

211

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* supesp. *Dendrolimus*.** *Laura Massaochin Nunes Pinto, Lidia M. Fiuza* (Centro de Biotecnologia/UFRGS)

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria naturalmente encontrada no solo, gram positiva, esporulante, caracterizada por produzir inclusões cristalinas durante a esporulação. Estas inclusões são constituídas por proteínas que apresentam atividade inseticida, denominadas delta-endotoxinas. A especificidade deste microrganismo está associada as enzimas do intestino do hospedeiro, sendo as inclusões cristalinas solubilizadas em meio alcalino, tipicamente encontrado no trato digestivo dos insetos. Para análise do modo de ação *in vitro* e *in vivo* deste entomopatógeno, o presente trabalho objetivou a produção e a purificação de endotoxinas de *Bt* subesp. *dendrolimus*. Este isolado foi cultivado em meio Usual Glicosado a 28°C e 180rpm, até obtenção da lise bacteriana. A purificação dos cristais foi realizada através do gradiente de sacarose, constituído de concentrações entre 88 e 67%. A suspensão bacteriana depositada sobre o gradiente foi submetida a ultracentrifugação (10.000g), a 4°C, durante 2 horas. As bandas foram coletadas, lavadas e observadas em microscopia de contraste de fase. Os produtos das interfaces das concentrações 72 e 79%, contendo os cristais puros, foram solubilizados durante 2 horas a 37°C na solução 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10, contendo 10mM de DTT. As protoxinas foram digeridas com tripsina bovina tipo I. As proteínas obtidas foram avaliadas em gel de poli-acrilamida a 10% (SDS - PAGE) e a concentração foi determinada através do método BRADFORD (1976). Os resultados obtidos mostram que este isolado produz inclusões paraesporais bipiramidais, onde a protoxina produzida apresenta um peso molecular de aproximadamente 130kDa e polipeptídeos tóxicos ou delta-endotoxina de 70kDa. Esta análise mostra que utilizando esse sistema de produção de proteína de *Bt* obtém-se 3,5 a 1,4mg de endotoxina por 1000ml de cultura bacteriana. (CNPq-PI)