalescente seguindo-se a adição de perclorato de sódio (item 3.8.13.), lentamente (gota - a - gota) agitando cuidadosamente o tubo. Adicionou-se 500 µl de clorofórmio - álcool - isoamílico (item 3.8.14.), agitando-

se gentilmente por 20 minutos. A emulsão foi centrifugada por 2 minutos a 12.000 r.p.m. e a fração superior foi removida com uma pipeta Pasteur para outro tubo eppendorf limpo. Foi acrescentado 2 volumes de etanol 95% (item 3.8.15.) e incubado à -20°C por 30 minutos. O DNA foi precipitado e centrifugado a 12.000 r.p.m. O etanol foi removido por aspiração e o DNA foi seco à vácuo por 10 minutos. O DNA foi resuspendido em 100 µl de água bidestilada e analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.10. Extração de DNA plasmidial de *Leuconostoc mesenteroides*

O método de extração de DNA plasmidial descrito pode ser utilizado para grande ou pequena quantidade de células, com a mesma eficiência. As culturas foram crescidas em 500 ml de LB (item 3.7.4.) contendo o antibiótico apropriado: para as linhagens MH4.1, MH8.1, MH8.2 e Z2 foram utilizadas 50 µl/ml de solução de ampicilina item 3.8.2. e 12 µg/ml de solução de tetraciclina item 3.8.3.; para a linhagem L2 foi utilizado 50 µg/ml de ampicilina e para a linhagem 8 não foi acrescentado antibiótico no meio. As culturas foram crescidas durante a noite (12 horas) a temperatura de 37°C. As células foram centrifugadas a 6.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C, até que um volume de 2,5 ml de

células fossem recuperadas em tubo de polipropileno de 50 ml. A cada tubo foi adicionado 7,5 ml de solução de lisozima com 5 mg/ml de lisozima (item 3.8.11.), e mantido em gelo por 1 hora.

Os esferoplastos foram lisados e as proteínas foram desnaturadas pela adição de 20 ml de SDS alcalino (item 3.8.16.). Depois de 10 minutos, à temperatura ambiente, a solução ficou com aspecto homogêneo e transparente (quando necessário deixou-se por mais 5 minutos até a solução ficar completamente transparente). Afim de precipitar as proteínas, foi adicionado 15 ml de solução de acetato de sódio (item 3.8.17.), misturando-se os tubos por inversão, ocasionalmente, durante a incubação de 1 hora no gelo. A mistura foi centrifugada a 6000 r.p.m. por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi filtrado através de lã de vidro em outro tubo estéril. Adicionou-se 2 volumes de etanol 95% (item 3.8.15.) ao sobrenadante e mantido à -20°C por 30 minutos para a precipitação do DNA, o qual foi recuperado por centrifugação à 12000 r.p.m. por 15 minutos à temperatura de -2°C.

O sobrenadante foi descartado por aspiração à vácuo e o DNA precipitado, secado por 15 minutos a 37°C, e resuspendido com 5,0 ml de 0,1 x SSC (item 3.8.18.). Assim preparadas as amostras estão prontas para a purificação com cloreto de césio.

3.11. Purificação de DNA plasmidial por bandamento com cloreto de céσιο

Este método foi utilizado para se obter as frações de plasmídios circularizados, de um conjunto contendo DNA genômico e DNA plasmidial fragmentado (linearizado).

Para remover as proteínas das amostras obtidas pelo método descrito no item 3.10, foi adicionado 2,0 ml da solução pronase - SDS 0,8% (item 3.8.19.), e incubado a 37°C por 30 minutos. O DNA plasmidial foi então purificado por gradiente de densidade em cloreto de céσιο (CsCl). Foi adicionado 8,4 g de CsCl, dissolvido e mantido no gelo por 15 minutos. Depois da centrifugação a 300 r.p.m. por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido, cuidadosamente, para outro tubo de 50 ml e foi adicionado 400 µl de solução de brometo de etídio (6 mg) (item 3.8.21.). As amostras foram transferidas para tubos próprios para ultracentrifugação (Quick Seal) e centrifugada em ultramicro-centrífuga, Beckman TL-100, a 65.000 r.p.m. por 20 horas a 22°C. As bandas de DNA foram observadas num transluminador de U.V. (ultra-violeta) e com a utilização de seringa e agulha, foram removidas para tubos de ensaio individualizadas. O brometo de etídio foi removido da solução com a adição de um volume igual de álcool isoamílico, misturando-se bem e removendo-se a fase superior contendo o brometo de etídio dissolvido no álcool. Essa etapa foi repetida várias

vezes até a total remoção do brometo de etídio, evidenciado pela ausência da coloração vermelha na solução. O CsCl foi removido da solução, pela adição de 3 volumes de água e precipitação do DNA com 2 volumes de etanol. A amostra foi centrifugada a 6000 r.p.m., e o sobrenadante foi removido por aspiração. O DNA foi dissolvido em 2 ml de água bidestilada e os plasmídios foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 13B).

3.12. Extração de DNA plasmidial dos transformantes

(*E. coli* DH5 α)

O procedimento para a extração de DNA plasmidial, para a maioria das bactérias contendo plasmídios, é essencialmente o mesmo. A diferença está no preparo da cultura e na quantidade e pureza de DNA que se pretende obter. Assim sendo, descreveremos o procedimento utilizado para a extração de DNA plasmidial em pequena escala, da *E. coli* DH5 α .

Colônias individuais crescidas em placa de petri com o meio seletivo foram transferidas em condições assépticas, para tubo de ensaio contendo 2,5 ml de meio LB (ítem 3.7.4.) com o antibiótico apropriado. Incubou-se a 37°C em banho-maria com agitação, por 12 horas. As células foram recuperadas por centrifugação em tubo eppendorf por 30

segundos e mantidas no gelo. Após a remoção do sobrenadante por aspiração, as células foram resuspendidas em 100 μ l de solução de lisozima contendo 5 mg/ml de lisozima (item 3.8.11.), e incubadas por 20 minutos no gelo. Adicionou-se 200 μ l de SDS alcalino (3.8.16.) e o tubo foi agitado várias vezes por inversão, mantido a temperatura ambiente, até que a aparência ficasse transparente e homogênea (de 10 a 15 minutos).

Para remover as proteínas, foi adicionado 150 μ l de acetato de sódio (idem 3.8.17.) gelado, agitou-se o tubo que foi mantido em gelo por 40 minutos, até o aparecimento de uma película branca. A mistura foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo eppendorf. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 95%, incubado à -20°C por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração, e o DNA foi ressuscitado com 100 μ l de T.E. (item 3.8.24.). O material foi prontamente misturado com auxílio do vortex, e novamente precipitado com etanol 95%. Após centrifugação e remoção do sobrenadante o DNA foi seco a 37°C , para se eliminar todo o etanol. O DNA foi ressuscitado em 50 μ l de T.E. (item 3.8.24.) e analisado com enzimas de restrição apropriadas em eletroforese de gel de agarose.

3.13. Análises com endonucleases de restrição

Todas as digestões totais com enzimas de restrição, foram feitas a 37°C por 12 horas. A mistura de reação conteve 10 x Tampão de Restrição, DNA, 0,1 a 1 unidade de enzima por mg de DNA e água destilada nas proporções recomendadas pelos fabricantes das enzimas e seus respectivos tampões.

As digestões parciais foram feitas a 37°C durante 1 hora, sendo monitoradas por eletroforese em mini-gel de agarose. Para se remover a enzima, após completada a digestão, foi feito um tratamento com fenol saturado (item 3.8.23.); com excessão onde as amostras foram diretamente checadas por eletroforese em gel de agarose, em que se acrescentou o tampão de amostra (item 3.8.27.) e colocou-se imediatamente no gel de agarose.

As endonucleases utilizadas tanto para obtenção de plasmídios recombinantes, como para a análise de sítios de restrição dos plasmídios estudados foram: EcoRI, BamHI, HindIII, ClaI, PvuI, PvuII, PstI, XbaI, Sali e Sau3A.

3.14. Ligação do DNA

As reações de ligação foram efetuadas afim de inserir fragmentos de EcoRI do plasmídio pLm52 no vetor pUC19, previamente digerido com EcoRI. Para recircularização de fragmentos isolados do plasmídio pLm52 e na tentativa de clonagem do gene da dextrana-sacarase, promoveu-se a ligação de fragmentos do DNA genômico de *Leuconostoc mesenteroides* com o vetor pUC19, visando-se posterior transformação. Todas as reações de ligação foram executadas à temperatura ambiente por 4 horas em solução contendo tampão de ligação (5 x) (Boehringer Mannheim), com 0,1 a 1 unidade da enzima T 4 DNA ligase (Boehringer Mannheim) por mg de DNA. As ligações foram checadas em gel de agarose 0,9%.

3.15. Preparo de células competentes à transformação

(Anônimo 1990a)

O método descrito a seguir foi utilizado na preparação de células de *E. coli* DH5 α e *Leuconostoc mesenteroides* linhagem 8, para os experimentos de transformação.

Partindo-se de 1 colônia isolada, foi inoculado, 5 ml de L.B. e incubada à 37°C com agitação por

12:00 horas. Cerca de 500 μ l dessa cultura, foram transferidos para 50 ml de LB e incubados por 2:30 horas à 37°C com agitação. As células foram recuperadas por centrifugação a 6000 r.p.m. por 25 minutos à 4°C, e colocadas no gelo. Acrescentou-se 25 ml de solução de transformação gelada (item 3.8.28.), ressuspendendo-se as células por agitação suave, e mantendo-se por no mínimo 1 hora no gelo. Após esse tempo, as células foram centrifugadas novamente, removendo-se o sobrenadante. O precipitado foi então ressuspendido em 1 ml de solução de transformação gelada.

3.16. Transformação

O método foi utilizado para transformação de *Leuconostoc mesenteroides* linhagem 8 e para *E. coli* linhagem DH5 α . A transformação em *E. coli* foi necessária para amplificar o número de cópias dos plasmídios recombinantes, possibilitando a avaliação e caracterização dos mesmos.

Cerca de 100 μ l de células competentes foram distribuídas em tubos eppendorf e mantidas no gelo. Adicionou-se 5 μ l de DNA e incubou-se no gelo por 60 minutos, agitando-se os tubos, cuidadosa e periodicamente.

Para a determinação da eficiência de transformação, em tubo eppendorf contendo 20 μ l de células competentes, acrescentou-se 2 μ l de pUC19 (controle positivo).

Procedeu-se o choque térmico à 42°C em banho-maria, por 45 segundos, sem agitação. Transferiu-se imediatamente para o gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 900 µl de meio SOC (item 3.7.6.), e incubou-se a 37°C com agitação por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio seletivo apropriado. No caso de DH5α transformado com vetor pUC19, este meio deve conter ampicilina e X Gal. No caso de seleção para resistência à tetraciclina, o meio continha ampicilina e tetraciclina.

Nos experimentos de transformação da linhagem 8 de *Leuconostoc mesenteroides* utilizaram-se meios seletivos contendo diferentes antibióticos e também o meio seletivo para a produção de dextrana (item 3.7.1.). As placas de transformação foram incubadas 37°C por 12 à 18 horas. As colônias crescidas foram transferidas para meio líquido (LB) para posterior análise. Alguns meios seletivos permitem uma incubação mais longa, como o meio para a produção de dextrana, mas, os meios contendo antibióticos, podem permitir o crescimento de transformantes falso positivos, pois devido a temperatura e luminosidade os antibióticos podem perder a sua atividade.

3.17. Eletroforese em gel de agarose

Esta técnica foi utilizada na análise de DNA genômico e plasmidial monitoração dos processos de digestão

e ligação de DNA e estimativa do número de peso molecular dos fragmentos dos plasmídios estudados.

A eletroforese foi realizada sob corrente elétrica de 15 V durante a noite (cerca de 14 horas), utilizando-se géis de agarose a 0,8% em tampão de tris acetato (item 3.8.25.). Ao tampão tris-acetato, adicionou-se aproximadamente 15 μ l da solução de brometo de etídio (item 3.8.21.), para que os géis pudessem ser analisados e fotografados em transiluminador de U.V. e fotografado com câmara Polaroid com filme polaróide tipo 57.

3.18. Estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios naturais e recombinantes

Os plasmídios naturais de *Leuconostoc mesenteroides* e os recombinantes, tiveram seus pesos moleculares expressos em pares de base (b.p.), estimados de acordo com a distância de migração dos fragmentos em gel de agarose por eletroforese. A mobilidade dos fragmentos foi medida diretamente nas fotografias. Com base nas distâncias percorridas pelos fragmentos do fago λ obtidos por digestão com HindIII ou do AD5 também digerido com HindIII, foi traçado uma curva logarítmica padrão, a partir da qual foi estimado os tamanhos de todos os fragmentos de um mesmo gel.

3.19. Uso do "Kit Gene Clean" (Anônimo, 1990b)

O "Kit Gene Clean" foi utilizado para o isolamento dos fragmentos D e 550bp, após eluição do gel de agarose. O método consiste em se correr um gel de agarose, com as canaletas aumentadas para possibilitar a aplicação de grande quantidade da amostra. A eletroforese segue como no ítem 3.17. Após a localização da banda correspondente ao fragmento desejado, procedeu-se ao corte do gel, determinando-se seu peso e efetuando-se sua transferência para tubo eppendorf onde foi adicionado 2 a 3 volumes de NaI. O tubo foi incubado em banho-maria à 45°C por 2 minutos, misturado e recolocado em banho-maria até que toda a agarose fosse derretida, mas sem ultrapassar a temperatura de 50°C. Foi adicionado "Glassmilk", cerca de 5 μ l para cada 5 μ g de DNA. Misturou-se ocasionalmente, durante a incubação no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se por 5 segundos e descartou-se a solução contendo o NaI. O precipitado foi lavado com aproximadamente 500 μ l da solução "New Wash" gelada. Após completar ressuspensão das células, estas foram centrifugadas por 5 segundos e o sobrenadante, descartado. Repetiu-se a lavagem por 3 vezes. Ressuspendeu-se o precipitado (branco devido ao glassmilk) em T.E. ou água destilada. O volume de T.E. foi no mínimo igual ao volume de glassmilk (15 μ l de T.E.). Misturou-se bem e incubou-se a 45°C por 3 minutos. Centrifugou-se por 30 segundos e transferiu-se o DNA dissol-

vido no T.E. (sobrenadante) para outro eppendorf limpo. A solução resultante contém o DNA altamente purificado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de dextranas é baseada no controle e monitoração da atividade da dextrana-sacarase. Através da otimização das condições da reação de conversão da sacarose em dextrana, é possível obter frações de polímeros com diferentes pesos moleculares. Este controle ambiental tornou a linhagem B512-F, que tem um bom crescimento em produção de dextrana, praticamente a única a ser utilizada industrialmente. Assim são praticamente inexistentes relatos sobre o melhoramento de *Leuconostoc mesenteroides*, pouco se conhecendo sobre a sua biologia e propriedades genéticas.

No presente trabalho, considerando a possibilidade de melhorar geneticamente esta espécie, obedecemos a sequência de atividades conforme relatado a seguir.

4.1. Isolamento e purificação de linhagens produtoras de dextrana

A ocorrência de contaminação de usinas de açúcar e álcool por *Leuconostoc mesenteroides*, é fato bem conhecido especialmente pelos danos que podem acarretar ao processo. Contudo, esta contaminação oferece a oportunidade de isolamento de linhagens com ampla variação genética, o que é imprescindível para um programa de seleção e melhoramento. Conforme JEANES (1952), vários meios seletivos podem ser utilizados, tanto para o crescimento, como para a purificação, embora não revelem a capacidade de produção de dextrana das linhagens. Esses meios foram utilizados neste trabalho (item 3.3) permitindo obter uma coleção de isolados, complementada por linhagens cedidas pelo Instituto Zimotécnico da ESALQ/USP.

A identificação rápida e eficiente de linhagens produtoras de dextrana, requereu a elaboração de um meio seletivo no qual fosse possível, durante o isolamento, diagnosticar as linhagens com alta e baixa capacidade de produção de dextrana. Isto foi conseguido acrescentando-se o corante Púrpura de Bromocresol (30 mg/l) ao meio com 50 g/l de sacarose (item 3.7.1). As colônias crescidas neste meio, em decorrência da atividade da enzima dextrana-sacarase, promoveu a diminuição do pH do meio, formando-se um halo de cor amarela, com forte contraste com a cor púrpura do meio.

Esta reação comprova a hipótese de OLMO (1983) quanto a natureza indutiva da enzima dextrana-sacarase. Em meios com outras fontes de carbono excetuando-se a sacarose, esta reação não se verifica, e até o presente não se conhece outras substâncias que possam substituir a sacarose convenientemente. Como se observa na Figura 4, é bastante evidente que existem linhagens de bom crescimento, e incapazes de produzir halos. Dentre as linhagens que produzem halos, existe variação quanto a este caráter, o que permite a identificação preliminar de linhagens alto e baixa produtoras. As linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* que aparecem na Figura 4, são aquelas que foram selecionadas e caracterizadas para a continuidade deste trabalho.

A linhagem MH4.1 é produtora de dextrana de bom crescimento na ausência de sacarose, fato este fundamental para isolamento e purificação de DNA, como será visto posteriormente. As demais linhagens MH8.1, MH8.2 e L2 apresentam um bom crescimento e menor capacidade de produção de dextrana. A linhagem Z2 foi a selecionada dentre aquelas cedidas pelo Instituto Zimotécnico ESALQ/USP. A linhagem 8 apresentou um crescimento lento na ausência de sacarose e boa capacidade de produção de dextrana. Dados referentes a avaliação e caracterização destas linhagens são apresentados a seguir.

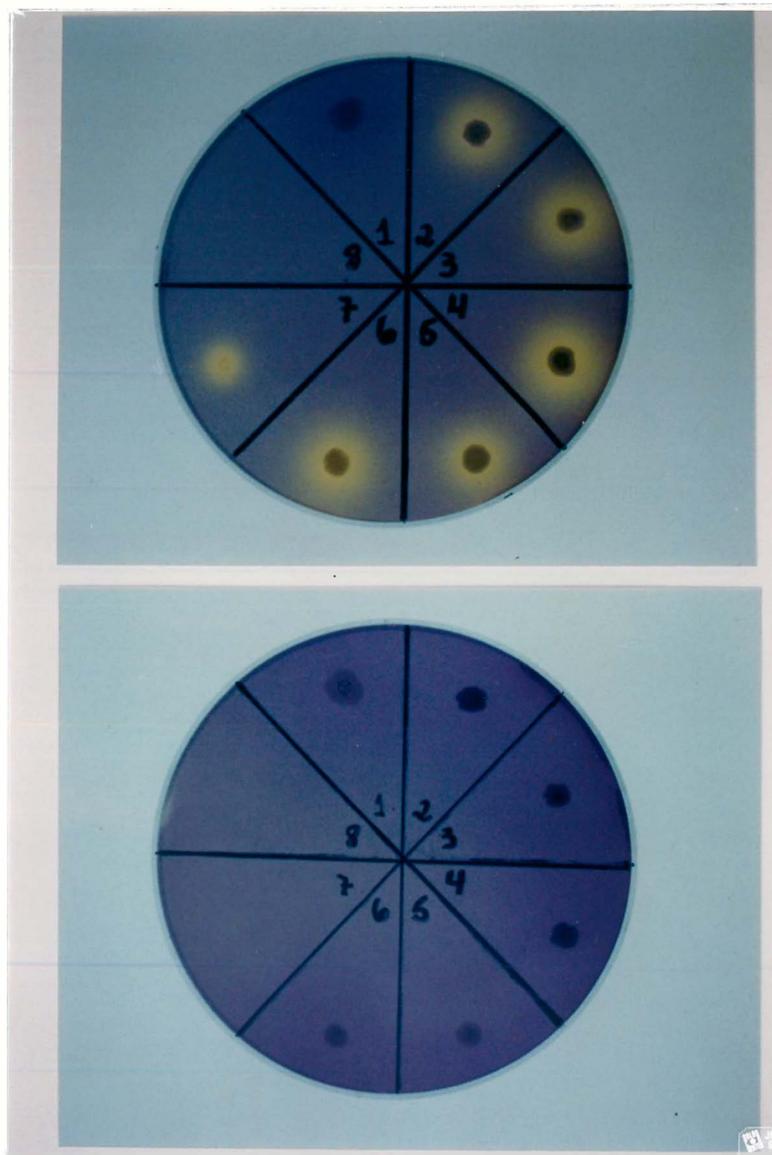


Figura 4. Meio seletivo para linhagens produtoras de dextrana com 5% sacarose e 30 mg/l de Púrpura de Bromocresol, em contraste com o mesmo meio sem sacarose. Os números correspondem às linhagens: *E. coli* DH5 α (1); *Leuconostoc mesenteroides* MH4.1(2); *L.m.* MH8.1 (3); *L.m.* MH8.2(4); *L.m.* L2(5); *L.m.* Z2 (6); *L.m.* 8 (7) e não inoculado (Branco) (8).

4.2. Avaliação da produção de dextranas

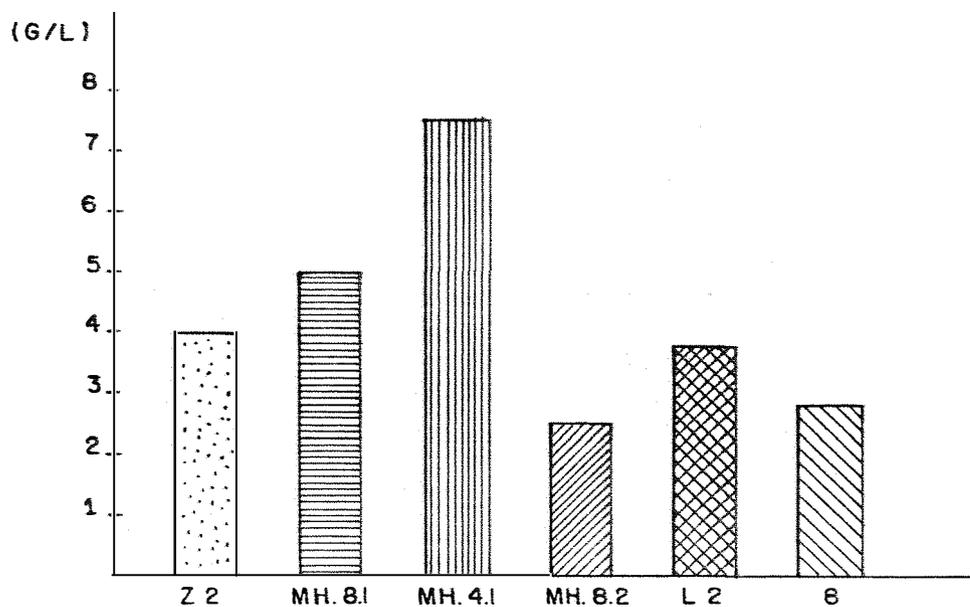
Seguindo-se os métodos de crescimento celular, extração, purificação (item 3.4) e dosagem de dextranas produzidas (item 3.5), procurou-se avaliar quantitativamente a produção daquelas seis linhagens selecionadas. Os resultados assim podem ser comparados àqueles de JEANES (1965a) realizados em frascos de Erlenmeyer. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 6 e Figura 5 e correspondem a médias de três repetições. Como se pode observar, as linhagens selecionadas, apresentam diferentes quantidades de dextrana, destacando-se a linhagem MH4.1, que produz quase o dobro em relação a linhagem Z2, esta a mais produtiva da coleção do Instituto Zimotécnico ESALQ/USP. Coincidentemente a linhagem MH4.1, apresenta também bom crescimento na ausência de sacarose, o que facilita a manipulação de suas células.

Para avaliação de linhagens industriais, destacam-se como fatores biológicos de maior interesse o crescimento e a reprodução (WANG et alii, 1979). O crescimento celular para ser otimizado depende da disponibilidade de oxigênio dissolvido além dos nutrientes e condições físico-químicas adequadas do meio. A formação de dextranas interfere com esses fatores devido ao aumento da viscosidade, limitando o crescimento celular. Por esta razão procurou-se avaliar o crescimento acompanhando a cinética

da formação do produto, o que exigiu desenvolver um equipamento para arejar a massa líquida com menor consumo de energia, dispensando-se a agitação e aproveitando as propriedades de decantação das células envoltas em dextrana.

Tabela 6. Avaliação de linhagens quanto a produção de dextrana.

Linhagens (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	Produção de dextrana (g/l)
Z1	4,0
MH8.1	5,0
MH4.1	7,6
MH8.2	2,6
L2	3,8
8	2,8



LINHAGENS DE LEUCONOSTOC MESENERÓIDES

Figura 5. Quantidade de dextrana produzida (g/l) por diferentes linhagens selecionadas. Processo clássico de fermentação (JEANES, 1965a).

4.3. Avaliação do processo de produção de dextrana, em fermentador com sistema simplificado de aeração

A avaliação da produção de dextrana em frasco de Erlenmeyer é dificultada devido ao aumento da viscosidade. Considerando-se a possibilidade de aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido e com isso aumentar a eficiência de conversão do substrato, construiu-se um protótipo de fermentador para arejamento contínuo do meio (Figura 3). Neste procedeu-se a avaliação da capacidade de produção de dextrana pela linhagem MH4.1, o que forneceu as bases para o desenvolvimento do fermentador Aeróbico Multiuso (TAVARES, 1989).

No protótipo de fermentador (Figura 3), obedecendo-se as condições descritas no item 3.6 para os parâmetros de fermentação, foi feita a avaliação da linhagem MH4.1. Os dados apresentados graficamente na Figura 6, correspondem ao crescimento celular, o qual aconteceu com a velocidade máxima de $428,5 \text{ cels.h}^{-1}$. A fase estacionária foi atingida após seis horas, como monitorado tanto pela densidade ótica (D.O.) como pelo número de células. A correlação entre estas medidas foi de 0,9867, indicando que a medida da D.O. é representativa para avaliação indireta do número de células. O processo de fermentação foi acompanhado durante 30 horas, período em que obtiveram-se os dados de pH, oxigênio dissolvido, D.O., produção de dextrana e variação de temperatura, conforme apresentado na Tabela 7.

Os resultados indicam que a produção máxima de dextrana (22,5 g/l) foi atingida por volta das 8 horas. Observou-se que com o esgotamento da sacarose disponível ocorreu redução da quantidade de dextrana em tempos mais prolongados. O máximo de produção de dextrana estimado pela D.O., também correspondeu ao tempo aproximado de 8 horas (Figura 7). O coeficiente de correlação da D.O. com a produção de dextrana foi de 0,73.

A variação de temperatura e pH durante a fermentação, encontra-se representada na Figura 8, onde se observa um aumento da temperatura correspondente ao aumento da população celular e estabilização subsequente. Os dados de pH, mostraram queda com posterior estabilização. Os dados correspondentes a oxigênio dissolvido (Figura 9), apresentaram uma curva sigmoideal, onde se verifica um decréscimo no correspondente a fase ativa de crescimento celular mas ainda restando cerca de 20% de oxigênio disponível nesta fase. Ao tempo de 8 horas, correspondente ao início da fase estacionária, como verificado para as outras mensurações, aumentou significativamente a quantidade de oxigênio dissolvido, o que já ocorreu em meio de alta viscosidade. Em torno de 18 horas, verifica-se ter se reduzido a quantidade de oxigênio dissolvido, possivelmente devido a metabolização de parte da dextrana produzida, como mencionado anteriormente. Estes dados são concordantes com os valores apresentados na Figura 10 para produção de dextrana.

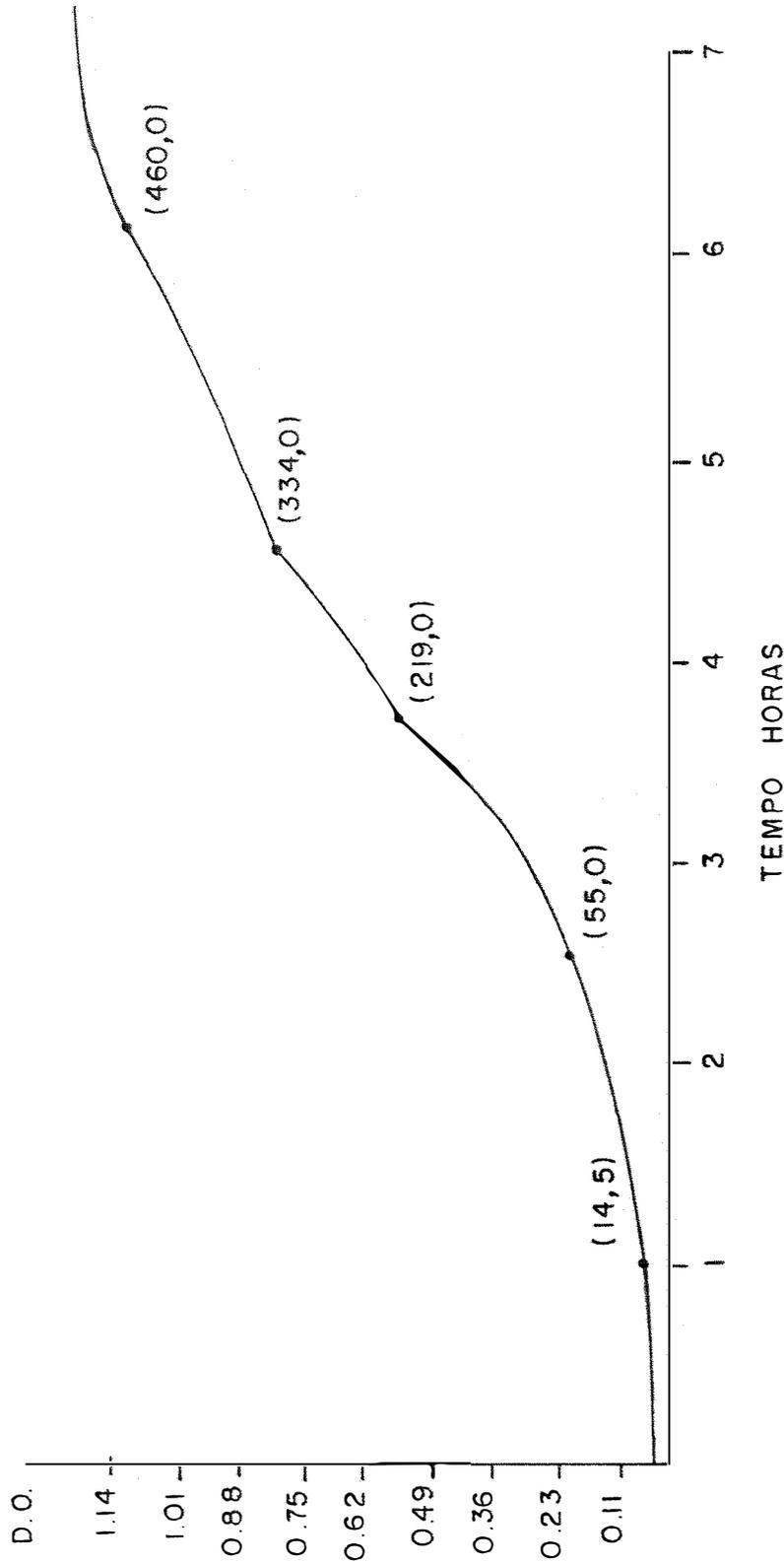


Figura 6. Curva de crescimento da linhagem MH4.1. Os valores entre parênteses correspondem ao número de células por ml $\times 10^{+7}$ para os respectivos pontos medidos na curva nos tempos em que foi feita a determinação. Coeficiente de correlação entre D.O. e n^o de células - $r = +0,9867$

Tabela 7. Avaliação de parâmetros da fermentação da linhagem MH4.1 em fermentador com aeração facilitada (Fig. 3).

Tempo	Temperatura (°C)	pH	Parâmetros avaliados		
			Oxigênio dissolvido (ppm O ₂)	Densidade óptica (absorbância)	Produção de dextrana (g/l)
0	28	5,5	0,50	0,23	2,5
1	29	5,2	0,25	-	-
2	30	4,9	0,25	0,25	10,5
3	30	4,7	0,20	-	-
4	31	4,6	0,13	0,28	12,5
5	31	4,5	0,13	-	-
6	32	4,4	0,12	0,30	17,5
7	32	4,3	0,12	-	-
8	32	4,1	0,10	0,40	22,5
9	32	3,9	0,10	-	-
19	33	3,7	0,70	0,29	17,5
20	33	3,6	0,60	-	-
24	33	3,6	0,60	-	-
25	33	3,6	0,50	0,24	17,5
26	33	3,5	0,50	-	-
30	33	3,5	0,50	0,24	17,5

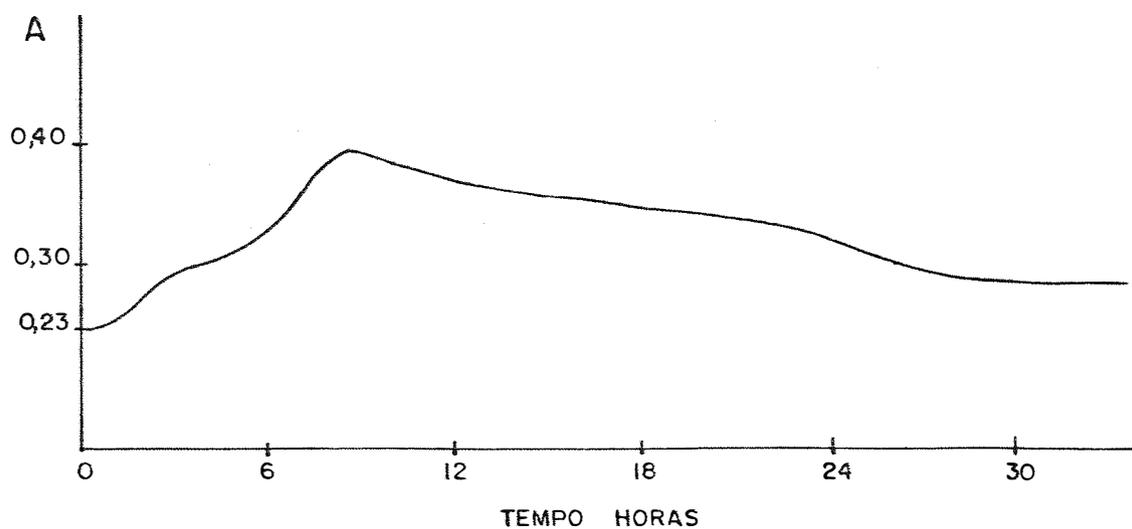


Figura 7. Densidade Óptica (absorbância), durante o processo de produção de dextrana pela linhagem MH4.1.

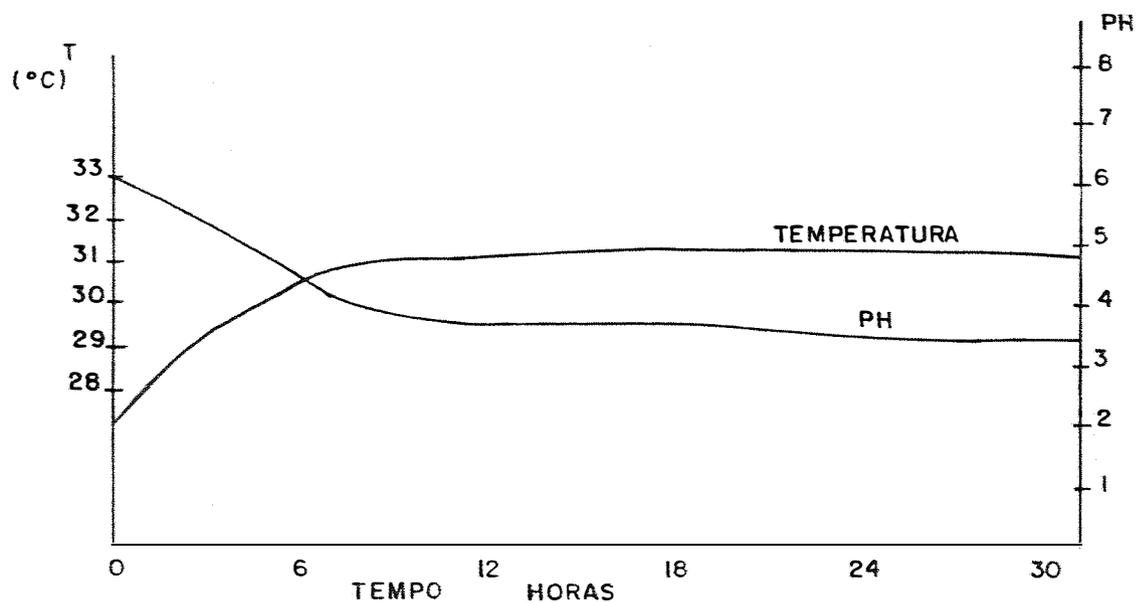


Figura 8. Variação da temperatura (°C) e do pH, durante o processo de produção de dextrana pela linhagem MH4.1.

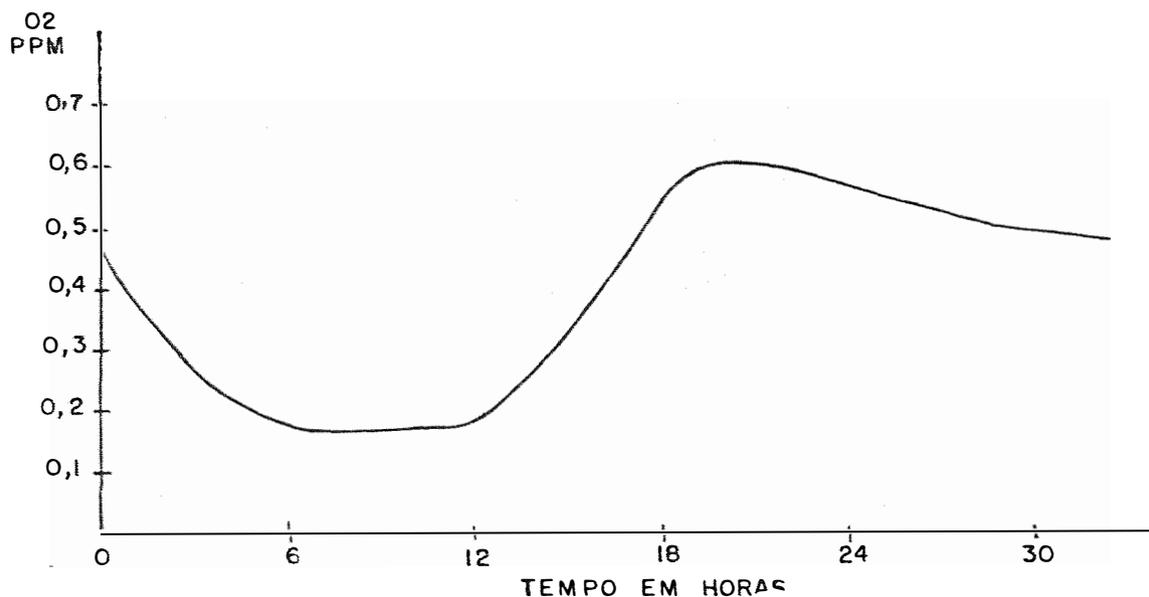


Figura 9. Variação da taxa de oxigênio (ppm) dissolvido no meio durante o processo de produção da dextrana pela linhagem MH4.1.

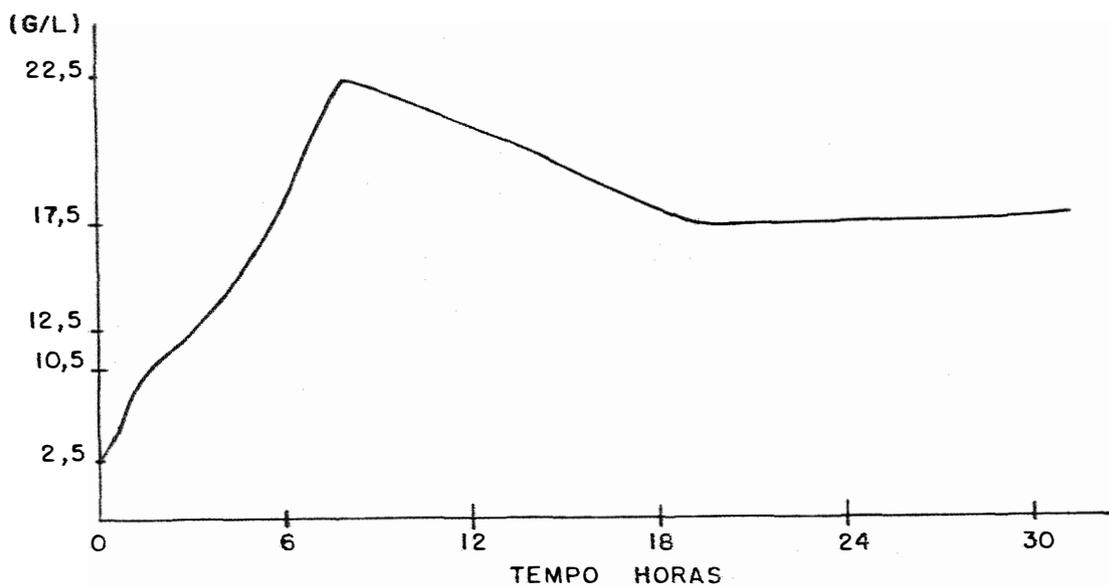


Figura 10. Produção de dextrana pela linhagem MH4.1, no processo de fermentação com aeração facilitada desenvolvido no protótipo de fermentador (Fig. 5).

A fermentação foi monitorada por um tempo de 30 horas, quando avaliou-se a produtividade e o rendimento. Considerando que o meio continha um teor de sacarose de 10% ($S = 100 \text{ g/l}$), e que o volume útil do reator foi de 4 litros, estimamos para as condições estudadas, que a produtividade foi de $1,5 \text{ g/l/h}$ e o rendimento de 41%. Esses valores são superiores àqueles obtidos por JEANES (1965a) com a linhagem NRRL-B512-F no processo clássico de produção de dextrana.

Considerando a produção de dextrana pela linhagem MH4.1, pelo processo clássico de Jeanes e no protótipo de fermentador utilizado, pode-se dizer que o aumento significativo de produção de $7,5 \text{ g/l}$ para $17,5 \text{ g/l}$ são decorrente das melhores condições do processo fermentativo, especialmente quanto a disponibilidade de oxigênio dissolvido.

A linhagem MH4.1 selecionada foi avaliada nestas condições descritas e teve algumas de suas características genéticas definidas, como se descreve a seguir.

4.4. Desenvolvimento de metodologia de extração de DNA genômico e DNA plasmidial de *Leuconostoc mesenteroides*

A obtenção de boas preparações de DNA depende da lise celular. A espécie *L. mesenteroides* com sua cápsula

de dextrana apresenta dificuldades ao rompimento da parede celular e por esta razão, várias técnicas foram propostas com esta finalidade.

CHASSY & GIUFFRIDA, 1980 sugeriu que bactérias da família Lactobacillaceae poderiam ser resistentes à lisozima e ORBERG & SANDINE (1984) conseguiram aumentar a eficiência de lise celular com o uso da mutanolysina após tratamento com lisozima.

Na tentativa de obter boas preparações de DNA, testamos enzimas hidrolíticas previamente ao uso da lisozima, mas os melhores resultados foram obtidos utilizando meios sem sacarose (item 3.7.3), capazes de promover bom crescimento celular e evitando a formação de dextranas, como acontece nos meios onde a fonte de carbono é a sacarose (JEANES, 1952; JEANES, 1973 e JEANES et alii, 1954 e 1965a). Os procedimentos adotados, favorecem também ao aumento da quantidade relativa de DNA plasmidial obtido em decorrência do crescimento lento observado nos meios empregados (PRITCHARD et alii, 1975; KORNEBERG, 1980; ENGBERG & NORDSTRÖM, 1975 e COLLINS & PRITCHARD, 1973). Com a padronização do inóculo (3 g/l), permitiu-se conciliar o aproveitamento do tempo e obtenção no dia seguinte de culturas no final da fase exponencial de crescimento, favorecendo a lise e obtenção de maior quantidade de DNA (KLAENHAMMER et alii, 1978).

A quantidade de células utilizadas tanto no método para extração de DNA genômico como no método de extração de DNA plasmidial, foi muito importante para o sucesso dos dois processos. Um excesso de células frequentemente leva a uma lise pobre, porque a digestão da parede celular se mostra insuficiente com lisozima em curto período de incubação (KLAENHAMMER et alii, 1978). A escassez de células também se mostra inadequada, porque a quantidade de DNA recuperado é muito pequena. A quantidade de células utilizada no método de extração de DNA genômico (item 3.9), mostrou ser apropriada, para uma boa lise celular, e conseqüentemente, a obtenção de boa concentração de DNA genômico. Para a precipitação de proteínas foi utilizado 5M (molar) de perclorato de sódio. O procedimento foi bem sucedido mas, a densidade da fase ácida ficou menor que a fase aquosa tornando inconveniente a coleta da fase aquosa após centrifugação. Esse problema foi resolvido pela adição de uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1, v/v) depois de colocado o perclorato de sódio, seguido por uma breve agitação e centrifugação do material. A maior densidade da fase orgânica, assim obtida, mobilizou a fase aquosa para o topo facilitando sua remoção. Seguindo-se a metodologia descrita nos itens 3.9, 3.17 e 3.18, foram obtidas as fotos de geis de agarose (Figura 11). Como se observa o método de extração de DNA genômico das linhagens MH4.1, MH8.1, MH8.2, L2, Z2 e 8, foi eficiente, mas a presença de

RNA, denotada pelos rastros no final da corrida eletroforética foi facilmente eliminado com o tratamento prévio das amostras com a enzima RNAase.

Como resultado do crescimento celular em meio sem sacarose e seguindo-se aos procedimentos de extração de DNA plasmidial mencionados no item 3.10, identificou-se na linhagem MH4.1 os plasmídios correspondentes a 2,1 Kb e 52,0 Kb (Figura 12). Esses resultados estão de acordo com ORBERG & SANDINE, 1984a que relatou a presença de dois plasmídios de DNA na espécie *Leuconostoc mesenteroides* (linhagem 98).

A purificação do DNA plasmidial através de gradiente de densidade em cloreto de céσιο, foi facilitada devido a elevada quantidade e pureza de DNA extraído, o que pela metodologia convencional de extração, com lise celular, por detergente em condições alcalinas, é prejudicado pela contaminação por fragmentos de DNA cromossomal lineares, ou fragmentos de plasmídios linearizados.

Como se observa na Figura 13A, padrões evidentes de plasmídios circulares foram obtidos nesta purificação em cloreto de céσιο (item 3.11). Mas, mesmo sem esta purificação, é possível efetuar a determinação do conteúdo de DNA plasmidial, como pode ser observado na Figura 12. Apesar disto, apresenta-se na Figura 13B o perfil eletroforético dos plasmídios encontrados nas diferentes linhagens. As bandas inferiores que foram retiradas dos

tubos de gradiente de densidade, apresentam plasmídios circulares de tamanhos variados conforme visualizado na Figura 13B. Os mesmos plasmídios digeridos com a enzima EcoRI aparecem na mesma figura com diferentes padrões de bandas, o que demonstra a sua natureza diferente. Estes resultados comprovam que realmente tais plasmídios embora diferentes, devido a sua conformação molecular, situaram-se na mesma posição do gradiente (BRODA, 1979).

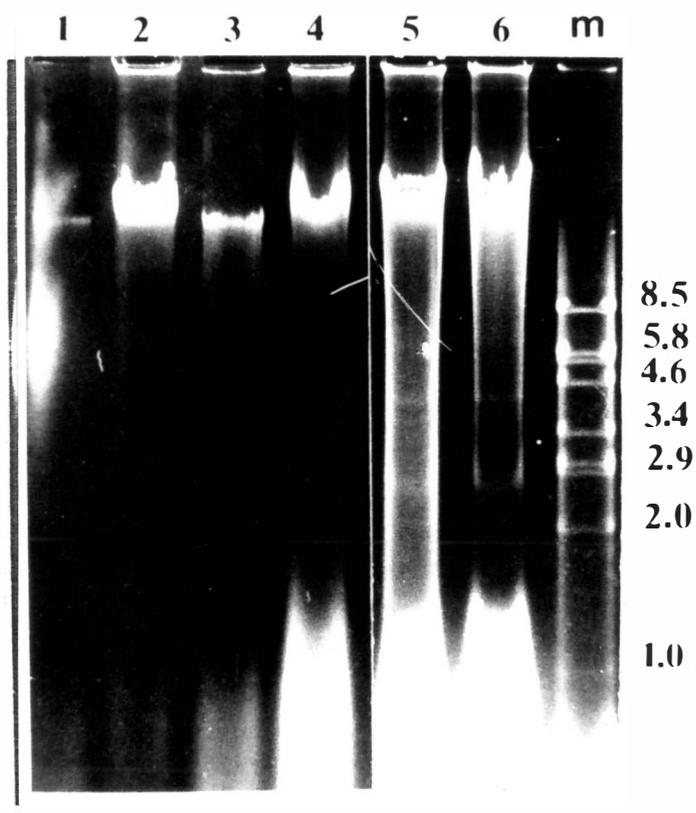


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose das amostras obtidas através do método de extração de DNA genômico de *Leuconostoc mesenteroides*. 1 - linhagem 8; 2 - linhagem MH8.1; 3 - linhagem MH8.2, 4 - linhagem Z2; 5 - linhagem MH4.1; 6 - linhagem L2; m - marcador vírus AD5 digerido com a enzima HindIII, gerando fragmentos de tamanhos 8,5 Kilobases (Kb), 5,8 Kb; 4,6 Kb; 3,4 Kb; 2,9 Kb; 2,0 Kb e 1,0 Kb.

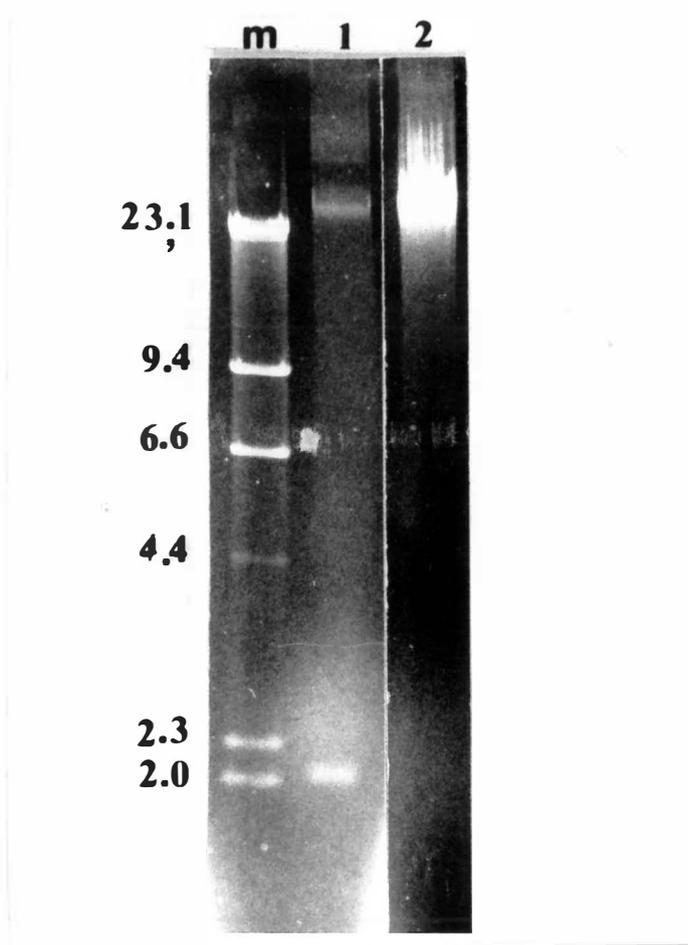
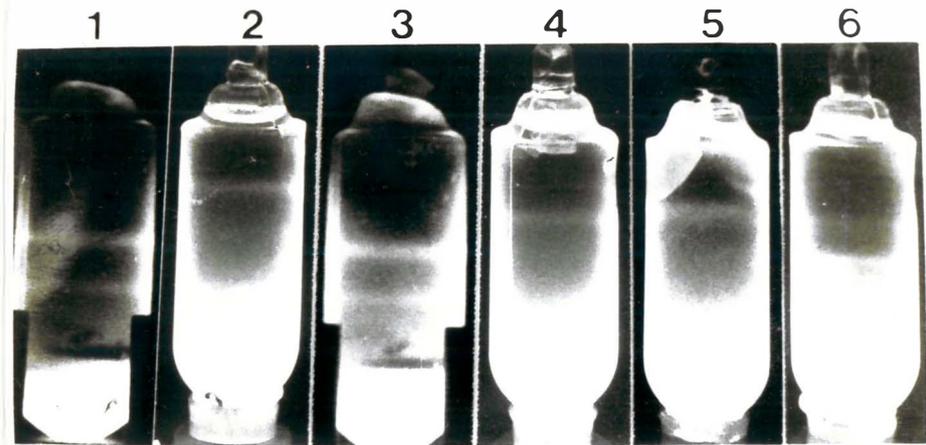
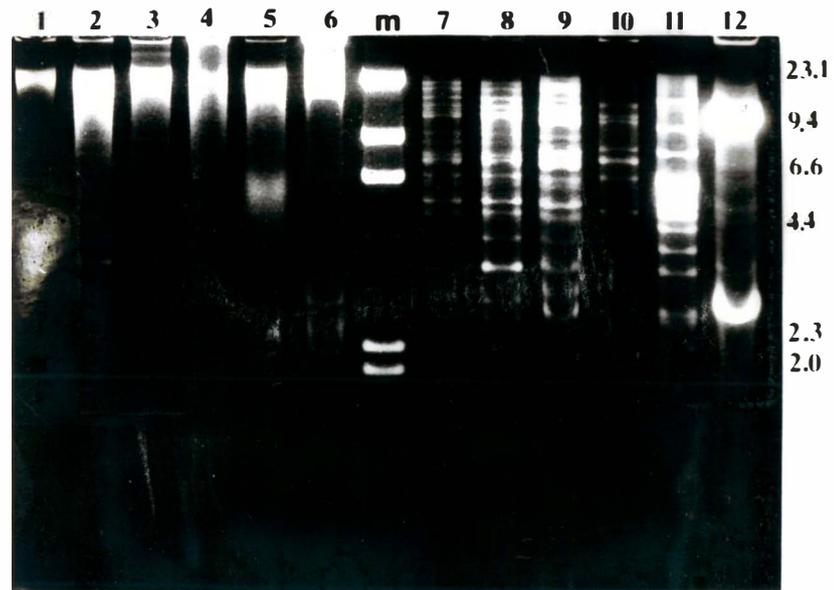


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose. 1 - método de extração de DNA plasmidial da linhagem MH4.1, mostrando a presença de dois plasmídios: superior 52,0 Kb e inferior 2,1 Kb; 2 - método de extração de DNA genômico da linhagens MH4.1; m - marcador: fago λ digerido com a enzima HindIII, gerando fragmentos de tamanhos 23,1 Kb; 9,4 Kb; 6,6 Kb; 4,4 Kb; 2,3 Kb e 2,0 Kb.



A



B

Figura 13. A - Purificação do DNA plasmidial por gradiente de densidade com cloreto de césio. 1 - linhagem MH4.1; 2 - linhagem MH8.1; 3 - linhagem MH8.2; 4 - linhagem L2; 5 - linhagem Z2; 6 - linhagem 8. B - perfil eletroforético de plasmídios obtidos na banda inferior da purificação com cloreto de césio para as diferentes linhagens analisadas.

4.5. Transformabilidade do material genético de *Leuconostoc mesenteroides*

Pouco se conhece até o presente sobre a genética do gênero, economicamente importante, *Leuconostoc* (TSAI & SANDINE, 1987). Recentemente alguns trabalhos demonstraram que a conjugação em *Leuconostoc* podem ocorrer (SANDINE et alii, 1987), e que o transposon Tn 919 pode ser conjugativamente transferível para *L. mesenteroides* (HILL et alii, 1985).

Para estudar o processo de conjugação entre espécies de *Leuconostoc*, PUCCI et alii (1988) escolheram os plasmídios pIP 501, o qual foi originalmente isolado de *Streptococcus agalactiae* (HORODNICENU et alii, 1976) e contém as marcas de resistência a eritromicina e cloranfenicol. Também utilizaram o plasmídio pAM β 1 (CLEWELL et alii, 1974), o qual contém o gene de resistência a eritromicina. O plasmídio pIP501, pode ser transferido para várias espécies bacterianas (TOBIAN & MACRINA, 1982) e o plasmídio pAM β 1, pode ser transferido para espécies lácticas streptococcicas (GASSON & DAVIES, 1980; HERSHIFIELD, 1979 e LEBLANC et alii, 1978), *Staphylococcus aureus* (LANDMAN, 1980), *Bacillus subtilis* (ENGEL et alii, 1980) e *Lactobacillus casei* (GIBSON et alii, 1976). PUCCI et alii (1988) caracterizaram a transferência desses plasmídios, como sendo o processo de conjugação, e que ele pode ser intra ou intergenérico entre *Leuconostoc* e *Sptreptococcus*.

Em 1974 REINBOLD & REDDY, observaram que duas linhagens de *L. dextranicum* eram resistentes a vancomicina, e TSAI & SANDINE (1987), utilizou essa característica como marca seletiva em estudos de transferência de plasmídios. KEMPLER & MCKAY (1981) apresentou resultados evidenciando que algumas propriedades metabólicas de *Streptococcus diacetylactys* parecem ser governadas em parte por DNA associado a elementos extracromossomais. No mínimo seis plasmídios, podem ser associados com a habilidade fermentativa da lactose, atividade de proteinase e habilidade para utilização de citrato. O'SULLIVAN & DALY (1982) foram os primeiros a evidenciar a presença de DNA plasmidial no gênero *Leuconostoc*. ORBERG & SANDINE (1984b) concluíram que a complexidade plasmidial de *Leuconostoc* sp., é mais um aspecto na semelhança entre essas bactérias e aquelas streptococci lácticas. Especula-se que uma futura manipulação genética dessas culturas usadas em laticínios e indústrias de vinho, possam envolver transferência de material genético entre esses dois grupos microbianos.

A genética da produção de dextrana é totalmente desconhecida, e a maior parte das informações disponíveis referem-se a enzima dextrana-sacarase, responsável pela produção da dextrana. Sabe-se que esta enzima é extracelular e que as atividades sacarase e transferase ocorrem em sítios distintos na enzima. A enzima possui uma estrutura dimérica e seu peso molecular varia de 130.000 à

133.000. Quando são dissociadas com tratamento alcalino (pH 10,5), produzem dois monômeros de peso molecular variando de 64.000 à 68.000 (KOBAYASHI et alii, 1985b).

Neste trabalho considerou-se que o sucesso dos processos de transformação dependeriam principalmente do desenvolvimento de métodos seletivos eficientes. Portanto, com o desenvolvimento do meio seletivo (item 3.7.1) capaz de identificar linhagens produtoras de dextrana-sacarase, e com a adequação dos métodos de extração de DNA genômico e plasmidial de *Leuconostoc mesenteroides*, foi possível tentar clonar o gene da enzima produtora de dextrana. Neste foi utilizado o método de clonagem tipo "shot gun", onde está envolvida a clonagem de fragmentos ao acaso. A linhagem utilizada foi a MH4.1 e o isolamento do DNA genômico se deu de acordo com o método descrito no item 3.9. O DNA genômico foi digerido independentemente com as enzimas de restrição HindIII, BamHI, EcoRI e Sau3A, de acordo com o item 3.13, sendo que a digestão total com HindIII, BamHI e EcoRI e a parcial com Sau3A, foram monitoradas em eletroforese de mini-gel de agarose.

Os fragmentos foram ligados ao vetor, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição, segundo o item 3.13) e células hospedeiras competentes (item 3.15) de *E. coli*, foram transformadas com o DNA ligado ao vetor (itens 3.14 e 3.16) e selecionadas em meios adequados. Diferentes combinações de vetor-hospedeiro e meio seletivo foram

testados, como: o vetor pBR 322 transformando a linhagem JM83 (*E. coli*) em meio seletivo contendo ampicilina e réplica em tetraciclina (item 3.8.3); o vetor pUC 18 transformando a linhagem LE 392 (*E. coli*), em meio seletivo contendo ampicilina e X-Gal (item 3.8.9); e o vetor pUC 19, transformando a linhagem DH5 α (*E. coli*) em meio seletivo com ampicilina e X-Gal.

O sistema contendo o vetor pUC 19 e DH5 α , de acordo com os métodos descritos acima, apresentou uma eficiência de transformação de 8×10^6 colônias transformadas por μg (micrograma) de pUC19. Essa alta eficiência de transformação fez com que esse sistema fosse utilizado durante todo esse trabalho. Todos os transformantes foram testados em meio seletivo (item 3.7.1) para a produção da enzima dextrana sacarase. Apesar da grande quantidade de transformantes obtidos, não foi possível identificar nenhum transformante produtor da enzima. Considerando, que o tratamento do DNA genômico com a enzima de restrição possa ter interrompido a sequência de informação para o gene da dextrana-sacarase, foi tentado clonar o gene utilizando o DNA genômico sem digestão enzimática. Com esse procedimento, a eficiência de transformação foi de 5×10^6 colônias por μg de pUC19, mas também não se conseguiu nenhum transformante capaz de produzir a enzima dextrana-sacarase.

Considerando a possibilidade de localização dos genes nos plasmídios, procurou-se fazer a transformação com DNA plasmidial. Para isto, com a adequação dos métodos de extração de DNA plasmidial e purificação por bandamento de cloreto de céσιο (ítems 3.10 e 3.11) (Figura 13A) ficou comprovada a existência de dois plasmídios na linhagens MH4.1 de tamanhos 52 Kb e 2,1 Kb (Figura 13B). Partiu-se para o estudo do plasmídio 52 Kb. Primeiramente, submetendo-se a digestão com as enzimas EcoRI, BamHI e HindIII (ítems 3.10 e 3.13), cujo padrão de restrição para cada uma das enzimas é apresentado na Figura 14. Analisando-se os fragmentos (item 3.18) pode-se concluir que a enzima EcoRI tem a capacidade de digerir o plasmídio 52 Kb gerando 5 fragmentos bem distintos, de tamanhos estimados em: fragmento A = 19,0 Kb; B = 16,5 Kb; C = 12,6 Kb; D = 3,6 Kb e E = 3,0 Kb. As enzimas BamHI e HindIII apresentam fragmentos resultantes de digestão parcial, o que dificulta a análise de restrição com essas enzimas.

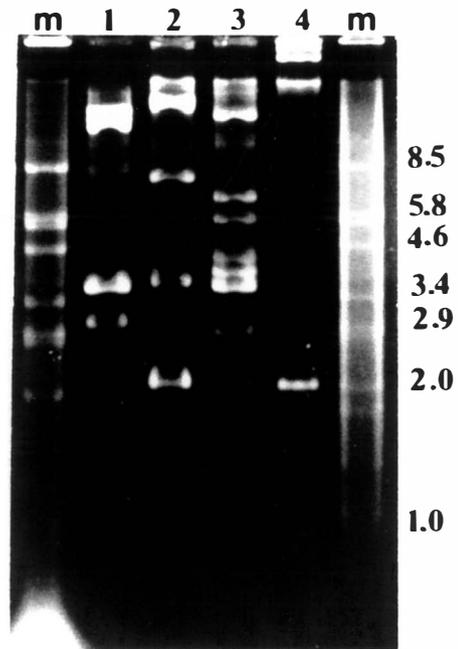


Figura 14. Análise do plasmídio de *Leuconostoc mesenteroides* 52 Kb (pLm 52). m - marcador AD5 digerido com HindIII; 1 - pLm 52 digerido com EcoRI; 2- pLm 52 digerido com BamHI; 3 - pLm 52 digerido com Hind III; 4 - pLm 52 não digerido (banda superior) e plasmídio 2,1 Kb (banda inferior); os dois plasmídios da linhagem MH4.1.

Na construção do mapa de restrição do plasmídeo 52 Kb, os 5 fragmentos originados da digestão com EcoRI foram subclonados em DH5 α , ligados em pUC19 no sítio de restrição para EcoRI (item 3.16). Os resultados das transformações estão mostrados na Tabela 8, onde são apresentados resultados referentes a um total de 10 transformações realizadas durante todo esse trabalho. Foram obtidas 203 colônias contendo o plasmídeo recombinante. Como se observa na Tabela 8 a coluna 1 se refere aos transformantes contendo o plasmídeo pUC19 recombinado com apenas um dos fragmentos do plasmídeo 52 Kb originados da digestão com EcoRI (foram subclonados os fragmentos B, C, D e E); a coluna 3 se refere aos transformantes contendo múltiplos fragmentos do plasmídeo 52 Kb; a coluna 2 se refere aos transformantes contendo o plasmídeo original (pUC 19) sem inserção de DNA plasmidial exógeno e a coluna 4 refere-se aos transformantes contendo fragmentos desconhecidos.

Os transformantes contendo os fragmentos B, C, D e E do plasmídeo 52 Kb individualizados foram denominados respectivamente T36, T51, T19 e T28 e foram utilizados para o mapeamento do plasmídeo 52 Kb. Não foi possível subclonar o fragmento A apesar do número de transformações efetuadas, talvez, devido ao seu tamanho (19,0 Kb).

Tabela 8. Transformações efetuadas com fragmentos do plasmídeo 52Kb após digestão com EcoRI e ligação no plasmídeo pUC19 e transformação em *E. coli* DH52.

Transformação	Número de colônias		Tipos de inserção				Efi ência de transformação (colônia/ μ g DNA)
	brancas	azuis	01	02	03	04	
1	6	281	0	3	2	1	$1,4 \times 10^6$
2	12	303	0	11	1	0	$1,5 \times 10^6$
3	24	260	6	16	0	2	$1,4 \times 10^6$
4	24	282	4	18	2	0	$1,3 \times 10^6$
5	24	275	2	19	2	0	$1,4 \times 10^6$
6	24	287	2	14	5	3	$1,4 \times 10^6$
7	24	284	1	21	2	0	$1,4 \times 10^6$
8	24	280	0	22	1	1	$1,4 \times 10^6$
9	24	265	0	20	3	1	$1,4 \times 10^6$
10	17	184	0	15	0	2	$1,4 \times 10^6$
Total	203	2701	15	159	19	10	

Na análise dos transformantes pode-se observar a alta frequência de transformação do fragmento D. Entre os 19 transformantes contendo fragmentos múltiplos, cerca de 14 continham o fragmento D (3,6 Kb) e dentre os 15 transformantes com apenas um fragmento, verificou-se que 10 correspondem a subclones do fragmento D (Tabela 8).

Pode-se observar na Figura 16 que o transformante Tzo que contém os fragmentos B, C e D, ao ser analisado por digestão com EcoRI produz três bandas referentes aos fragmentos clonados B, C e pUC 19. Estas bandas apresentam maior intensidade que aquela correspondente ao fragmento D. Estas evidências sugerem a hipótese de que o fragmento D pudesse conter origem de replicação independente daquela presente no vetor pUC 19. Com esta origem de replicação originária de *L. mesenteroides* produziria uma multiplicação diferencial do fragmento D, o que evidenciaria diferenças na intensidade destas bandas analisadas.

Para investigar sobre a hipótese de multiplicação diferencial do fragmento D, foi efetuado o seu isolamento a partir do gel de agarose utilizando-se o "Kit Gene Clean" (item 3.19). O fragmento com cerca de 3,6 Kb foi isolado e purificado, tendo sua circularização efetuada através da enzima T4 ligase (item 3.14). Após circularização comprovada em mini-gel de agarose, o plasmídeo 3,6 Kb correspondente aquele fragmento D, foi então digerido separadamente com as enzimas EcoRI, HindIII e PstI. Estes

fragmentos assim obtidos foram clonados em pUC 19 e nesta forma utilizados na transformação de células competentes de *L. mesenteroides*. Com isto esperava-se verificar que as enzimas eram capazes de alterar a origem de replicação nesta bactéria (item 3.13). A linhagem 8 de *L. mesenteroides* foi utilizada devido a sua sensibilidade a ampicilina, permitindo utilizar o meio seletivo com este antibiótico (item 3.8.2).

A eficiência da transformação foi de $1,3 \times 10^3$ colônias por μg de DNA, o que pode ser considerado como baixa eficiência, quando comparado à DH5 α , mas um resultado relevante levando em consideração as dificuldades naturais do *Leuconostoc mesenteroides*. Além de mostrar a eficiência do método de obtenção de células competentes para transformação (método 3.15) em *Leuconostoc mesenteroides* linhagem 8, os resultados sugerem que a origem de replicação do fragmento D (3,6 Kb) em *Leuconostoc mesenteroides* não pode ser alterada pelas enzimas de restrição EcoRI, HindIII e PstI.

O fragmento D (3,6 Kb) circularizado foi também utilizado para se transformar células de DH5 α competentes. Como não se conhecia nenhuma marca seletiva no fragmento D, os transformantes foram plaqueados em diferentes meios seletivos e em meio completo (2XYT) (itens 3.8.1., 3.8.2., 3.8.3., 3.8.4. e 3.8.5.).

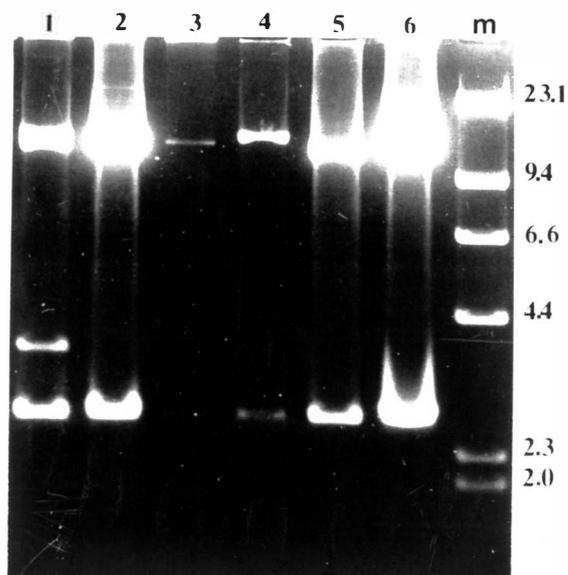


Figura 15. Perfil eletroforético dos plasmídios recombinantes de alguns transformantes. 1 - transformante (T₂₀), contendo os fragmentos B, C e D do pLm 52, e pUC19, onde pode se evidenciar que o fragmento D possui intensidade menor que B e C e pUC19 (digeridos com EcoRI); 2 - transformante T₅₀; 3 - transformante T₃₃; 4 - transformante T₃₆; 5 - transformante T₅₁; 6 - transformante T₅₄; m - marcador fago λ digerido com HindIII.

Efetutados três experimentos de transformação, com um total de 1580 colônias, efetuou-se sua avaliação nos meios LBamp, LBkm, LBcl e LDTlt onde nenhuma colônia foi capaz de crescer. No meio LB 5% sacarose com bromo cresol púrpura obteve-se o crescimento de 82 colônias incapazes de modificar a cor do meio de azul para amarelo. Devido a impossibilidade de seleção de transformantes nos meios seletivos com antibióticos ou corante efetuou-se a extração de DNA plasmidial (item 3.12), de uma amostra de 10 colônias selecionadas ao acaso a partir daquelas 1580 colônias crescidas em meio completo. Após eletroforese em gel de agarose do DNA plasmidial constatou-se em quatro colônias a presença do plasmídio 3,6 Kb correspondente ao fragmento D. Este resultado demonstra que o plasmídio é capaz de transformar DH5 α na ausência do vetor pUC19. Verificou-se portanto que o plasmídio 3,6 Kb (fragmento D) não possui as marcas de resistência aos antibióticos testados e que não forma o halo amarelo no meio seletivo para a produção de dextrana, o que é indicativo da inexistência do gene para dextrana-sacarase. O plasmídio contudo, possui algumas características que são de fundamental importância para um vetor, como a capacidade de replicar em *E. coli* e em *L. mesenteroides*, apresentar sítios conhecidos para várias enzimas de restrição e tamanho pequeno. Como desvantagem não dispõe de marca seletiva que permita a seleção de transformantes que contenham o DNA recombinante.

Entre os transformantes de DH5 α contendo fragmentos de origem desconhecida da digestão do plasmídeo 52 Kb com EcoRI, selecionou-se alguns transformantes resistentes à tetraciclina. Um desses transformantes (T41) continha um fragmento de tamanho 550 bp ligado no sítio de EcoRI ao vetor pUC 19 (Figura 16). O fragmento 550 bp foi purificado e isolado do gel de agarose com "Kit Gene Clean" (item 3.19). Após a purificação, o fragmento 550 bp (tetraciclina resistente) foi digerido com EcoRI e ligado ao plasmídeo 3,6 Kb, previamente digerido com a mesma enzima. O plasmídeo 3,6 Kb contendo o fragmento 550 bp resistente a tetraciclina, foi utilizado para transformar DH5 α , selecionando os transformantes em meio contendo tetraciclina. Nesse experimento constatou-se que a concentração para melhor eficiência de transformação com DH5 α competente é de 10-20 ng de DNA por 100 μ l de células competentes. Com essas quantidades foi possível obter uma eficiência de transformação de 5×10^6 colônias por μ g de DNA. Foi possível clonar o gene de resistência à tetraciclina, que se encontra no plasmídeo natural (52 Kb) de *Leuconostoc mesenteroides* linhagem MH4.1, e foi construído um vetor bifuncional para o *L. mesenteroides* e *E. coli*, agora sem a desvantagem antes apontada quanto a inexistência de marca seletiva.

A origem do fragmento 550 bp é desconhecida, supondo-se pertencer ao fragmento A, já que este não foi

analisado como o foram os fragmentos B, C, D e E nos quais se tem certeza da ausência desta marca de resistência (tetraciclina).

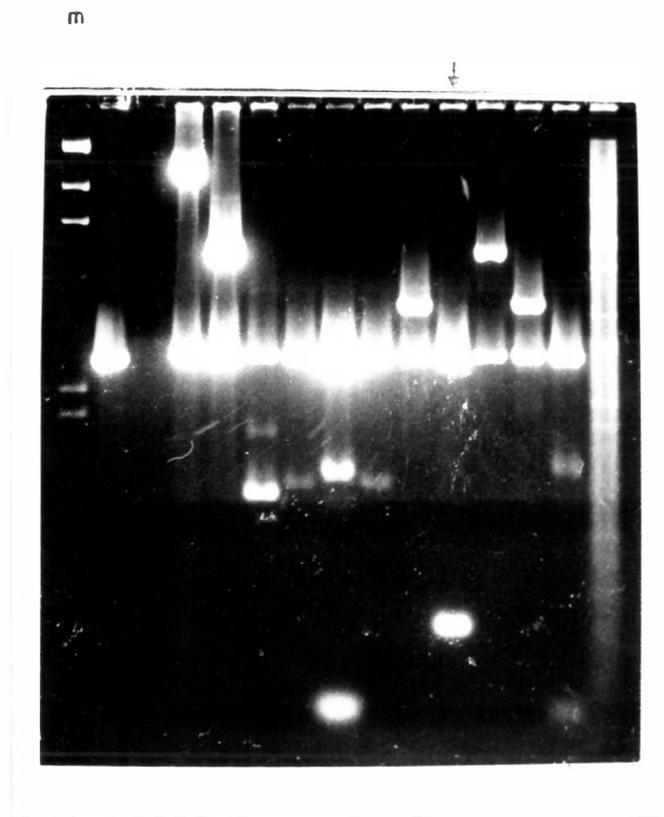


Figura 16. Perfil eletroforético dos plasmídios recombinantes de alguns transformantes resistentes à tetraciclina, sendo que a seta indica o transformante T₄₁ contendo o fragmento 550 bp; m - marcador (fago λ).

4.6. Mapeamento de sítios de enzima de restrição no plasmídeo 52 Kb da linhagem MH4.1 de *Leuconostoc mesenteroides*

4.6.1. Caracterização do plasmídeo 52 Kb da linhagem MH4.1 (pLm 52)

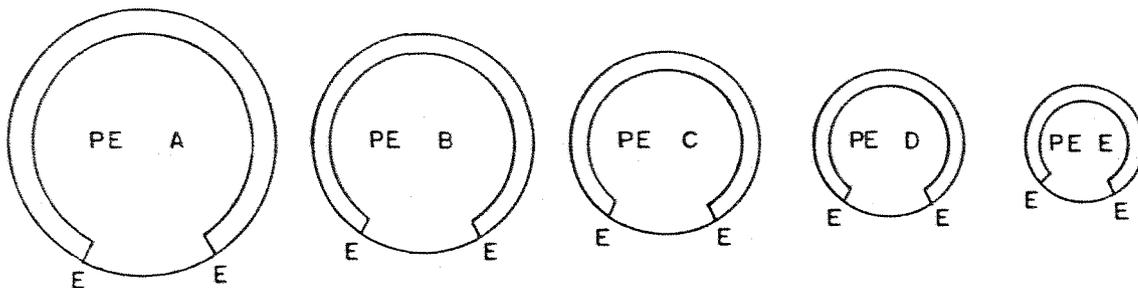
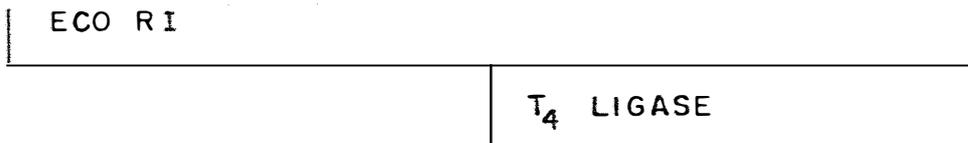
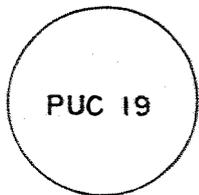
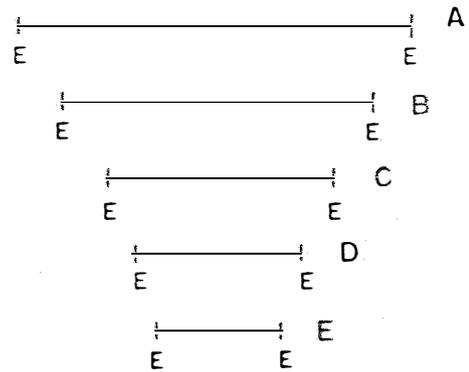
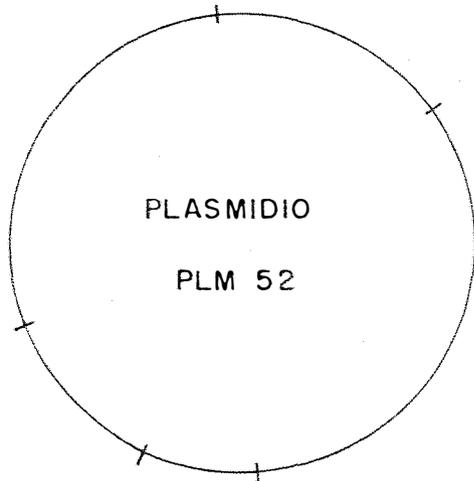
A digestão do plasmídeo 52 Kb com a enzima de restrição EcoRI, foi o primeiro passo para a subclonagem de fragmentos no plasmídeo pUC19. Cinco bandas, claramente visíveis em gel de agarose (Figura 14), foram denominadas de A à E, com os tamanhos estimados respectivamente de 19,0 Kb; 16,5 Kb; 12,6 Kb; 3,6 Kb e 3,0 Kb.

4.6.2. Subclonagem dos fragmentos EcoRI do plasmídeo 52 Kb

Os fragmentos de EcoRI do plasmídeo 52 Kb, foram ligados ao vetor pUC19, previamente digerido com EcoRI, através da enzima T₄ ligase (itens 3.13 e 3.14). Como resultado dessa ligação temos a formação de cinco plasmídios recombinantes, contendo cada um dos fragmentos. Esses plasmídios foram denominados como pEA, pEB, pEC, pED e pEE (onde p indica plasmídeo, E para EcoRI e A, B, C, D e E indicam os fragmentos inseridos ao plasmídeo original pUC 19. O esquema a seguir ilustra as etapas e os resultados do

método utilizado para se obter os subclones do plasmídio 52 Kb de *Leuconostoc mesenteroides* linhagem MH4.1.

DIGESTÃO COM E_{CO}R I GERANDO 5 FRAGMENTOS



OBTENÇÃO DE 5 PLASMÍDIOS RECOMBINANTES

4.6.3. Caracterização dos plasmídios recombinantes

O vetor puc 19 foi utilizado na obtenção dos subclones devido a facilidade que ele oferece para identificação dos transformantes em meio seletivo 2XYT contendo ampicilina e X-gal (itens 3.7.5., 3.8.2 e 3.8.9). É sabido que o vetor pUC19 expressa o fragmento amino terminal do produto do gene lac Z (β -galactosidade) e quando o hospedeiro (DH5 α) é transformado com esse vetor, sem nenhuma inserção, ele é capaz de crescer em meio com ampicilina e gerar colônias de cor azul em meio com X-gal. Assim é fácil a identificação de transformantes contendo plasmídios recombinantes, por apresentarem a cor branca. Como resultados de 10 transformações efetuadas (Tabela 8) foi possível obter transformantes contendo os plasmídios pEB, EC, pED e pEE, mas não foi possível obter transformantes com o plasmídio pEA.

Através da análise de restrição de cada um desses plasmídios, foi possível mapear 65% dos pLm 52 para o sítio de 8 enzimas de restrição. São elas EcoRI, pVulI, HindIII, PstI, SalI, BamHI, XbaI, ClaI.

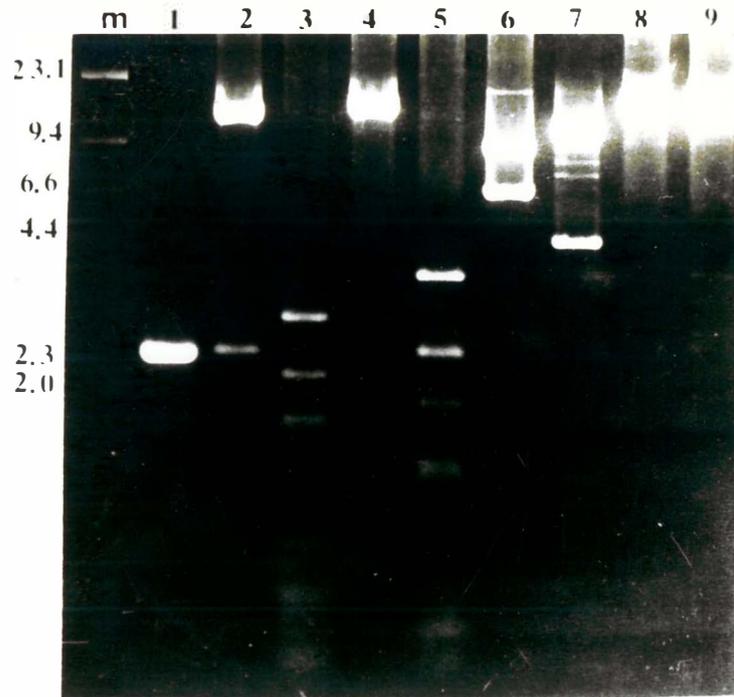
A Figura 17A apresenta o perfil eletroforético do plasmídio pEB36 digerido com as 8 enzimas de restrição gerando fragmentos de tamanhos estimados na Tabela 9.

Tabela 9. Digestão do plasmídeo pEB36 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 19,2 Kb.

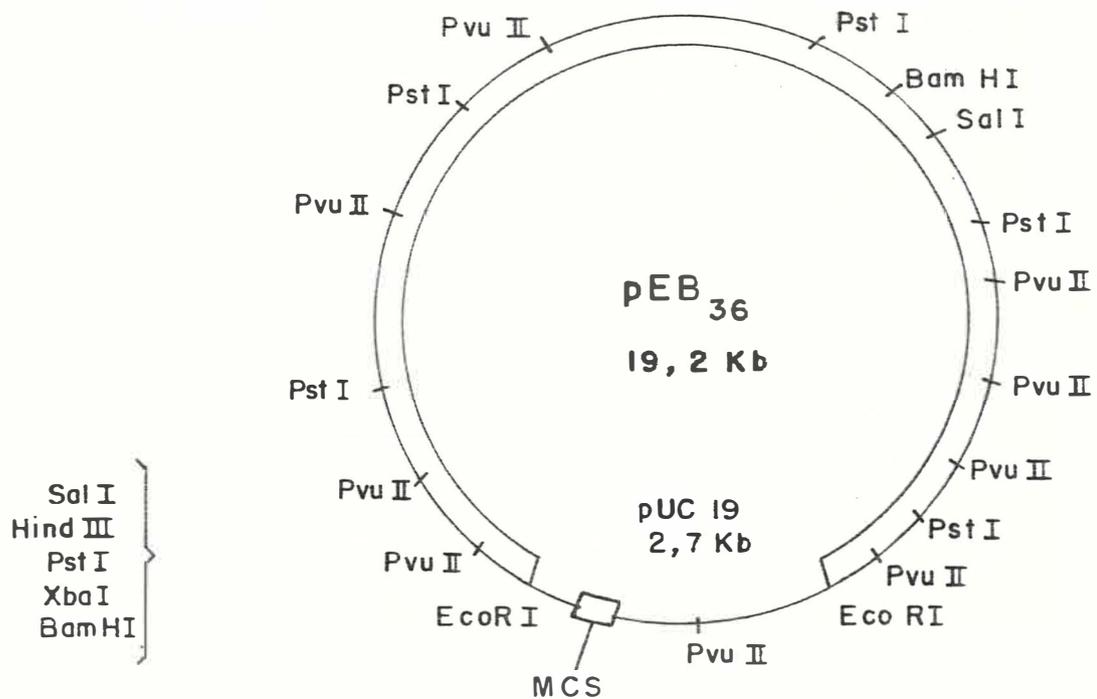
Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos (Kb)	Peso molecular estimado (Kb)
EcoRI	16,6-2,7	19,3
PvuII	4,6-2,7-2,6-2,3-17,-1,5-1,2-1,2-1,2	19,1
Hind III	19,3	19,3
PstI	6,5-3,4-3,0-28-2,5-1,0	19,2
SalI	11,8,7,4	19,2
BamHI	14,4-5,0	19,4
XbaI	19,3	19,3
ClaI	19,3	19,3

A Figura 17B mostra alguns sítios para enzimas de restrição no plasmídeo pEB36, sendo que as enzimas HindIII e XbaI não possuem sítio de restrição no fragmento B, só possuem um sítio de restrição MSC (Multiple Clone Site) do plasmídeo pUC19 e a ClaI possui um sítio de restrição no fragmento B.

A Figura 18A apresenta o perfil eletrofético do plasmídeo pEC51 digerido com 8 enzimas de restrição, gerando fragmentos de tamanhos estimados na Tabela 10.

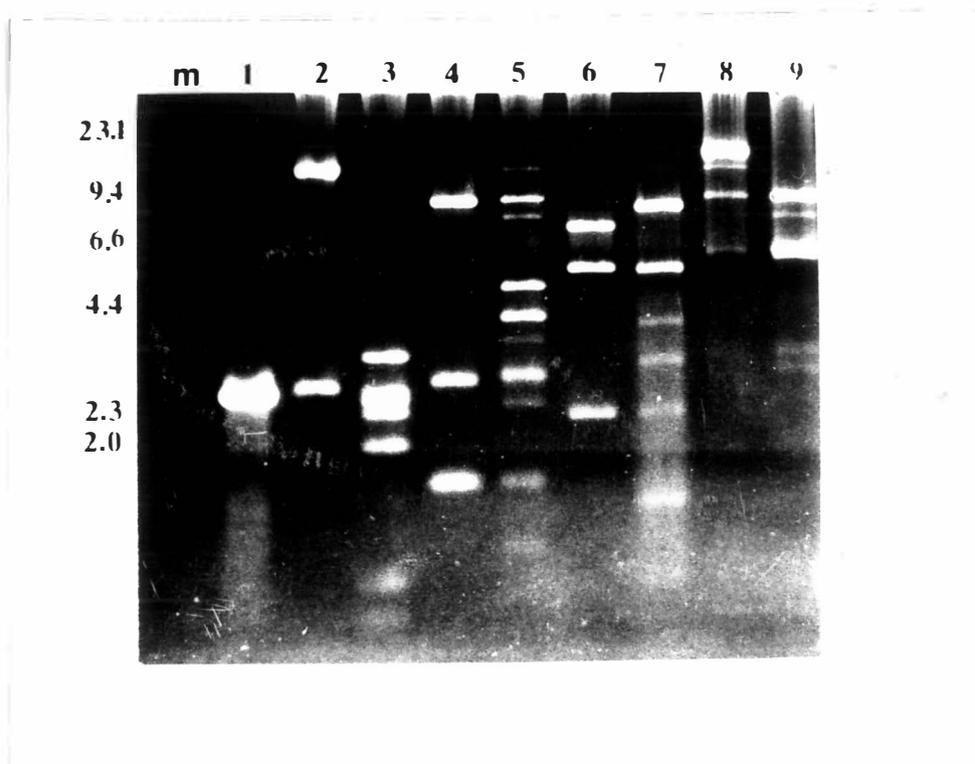


A

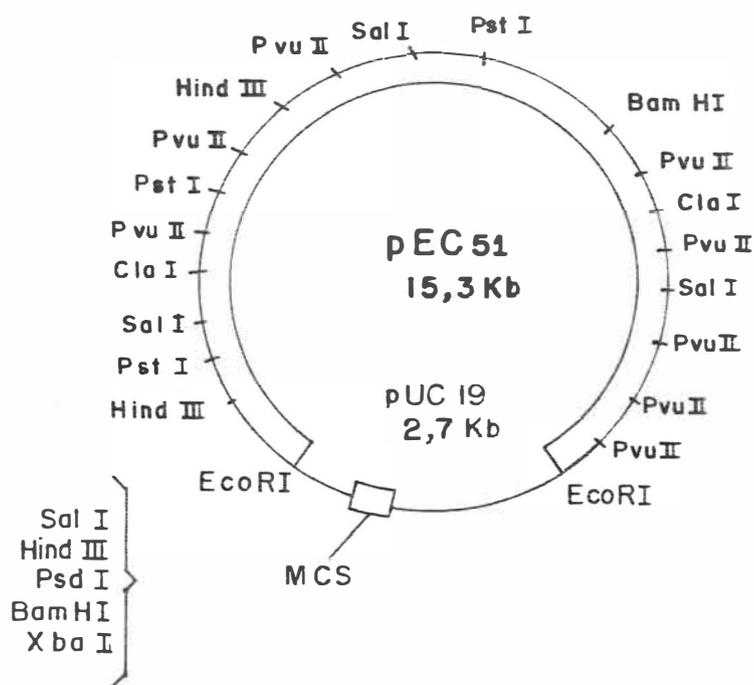


B

Figura 17. A-Perfil eletroforético do plasmídeo pEB36. m - marcador (fago λ digerido com HindIII; 1- pUC19; 2 - pEB36 digerido com EcoRI; 3 - pEB36 digerido com PvuII; 4 - pEB36 digerido com HindIII, 5 - pEB36 digerido com pstI; 6 - pEB36 digerido com SalI; 7 - pEB36 digerido com BamHI; 8 - pEB36 digerido com XbaI; e 9 - pEB36 digerido com ClaI. B-Mapa de restrição para algumas enzimas do plasmídeo pEB36.



A



B

Figura 18. A-Perfil eletroforético do plasmídeo pEC51; m - marcador (fago λ digerido com HindIII); 1 - pUC 19; os números 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, mostram o plasmídeo pEC91 digerido com EcoRI, PVuII, Hind III, PstI, SalI, BamHI, XbaI e ClaI respectivamente B-Mapa de restrição do plasmídeo pEC51.

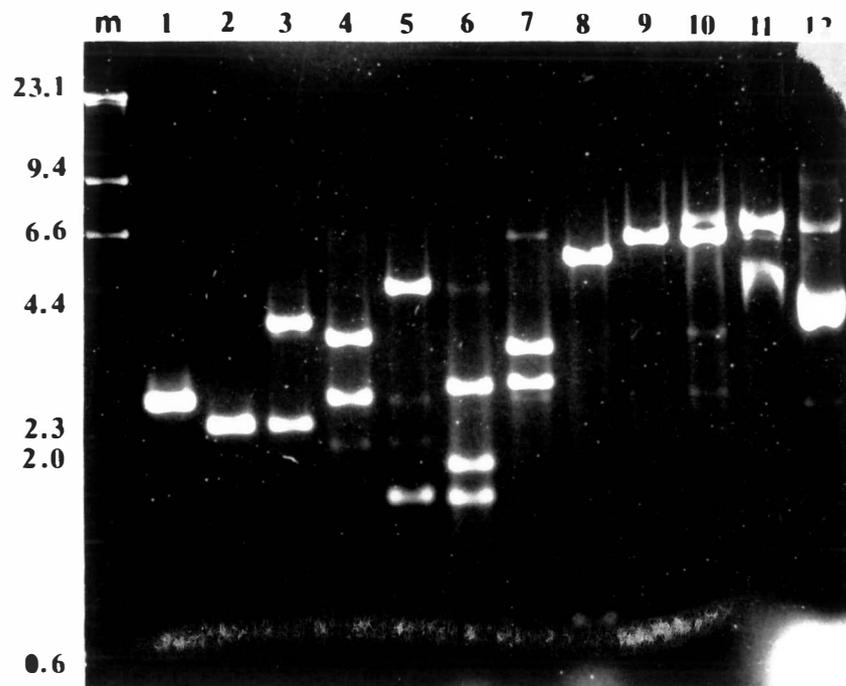
Tabela 10. Digestão do plasmídeo pEC51 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 15,3 Kb.

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos (Kb)	Peso molecular estimado (Kb)
EcoRI	12,6-2,7	15,3
PvuII	3,5-2,8-2,4-2,2-2,0-2,4-2,0	15,3
HindIII	10,2-3,2-1,8	15,2
PstI	5,6-4,4-3,4-1,8	15,2
Sall	7,4-5,8-2,2	15,4
BamHI	9,6-5,8	15,4
XbaI	15,3	15,3
ClaI	9,4-6,0	15,4

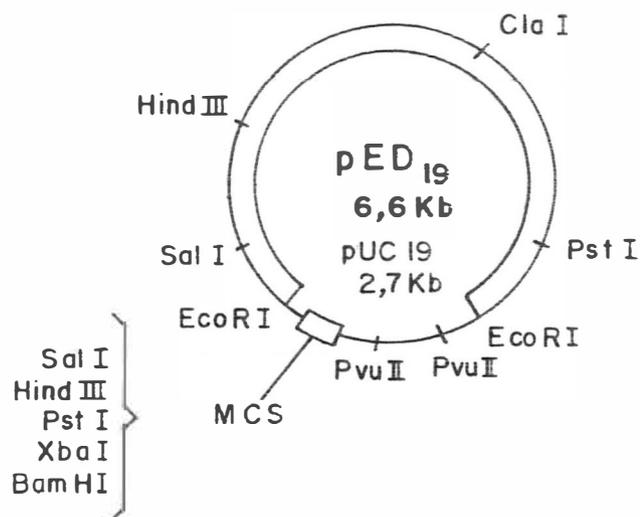
A Figura 18B, apresenta alguns sítios para enzimas de restrição no plasmídeo pEC51, sendo que a enzima XbaI não possui sítio de restrição no fragmento C, mas possui 1 sítio na região MCS do plasmídeo pUC19.

A Figura 19A apresenta o perfil eletroretico do plasmídeo pED19 digerido com 8 enzimas de restrição, gerando fragmentos de tamanhos estimados, apresentados na Tabela 11.

A Figura 19B mostra alguns sítios para enzimas de restrição no plasmídeo pED19, sendo que as enzimas BamHI, XbaI possuem apenas um sítio na região MCS de pUC19 e a enzima PvuII também só possui sítios de restrição em pUC19 e não no fragmento D. A enzima ClaI não possui sítio de restrição em pUC19, só no fragmento D.



A



B

Figura 19. A. Perfil eletroforético do plasmídeo pED19. m - marcador (fago λ digerido com HindIII); 1 - pUC19 digerido com EcoRI; 2 - puc19 digerido com PVuII; 3 - pED19 digerido com PVuII; 4 - pED19 digerido com EcoRI; 5 - pED19 digerido com HindIII; 6 - pED19 digerido com HindIII e PstI; 7 - pED19 digerido com PstI; 8 - pED19 digerido com SalI; 9 - pED19 digerido com BamHI; 10 - pED19 digerido com XbaI; 11 - pED19 digerido com ClaI e 12 pED19 não digerido. B. Mapa de restrição para o plasmídeo pED19.

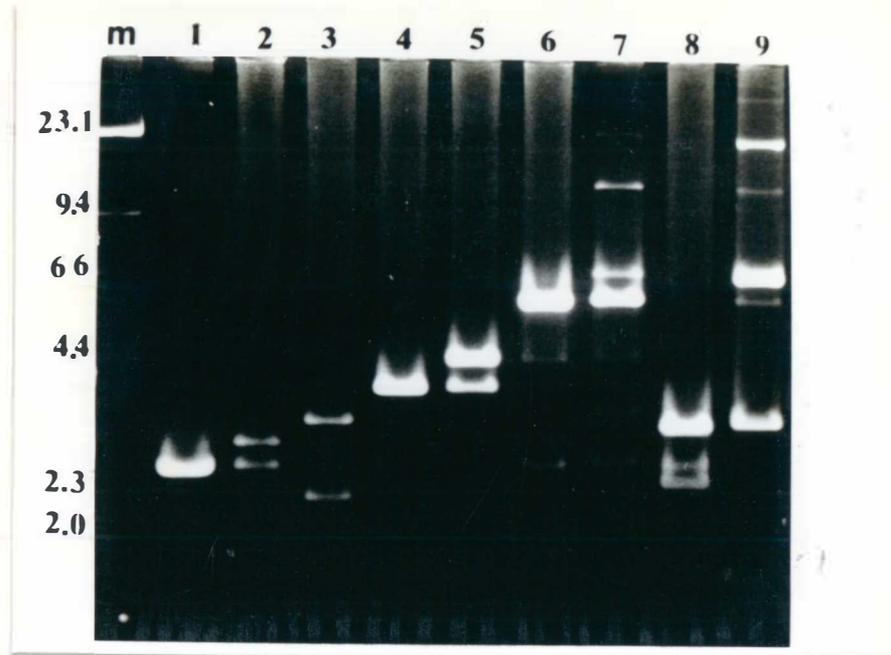
Tabela 11. Digestão do plasmídeo pED19 com enzimas de restrição. Tamanho médio do plasmídeo 6,6 Kb.

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos (Kb)	Peso molecular estimado (Kb)
EcoRI	3,6-2,7	6,3
PvuII	4,2-2,4	6,6
HindIII	5,0-1,8	6,8
PstI-HindIII	2,8-2,0-1,8	6,6
PstI	3,6-3,0	6,5
SalI	5,8-0,8	6,6
BamHI	6,5	6,5
XbaI	6,5	6,5
ClaI	6,5	6,5

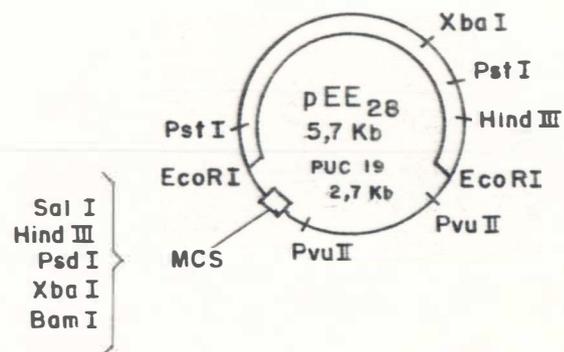
A Figura 20A, apresenta o perfil eletroforético do plasmídeo pEE28, digerido com 8 enzimas de restrição gerando fragmentos de tamanhos estimados na Tabela 12.

Tabela 12. Digestão do plasmídeo pEE28 com enzimas de restrição e tamanho médio do plasmídeo 5,7 Kb.

Enzimas de restrição	Fragmentos obtidos (Kb)	Peso molecular estimado (Kb)
EcoRI	3,0-2,7	5,7
PvuII	3,2-2,4	5,6
HindIII	3,9-1,7	5,6
PstI	4,4-3,9	8,3
SalI	5,6	5,6
Ba,HI	5,6	5,6
XbaI	3,2-2,5	5,7
ClaI	-	-



A



B

Figura 20. A. Perfil eletroforético do plasmídeo pEE28. m - marcador (fago λ digerido com HindIII); 1 - pUC19 digerido com EcoRI; números 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 se referem ao pEE28 digerido com as enzimas EcoRI, PVuII, HindIII, PstI, SalI, BamHI, XbaI e ClaI. B. Mapa de restrição do plasmídeo pEE28.

A Figura 20B mostra alguns sítios para enzimas de restrição no plasmídio pEE28, sendo que as enzimas *SalI* e *BamHI* não possuem sítio de restrição no fragmento E, só o possuem na região MSC de pUC19. A enzima *ClaI* apresentou um padrão eletroforético totalmente inexplicável, talvez tenha ocorrido a contaminação com outro material.

4.7. Identificação de marcadores genéticos nas linhagens de *L. mesenteroides* e nos transformantes obtidos

Leuconostoc é um gênero de bactéria gram-positiva, da família Streptococaceae, que são taxonômica e ecologicamente pertencentes ao grupo N-Streptococci. Sua identificação normalmente envolve os recursos da taxonomia bacteriana, contudo meios seletivos são utilizados considerando que esta espécie apresenta resistência natural a alguns antibióticos. O uso da tetraciclina foi feito com esta finalidade por McDONOUGH et alii (1962), sendo que GARVIE (1974) demonstrou que a identificação das marcas de resistência a antibióticos pode ser de grande valor para a classificação taxonômica de espécies do gênero *Leuconostoc*.

A vancomicina, um produto de *Streptomyces orientalis*, é um potente antibiótico, que interfere na biossíntese de peptidoglicanas da parede celular de bactérias gram-positivas, sendo que entre as espécies de bactérias sensíveis a este antibiótico é raro ou inexistente, a ocorrência de mutantes resistentes (EDWARDS, 1980).

REINHOLD & REDDY (1974) observaram que duas linhagens de *L. dextranicum* eram resistentes à vancomicina, mas, não examinaram este fato detalhadamente como fizeram ORBERG & SANDINE em 1984b. Eles encontraram linhagens de *Leuconostoc*, naturalmente resistentes a altas concentrações de vancomicina, como também linhagens sensíveis a esse antibiótico. A alta sensibilidade à vancomicina encontrada em bactérias streptococcus lácticas, as quais estão intimamente relacionadas - as *Leuconostoc* sp. do ponto de vista ecológico, sugere que a resistência exibida por algumas espécies de *Leuconostoc* deve ser resultante da adaptação dessas bactérias à presença deste antibiótico produzido por *Streptomyces* em seus habitats. Uma aplicação óbvia das observações de ORBERG & SANDINE (1984b) é o uso de vancomicina em meios eletivos para o isolamento de linhagens selvagens de *Leuconostoc* sp.

A investigação de marcas de resistência à vários antibióticos, foi feita logo no início deste trabalho, com as linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* isoladas por área (Tabela 13). Graças aos resultados dessa investigação foi possível direcionar os estudos de transformação, utilizando a variabilidade natural das linhagens isoladas.

Os transformantes obtidos durante todo esse trabalho, também foram caracterizados quanto à resistência a alguns antibióticos. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13. Antibiógrama das linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*.

Antibióticos µg/ml	Linhagens					
	MH4.1	MH8.1	MH8.2	L2	Z2	8
Ampicilina 50	+	+	+	+	+	-
Tetraciclina 10	+	+	+	-	+	-
Kanamicina 25	-	-	-	-	-	-
Streptomicona 20	-	-	-	-	-	-
Rifampicina 100	-	-	-	-	-	-
Cefatoxina 100	-	-	-	-	-	-
Eritromicina 100	+	+	+	+	+	-
Cloranfenicol 25	+	+	+	-	+	-
Branco (sem antibiótico)	+	+	+	+	+	+

+ apresentaram crescimento

- não cresceram

Tabela 14. Antibiógrama para os transformantes (DH5α), com fragmentos do plasmídeo pLm52.

Linhagens transformantes	Antibióticos (µg/m)				
	Ampicilina 50	Tetraciclina 10	Kanamicina 25	Cloranfenicol 25	sem antibiótico
1	+	-	-	-	+
2	+	+	-	-	+
19	+	-	-	-	+
20	+	-	-	-	+
23	+	-	-	-	+
27	+	-	-	+	+
28	+	-	-	-	+
29	+	+	-	-	+
31	+	-	-	-	+
36	+	-	-	-	+
41	+	-	-	-	+
50	+	-	-	-	+
51	+	-	-	-	+
52	+	+	-	-	+
53	+	-	-	-	+
54	+	+	-	-	+
55	+	-	-	-	+
58	+	+	-	-	+
59	+	+	-	-	+
61	+	+	-	-	+
64	+	-	-	-	+
70	+	+	-	-	+
72	+	+	-	-	+
74	+	+	-	-	+
87	+	+	-	-	+
93	+	-	-	-	+
100	+	+	-	-	+
DH5α não transf.	-	-	-	-	+

+ apresentaram crescimento; - não apresentaram crescimento.

Os resultados discutidos neste trabalho representam o esforço em desenvolver metodologias para a produção de dextranas e estudo genético e molecular da espécie *Leuconostoc mesenteroides*. Evidenciou-se que os trabalhos de isolamento e avaliação de diferentes bactérias demonstram a ampla possibilidade de superar produtividades antes obtidas (JEANES, 1965a) e grande potencial de melhoramento. Da mesma forma o processo fermentativo em condições de arejamento adequado se mostra produtivo apesar dos problemas inerentes com aumento progressivo da viscosidade do meio. Os dados levantados nestas condições foram básicos para o pedido de privilégio sobre o processo de produção de dextranas (TAVARES, 1989).

Os estudos genéticos e moleculares realizados, bem como a metodologia desenvolvida para esta finalidade, ampliam a possibilidade de melhor conhecimento de espécies *L. mesenteroides*, bem como do seu melhoramento para a produção de polímeros de dextranas.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho que compreendeu o estudo da produção de dextranas e caracterização molecular de linhagem de *L. mesenteroides*, permitiu as seguintes conclusões:

1. O isolamento de diferentes linhagens foi eficiente e permitiu identificar variação genética para a produção de dextranas, propriedades biológicas e moleculares.
2. O uso de meio seletivo possibilitou selecionar linhagens de alta produção de dextranas.
3. Através de processo de fermentação com aeração contínuo em protótipo de fermentador conseguiu-se melhorar a produção nesta escala superando-se valores registrados na literatura como elevados.

4. Este estudo permitiu obter dados fundamentais para desenvolver um processo de fermentação aeróbio, em fermentador multiuso.
5. A eficiência e purificação de DNA desenvolvidos neste trabalho, bem como do meio de crescimento adequado, possibilitam obter preparações de DNA genômico ou plasmidial em quantidades adequadas a estudos moleculares, clonagem e transformação.
6. O trabalho comprova ser viável a transformação de *L. mesenteroides*, efetuar transferência de genes para outras espécies, bem como destas isolar genes para a transformação de *L. mesenteroides*, viabilizando-se estudos genéticos e moleculares com as metodologias desenvolvidas neste trabalho.
7. O vetor plasmidial bifuncional que foi engenheirado a partir de fragmentos do plasmídeo de 52 Kb, com marca seletiva e origem de replicação de *L. mesenteroides* e *E. coli*, permitirá estudar a genética desta espécie, bem como efetuar transformação de genes específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÔNIMO, 1990a. Library Efficiency DH5 α TM Competent Cells Protocol. Bethesda Research Laboratories. Life Technologies, Inc. Cat. n° 82635A.
- ANÔNIMO, 1990b. Kit gene clean, Bethesda Research Laboratories. Life Technologies, Inc. Cat. n° 82635A.
- ALSOP, L. Industrial production of dextran. *Progress in Industrial Microbiology*, Netherlands, **18**: 1-44, 1983.
- ANTONINI, E.; BRUNORI, M.; WYWASI, J.; ZITO, R.; TAYLOR, J.F.; ROSSI-FANELLI, A. Studies on dextran and dextran derivatives. *Biopolymers*, New York, **2**(1): 2823-8, 1964.
- BAILEY, L.H; OWEN Jr., W.L.; OIWEN, W.L. Patent Industrial, (Estados Unidos), n° 2, 360.327, Oct. 17, 1944.
- BAKER Jr., P.J. Dextran. In: WHISTLER, R.L. & MILLER, J.N.B., ed. *Industrial gums*. New York, Academic Press, 1959. cap.23, p.118-26.
- BASEDOW, A.M. & EBERT, K.H. Polimer of dextran. Macromolecular. *Journal of Polymer Science Symposium*, Part D New York, **66**: 101-15, 1979.

- BIXLER, G.H.H.; McCHEE, G.E.; SHUTER, R.M. Dextran. *Industrial Engineering Chemistry*, Easton, 45: 692-1377, 1953.
- BOLETIM INFORMATION DA "PHARMACIA FINE CHEMICALS". Upplands Grafiska, Sweden, dez. 1974.
- BOLIVAR, F.; R.L. RODRIGUES; P.J. GREENE; M.C. BETLACH; H.L. HEYNEKER, H.W. BOYER. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, Netherlands, 2: 95-113, 1977.
- BREMNER, J.; COX, J.S.G.; MOSS, G.F. Structural studies on iron dextran. Characterisation of an alkali-degraded dextran suitable for use in production of parental iron-dextran complexes. *Carbohydrates*, Netherlands, 11: (1): 77-84, 1969.
- BRODA, P. *Plasmids*. Oxford, W.H. Freeman, 1979. 197p.
- CHASSY, B.M. & GIUFFRIDA, A. Method for lysis of gram-positive, asporogenous bacteria with lisozyme. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, 39: 153-8, 1980.
- CHASSY, B.M.; GILSON, E.M.; GIUFFRIDA, A. Evidence for plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Current Microbiology*, New York, 1: 141-4, 1978.
- CLEWELL, O.; YAGI, V.; DUNNY, G.; SCHULTZ, S. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, 117: 283-9, 1974.

- COLLINS, J. & PRITCHARD, R.H. Relationship between chromosome replication and F⁺lac episome replication in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, London, 78: 143-55, 1973.
- DAVIES, F.L. & GASSON, M.J. Reviews of the progress of dairy science: genetics of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, 48: 363-76, 1981.
- DAVIES, F.L.; UNDERWOOD, H.M.; GASSON, M.J. The value of plasmic profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712 ML 3 and C2. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 51: 325-37, 1981.
- DWORSCHAK, R.G.; LAGODA, A.A.; JACKSON, R.W. Fermentor for small scale submerged fermentations. *Applied Microbiology*, Washington, DC, 2: 190-7, 1954.
- EDWARDS, D.. *Antimicrobial drug action*. Baltimore, University Park Press, 1980. 133p.
- ENGBERG, B. & NORDSTRÖM, K. Replication of R-factor R1 in *E. coli* K-12 at different growth rates. *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, , 123: 179-86, 1975.
- ENGEL, H.; SOLDERMAN, N.; ROST, J.; LEEUVEN, W. van; EMBDEN, J.D.A. van. Transferability of macrolide, lincosamide, and streptogramin resistences between group A, B, and D streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, 142: 407-13, 1980.

- FLODIN, P. Dextran gels and their applications in gel filtration, In: WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, Academic Press, 1989. v.5, p.118-34.
- GARVIE, E.I. Genus II. *Leuconostoc* van Tieghem, 1878, In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 8.ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1974. p.510-3.
- GARVIE, E.I. Genus *Leuconostoc* van Tieghem, 1878, In: SNEATH, R.A.; MAIR, N.S.; SHARP; HOLT, J.G., ed. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1071-5.
- GASSON, M.J. & DAVIES, F.L. Conjugal transfer of the drug resistance plasmid pAM β 1 in lactic streptococci. **FEMS Microbiology Letters**, Cambridge, 7: 51-3, 1980.
- GIBSON, E.M.; CHACE, N.M.; LONDON, S.B.; LONDON, J. Transfer of plasmid - mediated - antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, 137: 614-9, 1976.
- GRONWELL, A. **Dextran and its use in colloidal infusion solutions**. New York, Academic Press, 1957, v.3, 412p.
- HALANDER, S.K. **Biotechnology in food proceedings**. Park Ridge, Noyes, 1986. 323p.
- HEHRE, E.J. Production from sucrose of serologically reactive polysaccharid by a sterile bacterial extract. **Science**, Washington, DC, 93: 237-8, 1941.

- HENRYK, N.K. Dextran. *Polymer*, London, 13(12): 553-4, 1968.
- HERSHFIELD, V. Plasmids mediating drug resistance in group β streptococcus: transferability and molecular properties. *Plasmid*, Duluth, 2: 137-49, 1979.
- HILL, C.; DALY, C.; FITZGERALD, G.F. Conjugative transfer of the transposon Tn 919 to lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Cambridge, 30: 115-9, 1985.
- HORODNICEANU, T.; BOUANCHAUD, D.; BIET, G.; CHALBERT, Y. R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Anti-microbiol Agents Chemotherapy*, Detroit, 10: 795-801, 1976.
- HUCKER, G.L. & PEDERSON, C.S. *N. Y. Agr. Expet. Sta. Tech. Bull*, 167: 3, 1930.
- JEANES, A. Dextran, a selected bibliography. U.S. Dept. Agr., *Bul. Agr. and Ind. Chem. AIC-288*, Peoria, 1952.
- JEANES, A. Preparation of dextrans from growing *Leucostoc* cultures. In: WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. *Methods in carbohydrate chemistry*, New York, Academic Press, 1965a, v.5, p.118-27.
- JEANES, A. Preparation of a water-soluble dextran by enzymic synthesis. In: WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. *Methods in carbohydrate chemistry*, New York, Academic Press, 1965b, v.5, 127-32.
- JEANES, A. Dextrans in encyclopedia of polymer science and technology, San Francisco. Academic Press, 1973, v.4, p.805-24.

- JEANES, A.; WILLIAM, C.A.; MIERS, J.C. Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Biological Chemistry*, San Marcos, 176: 603-15, 1948.
- JEANES, A.; HAYNES, W.C.; WILLIAM, C.A.; RANKIN, J.C.; MELVIN, E.H.; AUSTIN, M.; CLUSKEY, J.E.; TSUCHIYA, H.M.; RIST, C.E. Characterization and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. *Journal American Chemical Society*, Washington, DC, 76: 5041-52, 1954.
- KANDLER, O. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus*. *International Journal Systematic Bacteriology*, Washington, DC, 20(4): 491-507, 1970.
- KEMPLER, G.M. & MCKAY, L.L. Characterization of plasmic deoxyribonucleic acid in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: evidence for plasmic - linked citrate utilization. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, DC, 37(2): 316-23, 1979.
- KEMPLER, G.M. & MCKAY, L.L. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of Dairy Science*, 64: 1527-39, 1981.
- KLAENHAMMER, T.R. A general method for plasmid isolation in *Lactobacilli*. *Current Microbiology*, New York, 10: 23-8, 1984.

- KLAENHAMMER, T.R.; MCKAY, L.L.; BALDWIN, K.A. Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, DC, **35**: 592-600, 1978.
- KOBAYASHI, M.; TAKAGI, S.; MATSUDA, K. Structural characteristics of water-soluble-dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B-1298. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, **49**: 733-77, 1985.
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, J.; MATSUDA, K. Comparison of the multiplicity of dextransucrase from six strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, **49**: 501-7, 1985a.
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, J.; MATSUDA, K. Purification of the dimeric form of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* strains NRRL-B-1416 and B-1375. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, **49**: 1385-91, 1985b.
- KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, J.; MATSUDA, K. Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextransucrase evaluated by inhibition kinetics. *Agricultural Biological Chemistry*, Tokyo, **50**: 2585-90, 1986.
- KOEPSSEL, H.J.; JACKSON, R.W.; HOFFMANN, C.A. U.S. Patent Industrial (Estados Unidos), n° 2.759.587, 1956.
- KORNBERG, A. DNA replication. W.H. Freeman, San Francisco, 1980. 466p.

- LANDMAN, O.E.; BODKIN, D.J.; FINN Jr., C.W.; PEPIN, R.A. Conjugal transfer of plasmid pAMB1 from *Streptococcus anginosus* to *Bacillus subtilis* strains. In: POLSINELLI, M. & MAZZA, G. (ed.). *Transformation*. Oxford, Cots Wold Press, 1980. p.219-26.
- LEBLANC, D.J. & LEE, L.M. Rapid screening procedure for detection of plasmids in streptococci. *Journal Bacteriology*, Washington, DC, **140**: 1112-5, 1979.
- LEBLANC, D.J.; HAWLEY R.L.; LEE, L.N.; MARTIN, E.J. St. "Conjugal" transfer of plasmic DNA among and streptococci. *Proceedings of National Academy Sciences*, Allahabad, **75L** 3484-7, 1978.
- LIN, J.; SCHMITT, P.; DIVIES, C. Characterization of a citrate - negative mutant of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*; metabolic and plasmidic properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, Heidelberg, **34**: 628-31, 1991.
- LIPTAK, A. & JANOSSY, L. Structural studies on dextran. *Acta Biologica Debrecina*, Debrecen, **7/8**: , 11-6, 1969/70.
- MANIATIS, T.; FRITISH, E.F.; SAMBROOK, J., eds. *Molecular cloning; a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor, 1982. 545p.
- MARIBONA, J.L. & BELLO, O.M. La Dextrana. *Asociacion de Tecnicos Azucareiros de Cuba. Boletim Oficial*, La Habana, **21**: 65-73, 1966.
- MARTIN, L.E. Dextran: a plasma volume expander. *Chemistry and industry*, 1985. p.184-97.

- McDONOUGH, F.E.; HARGROVE, R.E.; TITSLER, R.P. *Journal of Dairy Science*, Champaign, **45**: 656, 1962.
- McNEELY, W.H. Biosynthetic polysaccharides. In: PEPPLER, H. *Journal of Microbiology Technology*. New York, 1967. cap.16, p.301-402.
- MEYERS, J.,A.; SANCHEZ, D.; ELWELL, L.P.; FALKOW, S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, **127**: 1529-37, 1976.
- MONSEN, T.J.; HOLM, S.E.; BURMAN, L.G. A general method for cell lysis and preparation of deoxyribonucleic acid from strobotococci. *FEMS Microbiology Letters*, Cambridge, **16**: 19-24, 1983.
- MURPHY, P.T. & WHISTLER, R.L. Dextrans. In: WHISTLER, R.L. & BEMILLER, J.N. *Industrial gums, polisaccharides and their derivatives*. New York, Academic Press, 1973. p.127-33.
- OLMO, O.A. Dextrana tecnica. In: MONTERO, J.V.M. *La industria delos derivados de la caña de azucar*. La Habana, ICIDCA, 1983, p.412-34.
- ORBERG, P.K. & SANDINE, W.E. Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Applied Environmental Microbiology*, Tokyo, **48**: 1129-33, 1984a.

- ORBERG, P.K. & SANDINE, W.E. Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N Streptococci. *Applied Environmental Microbiology*, Tokyo, **47**: 677-80, 1984b.
- O'SULLIVAN & DALY, C. Dextran. *Journal Food Science Technology*, Mysore, **6**: 206, 1982.
- OWEN, W.L. Gum dextran as a profitable by product for the sugar cane industry. *Sugar*, **45**: 42-3, 1950.
- PRAT, D.; VALDIVIA, L.A.; MONSAN, P.; PAUL, F.; LOPEZ-MINGUIA, C.A. Effect of borate ions on dextran sucrose acceptor reaction. *Biotechnology Letter*, Kew, **9**: 1-6, 1987.
- PRITCHARD, R.H.; CHANDLER, M.G.; COLLINS, J. Independence of F replication and chromosome replication in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics*, Berlin, **138**: 143-55, 1975.
- PUCCI, M.J.; MOTESCHIO, M.E.; KEMKER, C.L. Intergeneric and intrageneric conjugal transfer of plasmid encoded antibiotic resistance determinants in *Leuconostoc* spp. *Applied Environmental Microbiology*, Tokyo, **52(2)**: 281-7, 1988.
- QUEIROZ, J.H. & MANGERI, F. Otimização da produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melão como fonte de carbono. *Revista de Microbiology*, São Paulo, **20(2)**: 150-6, 1989.
- REINBOLD, G.W. & REDDY, M.S. Sensitivity or resistance of dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. *Journal Milk and Food Technology*, Ames. **37**: 517-21, 1974.

- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed., New York, Cold Spring Harbor, 1989. 545p.
- SANDINE, W.E. & TSAI, H.J. Conjugal transfer of lactose - fermenting ability from *Streptococcus lactis* C2 to *Leuconostoc cremonis* CAF7 yields *Leuconostoc* that ferment lactose and produce diacetyl. **Journal Industrial Microbiology**, Netherlands, 2: 25-31, 1987.
- SANDFORD, P.A. & BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. **The polysaccharides**, 2: New York, 412-90, 1983.
- SENTI, F.R. & SLOAN, J.W. Solubility of monoglycerides in oil and its relation to the production of global edible spread. **Journal of Polymer Science**, New York, 7: 327-45, 1955.
- SLOAN, J.W. & SENTI, F.R. **Journal American Chemical Society**, New York, 76: 4429, 1964. Apud Senti, F.R. et alii. **Journal of Polymer Science**, vol. VII, 327-45, 1964. (1955).
- SMITH, M.C. & SCHILLER, H. Detection in meta contrasts. **American Journal of Hospital Pharmacy**, Bethesda, 22: 273, 1965.
- SZEJTLY, J. Molecular configuration of amylose and its complexes in aqueous solutions. **Acta Chimica Hungarica**, Budapest, 45: 1212-24, 1965.
- TAKAOKA, H. Takeda Chemical Industries Ltd. Japan, 12, 098 (61). **Appl. Sept.**, Tokyo, 26, 1956.

- TARR, H. LA & HILBERT, H. Studies on reactions relating to carbohydrate and polysaccharides. The formation of dextran by *Leuconostoc mesenteroides*. *Canadian Journal Research*, Ottawa, 5(4): 414-27, 1931.
- TAVARES, F.C.A. Fermentador aeróbico multiuso e respectivos processos de fermentação. INPI nº 8.903.878, 1989.
- TOBIAN, J.A. & MACRINA, F.L. Helper plasmic cloning in *Streptococcus sanguis*: cloning of a tetracycline resistance determinant from the *Streptococcus mutans* chromosome. *Journal of Bacteriology*, Washington, DC, 152: 215-22, 1982.
- TSAI, H.J. & SANDINE, W.E. Conjugal transfer of nisin plasmid genes from *Streptococcus lactis* 7962 to *Leuconostoc dextranicum* 181. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, DC, 53: 352-7, 1987.
- TSUCHIYA, H.M.; HELLMAN, N.M.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; STRINGER, C.S.; ROGOVINI, S.P.; BOGARD M.O.; BRYANT, G.; FEGER, V.H.; HOFFMAN, C.A.; SENTI, F.R.; JACKSON, R.W. Factors affecting molecular weight of enzymatically synthesized dextran. *Journal of American Chemical Society*, Washington, DC, 77: 2412-9, 1955.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNWILL, P.; HUMPHREYS, A.E.; LILLY, M.D. *Fermentation and enzyme technology*. New York, John Wiley, 1979. 374p.
- WHITTENBURY, R. Equivalence of hydrogen and thiosulfate in bacterial photosyntheses. *Archives Mikrobiology*, Heidelberg, 53: 317-27, 1966.