

00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ORIGEN Y PROPIEDADES DE LAS DIVERSAS
FORMAS OBSERVADAS DE LA DEXTRANSACARASA
DE *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC.

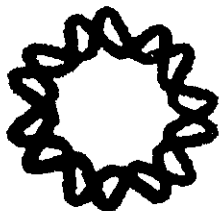
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

MONICA NOEL SANCHEZ GONZALEZ



276430

CUERNAVACA, MORELOS.

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Jurado Asignado

Dr. Lourival Domingos Possani Postay	Presidente
Dr. Agustín López-Munguía Canales	Secretario
Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Vocal
Dra. Guadalupe Espín Ocampo	Vocal
Dra. Carmen Beltrán Núñez	Vocal
Dr. Pierre F. Monsan	Suplente
Dra. Gloria Saab Rincón	Suplente

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Cuernavaca, Morelos, 2000.

La realización de los estudios de Doctorado fue posible gracias al apoyo económico otorgado por la Dirección General de Estudios Posgrado (DGEP); Programa de Apoyo al Posgrado, proyectos 030552 y 20236 y CONACyT, proyecto 25281-B

DEDICATORIAS

A mis padres Dr. Cuauhtémoc Sánchez y Sra. Maura González, por todo su amor y gran apoyo.

A mi hermano Lic. Rubén Sánchez, porque además de los lazos fraternos nos une una increíble amistad.

A la Sra. Eva Farrera de Sánchez, porque junto con mi hermano forman una bella familia.

A Marijose y Pepe, por toda su alegría, inocencia y ganas de vivir.

A Octavio, por el increíble y gran amor.

A la memoria de dos grandes personas que marcaron la vida de muchos: Srita. Ascensión González Meza y Lic. Alberto Rodríguez Cruz.

A Dios, simplemente mi todo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía, por ser un gran Maestro tanto en lo académico como en lo espiritual.

A los Doctores Alejandro Alagón Cano y Rogelio Rodríguez Sotres, por su interés en mi formación académica y por su invaluable amistad.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones.

Tengo la fortuna de contar con grandes amigos, son mi riqueza, GRACIAS a todos ellos:

Irma y Víctor, Male y Alfredo, Sonia y Jairo, Rosy y Pablo, Vero Aldama, Erick y Martha, Poncho y Edith, Pancho y Adriana, Sandra Morales, Lolis Baños, Toño de León, Gabriel Sandoval, Lidia Riaño, Claudia y Rubén, Francisco Villaseñor, Eduardo Torres, Cynthia y Luis, Toño Villegas, Miguel A. Torres, Martha Méndez, Lorena López, Facundo Márquez, Mary y Leobardo.

A la Sra. Bertha Hernández, por su gran ayuda.

A la familia Pérez González, por todo su cariño.

A la M. en B. Mariana Canedo, por su participación en el desarrollo del proyecto y amistad.

A mis compañeros de laboratorio.

Al personal de la planta piloto especialmente al T. L. Mario Caro y la Q.B.P. Miriam Ortiz por su ayuda en la elaboración de liofilizados.

Al Sr. Sergio Trujillo por su ayuda en la toma de fotografías.

Al personal del laboratorio: Sra. Aurelia, Mary Paz y Lupita por su paciencia y disposición.

A todos aquellos que de alguna manera han participado en mi formación académica.

Índice General

	Página
Summary	
Resumen	
I Introducción	1
II Generalidades	5
II.1 Dextranas	6
II.2 Reacciones de aceptor	7
II.3 Mecanismos de reacción	9
II.4 Estudio cinético	15
II.5 Estructura de la enzima	19
II.6 Peso molecular	24
III Objetivos	28
IV Materiales y Métodos	29
IV.1 Producción de la dextransacarasa	29
IV.1.1 Microorganismos	29
IV.1.2 Medios de cultivo	29
IV.1.3 Producción de la dextransacarasa constitutiva	30
IV.1.4 Producción de la dextransacarasa silvestre	32
IV.2 Concentración de muestras	33
IV.3 Determinación de la actividad dextransacarasa	34
IV.4 Electroforesis	34
IV.5 Cuantificación de proteína	35
IV.6 Proteólisis limitada de la dextransacarasa utilizando tripsina	35

IV.7 Ensayos de actividad proteolítica	35
IV.8 Caracterización de la actividad proteolítica	36
IV.8.1 Evolución de la actividad proteolítica durante la síntesis de dextran sacarasa	36
IV.8.1 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica	37
IV.8.2 Ensayos de inhibición de la actividad proteolítica	37
IV.8.3 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica	38
IV.9 Efecto de la proteólisis sobre la dextran sacarasa	38
IV.9.1 Proteólisis endógena	38
IV.9.2 Procesamiento de la dextran sacarasa con una proteasa libre de dextran sacarasa.	38
IV.9.3 Proteólisis limitada endógena de la dextran sacarasa	39
IV.10 Síntesis de dextran y oligosacáridos	39
IV.11 Caracterización de la dextran	40
IV.12 Secuenciación del extremo amino terminal	40
V Resultados I	40
Procesamiento proteolítico de la dextran sacarasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F y FMC	41
V.1 Múltiples formas de la dextran sacarasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC	42
V.2 Determinación de la actividad proteolítica	45
V.3 Evolución de la actividad proteolítica durante la síntesis de dextran sacarasa	47
V.4 Caracterización de la actividad proteolítica	48
V.4.1 Efecto del pH en la actividad proteolítica	48

V.4.2 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica.	48
V.4.3 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica	49
V.4.4 Temperatura óptima de actividad	50
V.5 Digestión de la dextranasa	51
V.6 Discusión	54
V.7 Conclusiones	57
V.8 Perspectivas	57
V.9 Anexo 1. Proteolytic processing of dextranase of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	58
VI Resultados II	59
Efecto de un proceso proteolítico sobre las propiedades catalíticas de la dextranasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512 FMC.	
VI.1 Evolución del proceso proteolítico sobre la dextranasa	60
VI.2 Propiedades catalíticas de la síntesis de dextrana	61
VI.3 Síntesis de oligosacáridos	62
VI.4 Caracterización de las dextranas	62
VI.5 Secuenciación del extremo amino terminal	65
VI.6 Discusión	66
VI.7 Conclusiones	69
VI.8 Perspectivas	69
VI.9 Anexo 2. Effect of proteolytic processing on the properties of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC dextranase forms.	70
VII Bibliografía	71

Índice de Figuras

	Páginas
Figura 1. Reacción de síntesis de dextrana	5
Figura 2. Representación de diferentes estructuras de dextranas sintetizadas por DS pertenecientes a diversas cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	7
Figura 3. Mecanismo propuesto por Robyt para explicar la síntesis de dextrana.	10
Figura 4. Modelo estructural del sitio activo de la DS propuesto por Robyt (1993).	12
Figura 5. Modelo estructural propuesto por Robyt (1993), para explicar las reacciones de aceptor.	12
Figura 6. Ilustración de la hipótesis propuesta por Kobayashi y Matsuda (1986), para explicar el mecanismo de reacción de la DS.	15
Figura 7. Esquema del mecanismo ping-pong Bi Bi propuesto para la DS.	17
Figura 8. Mecanismo secuencial aleatorio propuesto por Mooser y col. en 1985.	18
Figura 9. Mecanismo cinético propuesto para la DS por Reh y Buchholz en 1990.	19
Figura 10. Representación esquemática de los dominios estructurales de la DS.	21
Figura 11. Efecto del almacenamiento sobre el peso molecular de la DS de <i>L. mesenteroides</i> B-512FMC.	43
Figura 12. Proteólisis limitada con tripsina.	45
Figura 13. Detección de la actividad proteolítica producida por <i>L. mesenteroides</i> B-512F y FMC.	46
Figura 14. Detección de la actividad proteolítica de alto peso molecular producida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC.	46

Figura 15. Evolución de la actividad proteolítica en el sobrenadante de un cultivo en lote de <i>L. mesenteroides</i> B-512FMC.	47
Figura 16. Perfil de pH de la actividad proteolítica producida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC.	48
Figura 17. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad proteolítica producida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC.	49
Figura 18. Efecto de la disminución de la concentración de inhibidores sobre la actividad proteolítica producida por <i>L. mesenteroides</i> B-512FMC.	49
Figura 19. Identificación del metal involucrado con el sitio activo de la proteasa producida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC	50
Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica producida por <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC.	51
Figura 21. Efecto de la proteólisis en el peso molecular de la DS de <i>L. mesenteroides</i> B-512FMC.	53
Figura 22. Efecto de la actividad proteolítica sobre la DS de <i>L. mesenteroides</i> B-512FMC.	60
Figura 23. Perfil de elución de las dextranas sintetizadas por las dos formas enzimáticas de la DS	64
Figura 24. Análisis del comportamiento reológico de las dextranas sintetizadas por las dos formas enzimáticas de la DS.	64

Índice de Tablas

	Página
Tabla 1. Pesos moleculares reportados para la DS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	25
Tabla 2. Pesos moleculares reportados para la DS B-512F producida sin inducción por sacarosa.	26
Tabla 3. Composición del medio de conservación de <i>L. mesenteroides</i> .	30
Tabla 4. Composición del medio de cultivo utilizado para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512FMC.	31
Tabla 5. Composición del medio de cultivo utilizado Para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F.	32
Tabla 6. Efecto del cambio de peso molecular en el fenómeno de estimulación por presencia de dextrana.	44
Tabla 7. Propiedades catalíticas de dos DS de diferente peso molecular.	61
Tabla 8. Efecto de la concentración de maltosa en la velocidad inicial de reacción de las dos formas de la DS obtenidas por proteólisis.	62
Tabla 9. Resultado del proceso de secuenciación del extremo amino terminal de la DS de 155 kDa.	65

Summary

In the present work we demonstrate that various dextranucrase molecular mass frequently present in enzyme preparations are the result of proteolytic activity. An extracellular protease in *Leuconostoc mesenteroides* strains NRRL B-512F and B-512FMC dextranucrase preparations was identified. The protease had a molecular mass of approximately 30 kDa and was the predominant form derived from a high molecular mass precursor. The production and activity of protease in culture medium was strongly dependent on pH. The optimum pH for the proteolytic activity was 8, the optimum temperature 50°C, and the activity was partially inhibited by DFP and completely inhibited by 1-10 phenantroline. When *L. mesenteroides* dextranucrase (173 kDa) was hydrolyzed by this protease, at pH 7 and 37°C, various dextranucrase forms with molecular masses as low as 120 kDa conserving dextranucrase activity were obtained. At pH 5.2 and 27°C the proteolysis was limited and a 155 kDa dextranucrase form was produced from a 173 kDa precursor.

The effect of proteolytic processing on the properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextranucrase, was also studied comparing the properties of the 173 and 155 kDa monomeric dextranucrase forms. Although the lower molecular mass dextranucrase conserves 90% of its original enzymatic activity, some kinetic properties were modified. The cleaved dextranucrase form was more sensitive to substrate inhibition ($K_i=0.6$ mM) than the original 173 kDa form ($K_i=1.8$ mM). Although no changes in structure were found, the rheological behavior of the dextran produced under the same reaction conditions was modified. Most important, the rate of the reaction catalyzed by the low molecular mass dextranucrase was more sensitive to stimulation by maltose than the 173

kDa precursor. We concluded that the cleavage of approximately 18 kDa results in a slightly different enzyme. As this is an endogenous protease in *Leuconostoc mesenteroides*, this modification explains some of the observed differences in the behavior of dextransucrases

Resumen

En el presente trabajo se determinó que el origen de la diversidad de pesos moleculares de la dextranasa es en gran medida producto de actividad proteolítica. Se identificó la presencia de una proteasa extracelular en las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F y FMC. La proteasa tuvo un peso molecular aproximado de 30 kDa y fue la forma predominante derivada de un precursor de alto peso molecular. La producción y actividad de la proteasa en el medio de cultivo fue fuertemente dependiente de el pH. El pH óptimo de la actividad proteolítica fue 8 y la temperatura óptima 50°C. Esta actividad fue inhibida parcialmente por DFP y totalmente por 1-10 fenantrolina. A pH 7 y 37°C la proteasa degradó a la dextranasa produciendo varias formas enzimáticas, en las cuales se detectó actividad hasta 120 kDa. A pH 5.2 y 27°C se produjo por proteólisis limitada, una dextranasa de 155 kDa a partir del precursor de 173 kDa

El efecto del procesamiento proteolítico sobre la actividad de la dextranasa, se determinó a través de un estudio comparativo entre la forma de 173 y la de 155 kDa. A pesar de que la forma de menor peso molecular conservó el 90% de la actividad original, algunas propiedades cinéticas fueron modificadas. La dextranasa procesada proteolíticamente resultó más sensible al proceso de inhibición por exceso de sustrato ($K_i=0.6$ mM) que su precursor de 173 kDa ($K_i=1.8$ mM). No se encontraron diferencias en la estructura de las dextranas producidas por las dos formas enzimáticas. Sin embargo, el comportamiento reológico fue diferente. Por lo que respecta a las reacciones de aceptor, ambas

formas produjeron con el mismo rendimiento el mismo tipo de oligosacáridos. A pesar de esto, la forma de 155 kDa fue más sensible al proceso de estimulación de la actividad por presencia de maltosa que su precursor. En conclusión el proceso proteolítico ocasiona cambios en el peso molecular de las dextranacarases y modifica su actividad.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son los servidores de la vida. Se encuentran en todos los componentes de los seres vivos y son pieza clave en la variedad funcional. Las enzimas, por ejemplo, son proteínas con actividad catalítica. La naturaleza es extremadamente diversa en términos de la gran cantidad y variedad de moléculas orgánicas requeridas para la vida. No sería posible tener esta diversidad sin la existencia de la amplia gama de enzimas que las producen. Los carbohidratos constituyen la clase de compuestos más abundantes en la naturaleza. Anteriormente eran considerados biológica y fisiológicamente menos importantes que los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos. Solían ser considerados únicamente por su importancia como fuente de carbono y de energía, así como material estructural para las células. En las últimas décadas los carbohidratos han adquirido una relevancia biológica creciente debido al descubrimiento de las glicoproteínas y los glicolípidos. Los oligosacáridos representan una parte de las proteínas unidas a la membrana celular y constituyen los sitios de reconocimiento para hormonas, anticuerpos, toxinas, virus y bacterias. Son la base molecular de los grupos sanguíneos, son clave en el reconocimiento, crecimiento y diferenciación celular, entre otras funciones (Thiem, J. 1995). Por otra parte las propiedades fisicoquímicas de los oligosacáridos los hacen atractivos para la industria alimentaria. Son en general menos dulces que la sacarosa, producen bajas viscosidades y bajas actividades de agua, esta última característica los hace efectivos en el control de contaminaciones microbianas (Kwon y col. 1999). Las múltiples aplicaciones de los oligosacáridos en diversos campos, pero particularmente en el área de la salud como es en el caso de la síntesis de vacunas (Zhang y

Kováč, 1999), preprobióticos (Valette, 1993, Tomamatsu 1994), etc., hace sumamente atractiva la búsqueda de procesos de síntesis eficientes y viables.

La gran complejidad estructural de los oligosacáridos es la base de la alta especificidad de sus interacciones y al mismo tiempo dificulta la posibilidad de desarrollar métodos eficientes para su síntesis por vía química.

Tradicionalmente los oligosacáridos se han obtenido mediante extracción de plantas o de la hidrólisis enzimática de polímeros de origen microbiano o vegetal. En general, este tipo de procesos resulta poco eficiente y presenta dificultades para ser llevado a gran escala.

El uso de estrategias desarrolladas por la Biotecnología moderna, constituye una alternativa para la síntesis de oligosacáridos y polisacáridos, ya sea por vía fermentativa o por medio de una bioconversión enzimática.

En lo que a procesos enzimáticos se refiere, actualmente existen dos grandes alternativas: el uso de glicosidasas o de glicosiltransferasas. Progresos recientes en la enzimología han demostrado el uso potencial de las glicosidasas en las reacciones de hidrólisis inversa o de transglicosidación para la síntesis de glucooligosacáridos y galactooligosacáridos. Sin embargo, los bajos rendimientos obtenidos siguen siendo una de las principales limitantes en la aplicación de este tipo de enzimas. Otra opción para la síntesis de oligosacáridos consiste en el uso de transferasas. En la industria son actualmente usadas en la producción de glucooligosacáridos, fructooligosacáridos y ciclodextrinas (Monsan y Paul, 1995). Desde el punto de vista básico son importantes para la producción de oligosacáridos de estructura compleja y de glicoconjugados que son pieza clave en los fenómenos de reconocimiento (Borman 1993, Thomas y col. 1998).

En particular, los glucooligosacáridos pueden ser sintetizados a través de un grupo particular de glucosiltransferasas, que no requieren intermediarios de alta energía, como son las dextrantransferasas (E.C.2.4.1.5) (Remeaud-Simeon, y col., 1994, Monsan y Paul 1995). Estas enzimas catalizan la transferencia de glucosa proveniente de la sacarosa a moléculas aceptoras, principalmente azúcares, para la síntesis de glucooligosacáridos. En ausencia de aceptores el principal producto de la reacción es la dextrana, un polímero compuesto por enlaces $\alpha(1-6)$ en la cadena principal y con ramificaciones en $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$. La estructura química de las dextranas es altamente dependiente de la glucosiltransferasa y esta a su vez de la cepa productora. Las principales bacterias que sintetizan dextranas pertenecen a la familia de lactobacilos particularmente a los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F produce una dextrantransferasa extracelular que cataliza la síntesis de una dextrana que contiene 95% de enlaces $\alpha(1-6)$ y 5% de enlaces $\alpha(1-3)$. Por sus características estructurales este polímero es el más utilizado industrialmente (Robyt, 1979, Alsop 1983). La aplicación racional y eficiente de las dextrantransferasas en la producción de oligosacáridos y polímeros, requiere de un amplio conocimiento de estos sistemas enzimáticos. A este respecto, el estado actual del conocimiento en relación con la estructura y función de las dextrantransferasas, está sujeto aun a múltiples cuestionamientos. Existen propuestas contrastantes en aspectos fundamentales como son el peso molecular, mecanismo de reacción y modelo cinético. El origen de estas controversias recae en la presencia de dextrana en las preparaciones enzimáticas. La síntesis de estas enzimas es inducida por

sacarosa y por lo tanto su presencia ocasiona la asociación de la proteína a grandes cantidades de polímero, el cual hasta la fecha no ha sido posible eliminar completamente. Recientemente el papel de la dextrana como origen de error experimental, ha sido rebatido pues a través de mutaciones químicas se ha obtenido una cepa constitutiva de *Leuconostoc mesenteroides* [B-512FMC], capaz de sintetizar enzimas libres de polímero y a pesar de esto se siguen presentando resultados contradictorios. El objetivo de este trabajo es el contribuir al conocimiento de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC, tratando de establecer las causas que dan origen a la diversidad de comportamientos reportados en la literatura.

II. GENERALIDADES

Las transferasas son enzimas que catalizan el traslado de un grupo funcional específico desde un sustrato (donador) a otro (aceptor). La energía necesaria para la reacción es provista por el enlace original y es almacenada en un intermediario covalente enzima sustrato (Dedonder 1972; Monsan 1995).

Las glucosiltransferasas catalizan la conversión de sacarosa en glucanos de alto grado de polimerización conocidos como dextranas. Sin embargo, en presencia de carbohidratos de bajo peso molecular, las moléculas de glucosa son transferidas a estos azúcares para formar oligosacáridos.

Las dextrantransferasas (DT) (sacarosa:1,6- α -D-glucan 6- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.5) son glucosiltransferasas, en su mayoría extracelulares, elaboradas por microorganismos de la familia *Lactobacillaceae*, géneros *Leuconostoc* (especies *mesenteroides* y *dextranicum*) y *Streptococcus* (Robyt 1979). Estas enzimas catalizan la síntesis de dextranas a partir de sacarosa de acuerdo a la siguiente reacción:

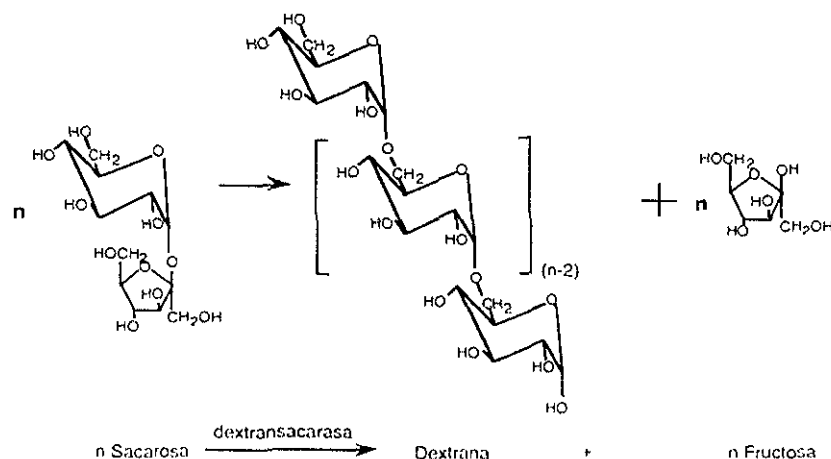


Figura 1. Reaccion de síntesis de dextrana.

II. 1 Dextrana

Dextrana es el nombre asignado a un grupo de polisacáridos bacterianos extracelulares compuestos casi exclusivamente por unidades monoméricas de α -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces $\alpha(1-6)$ (Alsop 1983).

A pesar de que las dextranas representan un problema grave en la industria refinadora de azúcar, se han desarrollado aplicaciones basadas en su inocuidad y su comportamiento reológico, en particular como sustituto de plasma sanguíneo. Sin embargo, son pocas las aplicaciones comerciales de la dextrana debido a que su precio es más alto que el de la celulosa o el almidón y sus propiedades reológicas menos interesantes que las de xantanas o alginatos. Por esta razón, las dextranas sólo son usadas en productos de alto valor agregado (Sephadex[®], preparaciones dextrana hemoglobina, dextrana sulfato, etc.) o alta especificidad de función (dextrana acoplada a sustancias biológicamente activas) (Belder 1990).

Desde 1976 los estudios para dilucidar la estructura de las dextranas se basan en sus propiedades químicas (análisis por metilación, oxidación por periodato) y físicas (solubilidad). Estos trabajos fueron complementados mediante análisis de ¹³C-RMN (Alsop 1983). Se encontró que estos polímeros tienen una relación relativamente alta de enlaces $\alpha(1-6)$ con cantidades variables de $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$ dependiendo de la cepa productora de la enzima (Figura 2).

La cepa B-512 de *Leuconostoc mesenteroides* ha sido la más estudiada, dado que la enzima extracelular que produce cataliza la síntesis de un polímero con alto porcentaje de enlaces $\alpha(1-6)$ consecutivos y relativamente un bajo

porcentaje de ramificaciones con enlaces $\alpha(1-3)$, lo que lo hace atractivo para diversas aplicaciones industriales.

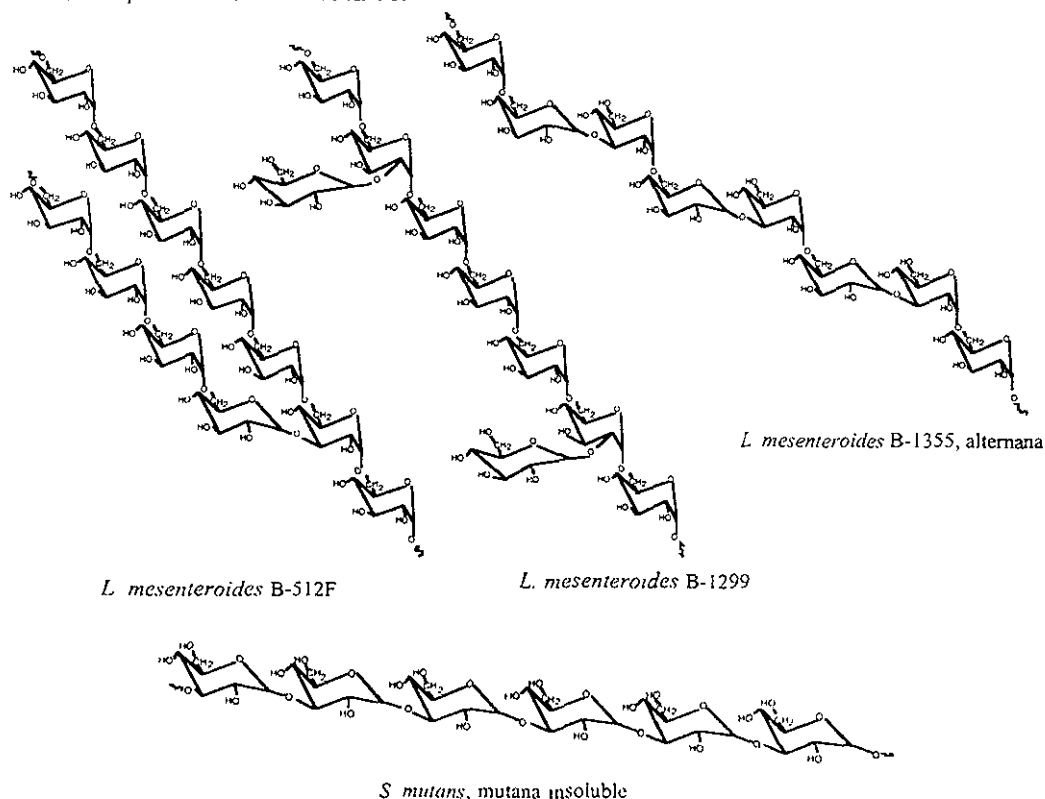


Figura 2. Representación de diferentes estructuras de dextranas sintetizadas por DS pertenecientes a diversas cepas de *Streptococcus* y *Leuconostoc mesenteroides*.

II.2 Reacciones de aceptor.

Koepsell en 1953 observó que cuando se introducían azúcares diferentes a la sacarosa en la mezcla de reacción de la DS, se modificaba la especificidad de la enzima, iniciando la síntesis de oligosacáridos a expensas de la síntesis de dextrana. Los residuos glucosilo de la sacarosa son transferidos por la DS a un grupo hidroxilo libre de estos azúcares denominados aceptores (Paul y col.,

1986; Robyt y Ecklund 1983; Robyt 1992). Los aceptores pueden ser desde monosacáridos hasta polisacáridos y la especificidad de ellos ha sido estudiada (Robyt 1991, 1992). Existen algunos casos en los que los productos de la reacción funcionan a su vez como aceptores produciendo de esta manera series homólogas; en otros, los primeros productos de la reacción pierden la capacidad de actuar como aceptores y en consecuencia se detiene la síntesis de oligosacáridos. Un ejemplo lo constituye la reacción con fructosa, subproducto de la reacción, ya que sólo se produce un disacárido conocido como leucrosa (5-O- α -D-glucopiranosil-D-fructopiranososa) en bajas concentraciones (Koepsell y col., 1953; Stodola y col., 1956; Robyt y Walseth 1978). Muchos carbohidratos pueden actuar como aceptores, habiéndose reconocido hasta la fecha un total de 30, incluyendo a la dextrana (para la ramificación de los polímeros) (Robyt y Taniguchi 1976; Robyt y Ecklund 1983; Ebert y Shenk 1968). Varios autores han clasificado a las moléculas aceptoras de acuerdo a su capacidad para desviar la síntesis de polímero hacia la producción de oligosacáridos y al efecto que ejercen sobre la velocidad de reacción, de tal manera que existen aceptores fuertes, intermedios y débiles (Ebert y Shenk 1968). Además de la naturaleza de los aceptores, la concentración de los mismos está involucrada en el número de moléculas desviadas hacia la síntesis de oligosacáridos. Lo anterior se observa a través del efecto que tiene en el rendimiento la relación de concentraciones sacarosa/aceptor (s/a). Un medio con una alta concentración de acepto relative a la sacarosa (relación s/a muy pequeña), se espera que produzca poca dextrana y una mayor proporción de oligosacáridos (Robyt y Eklund 1983; Tanriseven y Robyt 1993). Entre los aceptores estudiados, se ha

demostrado que la maltosa y la isomaltosa son los más eficientes (Robyt y Eklund 1983). Entre estos por su disponibilidad, la maltosa ha sido ampliamente utilizada en la síntesis de oligosacáridos a través de la DS. Por otro lado, la estructura química de los productos de aceptor, al igual que la estructura de las dextranas, depende de la cepa productora de la DS. La glucosiltransferasa de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F en presencia de maltosa produce inicialmente un trisacárido conocido como panosa (6²-O- α -D-glucopiranosil maltosa). Cuando este azúcar funciona a su vez como aceptor, se produce un tetrasacárido (6²-O-isomaltosilmaltosa), que nuevamente funciona como aceptor para producir un pentasacárido (6²-O-isomaltotriosilmaltosa) y así sucesivamente. De esta manera se produce una serie homóloga de productos de aceptor que son isomaltodextrinas unidas al oxígeno del carbono número seis del extremo no reductor de la maltosa. Los productos oligosacáridos son designados por las siglas en inglés que indican el grado de polimerización como: DP3, DP4, DP5, etc., (Robyt y Eklund 1983).

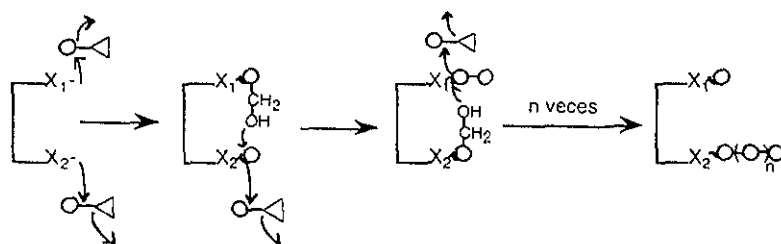
II.3 Mecanismo de reacción.

El mecanismo de reacción de la DS es hasta la fecha sujeto de polémica. Son dos la hipótesis propuestas. Robyt y col., en 1974 proponen un mecanismo que hasta la fecha es el más difundido ya que explica diversos fenómenos que ocurren en la reacción con la DS (Figura 3). Dicho mecanismo supone la existencia de dos grupos nucleófilos en el sitio activo (X_1 y X_2). Estos grupos atacarían a la sacarosa para producir un complejo con dos grupos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del C₁. Hasta la fecha se ha comprobado la presencia de sólo un grupo carboxilo de ácido aspártico en el

sitio activo, el cual es esencial para la catálisis (Mooser y col., 1991). En pasos subsecuentes, el oxígeno del C_6 -OH de una de las moléculas de glucosa del complejo realizaría un ataque nucleofílico al C_1 de la glucosa vecina para formar un enlace $\alpha(1-6)$. Esto ocasionaría la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permitiría atacar a una nueva molécula de sacarosa, para restaurar así el complejo entre la enzima y glucosa. El grupo C_6 -OH de la nueva glucosa incorporada, atacaría al C_1 del grupo isomaltosil, formando un enlace $\alpha(1-6)$ adicional y dando lugar a un trisacárido.

Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos formarían alternativamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crecería por la aparente inserción de glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido. Con este modelo se eliminaría la necesidad de un iniciador.

El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa alcanza niveles tales que se hace posible la transferencia de cadenas de dextrana y/o la unidad glucosilo unida al sitio activo, deteniendo el crecimiento del polisacárido o formando leucrosa, respectivamente.



X_1 y X_2 , representan nucleófilos del sitio activo, $\bigcirc-\triangle$ representa sacarosa; $\bigcirc$ es un grupo glucosilo, $\triangle$ es un grupo fructosilo y $-$ representa un enlace $\alpha(1-6)$

Figura 3. Mecanismo propuesto por Robyt para explicar la síntesis de dextrana

Robytt y col., (1978) propusieron también un mecanismo para explicar las reacciones de aceptor. Se postula que un grupo hidroxilo del aceptor actúa como nucleófilo y desplaza tanto al grupo glucosilo como al grupo dextranosilo del sitio activo, formando con ellos un enlace $\alpha(1-6)$.

Además de dilucidar el mecanismo de formación de dextrana, propuso un modelo estructural para explicar los fenómenos observados con la DS. Su modelo contempla la presencia de dos sitios de unión a sacarosa y otro de unión para aceptores, según se muestra en la Figura 4 (Tanriseven y Robytt, 1992). Esta conclusión fue derivada de observar que aceptores eficientes no inhibieron competitivamente la unión de la sacarosa. De esta manera postuló la existencia de un sitio de unión para los aceptores, separado del sitio de unión a sacarosa. Se desconoce el número de sitios de unión a aceptores, pero podría haber más de uno.

De acuerdo con Robytt y Tanriseven (1992), el sitio de unión a aceptores se encuentra entre los dos nucleófilos del sitio activo, de tal manera que la unión de un aceptor bloquea la inserción de una molécula de glucosa en la dextrana inhibiendo la síntesis del polisacárido y desviando las unidades de glucosa hacia la síntesis de productos de aceptor (Figura 5). Los aceptores pueden también reaccionar con los grupos dextranosilo unidos al sitio activo deteniendo así la síntesis de polisacárido. Para explicar por qué la maltosa es el mejor aceptor, propone que en el sitio de unión a aceptores hay por lo menos 2 subsitios.

En el caso de las reacciones de ramificación, propone que la dextrana actúa como aceptor desplazando unidades de glucosa para formar una ramificación o bien, que pueda desplazar a un grupo dextranosilo para formar una

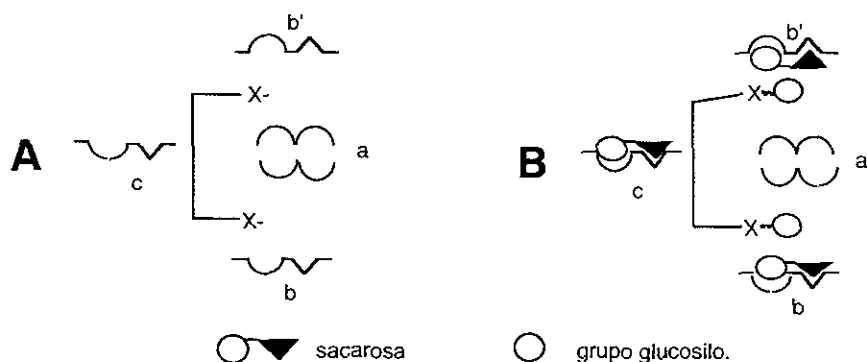


Figura 4. Modelo estructural del sitio activo de la dextranasa propuesto por Robyt (1993). **A.** La dextranasa activa, muestra dos sitios de alta afinidad a la sacarosa (b y b'); un sitio alostérico de unión a sacarosa de baja afinidad (c) y un sitio de unión a aceptores (a). **B.** Enzima inhibida alostéricamente por una alta concentración de sacarosa, la conformación de la enzima cambió por lo tanto no se puede sintetizar dextrana.

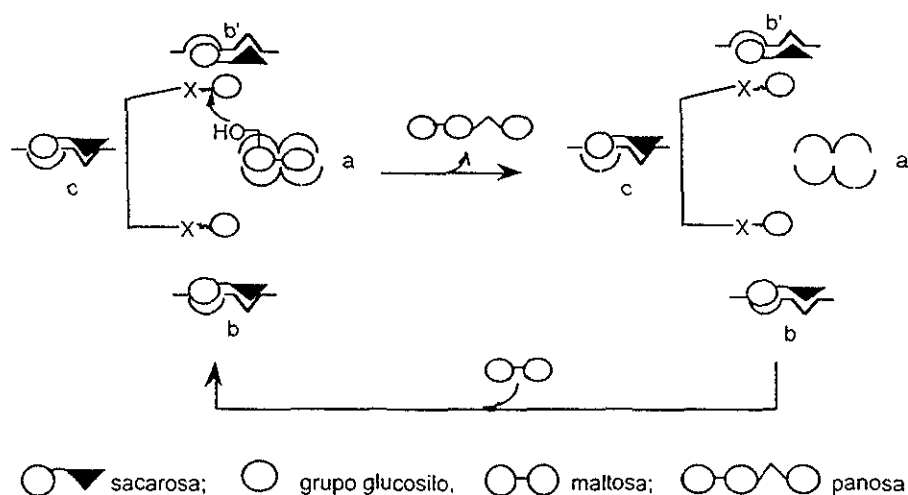


Figura 5. Modelo estructural propuesto por Robyt para explicar las reacciones de aceptor. La enzima se encuentra alostéricamente inhibida y en presencia de maltosa produce el primer componente de la serie homóloga de oligosacáridos. panosa.

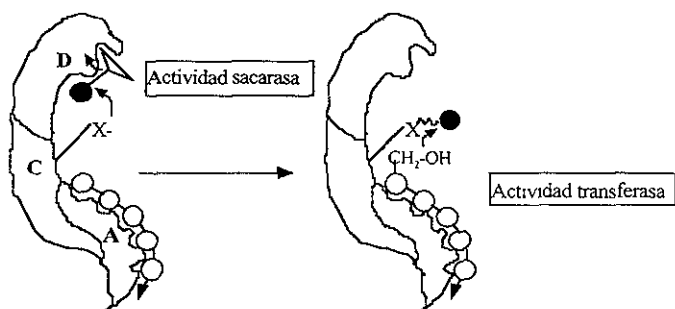
ramificación más grande, por lo que no se requiere de un sitio adicional para la formación de ramificaciones.

Se ha propuesto igualmente la existencia de un tercer sitio de unión a sacarosa de baja afinidad para explicar la inhibición por exceso de sustrato (Tanriseven y Robyt, 1993), de tal manera que al haber un excedente de sacarosa este sitio es ocupado, ocasionando un cambio en la conformación de la enzima (Figura 4 y 5). De acuerdo con la propuesta este cambio no afectaría la unión de moléculas de sacarosa, ni la formación del complejo glucosil-enzima, ni disminuye la afinidad por los aceptores, sólo evita la interacción de los dos grupos glucosilo para la síntesis de dextrana. Esta es la conclusión derivada de experimentos realizados en reacciones sin aceptor con altas concentraciones de sacarosa. A través de cromatografía en placa fina, se observa la producción de glucosa y fructosa libres. Si a estas preparaciones se les agrega un aceptor potente como la maltosa, la síntesis se desvía casi completamente hacia la producción de oligosacáridos, siendo mínima la cantidad de dextrana sintetizada aún empleando relaciones $s/a=1$. El modelo estructural y funcional total se presenta en las Figuras 4 y 5. Es conveniente señalar que todos los estudios realizados por Robyt se refieren al comportamiento de la DS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Por otra parte, se ha propuesto que el mecanismo de reacción de las DS es semejante al de las glucosidasas. Esta hipótesis es apoyada por dos grupos de investigación. Kobayashi, Yokoyama y Matsuda (1986), a partir de un estudio cinético de la DS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B1416, proponen que la molécula donadora (sacarosa) y el sustrato aceptor (dextrana), se unen a sitios distintos de la enzima. Varios resultados son congruentes con este modelo. Se demostró que el tipo de inhibición de diversos compuestos era diferente para cada sustrato (sacarosa y dextrana). Se agrupó la acción de 16

efectores en seis categorías dependiendo si activaban o inhibían la actividad de sacarasa o transferasa de la enzima. La actividad sacarasa representa la reacción entre la sacarosa y el grupo catalítico y la actividad de transferasa representa la reacción entre la dextrana y el grupo catalítico el cual retiene un grupo glucosilo de la sacarosa. Mediante gráficas bifásicas de dobles recíprocos variando las concentraciones de sustrato en presencia o ausencia de inhibidores, se demostró que los valores de K_M pueden cambiar conforme varía la proporción sacarosa/dextrana y el cambio en la afinidad por los sustratos indica competencia entre la sacarosa y la dextrana por el sitio de aceptor. De esta manera es posible que cuando haya un exceso de sacarosa ésta ocupe dos sitios, cambiando significativamente la velocidad de reacción. Todo lo anterior permitiría justificar la existencia de sitios independientes para los aceptores y para los donadores (Kobayashi, Yokoyama y Matsuda 1984, 1985).

El crecimiento de las cadenas, como puede observarse en la Figura 6, se realiza por el extremo no reductor, según fue comprobado por Kobayashi y Matsuda (1978), al observar que la glucoamilasa inhibía competitivamente la síntesis de glucano, siendo la inhibición consecuencia de la competencia entre la glucoamilasa y la DS por el grupo glucosilo del extremo no reductor de la dextrana. Dentro de las diferencias con el mecanismo propuesto por Robyt, destaca en este caso la propuesta de la necesidad de un iniciador para el comienzo de la reacción.



A: sitio de unión al aceptor; C: sitio catalítico; D: sitio de unión al donador; X: residuo catalítico (nucleófilo); ●: sacarosa; ●: glucosa; ○-○-○-○-○: dextrana (aceptor).

Figura 6. Ilustración de la hipótesis propuesta por Kobayashi (Kobayashi y Matsuda 1986) para explicar el mecanismo de reacción de la DS.

De la misma manera, Mooser y col., (1991) basados en resultados de estudios cinéticos, aislamiento de secuencias y en la caracterización de complejos glucosil-enzima, proponen que en el sitio activo de la DS de *Streptococcus* existen dos grupos funcionales que juegan un papel importante en el mecanismo de reacción: sólo un grupo carboxilato (contradiendo la idea de Robyt de dos carboxilos en el sitio activo) que forma el complejo glucosilenzima, identificado como carboxilo de ácido aspártico y un residuo de histidina que facilita la salida de la fructosa a través de la donación de un protón.

II.4. Estudio cinético.

Algunos de los fenómenos que caracterizan el comportamiento cinético de la DS son la inhibición por exceso de sacarosa (Hehre 1946; Stringer y Tsuchiya 1958); el aumento de la velocidad de reacción en presencia de aceptores fuertes (efecto que contrarresta al anterior) (Stringer y Tsuchiya 1958); la

inhibición por exceso de los mismos (Reh y col., 1990); el cambio de las constantes cinéticas en función del tipo y concentración del aceptor (Stringer y Tsuchiya 1958, Oriol y col., 1987) y el controversial aumento de la velocidad inicial por presencia de dextrana (Kobayashi y Matsuda, 1978, Robyt, 1979, Willemot y col., 1988, Miller y col., 1986, Robyt 1995, y Monchois y col., 1998). Se han reportado diversas constantes cinéticas para la reacción de síntesis de dextrana (Hehre, 1946, Stringer y col., 1968, Martínez-Espíndola y López-Munguía 1985, Miller y col., 1986). El fenómeno de estimulación de la velocidad por presencia de dextrana no ha podido esclarecerse y no es reproducible. Lo anterior, aunado al escaso conocimiento acerca de la estructura y mecanismo de reacción de la DS, ocasiona que las propuestas de modelos cinéticos sean limitadas.

Las reacciones más estudiadas desde el punto de vista cinético son las de síntesis de polímero. Su descripción cinética se inicia en 1946 (Hehre 1946) al encontrarse que utilizando concentraciones de sacarosa hasta 200 mM, la reacción obedece el modelo de Michaelis-Menten, mientras que a concentraciones mayores las velocidades disminuyen. En estudios posteriores se encontró que la disminución de la velocidad de reacción es ocasionada por una inhibición debida al exceso de sustrato. En lo que respecta a las reacciones de aceptor, en los primeros estudios se observó que al agregar α -metilglucósido (aceptor fuerte) en la mezcla de reacción, la velocidad aumenta, disminuyendo el efecto inhibitorio ocasionado por el exceso en la concentración de sacarosa. Se propuso entonces una ecuación que modelaba el comportamiento de la velocidad global de reacción para determinadas concentraciones de aceptor y de sacarosa (Stringer y Tsuchiya 1958). Años

más tarde se planteó una ecuación que describía el comportamiento de la reacción global en presencia y ausencia de aceptores y en un intervalo más amplio de concentraciones. Esta ecuación se basa en un mecanismo de inserción, aunque tiene la limitación de no describir el aumento en la velocidad de reacción observado en presencia de aceptores (Ebert y Shenk 1968).

Posteriormente, haciendo una semejanza con la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, se propuso que el mecanismo cinético que describía el comportamiento de la DS en la síntesis de polímero era ping-pong Bi-Bi, como se ilustra en la Figura 7. En este mecanismo el polímero actúa como sustrato y producto a la vez (Kobayashi y Matsuda 1978).

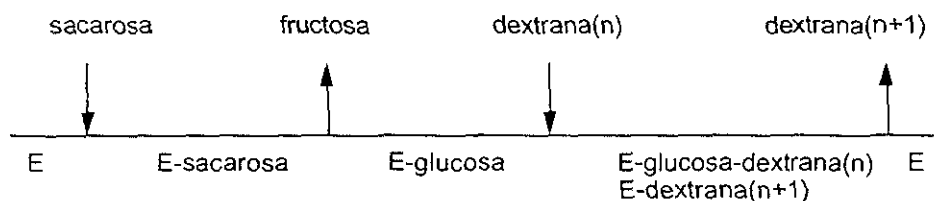
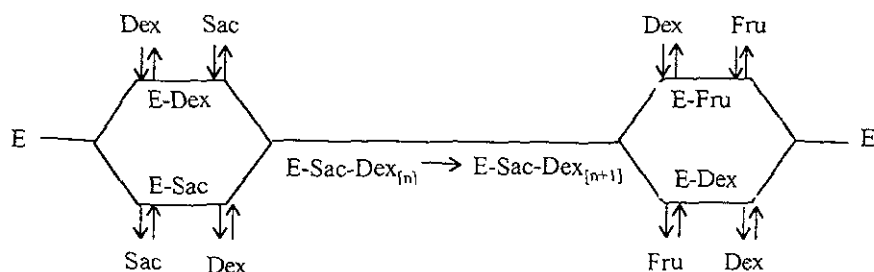


Figura 7. Esquema del mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto para la DS. E=DS (Kobayashi y col., 1978).

Cuando un sustrato y un producto son muy similares, como en el caso del crecimiento de cadenas de dextrana, el comportamiento cinético es diferente al de un mecanismo ping-pong Bi-Bi usual, se presentan fenómenos de inhibición por sustrato en este caso la dextrana tendría un efecto inhibitorio. Kobayashi trabajó en un intervalo limitado de concentraciones de dextrana y supuso que con excesos de polímero se presentaría inhibición. Haciendo uso de este

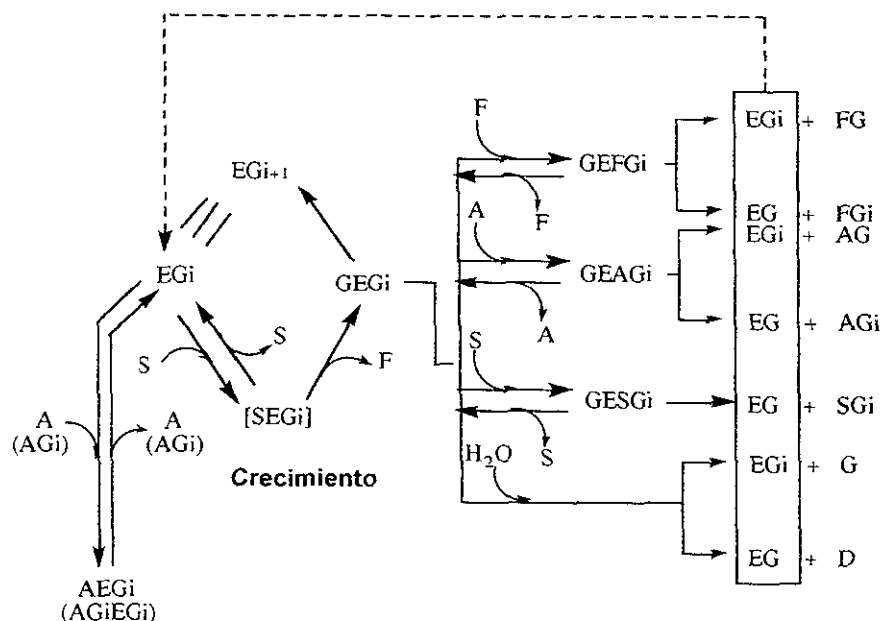
hecho, se refutó el mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto ya que un exceso de dextrana no inhibía la velocidad de reacción de síntesis de polímero. Mooser y col., en 1985 propuso un mecanismo secuencial aleatorio de equilibrio rápido que modela la transferencia de glucosa hacia el polímero en crecimiento. En este mecanismo se propone la formación de un complejo enzima-sacarosa-polímero (complejo central) antes de que sea liberada la fructosa (Figura 8).



Dex=dextrana; Sac=sacarosa; Fru=fructosa

Figura 8. Mecanismo secuencial aleatorio propuesto por Mooser en 1985.

Reh y Buchholz en 1990 propusieron un modelo complejo, basado en el mecanismo de inserción descrito por Robyt, que incluye reacciones catalizadas por la DS, en especial las reacciones de aceptor. Recientemente, se han hecho intentos por validarlo (Böker y col., 1993, Demuth y col., 1999, Heinke y col., 1999), pero además de que sólo ha funcionado satisfactoriamente con la enzima de la cepa B-512F (Dols y col., 1999), deja muchos aspectos sin cubrir principalmente el papel de la dextrana como sustrato.



Inhibición por exceso de aceptor

Reacciones de aceptor

E=dextranasa, S=sacarosa, F=fructosa, G=glucosa, Gi=dextrana en crecimiento, D=dextrana, A=aceptor

Figura 9 Mecanismo cinético propuesto para la DS por Reh y Buchholz en 1990.

II.5 Estructura de la enzima.

Recientemente, como consecuencia de la evolución en las técnicas de biología molecular e ingeniería de proteínas, se han realizado numerosos estudios que tratan de dilucidar la estructura del sitio activo de la DS, con el fin de esclarecer el mecanismo de reacción. Estos estudios se han realizado predominantemente con las glucosiltransferasas (GTF's) de varias especies de *Streptococcus* y en los últimos años con la DS de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. *Streptococcus* produce enzimas constitutivas (Alsop 1983) que

sintetizan polímeros solubles (GTF-S) e insolubles (GTF-I). En *Leuconostoc mesenteroides* la producción de DS es inducida por la presencia de sacarosa. Se ha determinado que las enzimas están compuestas por dos dominios funcionales (Figura 10): el dominio N-terminal en el que se localiza la actividad catalítica y el dominio C-terminal en el que se encuentra el segmento de unión al glucano. Este último no tiene actividad catalítica pero presenta una alta afinidad por la dextrana, la cual conserva aún cuando es escindido del resto de la enzima (Mooser y Wong 1988, Funane y col., 1998, Monchois y col., 1998). Es una región formada por 300 a 400 aminoácidos y contiene unidades de repetición (UDR) formadas por aproximadamente 30-65 aminoácidos (Wong y col., 1990; Kobayashi y col., 1989, Ferretti y col., 1987). Las UDR se han clasificado con base en la similitud de secuencia y han sido designadas A, B, C y D de acuerdo a la composición de aminoácidos (Ferretti y col., 1987; Giffard y col., 1994; Monchois y col., 1999). Todas las UDR presentan el motivo estructural YG, cuya estructura primaria es la siguiente:

NDGYFxxxGH^ox(G/N)xH^oH^oH^o donde x, es un aminoácido no conservado y H^o es un residuo de aminoácido hidrofóbico. En algunas DS, al remover el 80% de las UDR, se obtiene una proteína únicamente con actividad de sacarasa, perdiendo totalmente la actividad transferasa (Ferretti y col., 1987; Kato y Kuramitsu 1990). Por otro lado, al eliminar todas las UDR se ocasiona la pérdida total de actividad. En otras enzimas, como la DS de *L. mesenteroides* B-512F, el perder 40 % de las UDR debilita de tal manera la unión del glucano que se pierde más del 75% de la actividad (Lis y col., 1995, Monchois y col., 1998). Las UDR tienen un papel importante mas no exclusivo en la determinación de la estructura del polímero producido. Comparando la

secuencia de aminoácidos de la GTF-S con la GTF-I de *S. mutans*, se encontró que hay regiones conservadas para cada grupo. Al cambiar seis aminoácidos de las regiones no conservadas en la GTF-I por los correspondientes en la GTF-S, la enzima resultante produjo polímero soluble a diferencia de la enzima nativa. De igual manera, al cambiar un sólo aminoácido de la GTF-S por el correspondiente de la GTF-I, ocurrió la síntesis de polímero insoluble (Shimamura y col., 1994).

Además de estas funciones, se piensa que las UDR participan en la determinación de la dependencia de un iniciador para la síntesis de dextrana. Se han reportado DS de *Streptococcus* dependientes de iniciador y los resultados de algunos trabajos de construcción de enzimas híbridas a partir de dos genes estructurales de enzimas que diferían en la dependencia al iniciador, sugieren que el extremo carboxiterminal que contiene las UDR juega un papel importante en este fenómeno (Nakano y Kuramitsu 1992; Simpson y col., 1995).

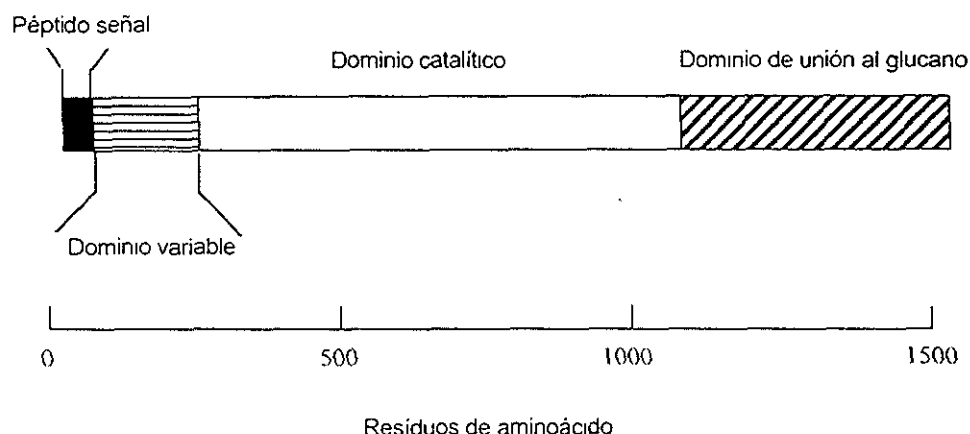


Figura 10. Representación esquemática de los dominios estructurales de la DS

En lo que respecta al extremo N-terminal, la región comprendida del aminoácido 268 al 1134 en la secuencia de la DS de *L. mesenteroides*, es homóloga para todas las DS y resulta esencial para la catálisis. También se ha identificado un residuo de aspártico al que se une covalentemente la glucosa, mismo que al ser mutado, ocasiona la pérdida total de actividad (Mooser y col., 1991; Mooser e Iwaoka 1989; Monchois y col., 1997). Por otra parte, se ha sugerido que existe por lo menos otro aminoácido involucrado en la catálisis. A este respecto se ha encontrado un residuo de histidina que se propone participa en la liberación de fructosa a través de la donación de protones (Fu y Robyt 1988; Monchois y col., 1999; Tsumori y col., 1997). Existe también una hipótesis acerca de la participación de lisinas en el mecanismo de reacción, pues se ha inhibido la actividad al modificar químicamente estos residuos (Goyal y Katiyar 1995a; Goyal y Katiyar 1995b).

Como consecuencia de la existencia de sitios separados para la unión de sacarosa y dextrana, se ha propuesto que en ausencia de sustrato, los dominios en los que se ubica el sitio de unión no se encuentran correctamente alineados para la catálisis. La unión con el sustrato induce un realineamiento conformacional que junta a los dominios para formar el sitio activo. Se sugiere que la dextrana tiene propiedades alostéricas en la síntesis de polímero, ya que la unión de ésta a la enzima induce cambios conformacionales de tal manera que queda expuesto el sitio de unión a la sacarosa. Así mismo, al unirse la sacarosa a la enzima produce un cambio conformacional que facilita la unión de la dextrana (Mooser e Iwaoka 1989; Funane y col., 1993; Robyt 1995)

Finalmente, existe en la estructura de la enzima un dominio variable, correspondiente a una región no conservada localizada junto al extremo carboxilo terminal del péptido señal. Esta región fue deletada en *Streptococcus sobrinus*, sin observarse algún cambio en la actividad (Abo y col., 1991). Por otra parte la DS A de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 no posee este dominio (Monchois y col., 1999). Se desconoce el significado de la presencia de esta región.

En lo referente a la estructura secundaria y terciaria de la DS, hasta la fecha no se han realizado estudios cristalográficos, pero existen dos predicciones de la estructura secundaria del dominio amino terminal. Ambos estudios tienden a mostrar que las glucosiltransferasas poseen una estructura de barril $(\alpha/\beta)_8$ como las glicosidasas (incluyendo α -amilasas), ciclodextrinas glucosiltransferasas (CGTasa), isoamilasa y glucano glicosidasas (Mac Gregor y col., 1996; Devulapalle y col., 1997).

El motivo $(\alpha/\beta)_8$ se caracteriza por la presencia de 8 hebras β -plegadas paralelamente (E_1 - E_8) localizadas en el centro de la proteína alternadas con 8 α -hélices (H_1 - H_8) localizadas en la superficie de la proteína.

Estas dos predicciones dan el mismo resultado concerniente a la colocación de H_3 - E_8 . El aspártico involucrado en la formación del complejo glucosil-enzima estaría localizado en la región carboxilo terminal de E_4 . Sin embargo, la localización de H_1 - E_3 difiere en las dos propuestas. Para Mac Gregor y col., existe una permutación circular de estos elementos: la hélice amino terminal debería de ser H_3 y los elementos E_1 - H_1 - E_2 - H_2 - E_3 , deben estar alejados de la

secuencia en lugar de ser el inicio de la misma. De acuerdo con Devulapelle y col., (1997), los primeros elementos deben localizarse en la región amino terminal variable. Sin embargo, esta hipótesis no es consistente con los resultados poco significativos acerca del papel del dominio variable. Estas predicciones han permitido el alineamiento de aminoácidos conservados que tienen un papel importante en el mecanismo de reacción de las glicosidasas. Lo anterior ha permitido proponer funciones no contempladas a diferentes residuos de aminoácidos de al DS.

II.6 Peso molecular

Existen grandes controversias en lo concerniente al peso molecular. Se han reportado pesos moleculares en el intervalo de 1.85×10^5 Da a 6.4×10^4 Da (Tabla 1). Adicionalmente, se presenta el fenómeno de multibandeo en una sola muestra analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). En un inicio se sugirió que estos fenómenos eran ocasionados por la presencia de dextrana en las preparaciones enzimáticas. El polímero ocasionaba problemas en la migración de las proteínas en SDS-PAGE (Kim y Robyt 1994b). Lo anterior se confirmaba al observar la aparición de bandas de menor peso molecular cuando se eliminaba una porción de dextrana a las enzimas. Se concluyó que el proceso estaba relacionado con la disgregación de subunidades de un oligómero de alto peso molecular Kim y Robyt 1994b.

Tabla 1. Pesos moleculares reportados para la DS de *Leuconostoc mesenteroides*

Cepa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Peso molecular (kDa)	Referencia
512F	64 65	Kobayashi y Matsuda 1990
512F	177 158	Miller y col., 1986
512F	195 130 65	Willemot y col., 1986
512FM	158	Fu y Robyt 1990

Posteriormente, utilizando agentes químicos se logró mutar entre otras a la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F para producir DS constitutivamente (Mizutani y col., 1994; Kim y Robyt 1994a). Además, utilizando herramientas de biología molecular, se logró aislar y expresar el gen de la DS en *E. coli* (Wilke-Douglas y col., 1989), de esta manera se obtuvieron enzimas libres de polímero. Sin embargo, los pesos moleculares de las DS todavía se encontraban en un amplio intervalo (Tabla 2), existiendo la posibilidad de la presencia de subunidades. Lo anterior se replanteó al observarse la formación de bandas de 65, 62, y 57 kDa a partir de una DS de 184 kDa purificada por SDS-PAGE, después de haber sido almacenada 30 días a 4°C (Kim y Robyt 1994b).

El gen de la DS de *Leuconostoc mesenteroides* codifica para una proteína de 1527 aminoácidos, lo que equivaldría a un peso molecular de 169 kDa. Debido a lo anterior se ha propuesto que los diversos pesos moleculares reportados para las DS pudieran ser producto de actividades proteolíticas presentes en las

través de SDS-PAGE. Este polipéptido se convirtió en una proteína de 156 kDa después de incubarse por 96 h a pH 6.3 y 25°C (Grahame y Mayer 1984). En lo que respecta a la actividad, se realizó un estudio comparativo entre las formas de 174 y 156 kDa (Grahame y Mayer 1985). Se analizó la eficiencia catalítica y la estructura de la dextrana producida, sin que se encontraran diferencias en el comportamiento de estas dos formas de la enzima.

En *Leuconostoc mesenteroides* hasta la fecha no se ha detectado la presencia de proteasas. Sin embargo, se han detectado cambios en el peso molecular semejantes a los reportados en *Streptococcus sanguis* (Fu y Robyt 1990; Kim y Robyt 1994b; Kitaoka y Robyt 1998; Miller y Robyt 1986a; Miller y Robyt 1986b; Miller y Robyt 1986c; Wilke-Douglas y col., 1989). Por lo que respecta a la actividad, se han realizado estudios relacionados con la eficiencia catalítica de las reacciones de síntesis de polímero, concluyéndose que las formas de 173 y 155 kDa son similares (Fu y Robyt 1990, Miller y Robyt 1986a, Miller y Robyt 1986b) Hasta la fecha no se han realizado estudios más específicos respecto a tipos de producto y reacciones de aceptor.

III. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de las glucosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*, a través de la exploración de la hipótesis del procesamiento proteolítico como origen de la diversidad de pesos moleculares de la dextrantransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC y su implicación en el comportamiento bioquímico de la enzima, en particular las reacciones de producción de polímero y oligosacáridos.

Los objetivos particulares son:

1. Determinar la presencia de proteasas en las preparaciones de dextrantransferasa tanto en la cepa silvestre como en la constitutiva.
2. Caracterizar la actividad proteolítica en términos de pH, temperatura y efecto de inhibidores.
3. Determinar el efecto de la actividad proteolítica sobre el peso molecular de la dextrantransferasa.
4. Estudiar el efecto de la proteólisis de la dextrantransferasa en las reacciones de síntesis de polímero y oligosacáridos.
5. Determinar el punto de escisión proteolítica.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Producción de la DS

IV.1.1 Microorganismos

La DS constitutiva fue producida a partir de un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. La cepa fue proporcionada por el Dr. John F. Robyt de la Universidad de Iowa.

La DS silvestre (síntesis de DS inducible por la presencia de sacarosa), fue producida a partir de un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

La cepa se obtuvo de la colección Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de Peoria, Illinois.

En ambos casos se partió de células crecidas en agar inclinado y conservadas a 4°C. Posteriormente estas células se cultivaron y conservaron en una solución de glicerol a una concentración de 15% (v/v) a -4°C. Las soluciones así preparadas se utilizaron como inóculos para las fermentaciones a nivel matraz.

IV.1.2 Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo para la conservación del microorganismo (agar inclinado), se presenta en la Tabla 3. La cepa de colección *L. mesenteroides* NRRL B-512F fue obtenida como liofilizado por lo que previamente fue activada.

Tabla 3. Composición del medio de conservación de *L. mesenteroides*.

Componente	Concentración
Tryptona 0123 (Difco)	10 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Jugo de tomate, filtrado, pH 7	2% (v/v)
Agar	15 g/l

La composición del medio de cultivo para el crecimiento de *L. mesenteroides* B-512FMC, se presenta en la Tabla 4. El pH del medio se ajustó a 6.9 con ácido ortofosfórico antes de esterilizar. La glucosa y las sales se esterilizaron por separado.

La composición del medio de cultivo utilizado para *L. mesenteroides* B-512F se presenta en la Tabla 5. Al igual que en el caso anterior, el pH se ajustó a 6.9 con ácido ortofosfórico antes de esterilizar

IV.1.3 Producción de la DS constitutiva.

Los inóculos se produjeron activando las células almacenadas en glicerol, en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo estéril. Los glicerolos no debían tener más de 6 meses de almacenamiento. El microorganismo se creció

a 25°C en condiciones estáticas por 12 h o hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 1.5. Posteriormente fueron utilizados como inóculos en una

Tabla 4. Composición del medio de cultivo utilizado para *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC

Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	20
Extracto de levadura	10
Peptona	5
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

fermentación de 1 L realizada en matraces Fernbach (2.8 L), a 25°C en condiciones estáticas. La fermentación se detuvo al alcanzar una densidad óptica en el intervalo 1.5-2 o al alcanzar un pH de 5.9-6.3.

El crecimiento del microorganismo se determinó por turbidez a 650nm en un espectrofotómetro Spectronic 601. Al final de la fermentación el pH se ajustó a 5.2. El sobrenadante de fermentación fue recuperado después de centrifugar el medio de cultivo a 5000Xg por 15 min

Tabla 5. Composición del medio de cultivo utilizado para *Leuconostoc mesenteroides* B-512F

Componente	Concentración (g/l)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	10
Peptona	5
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ 7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

IV.1.4 Producción de la DS silvestre

Los inóculos se produjeron activando las células almacenadas en glicerol, en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo estéril. El microorganismo se incubó a 30°C en condiciones estáticas, de 12-14 h o hasta alcanzar una densidad óptica de entre 6-7, después de realizar una dilución 1:10. Estos cultivos se emplearon posteriormente como inóculos en una fermentación de 500 ml en matraces Fernbach (2.8 L), a 30°C y 200 rpm. La fermentación se detuvo al alcanzar una densidad óptica de entre 6-7. Al final de la fermentación

el pH se ajustó a 5.2. El sobrenadante de fermentación fue recuperado después de centrifugar el medio de cultivo a 5000Xg por 15 min

IV.2 Concentración de muestras

Los sobrenadantes de fermentación fueron concentrados 10 veces por ultrafiltración en un sistema Amicon (Amicon, Grace & Co.-Conn., Beverly, Ma.), equipado con un cartucho de fibras huecas HP 100-20, con tamaño de corte de 100 kDa. Los ultrafiltrados fueron posteriormente almacenados a 4°C.

Para la electroforesis de proteínas, los ultrafiltrados fueron concentrados 10 veces utilizando membranas cónicas de ultrafiltración con tamaño de corte de 50 kDa (Centriflo[®], Amicon).

Para las determinaciones de actividad proteolítica en geles, los ultrafiltrados requirieron pasos de concentración adicionales. Las muestras que tenían baja actividad proteolítica (actividad no detectada en geles), fueron dializadas contra amortiguador de acetato de amonio 50 mM, pH 5.2, liofilizadas y resuspendidas en un volumen de amortiguador de acetato de sodio 50 mM, (pH 5.2, con CaCl₂ 0.3 mM y azida de sodio 3 mM), necesario para concentrar la muestra 2000 veces. Los ultrafiltrados que contenían alta actividad proteolítica no se liofilizaron, fueron concentrados 10 veces más utilizando membranas cónicas de ultrafiltración (Centriflo[®], Amicon), con tamaño de corte 25 kDa.

IV.3 Determinación de actividad DS.

La actividad DS fue determinada midiendo la velocidad inicial de liberación de fructosa a partir de sacarosa, utilizando un kit enzimático (Boehringer Mannheim Germany). Las reacciones fueron realizadas a 30°C en amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.2, conteniendo CaCl_2 0.3 mM y azida de sodio 3 mM. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de fructosa por minuto a 30°C.

IV.4 Electroforesis

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), fue realizada de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli U. K. 1970). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 0.75 mm de espesor. Las muestras fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de muestra 2X, que contenía Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05%. Para la determinación de peso molecular, esta mezcla se calentó por 5 min. Después de realizada la electroforesis, las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie R-250.

Para la detección de actividad enzimática en geles (DS o proteasa), la electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes, el amortiguador de muestra no contuvo β -mercaptoetanol y las preparaciones fueron incubadas por 1 h a 27°C antes de ser aplicadas al gel. La actividad DS fue detectada después de realizar la electroforesis a 4°C. El gel fue lavado a 4°C con amortiguador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.2, conteniendo CaCl_2 0.3 mM, azida de sodio 3

mM y Triton X-100 0.1% (v/v). Posteriormente el gel fue incubado con el mismo amortiguador conteniendo de sacarosa 300 mM, a 27°C por 12 h. La actividad fue detectada por la formación de polímero.

IV.5 Cuantificación de proteína

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hercules, CA) y albúmina sérica bovina (Fracción V, SIGMA), como estándar.

IV.6 Proteólisis limitada de la DS utilizando tripsina

La proteólisis limitada de la DS, se realizó incubando una preparación de DS (15 µg de proteína) con tripsina (0.15, 0.015, 0.006, 0.003, 0.0015 µg) en amortiguador Tris-HCl 0.2 M, pH 8, CaCl₂ 1mM a 37°C por 2 h y en un volumen total de reacción de 30µl. La proteólisis se detuvo por la adición de 2µl de diisopropilfosfluoridato (DFP) 50 mM.

IV.7 Ensayos de actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue detectada en SDS-PAGE que contenían de acrilamida 15% (p/v) y gelatina 0.1% (p/v) (Henssen y Dowdle 1980), utilizando el sistema de Laemmli (Laemmli U. K. 1970). Después de la electroforesis, el gel fue lavado dos veces con amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8 conteniendo Triton X-100 0.5% (v/v), durante 1 h. Posteriormente el gel fue incubado en el mismo amortiguador a 37°C por 12h y finalmente teñido por 2 h con azul de Coomassie

R-250 preparado en una mezcla que contenía 2-propanol 25%/ácido acético 10%. Finalmente fue destañado con ácido acético 10%. Las bandas claras correspondieron a zonas de actividad proteolítica.

La proteasa de alto peso molecular fue detectada en SDS-PAGE-GCP incubando los geles después de la electroforesis por 72 h a 37°C en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8. La transformación de la proteasa de alto peso molecular en la forma de 30 kDa, se determinó incubando una preración en el buffer de muestra por 3 h a 27°C y comparando los resultados con una preparación sin incubación.

La actividad proteolítica fue cuantificada siguiendo el incremento en absorbancia a 595 nm que resultó de la incubación de 1-100 µl de preparación enzimática a 37°C por 16 h con 3.7 mg de Hide Powder Azure (HPA) en amortiguador Tris-HCl 0.2M, pH 8, conteniendo CaCl₂ 1 mM, en un volumen total de 500 µl (King y col. 1983) La actividad fue reportada como unidades relativas de tripsina, donde una unidad relativa es equivalente al cambio en absorbancia producido por 1 ng de tripsina (GIBCO) en 16h a 37°C y pH 8.

IV.8 Caracterización de la actividad proteolítica

IV.8.1 Evolución de la actividad proteolítica durante la síntesis de DS

La evolución de la actividad proteolítica en un cultivo en lote de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC, se realizó en matraces Fernbach de 2.5 l bajo las condiciones antes mencionadas. En el transcurso de la fermentación, se

analizaron los siguientes parámetros: pH, crecimiento (densidad óptica, 650 nm), y actividad DS.

IV.8.2 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

El efecto del pH fue determinado a 37°C en SDS-PAGE con gelatina copolimerizada (GCP). Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en los siguientes amortiguadores a una concentración 50 mM: Acetato de sodio, pH 5; MOPS (Ácido 3-[N-Morpholino]butano sulfónico)/sal de sodio, pH 6.2 y 7; Tris-HCl pH 8 y 9; borato de sodio, pH 10 y carbonato de sodio, pH 11. Posterior a la incubación, los geles fueron procesados para la detección de actividad.

IV.8.3 Ensayos de inhibición de la actividad proteolítica

El efecto inhibitorio producido por DFP, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido iodoacético (IAA), L-trans-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)-butano (E-64), 1-10-fenantrolina (O-Ph) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fue estudiado directamente en SDS-PAGE-GCP. Las muestras fueron incubadas antes de la electroforesis con 10 mM del inhibidor (E-64 fue utilizado a una concentración de 5 mM) a 37°C, pH 8 por 2h. O-Ph y EDTA se utilizaron a una concentración de 100 mM y fueron incluidos en los amortiguadores de incubación utilizados después de la electroforesis.

IV.8.4 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica

Para determinar el efecto de la presencia de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica, después de la electroforesis los geles fueron incubados 1 h en Tris-HCl 50mM, pH 8 conteniendo O-Ph 18 mM. Posteriormente fueron lavados en el mismo amortiguador pero en ausencia del inhibidor y finalmente fueron incubados a 37°C en la presencia de ZnCl_2 , CaCl_2 y NiCl_2 20 mM.

IV.9 Efecto de la proteólisis sobre la DS

IV.9.1 Proteólisis endógena de la DS

Los concentrados de DS ($70 \mu\text{g}$ de proteína ml^{-1}) fueron incubados a 37°C por 48 h, en la presencia de MOPS 0.2M, pH 7, conteniendo CaCl_2 1 mM y azida de sodio 3 mM. La reacción fue detenida por la adición de O-Ph 18 mM.

IV.9.2 Procesamiento de la DS con una proteasa libre de DS

Debido a la dificultad de la eliminación de la actividad proteolítica, se decidió preparar DS libres de actividad proteolítica tratando térmicamente a las preparaciones (ebullición por 20 min) con el fin de desactivar toda la actividad proteolítica incluida. Estas preparaciones fueron sometidas a proteólisis utilizando una proteasa libre de DS, producida por la cepa silvestre de *L. mesenteroides* B-512F crecida en glucosa bajo las condiciones antes mencionadas.

IV.9.3 Proteólisis limitada endógena de la DS

La producción de la DS de 155 kDa a partir de la forma de 173 kDa, se realizó incubando el ultrafiltrado a 27°C y pH 5.2. El tiempo de incubación fue dependiente de la actividad proteolítica presente. El tiempo mínimo requerido para una total transformación, en las condiciones antes descritas, fue de 15 días. Durante la digestión se monitoreó la actividad DS y el peso molecular de las formas enzimáticas. La DS de 155 kDa producida de esta manera quedó libre de la presencia de la DS de 173 kDa.

IV.10 Síntesis de dextrana y oligosacáridos.

La dextrana fue sintetizada a 30°C, pH 5.2, utilizando 1 U/ml de enzima y sacarosa 100 g/l. El polímero fue recuperado por precipitación con etanol, posteriormente dializado contra a agua y finalmente sometido a liofilización. Para la síntesis de oligosacáridos, la maltosa fue utilizada como aceptor. Las reacciones se realizaron a 30°C en amortiguador acetato de sodio 50 mM pH 5.2, CaCl_2 0.3 mM, azida de sodio 3 mM, sacarosa 50 g/l y maltosa 25 o 10 g/l correspondiente a cocientes de concentración de sacarosa/maltosa de 2 y 5. Los oligosacáridos fueron analizados utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución, en un sistema Waters equipado con un detector de índice de refracción, una columna C18 y agua ultrapura como fase móvil a un flujo de 0.7 ml/min.

IV.11 Caracterización de la dextrana.

La estructura del polímero fue analizada por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^1H y ^{13}C con la ayuda del Dr. Manuel Jiménez del Instituto de Química de la UNAM.

El peso molecular fue determinado por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando la columna de permeación en gel Ultrahydrogel Linear (Waters), con intervalo de exclusión entre 1×10^3 y 7×10^6 kDa, empleando una solución NaNO_3 100 mM como eluyente a un flujo de 0.6 ml/min.

La caracterización reológica se realizó con dextrana 20 g/l, utilizando un reómetro Rheomat 120 (Contraves, Switzerland) equipado con el dispositivo de plato y cono ($R=5$ cm, $\theta_0=2^\circ$). Las mediciones se realizaron a 21°C .

IV.12 Secuenciación del extremo amino terminal

El extremo amino terminal de la proteína de 155 kDa fue secuenciado en el servicio de la Universidad de Harvard. Las muestras sujetas a la actividad proteolítica se procesaron de acuerdo a el método establecido por Speicher en 1989.

V RESULTADOS I

Procesamiento Proteolítico de la DS de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F y FMC.

V.1 Formas múltiples de la DS de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC.

La DS fue producida a través de un proceso fermentativo de las cepas de *L. mesenteroides* B-512F y B-512FMC, según se describe en Materiales y Métodos. En la cepa silvestre, la síntesis de la DS requiere de inducción con sacarosa la cual es sustrato de la enzima, por lo que se obtienen proteínas asociadas a grandes cantidades de dextrana. La viscosidad producida por la presencia de dextrana, dificulta la concentración de las muestras y su purificación. Este problema no se presenta en la cepa constitutiva, pues la DS es producida empleando glucosa como fuente de carbono.

El medio de cultivo fue centrifugado, ultrafiltrado y almacenado a 4°C. Después de varios meses de almacenamiento, se observaron modificaciones en el peso molecular de las DS al ser analizadas por SDS-PAGE (Figura 11) En dicha Figura se puede apreciar que mientras que en preparaciones frescas se observa una banda de 173 kDa en preparaciones con 4 a 6 meses de almacenamiento se observa primero la formación de dos bandas y finalmente una sola banda de 155 kDa. Si bien estos resultados se obtuvieron con las dos cepas, el fenómeno fue más evidente en la cepa constitutiva pues se pudieron obtener concentraciones más grandes de proteína.

Este cambio en el peso molecular ya ha sido reportado en la literatura y se ha propuesto que es consecuencia de un proceso proteolítico (Fu y Robyt 1990, Grahame y Mayer 1984, Miller y col., 1986, Miller y Robyt 1986). Sin embargo, en *L. mesenteroides* no se ha detectado la presencia de proteasas

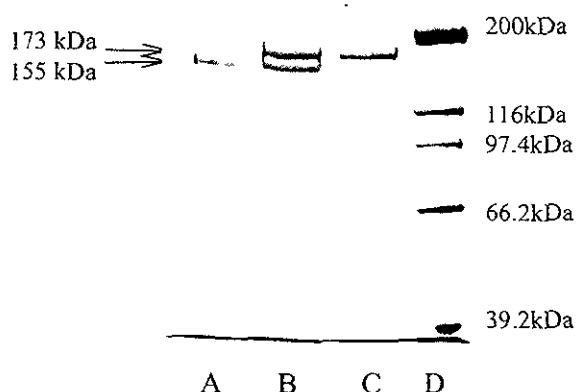


Figura 11. Efecto del almacenamiento sobre el peso molecular de la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE de la DS con diferentes tiempos de almacenamiento. Después del proceso de ultrafiltración, diversos lotes de DS fueron almacenados a 4°C. A: DS con 6 meses de almacenamiento. B: DS con 4 meses de almacenamiento. C: DS tiempo inicial. D: Marcadores de peso molecular.

El origen del estudio de los cambios en el peso molecular de la DS fueron las controversias existentes en lo referente a fenómenos cinéticos como es el proceso de estimulación de la velocidad inicial por presencia de dextrana exógena. En la Tabla 6 se presenta el efecto de la presencia de polímero (cepa constitutiva), sobre el fenómeno de estimulación de la actividad de la DS. Como se puede apreciar, la transformación completa de la banda de 173kDa en una de 155kDa se relaciona con la aparición del fenómeno de estimulación. Al parecer, la escisión de un péptido participa en este aumento de actividad por la presencia de dextrana. Sin embargo, debido al tiempo de almacenamiento este fenómeno pudiera estar relacionado con un factor diferente al cambio en el peso molecular.

Tabla 6. Efecto del cambio de peso molecular en el fenómeno de estimulación por presencia de dextrana.

Peso molecular (kDa)	Tiempo de almacén a 4°C (meses)	% de actividad remanente ^a	Actividad en ausencia de dextrana ^b	Actividad en presencia de dextrana ^{b,c}	Factor de estimulación ^d
155	6	63	106	125	1.2
155 173	4	90	123	122	1
173	0	100	94	92	1

^aActividad después de almacenamiento

^bActividad determinada a pH 5.2, 30°C y 300 mM de sacarosa, U/mg proteína

^cUtilización de 10 µg/ml de dextrana T-70

^dActividad en presencia de dextrana/Actividad en ausencia de dextrana

Para comprobar lo anterior fue necesario inducir el cambio en el peso molecular de la DS. Por lo tanto, se decidió someter a la enzima a un proceso de proteólisis limitada utilizando inicialmente tripsina. Las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo fueron 37°C y pH=8, analizando las digestiones mediante SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 12, en los carriles B al F que muestran digestiones con tripsina, no se observa la formación de la banda de 155kDa. El carril G corresponde a un control de la enzima incubada sin tripsina. Si se compara el carril G con el J, que contiene a la muestra sin incubación, se aprecia una disminución de la banda de 173kDa y aparición de la banda de 155kDa así como otras bandas que van de 120-50kDa. De esta observación puede concluirse que la muestra control incubada a 37°C y pH 8 fue objeto de una modificación por parte de una actividad proteolítica inherente a la muestra.

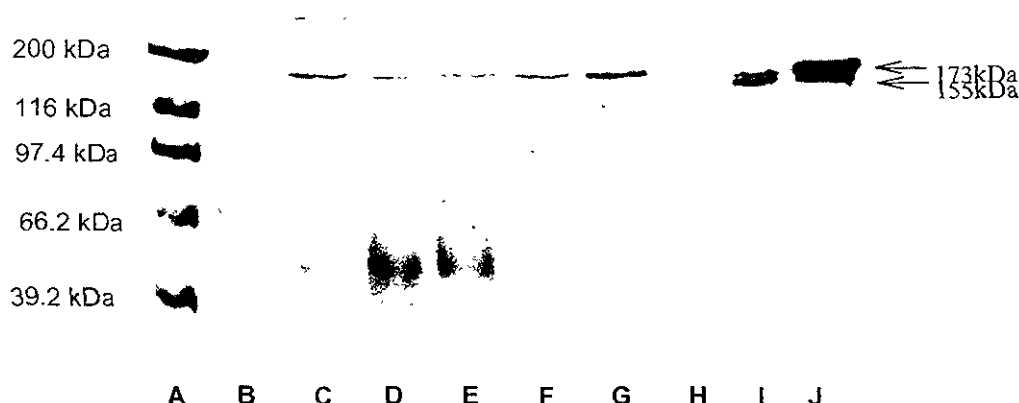


Figura 12. Proteólisis limitada con tripsina. Las reacciones se realizaron a 37°C, pH=8 por 2 hrs., con diferentes relaciones DS/tripsina (D/T) (ver Materiales y Métodos). A: Marcadores de peso molecular. B: D/T=100, C: D/T=1000, D: D/T=2500, E: D/T=5000, F: D/T=10 000, G: DS incubada sin tripsina (14.5µg). H: Tripsina (0.15µg), I: DS naturalmente procesada J: DS sin incubación (14.5µg).

V.2 Determinación de actividad proteolítica

Dado que los resultados anteriores, constituyen indicios de proteasas en las preparaciones enzimáticas, se decidió comprobar la presencia de estas enzimas realizando una SDS-PAGE-GCP. Después de la electroforesis, el gel fue incubado a pH 8 y 37°C, toda la noche. Posteriormente fue teñido con azul de Coomassie y al ser desteñido se observaron bandas de claridad como se aprecia en la Figura 13. De acuerdo con los marcadores de peso molecular, la actividad proteolítica principal tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa. La misma proteasa fue detectada en la cepa de *L. mesenteroides* B-512F.

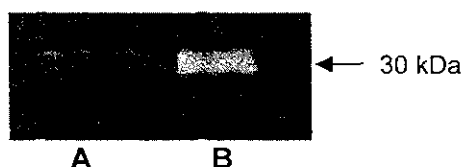


Figura 13. Detección de la actividad proteolítica producida por *L. mesenteroides* B-512F y FMC. SDS-PAGE con gelatina 0.1% (p/v) en el gel separador (poliacrilamida 15%) (ver Materiales y Métodos). A: *L. mesenteroides* B-512F. B *L. mesenteroides* B-512FMC

Después de incubar los geles por 72 h bajo las mismas condiciones, se observó la aparición de una banda de actividad proteolítica con un peso molecular mayor de 200 kDa, en menor proporción respecto a la de 30 kDa. Las preparaciones que no se incubaron por 3 h en el amortiguador de muestra sólo presentaron la banda de actividad proteolítica de alto peso molecular, después de incubar el gel por 72 h a 37°C. Este resultado sugiere que la enzima de 30 kDa es producto de disociación y/o de degradación de la actividad de alto peso molecular (Figura 14).

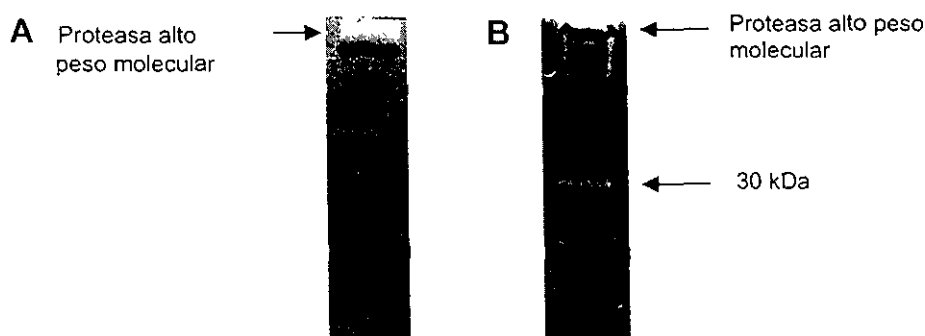


Figura 14. Detección de la actividad proteolítica de alto peso molecular producida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE con 0.1% de gelatina en el gel separador (poliacrilamida 11%) (ver Materiales y Métodos). A. Muestra sin incubar en el buffer de muestra. B. Muestra incubada por 3 h en el buffer de muestra a 27°C

Por otra parte, la actividad proteolítica también se puso en evidencia utilizando HPA. Después de incubar a pH 8 y 37°C las preparaciones de DS, se observó un aumento de absorbancia, producto de la hidrólisis de colágeno insoluble acoplado a fenotiacinas.

V.3 Evolución de la actividad proteolítica durante la síntesis de DS.

En la Figura 15 se aprecia la producción de la actividad proteolítica durante el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. Como se puede observar, la presencia de actividad proteolítica en el sobrenadante de fermentación es anterior a la producción de DS. Se aprecia también una clara relación entre la caída de la actividad proteolítica y el decremento de pH, el cual es inicialmente fijado en valores cerca de la neutralidad y cae debido a la producción de ácido láctico.

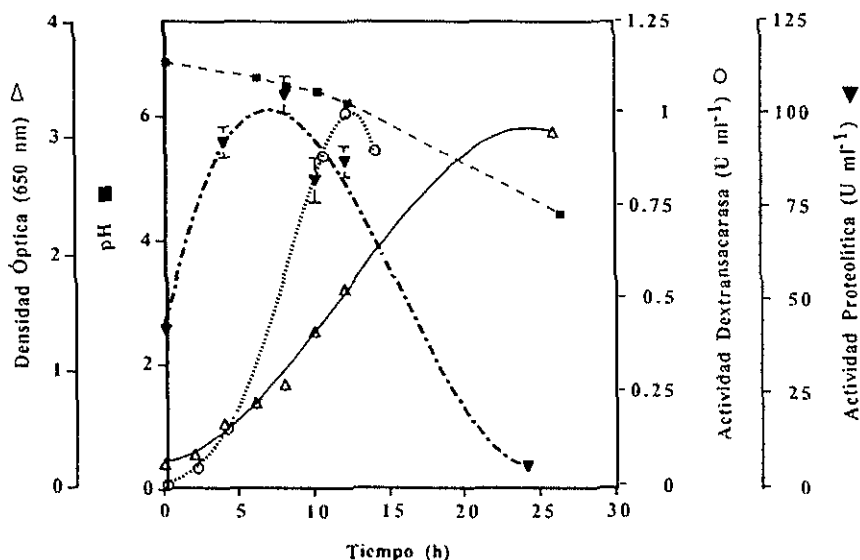


Figura 15. Evolución de la actividad proteolítica en el sobrenadante de un cultivo en lote de *L. mesenteroides* B-512FMC. La actividad proteolítica fue medida con Hide Powder Azure

V.4 Caracterización de la actividad proteolítica

V.4.1 Efecto del pH en la actividad proteolítica

El efecto del pH en la actividad proteolítica se determinó utilizando SDS-PAGE-GCP. En la Figura 16 se aprecia que el pH óptimo de la actividad proteolítica es 8. Sin embargo, presenta actividad desde 5.2 (difícil de apreciar en la fotografía) hasta pH 10.

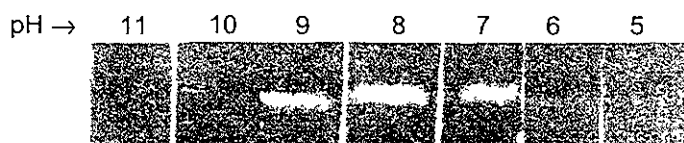


Figura 16 Perfil de pH de la actividad proteolítica producida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE (poliacrilamida 15%), 0.1% gelatina, incubación a 37°C.

V.4.2 Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

Se determinó el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad a pH 8. En la Figura 17 se aprecia que E-64 y AIA inhibidores de cisteín proteasas no ejercieron ningún efecto sobre la actividad. Por lo que respecta a los inhibidores de proteasas séricas, PMSF inhibió parcialmente la actividad y DFP inhibió casi totalmente, sin embargo cuando se disminuyó la concentración de este inhibidor 10 veces no se apreció inhibición significativa (Figura 18). Como inhibidores de metalo proteasas se utilizaron EDTA y O-Ph; a pesar de que el primero tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad proteolítica, se logró observar una ligera zona

de claridad (difícil de apreciar en la Figura 17), mientras que el segundo inhibió totalmente la actividad aún cuando se disminuyó la concentración casi 6 veces.

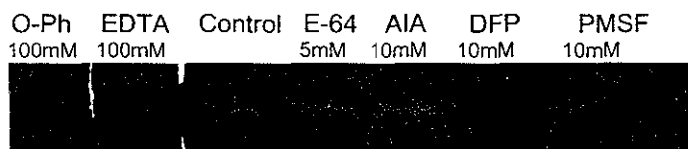


Figura 17. Efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad proteolítica producida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE (poliacrilamida 15%), 0.1% gelatina. DFP, PMSF, E-64 y AIA, incubación de las muestras a 37°C, 15 min., antes de realizar la electroforesis. O-Ph y EDTA adicionados después de la electroforesis, durante la incubación a pH 8 y 37°C.

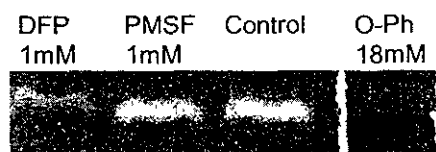


Figura 18. Efecto de la disminución de la concentración de inhibidores sobre la actividad proteolítica producida por *L. mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE (poliacrilamida 15%), 0.1% gelatina. DFP y PMSF, incubación de las muestras a 37°C, 15 min., antes de realizar la electroforesis. O-Ph adicionado después de la electroforesis, durante la incubación del gel a pH 8 y 37°C.

V.4.3 Efecto de cationes divalentes sobre la actividad proteolítica

Debido a que los inhibidores de proteasas séricas son poco específicos no se pudo identificar el grupo funcional involucrado en la catálisis. A pesar de lo anterior, el grado de inhibición fue mayor con los agentes quelantes, lo que indica la asociación de iones metálicos con la actividad. Como se puede apreciar en la Figura 19, después de inhibir la actividad por presencia de O-Ph, el único catión divalente que permitió la recuperación de la misma fue el Ca^{2+} . El Ni^{2+} lo

hizo en menor proporción, mientras que el Zn^{2+} no permitió la recuperación de la actividad.

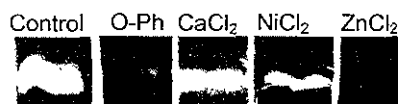


Figura 19. Identificación del metal involucrado con el sitio activo de la proteasa producida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. SDS-PAGE, (poliacrilamida 15%), 0.1% gelatina. Después de la electroforesis los geles fueron incubados con O-Ph, lavados e incubados a pH=8 y 37°C por 12 h., con los diferentes iones metálicos.

V.4.4 Temperatura óptima de actividad

El perfil de temperatura se determinó utilizando HPA. Como se aprecia en la Figura 20, esta enzima presenta actividad óptima a los 50°C y conserva 75% de la actividad a 70°C. En general las proteasas son más resistentes a la desnaturalización que otras proteínas (North, 1989), a pesar de que el método no permitió determinar actividad por arriba de 70°C, creemos que la enzima presentará actividad a temperaturas mayores.

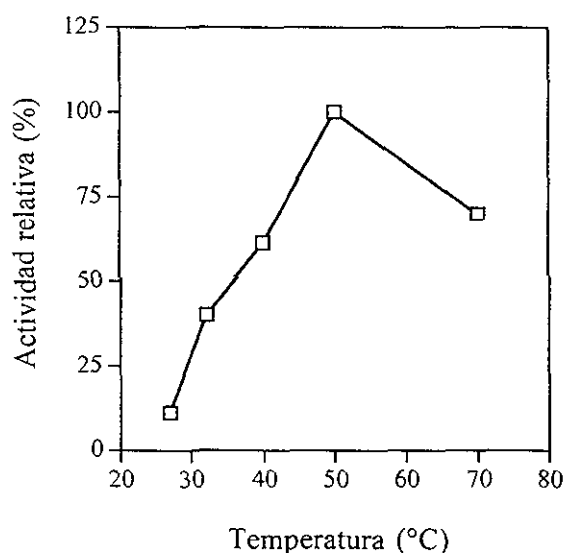


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica producida por *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. La actividad fue medida utilizando HPA, a pH 8

V.5 Digestión de la DS

Los preparados enzimáticos de DS fueron sometidos a un proceso de proteólisis endógena incubándolos a pH=7 y 37°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos analizando la actividad y el peso molecular de la DS. En la Figura 21A se puede observar que la banda de 173 kDa se reduce considerablemente con el tiempo de incubación, produciéndose diversas bandas de menor peso molecular incluyendo la banda de 155. En un gel de actividad DS, se determinó que la forma de 120 kDa fue la forma más pequeña que retuvo actividad (resultado no mostrado). La proteólisis se logró limitar incubando las muestras a

27°C y pH=5.2 con tiempos variables dependiendo de la concentración de proteasa, lográndose así la formación mayoritaria de una banda de 155 kDa de peso molecular. El mismo resultado se pudo obtener a pH 5.2 y 4°C, con mayor tiempo de incubación.

La DS y la proteasa son enzimas fuertemente asociadas. La ultrafiltración en presencia de 0.1% de SDS permitió eliminar una porción de la proteasa de 30 kDa pero quedó siempre presente un remanente de actividad proteolítica. Con el fin de comprobar que los cambios en el peso molecular son el producto de una actividad proteolítica sintetizada por *L. mesenteroides*, las preparaciones de DS obtenidas de la cepa B-512FMC fueron tratadas térmicamente (90°C por 20 min), para eliminar toda la actividad proteolítica. A estas preparaciones se les adicionó proteasa libre de DS producida por el crecimiento de la cepa silvestre de *L. mesenteroides* B-512F en glucosa. Los resultados se muestran en la Figura 21B, en la que se puede apreciar que las bandas formadas son las mismas que las obtenidas en la digestión endógena presentada en la Figura 21A.

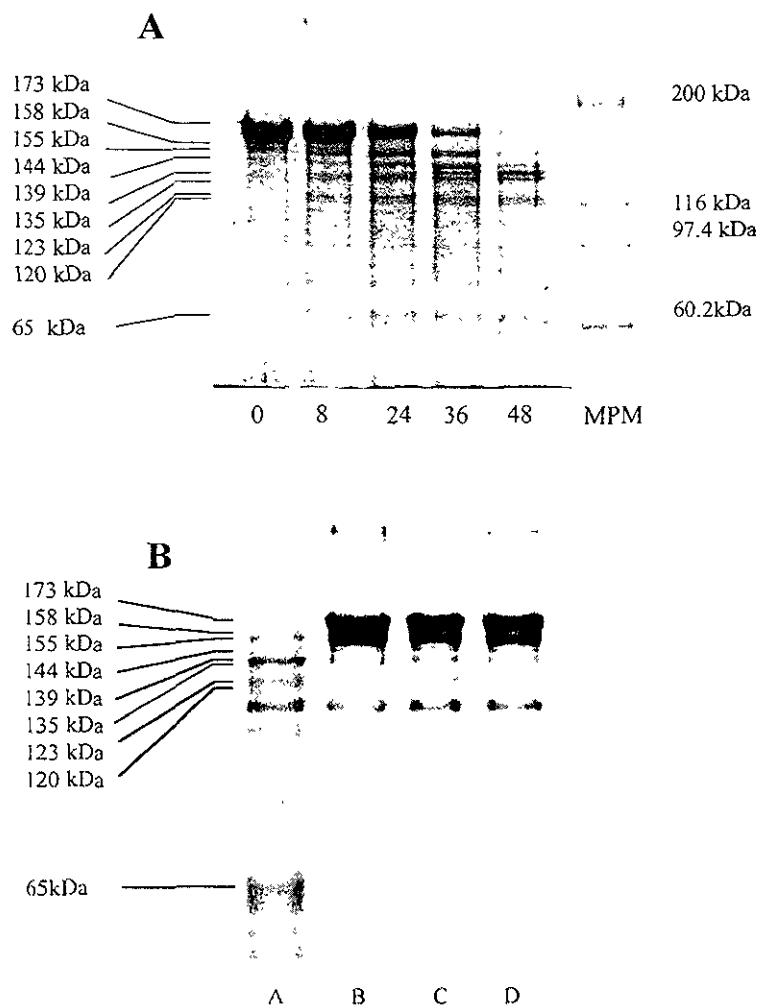


Figura 21. Efecto de la proteólisis en el peso molecular de la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC. Geles de SDS-PAGE al 6% teñidos con azul de Coomassie R-250. **A.** Proteólisis endógena. Una preparación de DS ultrafiltrada, fue incubada a pH 7, 37°C por 0, 8, 24, 36, 48 h, MPM, marcadores de peso molecular. **B.** Con adición de proteasa. La preparación de DS ultrafiltrada, fue tratada térmicamente (90°C, 20 min), para desactivar la actividad proteolítica. **B** y **D** son los controles antes de la incubación, **C** después de tres horas de incubación (pH 7 y 37°C) sin adición de proteasa, **A** después de 3 h de incubación (pH 7 y 37°C) con la adición de actividad proteolítica proveniente de *L. mesenteroides* B-512F.

V.6 Discusión

Se ha reportado la presencia de proteasas en cultivos de diversas cepas de *Streptococcus* (Grahame, D y Mayer; 1984, Harrington y Russell, 1994; Henssen y Dowdle, 1980; Homer y Whiley 1990). En *S. sanguis* se detectó un cambio en el peso molecular similar al observado en *L. mesenteroides*: una forma de 174 kDa considerada como monómero, fue modificada a otra de 156 kDa por proteólisis (Grahame y Mayer, 1984). Debido a que esta transformación pudo ser parcialmente inhibida por EDTA, se concluyó que el proceso involucraba una metalo proteasa. Homologías en la estructura primaria y probablemente en la terciaria de las glucosiltransferasas de *Streptococcus* y *Leuconostoc* pudieran ser la causa de la similitud en el procesamiento proteolítico. A pesar de lo anterior, hasta la fecha no se han reportado actividades proteolíticas asociadas a *L. mesenteroides*. Entre otras razones esto es probablemente debido a dos causas: a la baja concentración de proteasas y a las condiciones usuales de ensayo de la actividad proteolítica, que son generalmente adecuadas para la actividad DS (25-30°C y pH 5.0-5.5), pero lejanas de las condiciones óptimas de la actividad proteolítica reportadas en este trabajo (pH 8 y 50°C). Lo anterior es ilustrado también por el hecho de que los sobrenadantes requieren ser concentrados entre 200 y 2000 veces para detectar actividad proteolítica y de que a pH 5.2 y 25°C sólo se presenta el 12% de la actividad proteolítica ensayada a pH 8 y 37°C (medido con HPA). Sin embargo, la actividad residual es suficiente para modificar a la DS cuando se almacena a 4°C por largos periodos de tiempo.

Las condiciones de producción, fuente de proteína y el número de resiembras pueden alterar la cantidad de proteasa producida. Durante un cultivo de *L. mesenteroides* se puede observar una clara relación entre la actividad proteolítica y el perfil de pH. Se aprecia que en la fermentación la producción de actividad proteolítica es previa a la producción de DS, de tal manera que la actividad máxima de DS se alcanza una vez que la actividad proteolítica ha comenzado a decrecer (Figura 15). Estos resultados indican que probablemente las proteasas se requieren en etapas tempranas del cultivo ya sea para aportar aminoácidos al microorganismo y/o para el procesamiento de la DS.

La DS y la proteasa están fuertemente asociadas. A pesar de incubar por 24 h los preparados de DS a pH 6.8 en presencia de SDS para convertir la proteasa de alto peso molecular a la forma de 30 kDa y de eliminar de esta manera la actividad proteolítica por ultrafiltración, siempre quedó actividad residual. Existen reportes en la literatura acerca de la presencia de las denominadas "firmly-bound" o "sticky" proteasas, las cuales permanecen fuertemente unidas a proteínas durante los procesos de purificación (North 1989). Las proteasas de *L. mesenteroides* se comportan como este tipo de proteasas: son producidas en bajas cantidades y tienen una alta actividad específica por lo que es difícil detectarlas como bandas de proteínas en SDS-PAGE teñido con Coomassie. La única manera de determinar su presencia es a través de ensayos de actividad después de concentrarlas.

La presencia de una proteasa de alto grado de agregación o alto peso molecular (precursor de la forma de 30 kDa) contaminando los preparados de la DS, hace

difícil el uso de SDS-PAGE o filtración en gel para purificar. Estos resultados son consistentes con las observaciones hechas por Kim y Robyt en 1994, quienes obtuvieron DS de bajo peso molecular después de incubar, por 30 días a 4°C, una DS de *L. mesenteroides* B-512FMC de 184 kDa purificada por SDS-PAGE. La dificultad en la identificación de proteasas en las preparaciones de DS, dio lugar a varias hipótesis que intentaban explicar la presencia de múltiples formas de la enzima. La primera de ellas propone que la dextrana influencia la agregación de la enzima; las formas observadas son agregados enzimáticos de diferente peso molecular (Kim y Robyt 1994, Kobayashi y Matsuda 1980). Sin embargo, diferentes pesos moleculares son obtenidos también con las enzimas constitutivas (Funane y col. 1995, Kitaoka y Robyt 1998, Monchois y col. 1998, Smith y Zahnley 1997, Willemot y col. 1988). Otra hipótesis propuesta consiste en la presencia de subunidades de 57-62 kDa conformando a la DS (Kim y Robyt 1994, Kobayashi y Matsuda 1980, Kobayashi, Mihara y Matsuda 1986). Recientemente se reportó que el gen que codifica para la DS de *L. mesenteroides* B-512F, está localizado en un operón monocistrónico (Quirasco y col. 1999). Por otra parte, la secuencia del gen de la DS de *L. mesenteroides* B-512F, codifica 1527 aminoácidos incluyendo el péptido señal (Wilke-Douglas y col. 1989), lo que resulta en una proteína de 170 kDa, eliminando el péptido señal es reducida a 166 kDa. La diferencia con la forma de 173 kDa puede ser explicada por error experimental de la técnica electroforética (Creighton, T. E. 1993).

V.7 Conclusiones

Se determinó la presencia de actividad proteolítica en las preparaciones de dextranacarasa de las cepas de *L. mesenteroides* B-512F y FMC.

La actividad proteolítica presentó un pH óptimo de 8, temperatura óptima de 50°C y fue inhibida por orto-fenantrolina.

La presencia de diversas formas de la DS de *L. mesenteroides* B-512F y FMC, usualmente reportada en la literatura, es el resultado de un procesamiento proteolítico. La cantidad de cada forma depende de la actividad proteolítica, condiciones y tiempo de almacenamiento. También depende de los métodos de producción y purificación aplicados.

V.8 Perspectivas

El presente trabajo constituye el inicio de los estudios de las actividades proteolíticas en *Leuconostoc mesenteroides*. Actualmente, están en preparación dos publicaciones en donde además de analizar otras cepas de *L. mesenteroides*, se determinan factores del cultivo que afectan su producción.

En lo referente a los estudios posteriores, se planea completar la caracterización de la actividad, determinando el grupo funcional involucrado en la catálisis. Por otra parte, es necesario determinar el tipo de asociación con la DS y determinar el proceso involucrado en la transformación de la enzima de alto peso molecular en la forma de 30 kDa.

ANEXO 1

Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*.

Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*

Mónica Sánchez-González^a, Alejandro Alagón^a, Rogelio Rodríguez-Sotres^b,
Agustín López-Munguía^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271 Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria 04510 D.F. Mexico

Received 20 August 1999; received in revised form 28 September 1999; accepted 29 September 1999

Abstract

Various dextransucrase molecular mass forms found in enzyme preparations may sometimes be products of proteolytic activity. Extracellular protease in *Leuconostoc mesenteroides* strains NRRL B-512F and B-512FMC dextransucrase preparations was identified. Protease had a molecular mass of 30 kDa and was the predominant form derived from a high molecular mass precursor. The production and activity of protease in culture medium was strongly dependent on pH. When *L. mesenteroides* dextransucrase (173 kDa) was hydrolyzed by protease, at pH 7 and 37°C, various dextransucrase forms with molecular masses as low as 120 kDa conserving dextransucrase activity were obtained. © 1999 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Dextransucrase molecular mass; Protease; *Leuconostoc mesenteroides*

1. Introduction

Dextran is a glucose polymer synthesized by dextransucrase (sucrose 1,6- α -D-glucan 6- α -glucosyltransferase, EC 2.4.1.5), a glucosyltransferase produced by *Leuconostoc* and *Streptococcus* lactic acid bacteria. Dextransucrase (DS) from *Leuconostoc mesenteroides* is a sucrose inducible enzyme that cat-

alyzes the polymerization of the glucopyranosyl moiety of sucrose to form an $\alpha(1 \rightarrow 6)$ linked glucan with $\alpha(1 \rightarrow 3)$ branched linkages [1]. The strain B-512FMC is a constitutive DS producing mutant of *L. mesenteroides* obtained by Robyt et al. [2].

The properties of DS have been extensively studied and reviewed [1,3,4]. Molecular masses of DS have been reported, ranging from 64 to 185 kDa [4]. This variation has been associated with the presence of dextran in the purified preparations, with the disassociation of subunits from a high molecular mass multimeric complex [5–7] or with the action of proteases [8,9], although until now no protease has been reported in *L. mesenteroides*. Recently, Smith and Zahalely [10] reported that the

* Corresponding author. Tel.: +52 (56) 22-76-73;
Fax: +52 (73) 17-23-88; E-mail: agustin@ibt.unam.mx

various molecular mass forms of alternansucrase (a glucosyltransferase closely related to DS) produced from constitutive mutants of *L. mesenteroides* NRRL B-1355, were not related to dextran. However, proteolytic activity was not found.

In the present work, we demonstrate that the various molecular mass forms of DS from *L. mesenteroides* strains NRRL B-512F and B-512FMC already reported in the literature, result from proteolytic processing.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

L. mesenteroides NRRL B-512F was obtained from the stock culture collection of the National Center for Agricultural Utilization Research (USDA-ARS, Peoria, IL, USA). *L. mesenteroides* B-512FMC was kindly provided by Dr. John F. Robyt. Both strains were cultured for DS production as already described [2].

The culture supernatant was concentrated 10-fold by ultrafiltration with an ultrafiltration system (Amicon, Beverly, MA, USA), equipped with an HP100-20, 100 kDa cut off hollow fiber cartridge. Due to the low concentration of protease, all samples required 200–2000 times concentration in order to assay for proteolytic activity. Samples were dialyzed against 50 mM ammonium acetate buffer (pH 5.2), lyophilized and resuspended in a smaller volume of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, containing 0.3 mM CaCl_2 and 3 mM sodium azide. Some samples required higher concentration as proteolytic activity tended to decrease in subcultures.

2.2. Dextranucrase assay

Dextranucrase activity was determined measuring the initial rate of fructose release from sucrose with a glucose/fructose kit (Boehringer Mannheim, Germany). Reactions were performed at 30°C in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2 containing 0.3 mM CaCl_2 and 3 mM sodium azide. One enzyme activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μmol of fructose per min under these conditions.

2.3. Electrophoresis

SDS-PAGE was performed as published [11]. Samples were mixed with an equal volume of 2× sample buffer and incubated at 90°C for 5 min. DS forms were electrophoretically separated on 6% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie brilliant blue R-250.

2.4. Protease activity assay

Proteolytic activity was observed after electrophoresis in SDS-PAGE containing 15% (w/v) acrylamide and 0.1% gelatin [12] with the Laemmli buffer system [11]. For electrophoresis, samples were mixed with an equal volume of SDS sample buffer without β -mercaptoethanol and incubated for 1 h at 27°C. After electrophoresis, the gel was washed two times (30 min each) with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 0.5% Triton X-100, followed by incubation in the same buffer at 37°C for 12 h. Finally, the gel was stained with 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 and destained with 10% acetic acid. The clear bands correspond to zones of proteolytic activity.

The proteolytic activity was quantified following the increase in absorbance at 595 nm resulting from the incubation of enzyme preparations at 37°C for 16 h with Hide Powder Azure (Sigma, Chem. Co.), in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8, containing 1 mM CaCl_2 [13]. The enzyme activity is reported in relative trypsin equivalent units, where one relative trypsin unit is equal to the absorbance change produced by 1 ng of trypsin (GIBCO, BRL, Products) in 16 h at 37°C and pH 8.

2.5. Effect of pH

The effect of pH on activity was determined at 37°C in SDS-PAGE gelatin gels using the following buffers at 50 mM: Sodium acetate buffer, pH 5; MOPS (4-morpholine-propanesulfonic acid), sodium salt, pH 6.2 and 7; Tris-HCl, pH 8 and 9; sodium borate buffer pH 10; and sodium carbonate buffer, pH 11.

2.6. Inhibition assays

The inhibition of protease activity by diisopropyl

phosphorofluoridate (DFP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), iodoacetic acid (IAA), L-trans-epoxy-succinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane (E-64), 1-10-phenanthroline (O-Ph) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was studied directly in SDS-PAGE gels containing gelatin. Samples were incubated previous to electrophoresis with 10 mM of the inhibitor (E-64 was used at 5 mM) at pH 8, 37°C for 2 h. In the case of O-Ph and EDTA, 100 mM of the inhibitor were included in the incubating buffers.

2.7 Effect of divalent cations

In the experiments measuring the effects of metal ions on the protease activity, after electrophoresis, the gel was incubated for 1 h with the renaturation buffer containing 18 mM O-Ph, washed with the same buffer without the inhibitor and incubated at 37°C with 20 mM $ZnCl_2$, $CaCl_2$ or $NiCl_2$ in the buffer.

2.8 Endogenous dextranuclease proteolysis

Samples of DS culture supernatant ultrafiltrates

(70 μg protein ml^{-1}) were incubated at 37°C in the presence of 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7, containing 1 mM $CaCl_2$ and 3 mM sodium azide. The reaction was stopped by the addition of 18 mM O-Ph.

2.9 Protein determination

Protein concentration was assayed by the method of Bradford [14] with Bio-Rad (Hercules, CA, USA) dye-binding protein reagent and bovine serum albumin (Sigma, Fraction V) as standard.

3. Results

3.1 Proteolytic activity in *L. mesenteroides* culture supernatants

The presence of proteases in *L. mesenteroides* concentrated culture supernatants was determined in SDS-PAGE including gelatin in the resolving gel. After overnight incubation, clear bands corresponding to activity were obtained. According to the protein standards, the primary proteolytic activity had an approximate molecular mass of 30 kDa. A high

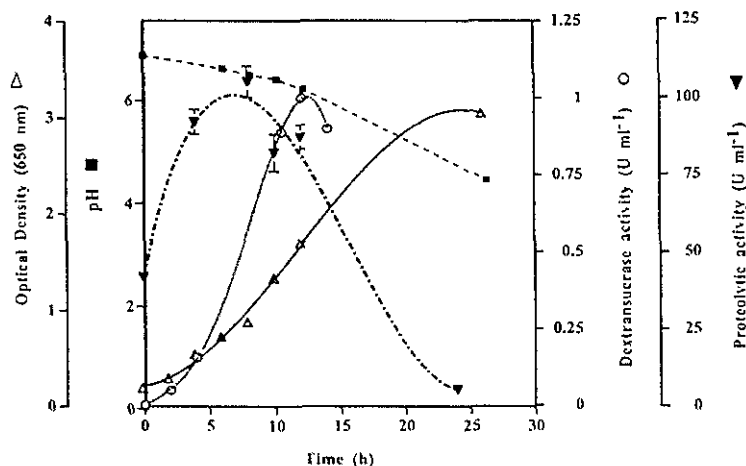


Fig. 1. Protease activity in a batch culture supernatant of *L. mesenteroides* B-521 MC grown in a Fernbach 2 × 1 flask at 28°C. The proteolytic activity (▼) was measured with Hide Powder Azure as the substrate (bars indicate standard deviation).

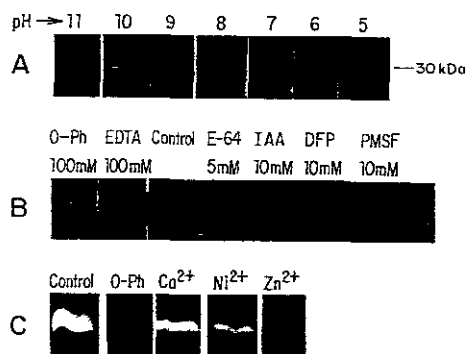


Fig. 2 Effect of different factors on the proteolytic activity of *L. mesenteroides* B-512FMC as measured in 15% SDS-PAGE activity gelatin gels. A: Effect of pH, from pH 11 to 5. B: Effect of inhibitors. Control, without inhibitors. C: Effect of metal ions. Control, without inhibitor; O-Ph, control washed with 18 mM O-Ph, without activity restoration; Ca^{2+} , 20 mM CaCl_2 ; Ni^{2+} , 20 mM NiCl_2 ; Zn^{2+} , 20 mM ZnCl_2 .

molecular mass proteolytic activity was also observed but in less proportion than the 30 kDa protease. After 1 h incubation in the sample buffer the proportion of the 30 kDa protease is considerably increased, suggesting that it is a degradation or dissociation product of a higher molecular mass form. Proteases in culture supernatant also showed activity against denatured collagen (Hide Powder Azure) at pH 8 and 37°C, as can be seen in Fig. 1.

3.2. Protease activity during dextranucrase synthesis

Proteolytic activity was found in *L. mesenteroides* B-512FMC culture supernatants already used for DS synthesis (Fig. 1). There was a clear relation between the drop of protease activity and the decrease in culture supernatant pH, which was initially fixed near neutral values and decreased rapidly due to the production of lactic acid.

For protease purification and analysis, supernatants were harvested when the maximum optical density was reached in the case of *L. mesenteroides* B-512F. However, as shown in Fig. 1, in the case of *L. mesenteroides* B-512FMC DS was less stable and was therefore harvested after 12 h of culture.

3.3. Effect of pH

The effect of pH on the proteolytic activity was studied in different buffers at 37°C (Fig. 2A). The highest activity is obtained at pH 8.

3.4. Protease inhibition

The effect of various inhibitors at pH 8 was studied as shown in Fig. 2B. E-64 and IAA, inhibitors of cysteine proteases, did not affect the protease activity from *L. mesenteroides*, while DFP and PMSF, inhibitors of serine proteases had a partial inhibitory effect. On the other hand, O-Ph, a metal ion complexing agent, completely inhibited the pro-

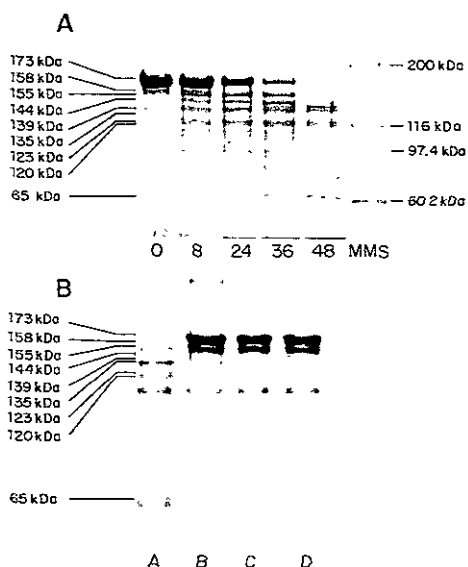


Fig. 3 Effect of proteolysis on the molecular mass of *L. mesenteroides* B-512FMC DS. 6% SDS-PAGE gels stained with Coomassie brilliant blue R-250. A: Endogenous proteolysis. DS ultrafiltrate was incubated at pH 7, 37°C for: 0, 8, 24, 36, 48 h; MMS, molecular mass standards. B: With added protease. The DS ultrafiltrate was heat treated (90°C, 20 min), to inactivate the proteolytic activity. C and D, controls before incubation with and without protease addition; C, after 3 h of incubation (pH 7 and 37°C) without added protease; and D, after 3 h of incubation (pH 7 and 37°C) in the presence of protease prepared from *L. mesenteroides* NRRL B-512F.

tease activity, while EDTA inhibited only partially. In Fig. 2C, it is shown that the addition of calcium restored the proteolytic activity. The same properties were obtained for the proteases from both *L. mesenteroides* strains, B-512FMC and B-512F.

3.5 Dextranuclease digestion

After exposing the DS to endogenous proteolysis at pH 7 and 37°C, the 173 kDa band was considerably reduced producing various lower molecular mass proteins (Fig. 3A). DS activity was assayed directly on the gel, and it was found that the 120 kDa molecular mass form was the smallest DS digest retaining enzymatic activity (data not shown). It is important to point out that at pH 5.2 the 155 kDa protein was the smallest form observed.

Dextranuclease and protease were strongly associated. Even after extensive ultrafiltration in the presence of 0.1% SDS, although some of the 30 kDa protease was eliminated, residual proteolytic activity was always observed in the retained DS fraction. Therefore, DS was heat treated (90°C for 20 min), to denature proteolytic activity. This preparation was treated with added protease (produced by growing *L. mesenteroides* B-512F in glucose to avoid dextranuclease production). These results are shown in Fig. 3B, where it may be seen that the DS protein bands were the same as the ones resulting from an autodigestion assay described above (Fig. 3A).

4. Discussion

Proteases have been reported in glucosyltransferase (GTF) cultures from *Streptococcus* strains [15,16]. In *Streptococcus sanguis*, a similar change in GTF molecular mass is observed, a 174 kDa form considered as a monomer is modified to a 156 kDa form by proteolysis [17]. However, until now proteases had not been reported in *L. mesenteroides*. Among other reasons, this is probably due to its low concentration and the usual assay conditions (pH 5.2 and 25°C), which are optimal for the activity and stability of DS, but far from the optimal conditions for the protease (37°C and pH 8). This is illustrated by the fact that protease supernatant fluids required 200–2000-fold concentration, and that

only 12% of the proteolytic activity at pH 8 and 37°C was observed at pH 5.2 and 25°C (as measured by the Hide Powder Azure assay). However, this residual activity was enough to modify DS when stored in solution at 4°C for long periods of time. Production conditions, protein source in the culture medium and subculturing may alter the amount of protease produced.

Dextranuclease and protease were strongly associated. There are reports in the literature concerning firmly bound or 'sticky' proteases, which remain tightly attached to proteins throughout purification [18]. *L. mesenteroides* proteases behave as these sticky proteases. The presence of a highly aggregated or high molecular mass protease (precursor of the 30 kDa protease) contaminating DS, makes difficult the use of electrophoresis or gel filtration for purification. These results are consistent with observations reported by Kim and Robyt [7], who obtained low molecular mass DS enzymes from an SDS-PAGE 184 kDa purified DS from *L. mesenteroides* B-512FMC after incubation at 4°C for 30 days.

The difficulties in identifying a protease in DS preparations allowed the hypothesis of the existence of 57–62 kDa subunits of DS [5–7]. It has recently been reported that the *L. mesenteroides* B-512F DS gene is located in a monocistronic operon [19]. The *L. mesenteroides* NRRL B-512F DS gene sequence encodes 1527 amino acids including the signal peptide [20], resulting in a predicted 170 kDa protein, that upon elimination of the signal peptide would be reduced to 166 kDa. The difference with the 173 kDa form can be explained by experimental error in the electrophoretic technique [21].

We conclude that the presence of different molecular mass forms of DS from *L. mesenteroides* strains B-512F and B-512FMC usually reported in the literature are the result of proteolytic processing. The amount of each form depends on the proteolytic activity, storage conditions, and storage time. They also depend on DS production and purification methods.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT (project 25281-B) and by UNAM-PAEP projects 030552 and

202360. M.S.-G. acknowledges the support of a UNAM-DGAPA scholarship. We also thank Mariana Canedo for technical assistance.

References

- [1] Alsop, R. (1983) Industrial production of dextrans. In: *Process in Industrial Microbiology* (Bushel, M.E., Ed.), Vol. 18, pp. 1–43. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
- [2] Kim, D. and Robyt, J.F. (1994) Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16, 659–664.
- [3] Robyt, J.F. (1986) Dextran. In: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* (Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G. and Menges, G., Eds.), Vol. 4, pp. 752–767. John Wiley and Sons, New York.
- [4] Robyt, J.F. (1995) Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 51, 133–168.
- [5] Kobayashi, M. and Matsuda, K. (1980) Characterization of the multiple forms and main component of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim. Biophys. Acta* 614, 46–62.
- [6] Kobayashi, M. and Matsuda, K. (1986) Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biochem.* 100, 615–621.
- [7] Kim, D. and Robyt, J.F. (1994) Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microbiol. Technol.* 16, 1010–1015.
- [8] Fu, D. and Robyt, J.F. (1990) A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextransucrase. *Prep. Biochem.* 20, 93–106.
- [9] Miller, A. and Robyt, J.F. (1986) Functional molecular size and structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 80, 198–203.
- [10] Smith, M.R. and Zahnley, J.C. (1997) *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 mutant producing alternansucrases exhibiting decreases in apparent molecular mass. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 581–586.
- [11] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680–685.
- [12] Henssen, C. and Dowdle, E. (1980) Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Anal. Biochem.* 102, 196–202.
- [13] King, T.P., Alagon, A.C., Kuan, J., Sobotka, A.K. and Lichtenstein, L.M. (1983) Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. *Mol. Immunol.* 20, 297–308.
- [14] Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [15] Harrington, D. and Russell, R. (1994) Identification and characterization of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 121, 237–242.
- [16] Homer, K.A., Whitley, R.A. and Beighton, D. (1990) Proteolytic activity of oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 55, 257–260.
- [17] Grahame, D. and Mayer, R. (1984) The origin and composition of multiple forms of dextransucrase from *Streptococcus sanguis*. *Biochim. Biophys. Acta* 786, 42–48.
- [18] North, M.J. (1989) Prevention of unwanted proteolysis. In: *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Beynon, R.J. and Bond, J.S., Eds.), pp. 105–123. IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- [19] Quirasco, M., Lopez-Munguia, A., Remaud, M., Monsan, P. and Farres, A. Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Appl. Environ. Microbiol.*, accepted for publication.
- [20] Wilke-Douglas, M., Perchorowicz, J.T., Houck, C.M. and Thomas, B.R. December 1989. U.S. patent WO 89/12386.
- [21] Creighton, T.E. (1993) Chemical properties of polypeptides. In: *Protein Structure and Molecular Properties* (Creighton, T.E., Ed.), pp. 1–47. W.H. Freeman and Company, New York.

VI RESULTADOS II

**Efecto de un proceso proteolítico sobre las propiedades catalíticas de la
DS de *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC.**

VI.1 Evolución del proceso proteolítico sobre la DS.

El análisis de el efecto de la proteólisis sobre la DS se realizó comparando las propiedades catalíticas de la forma intacta de 173 kDa y la forma de 155 kDa de la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC. En la Figura 22A se muestra el efecto de la proteólisis sobre el peso molecular, mientras que en la 22B se aprecia el efecto sobre la actividad. Como se puede observar, después de 60 días de incubación a 27°C y pH 5.2 se formó la DS de 155 kDa y se perdió únicamente 10% de actividad.

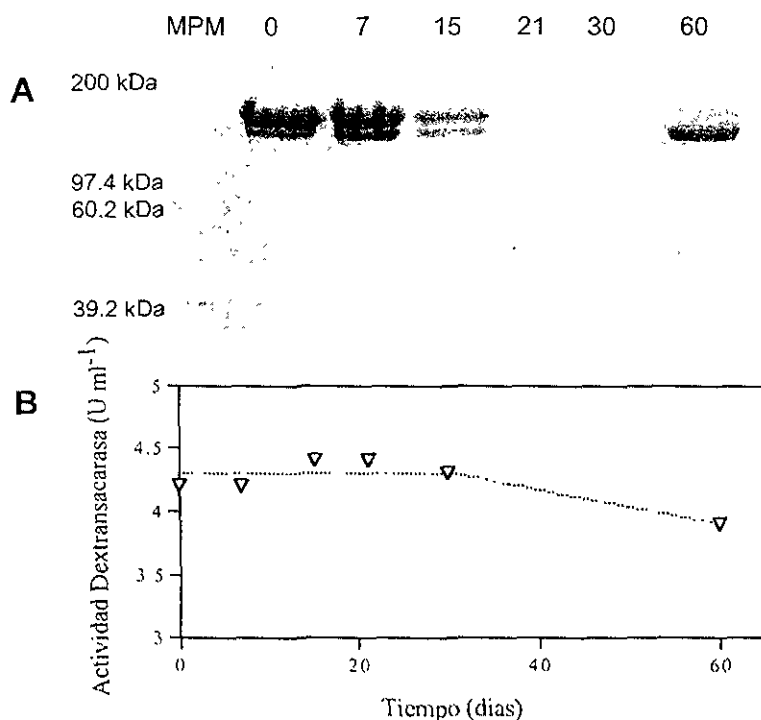


Figura 22. Efecto de la actividad proteolítica sobre la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC. **A.** Proteólisis limitada. Ultrafiltrado incubado a pH 5.2 y 27°C por :0, 7, 15, 21, 30, 60 días; M: marcadores de peso molecular. **B.** Evolución de la actividad DS durante la incubación.

VI.2 Propiedades catalíticas de la síntesis de dextrana.

Se realizaron estudios cinéticos de la DS de 155 y 173 kDa para determinar el pH óptimo para la reacción, la actividad específica máxima, la K_m para la sacarosa y la constante de inhibición por exceso de sustrato (K_i). Los resultados se presentan en la Tabla 7. Como se puede apreciar, el único parámetro donde se encontraron diferencias significativas fue en la constante de inhibición por exceso de sustrato (K_i).

A diferencia de los resultados presentados en la Tabla 6, en donde se observa el fenómeno de estimulación de la actividad de la DS de 155 kDa por presencia de dextrana después de ser almacenada por 6 meses a pH 5.2 y 4°C, no se presentó este fenómeno de estimulación en ninguna de las formas enzimáticas observadas en la Figura 22A. Debido a que la enzima almacenada a 4°C por 6 meses perdió 40% de actividad, el fenómeno de estimulación parece estar más relacionado con la estabilidad que con el cambio de peso molecular.

Tabla 7. Propiedades catalíticas de dos DS de diferentes peso molecular.

Forma enzimática	K_m (mM) ^a	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ^a	K_i (mM) ^a	pH óptimo ^b
155 kDa	34 $\pm$ 1	141 $\pm$ 4	0.6 $\pm$ 0.02	4.5 - 5.7
173 kDa	29 $\pm$ 0.8	156 $\pm$ 2	1.8 $\pm$ 0.05	4.5 - 5.7

^aLas constantes fueron determinadas a pH 5.2 y 30°C.

^bEl pH óptimo se determinó a 30°C.

VI.3 Síntesis de oligosacáridos

Por lo que respecta a la síntesis de oligosacáridos, en las dos concentraciones de maltosa utilizadas se observó un aumento en la velocidad inicial medida como liberación de fructosa (Tabla 8). Sin embargo, este aumento fue más notable en las formas enzimáticas de 155 kDa que en las formas enzimáticas intactas.

El rendimiento y el grado de polimerización de los oligosacáridos fue el mismo para las dos formas enzimáticas en cualquiera de las concentraciones de maltosa.

Tabla 8. Efecto de la concentración de maltosa en la velocidad inicial de reacción de las dos formas de la DS obtenidas por proteólisis.

Forma enzimática	Sacarosa (g/l)	Maltosa (g/l)	Velocidad inicial de reacción (μ mol fructosa/min/ml)	Factor de estimulación ^a
155 kDa	50	0	1.2 $\pm$ 0.080 n=3	1
	50	10	1.9 $\pm$ 0.030 n=3	1.6
	50	25	2.4 $\pm$ 0.001 n=3	2
173 kDa	50	0	1.2 $\pm$ 0.12 n=3	1
	50	10	1.6 $\pm$ 0.01 n=3	1.3
	50	25	1.8 $\pm$ 0.13 n=3	1.5

La reacción se llevó a cabo a pH 5.2 y 30°C. En ambos casos se utilizó 1.2 U/ml de cada forma enzimática, actividad medida con sacarosa como único sustrato

^a Velocidad inicial en presencia de maltosa/velocidad inicial en ausencia de maltosa

VI.4 Caracterización de dextranas

Los espectros de RMN indicaron que las dextranas producidas por la DS de 155 kDa, así como por la de 173 kDa, presentaron las mismas características

estructurales (resultados no presentados). A pesar de esto, debido a que se observaron diferencias en las propiedades de mezclado y en el comportamiento de formación de gel, se analizó el peso molecular de los polímeros. Utilizando una columna de permeación en gel en HPLC, se determinó que los polímeros producidos por las formas enzimáticas tanto de 173 kDa como de 155 kDa se agrupan en dos fracciones, una con un peso molecular promedio de 2500 kDa (LDx) y una segunda que rebasa los límites de exclusión de la columna (HDx). Como se aprecia en la Figura 23, la fracción de alto peso molecular producida por la forma de 173 kDa presentó un peso molecular mayor que la fracción producida por la forma de 155 kDa. Sin embargo, por eluir en el volumen muerto no se pudo cuantificar la diferencia. La cantidad relativa de ambas fracciones calculada por las áreas de los picos de elución (A_{LDx}/A_{HDx}), fue diferente. Mientras que la forma de 155 kDa produjo cantidades relativamente similares de ambas fracciones ($A_{LDx}/A_{HDx}=1.3$), la DS de 173 kDa produjo una proporción significativamente mayor de la fracción de alto peso molecular ($A_{LDx}/A_{HDx}=1.8$). Para confirmar estos resultados, se realizó un estudio reológico. En la Figura 24 se puede observar que ambos polímeros presentaron comportamiento reológico de fluidos no Newtonianos. A pesar de lo anterior, tienen propiedades reológicas diferentes, ya que se observa un decremento en la viscosidad en la dextrana producida por la forma de 155 kDa. Debido a que los polímeros se analizaron a la misma concentración, estas diferencias fueron debidas a la influencia del peso molecular (Tecante y López-Munguía 1986).

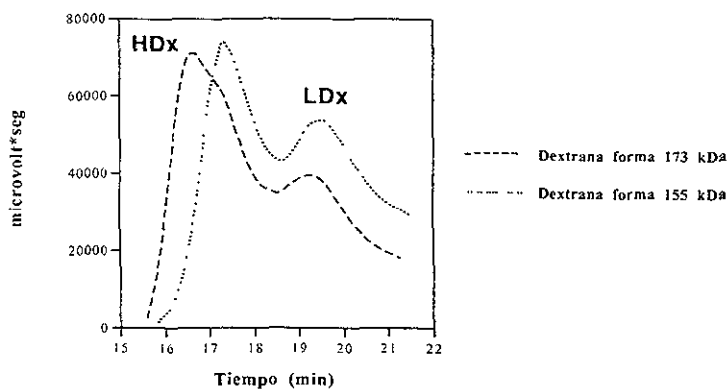


Figura 23. Perfil de elución de las dextranas sintetizadas por las dos formas enzimáticas de la DS. Permeación en gel en HPLC, columna Ultrahydrogel Linear.

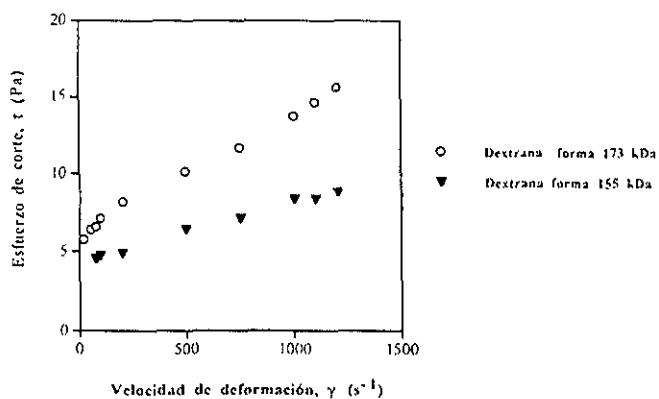


Figura 24. Análisis del comportamiento reológico de las dextranas sintetizadas por las dos formas enzimáticas de la DS. El análisis se realizó en un reómetro Rheomat 120 (Contraves, Switzerland), utilizando 20 g/l de polímero.

VI.5 Secuenciación del extremo amino terminal

Con el fin de conocer el sitio o sitios de corte de la proteasa, se solicitó la secuenciación del extremo amino terminal de la DS procesada proteolíticamente. La DS fue purificada por electroforesis y transferida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Sin embargo, el servicio reportó la presencia de numerosos extremos amino terminales (Tabla 9). Los péptidos encontrados corresponden a extremos amino terminales de DS con tamaños diferentes: Péptido 1, 110 kDa; péptido 2, 90 kDa; péptido 3, corresponde a una secuencia de las UDR del extremo carboxilo terminal; los péptidos 4 y 5 no fueron identificados pero pudieran pertenecer a la secuencia de la proteasa. Estos resultados confirman que la electroforesis no es un método adecuado para la purificación de la DS y como consecuencia la enzima es proteolizada durante el proceso de transferencia de las proteínas a la membrana PVDF.

Tabla 9. Resultado del proceso de secuenciación del extremo amino terminal de la DS de 155 kDa

Péptido 1 (507)	A	V	N	D	V	D	N	K	N	V	V	E	Q	A	D
Péptido 2 (738)	T	D	D	G	Q	Y	M	A	T	K	S	P	Y	Y	D
Péptido 3 (1247)	Q	V	F	D	Q	Y									
Péptido 4 (N.I)	S	F	T	E	Y	L									
Péptido 5 (N.I)	I	K	P	I											

Los péptidos 1, 2 y 3 se encontraron en la misma proporción

Los péptidos 4 y 5 no se identificaron dentro de la secuencia de la DS

VI.6 Discusión

El cambio en el peso molecular de las DS producidas tanto por *Streptococcus* como por *L. mesenteroides* ha sido ampliamente comentado en la literatura (Fu y Robyt 1990, Grahame y Mayer 1984, 1985, Kim y Robyt 1993, Kitaoka y Robyt 1998, Kobayashi y Matsuda 1986, Kobayashi, Mihara y Matsuda 1986, Miller y Robyt 1986, Miller y Robyt 1986b, Smith y Zahnley 1997, Wilke- Douglas 1989). Dentro de estos cambios se ha reportado la presencia de una forma enzimática de 155 kDa (Fu y Robyt 1990, Grahame y Mayer 1984, 1985, Kitaoka y Robyt 1998, Miller y Robyt 1986 y 1986b, Wilke-Douglas 1989), la cual fue el único producto de un proceso proteolítico limitado.

En el presente trabajo se logró producir la forma enzimática de 155 kDa libre de la forma de 173 kDa de la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC. Durante la transformación hubo aproximadamente un 10% de pérdida de actividad. La enzima procesada proteolíticamente tuvo un comportamiento muy similar a su precursor en términos de sus propiedades fisicoquímicas tales como pH óptimo de reacción y propiedades cinéticas: afinidad por la sacarosa (K_m), actividad específica y especificidad pues los productos resultantes tuvieron la misma estructura. Los porcentajes de hidrólisis fueron los mismos (entre 4 y 5%). El fenómeno de estimulación por presencia de dextrana no se presentó en ninguna de las formas enzimáticas, lo que indica que es producto de otra variable diferente al cambio en el peso molecular. A pesar de esto encontramos que la DS procesada proteolíticamente fue más sensible a la inhibición por exceso de sustrato, ya que su K_i fue menor a la constante del precursor. Por otro lado, a

través del análisis por permeación en gel y del estudio reológico de los polímeros sintetizados por las dos formas enzimática, se determinó que la DS procesada produjo dextranas de estructura similar pero de menor peso molecular.

A lo largo de los años se han reportado diferentes métodos de purificación, pesos moleculares y propiedades de la DS (Kobayashi y Matsuda 1980, Kobayashi y Matsuda 1986, Kobayashi, Mihara, Matsuda 1986). Se han encontrado dificultades para dilucidar un mecanismo de reacción y para la determinación de efectos cinéticos (Monchois 1999, Robyt 1995).

Existen varias propuestas que intentan explicar fenómenos como la inhibición por exceso de sacarosa (Kobayashi, Yokoyama y Matsuda 1986, Tanriseven y Robyt 1993) y el aumento de la actividad por presencia de aceptores (Ebert y Shenk 1968; Mayer y col., 1981; Paul y col., 1986; Tanriseven y Robyt 1992), pero ninguno ha sido comprobado. Cualesquiera que sean los mecanismos, ambos parecen ser afectados por la presencia o ausencia de un fragmento o fragmentos enzimáticos de aproximadamente 18 kDa. Si estos péptidos disminuyen la accesibilidad de los sustratos al sitio activo, su eliminación resultaría en un incremento en la accesibilidad de la maltosa observándose un aumento en la velocidad de reacción. En este sentido, la enzima procesada incrementaría también la susceptibilidad a la inhibición por sustrato ya que el sitio activo no estaría limitado por la difusión de la sacarosa. De la misma manera el fácil acceso de moléculas responsables de terminar el crecimiento de los polímeros (tales como fructosa y sacarosa según la propuesta de Tanriseven

y Robyt en 1992), resultaría en la síntesis de polímeros de menor peso molecular.

En análisis estructurales del gen de *L. mesenteroides* B-512F, se ha observado que la eliminación de 83 aminoácidos por el extremo carboxilo terminal ocasiona aproximadamente 70% de pérdida de actividad (Monchois y col., 1998). En el presente trabajo se determinó que el corte proteolítico elimina alrededor de 164 aminoácidos y ocasiona la pérdida de aproximadamente 10% de actividad.

Aunque ambas delecciones tienen efectos sobre el porcentaje de estimulación de la actividad por presencia de aceptores y mantienen constante la K_m , parecen ser procesos diferentes, existiendo la posibilidad de que en la proteólisis se elimine un péptido por el extremo amino terminal que correspondería al dominio variable de la DS. Sin embargo, este resultado se comprobará hasta que se pueda purificar la DS para ser secuenciada.

L. mesenteroides produce proteasas de alto peso molecular, que se transforman a formas de menor peso molecular (30 kDa). El peso molecular de estas enzimas y/o el tipo de asociación dificulta la separación de ambas actividades. Existen diferencias en las propiedades de la DS reportadas en la literatura (Kobayashi y Matsuda 1980) y es muy probable que estas diferencias sean el resultado de la acción de proteasas sobre la DS durante los procesos de producción, purificación y almacenamiento, como fue mostrado aquí para las dos formas de la DS de *L. mesenteroides* B-512FMC.

VI.7 Conclusiones

El procesamiento proteolítico limitado de la DS, que resulta en la pérdida de aproximadamente 18 kDa, produce cambios en las propiedades cinéticas de la enzima como son: disminución de 67% de la K_i por exceso de sustrato y aumento de 33% en el factor de estimulación de la actividad por presencia de maltosa.

El peso molecular de las dextranas sintetizadas es modificado, la eliminación de un fragmento de 18 kDa ocasiona la síntesis de polímeros de menor peso molecular.

VI.8 Perspectivas

Actualmente se intenta separar liberar a la DS de la actividad proteolítica, para poder enviar a secuenciar el extremo amino terminal de la DS.

Se propone realizar un estudio más profundo utilizando herramientas de Biología Molecular para identificar los péptidos eliminados en el proceso proteolítico y dilucidar su función. Además es necesario analizar otras formas enzimáticas para evaluar los cambios en las propiedades con respecto al precursor de 173 kDa.

Por otro lado se determinarán las variables que intervienen en el proceso de estimulación por presencia de dextrana.

Anexo 2.

Effect of proteolytic processing on the properties of *Leuconostoc mesenteroides*
B-512FMC dextransucrase forms.

Effect of proteolytic processing on the properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranase forms.

Summary

A 155 kDa enzymatic form of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC, was produced through a limited proteolytic processing from a 173 kDa precursor. Although the lower molecular mass dextranase conserves 90% of its original enzymatic activity, some kinetic properties were modified. The cleaved dextranase form was more sensitive to substrate inhibition since its K_i fell from 1.8 to 0.6 mM. Although no changes in structure were found, the rheological behavior of the dextran produced under the same reaction conditions was modified. Most important, the rate of the reaction catalyzed by the low molecular mass dextranase was more sensitive to stimulation by maltose than with the 173 kDa precursor. We concluded that the cleavage of approximately 18 kDa results in a slightly different enzyme. As this is an endogenous protease in *Leuconostoc mesenteroides*, this modification explain the observed differences in the behavior of dextranases.

Introduction

Dextranase (EC 2.4.1.5) is mainly produced by *Leuconostoc mesenteroides* and oral *Streptococcus* species. It catalyzes the synthesis of dextran, a high molecular mass D-glucose polymer, using sucrose as substrate. Glucosidic bond synthesis occurs without the mediation of nucleotide activated sugars and cofactors are not required. In addition when efficient acceptors, like maltose, are included in the reaction medium, the enzyme catalyzes the synthesis of low molecular mass oligosaccharides [16].

Dextranase (DS) from the industrial strain, *L. mesenteroides* NRRL B-512F has been the subject of intensive research. It is an inducible enzyme that catalyzes the synthesis of a soluble dextran with more than 95% $\alpha(1-6)$ bond [17]. The enzyme from this strain is recovered tightly

bound to the polymer. Kim and Robyt [5], obtained the strain B-512FMC a constitutive DS producing mutant of *L. mesenteroides* that can be cultivated in the absence of sucrose, thus allowing the production of a dextran-free DS.

The biochemical and kinetic properties of dextransucrase have not been completely described and at least two mechanisms of enzyme reaction have been proposed [17,19]. Interestingly, DS forms with molecular masses ranging from 185 to 64 kDa have been reported [19]. We have recently demonstrated that several molecular masses of the DS from *L. mesenteroides* strains NRRL B-512F and B-512FMC, resulted from proteolytic processing of a 173 kDa form. The proportion of the various forms appearing depends on the level of proteolytic activity, the storage conditions and the storage time [20]. Although some comparative studies have been performed among the catalytic efficiency [2,4,14,15] and dextran structure [4] of the common 173 and 155 kDa forms from *Streptococcus* and *L. mesenteroides*, their conclusion is that both forms have the same catalytic behavior. However, properties that are more specific were not compared. The goal of the present work is to further the comparison of the properties of the 173 and 155 kDa monomeric forms of the *L. mesenteroides* B-512FMC dextransucrase.

Materials and Methods

Bacterial strain and culture conditions

L. mesenteroides B-512FMC was kindly provided by Dr. John F. Robyt. The strain was cultured for DS production as already described [5].

The culture supernatant was concentrated 10 fold by ultrafiltration with an ultrafiltration system (Amicon, Beverly, MA), equipped with an HP100-20, 100 kDa cut off hollow fiber cartridge. The 155 kDa DS form was obtained by proteolytic processing with the endogenous protease activity. The ultrafiltrate was incubated at 27°C and pH 5.2, the incubation time was depended on the amount of protease activity found on each preparation. The minimum required time for maximum

transformation was 15 days. The progress of the dextranucrase digestion was monitored by electrophoresis [12].

Dextranucrase assay

Dextranucrase activity was determined following the initial rate of fructose release from sucrose with a glucose/fructose kit (Boehringer Mannheim Germany). Reactions were performed at 30°C in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, 0.3 mM CaCl_2 and 3 mM sodium azide. One enzyme activity unit (U) was defined as the amount of enzyme that catalyzed the formation of 1 μmol of fructose per minute under the above mentioned conditions.

Dextran and oligosaccharide synthesis

Dextran was synthesized at 30°C, pH 5.2 with 1 U/ml of the enzyme and 100 g/l sucrose. Polymer was recovered by ethanol precipitation, dialyzed against water and lyophilized.

For the oligosaccharide synthesis, maltose was used as acceptor. Reactions were carried out at 30°C in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2, 0.3 mM CaCl_2 and 3 mM sodium azide, 50 g/l sucrose and 25 or 10 g/l of maltose equivalent to a ratio sucrose to maltose concentration ratio of 2 or 5. Oligosaccharides were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), in a Waters instrument equipped with a refraction index detector, using a C18 column and ultrapure water as eluant at a flow rate of 0.7 ml/min.

Dextran characterization.

Polymer structure was analyzed by proton and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Polymer molecular mass was determined by high performance liquid chromatography in a Waters instrument equipped with a refraction index detector using a Ultrahydrogel Linear column (Waters) and 100 mM NaNO_3 as eluant at a flow rate of 0.6 ml/min. The column has a fractionation range of 1×10^3 to 5×10^6 kDa.

For the dextran rheological characterization, dextran was resuspended in water to obtain 20 g/l as a final concentration. Steady shear measurements were made using a Rheomat 120 rheometer

(Contraves, Switzerland) with the cone and plate geometry ($R=5\text{ cm}$, $\theta_0=2^\circ$). All measurements were carried out as already described [24].

Results

Evolution of dextransucrase proteolysis

In Figure 1 the evolution of dextransucrase molecular mass forms (A) and activity (B) when stored for 60 days at pH 5.2 and 27°C , is shown. Under these conditions, a single 155 kDa DS form is obtained by proteolytic cleavage and only 10% of the activity was lost.

Catalytic properties for dextran synthesis

Kinetic studies were performed with both forms of DS. Optimal reaction pH and kinetic parameters K_m and maximum specific activity as well as the substrate inhibition constants (K_i) were determined and are compared in Table 1. From these results, it may be concluded that although no significant differences between optimal pH, K_m and specific activity of the two DS forms were found, they differ in their substrate inhibition constants.

Oligosaccharide synthesis

As far as the oligosaccharide synthesis carried out in the presence of maltose is concerned, no changes were observed in the yield and product profile obtained under similar reaction conditions. A higher activating effect measured as an increase in the initial fructose release rate, was observed with the low molecular mass dextransucrase, as shown in Table 2

Dextran properties

The NMR spectra of dextran synthesized by both DS forms were similar, indicating no differences in polymer structure (data not shown). Nevertheless, as differences were noticed in both systems during the reaction, particularly mixing and gel formation behaviors, the molecular mass of the resulting dextran was analyzed. The polymers produced with the two DS forms were resolved into two fractions by HPLC. One of the fractions had a molecular mass of around 2500

kDa, (LDx), while the second one eluted with the void volume (HDx). The relative amount of both fractions, calculated by the areas of the peaks on the elution profiles, were different. This is represented by the HDx to LDx area ratio (A_{HDx}/A_{LDx}). While the low molecular mass DS produced similar amounts of both fractions ($A_{HDx}/A_{LDx}=1.3$), the 173 kDa form produced a higher amount of the high molecular mass dextran fraction ($A_{HDx}/A_{LDx}=1.8$). In order to confirm results, a rheological analysis of both products was carried out. Although both polymers behave in solution as non-Newtonian fluids, they had different rheological properties and a decrease in viscosity was observed in the dextran produced by the low molecular mass DS, as shown in Figure 2 [24].

Discussion

There are many reports in the literature concerning changes in molecular mass of DS obtained from both *Streptococcus* and *Leuconostoc* strains. [2-4,6-10,14,15,20,21,25]. Reports of a 155 kDa protein are common [2-4,7,14,15,25], and it has been suggested that this is a single product of limited proteolysis of DS retaining enzymatic activity [20].

In the present work, the 155 kDa form was obtained by an incubation process defined in terms of the protease content of the DS preparation. During this process, only 10% of the original activity was lost. The processed enzyme, had a very similar behavior than its precursor in terms of kinetic and physicochemical properties such as optimal reaction pH, affinity for sucrose (K_m), specific activity as well as product chemical structure and acceptor products in the presence of maltose. Although not shown, no changes were neither observed in the amount of sucrose hydrolyzed by the enzyme (between 4-5%). However, we have found that the low molecular mass was more sensible to excess substrate inhibition, as shown by the lower inhibition constant (K_i). Furthermore, the product dextran had a lower molecular mass as inferred by its rheological behavior

Although various hypothesis have been advanced to explain sucrose inhibition [11,23] as well as the effect of acceptors (maltose) on the initial reaction rate [1,13,18,22], none of them have been demonstrated. Nevertheless these hypothesis, both phenomena are related to the existence of specific sites on the enzyme structure. The proteolytic processing of DS eliminates an approximately 18 kDa peptide. If this peptide hinders the accessibility of reactants to the enzyme domains, then the result of its elimination could increase the accessibility of the maltose, increasing the reaction rate. In the same logic, the processed enzyme would increase its susceptibility to substrate inhibition, as the active site will no longer be limited by sucrose diffusion. Also, the accessibility of molecules responsible to end the dextrans chains elongation process (such as fructose or sucrose as proposed by Tariseven and Robyt), would result in lower molecular mass products. In conclusion, some of the properties observed in the 173 kDa form, are the result of a process limited by substrate diffusion within the protein.

In a structural analysis with the gene from *L. mesenteroides* B-512F, it has been observed that the elimination of 83 aminoacids from de carboxy terminal region produced 70% reduction of enzyme activity [16], while in our empirical process only 10% is lost. Although both processes seem to have an effect on the stimulation of activity and no change in the sucrose affinity, the probability of a deletion from the amino terminal region is most probable, as there is no function associated to this variable domain.

L. mesenteroides produces high molecular mass proteases, their transformation into low molecular mass forms (30 kDa) is favored by processing or storage conditions [20]. The molecular mass and/or association with the DS, make difficult the separation of both activities. There are differences in DS properties reported in literature. It is therefore probable that these differences may result from changes in molecular mass during production, purification and storage, as shown here for the two DS forms from *L. mesenteroides* B-512FMC.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (project 25281-B) and by UNAM-PAEP projects 030552 and 202360. M. Sánchez acknowledges the support of an UNAM-DGAPA scholarship. We also thank, Dr. Carlos Peña and M. Sc. Maria Soledad Cordova for help in the polymer analysis and to Dr. Manuel Jimenez for help in the NMR analysis.

References

- 1 Ebert KH and G Schenk. 1968. Mechanism of biopolymer growth: The formation of dextran and levan. *Adv Enzymol* 30:179-221.
- 2 Fu D and JF Robyt. 1990. A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranucrase. *Prep Biochem* 20:93-106.
- 3 Grahame DA and RM Mayer. 1984. The origin and composition of multiple forms of dextranucrase from *Streptococcus sanguis*. *Biochim Biophys Acta* 786:42-48.
- 4 Grahame DA and RM Mayer. 1985. Purification, and comparison, of two forms of dextranucrase from *Streptococcus sanguis*. *Carbohydr Res* 142:285-298.
- 5 Kim D and JF Robyt 1994. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucanases. *Enzyme Microbiol Technol* 16:659-664.
- 6 Kim D and JF Robyt. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranucrase. *Enzyme Microb Technol* 16:1010-1015.
- 7 Kitaoka M and JF Robyt. 1998. Large-scale preparation of highly purified dextranucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. *Enzyme Microb Technol* 23 386-391.
- 8 Kobayashi M and K Matsuda. 1980. Characterization of the multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRI. B-512F. *Biochim Biophys Acta* 614 46-62

- 9 Kobayashi M and K Matsuda 1986. Electrophoretic analysis of multiple forms of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. J Biochem 100:615-621.
- 10 Kobayashi M, K Mihara, and K Matsuda. 1986. Dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: Characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. Agric Biol Chem 50:551-556.
- 11 Kobayashi M, I Yokoyama, and K Matsuda. 1986. Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextranase evaluated by inhibition kinetics. Agric Biol Chem 50:2585-2590.
- 12 Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
- 13 Mayer RM, MM Matthews, CL Futerman, VK Parnik, and SM Jung. 1981. Dextranase: Acceptor substrate reactions. Arch Biochem Biophys 208:278-287.
- 14 Miller AW and JF Robyt. 1986. Activation and inhibition of dextranase by calcium. Biochim Biophys Acta 880:32-39
- 15 Miller AW and JF Robyt. 1986. Inhibition of dextranase by Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris). Arch Biochem Biophys 248:579-586.
- 16 Monchois V, A Reverte, M Remaud-Simeon, P Monsan, and RM Willemot 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F dextranase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. Appl. Environ Microbiol 64:1644-1649.
- 17 Monchois V, RM Willemot, and P Monsan. 1999. Glucanases mechanism of action and structure-function relationships. FEMS Microbiol Rev 23:131-151.
- 18 Paul F, E Oriol, D Auriol, and P Monsan 1986. Acceptor reactions of a highly purified dextranase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. Carbohydr Res 149 433-441.
- 19 Robyt JF 1995 Mechanism in the glucanases synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. Adv Carbohydr Chem Biochem 51:133-168

- 20 Sanchez-Gonzalez M, A Alagon, R Rodriguez-Sotres, A Lopez-Munguia. 1999. Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. FEMS Microbiol Lett. 181:25-30.
- 21 Smith MR, JC Zahnley. 1997. *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 mutants producing alternansucrases exhibiting decreases in apparent molecular mass. Appl Environ Microb 63:581-586.
- 22 Tanriseven A and JF Robyt. 1992. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextransucrase, and the demonstration of a separate acceptor binding-site. Carbohydr Res 225:321-329.
- 23 Tanriseven A and JF Robyt. 1993. Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentrations. Carbohydr Res 245:97-104.
- 24 Tecante A and A López-Munguia. 1986. Rheological characterization of dextran-enzymatic synthesis media. J Polymer Sci 31:2337-2350.
- 25 Wilke-Douglas M, JT Perchorowicz, CM Houck, and BR Thomas. December 1989. US patent WO 89/12386.

TABLE 1

Catalytic properties of two different molecular mass forms of dextransucrase from *L. mesenteroides* B-512FMC

Dextransucrase form	K _m (mM) ^a	Specific activity (μmol/min/mg protein) ^a	K _i (mM) ^a	Optimal pH at 30°C
155 kDa	34±1	141±4	0.6±0.02	4.5 – 5.7
173 kDa	29±0.8	156±2	1.8±0.05	4.5 - 5.7

^a pH 5.2 and 30°C

TABLE 2

Effect of maltose concentration on the final reaction rate of two forms of dextransucrase from *L. mesenteroides* obtained by proteolysis.

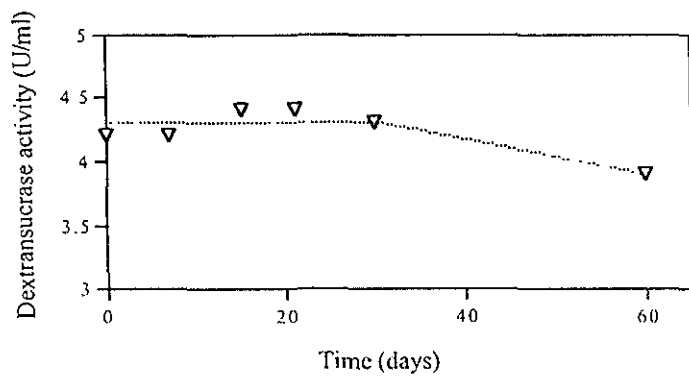
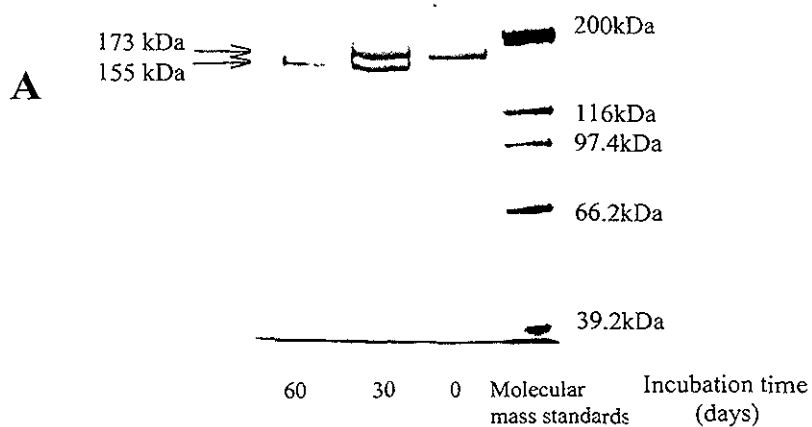
Enzymatic form	Sucrose (g/l)	Maltose (g/l)	Initial reaction rate ($\mu\text{mol fructose/min/ml}$)	Stimulation factor
155 kDa	50	0	1.2 ± 0.080	1
	50	10	1.9 ± 0.030	1.6
	50	25	2.4 ± 0.001	2
173 kDa	50	0	1.2 ± 0.12	1
	50	10	1.6 ± 0.01	1.3
	50	25	1.8 ± 0.13	1.5

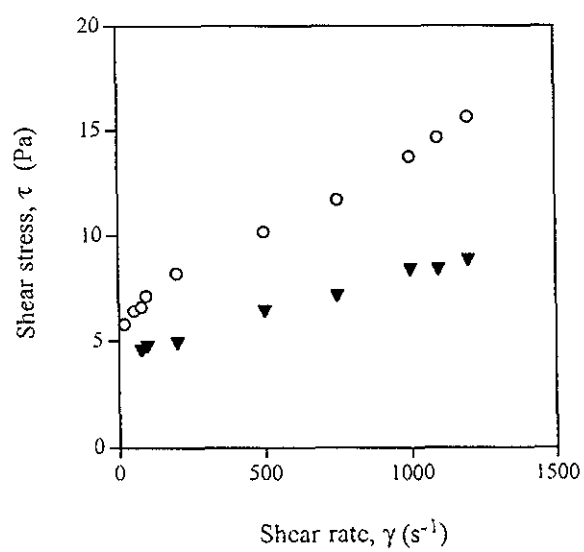
Reactions were carried out at pH 5.2 and 30°C, in both cases using 1.2 U/ml of each dextransucrase form as measured with sucrose as the single substrate.

Figure legend

Figure 1. Effect of proteolytic activity upon the *L. mesenteroides* B-512FMC dextranase. **A.** Molecular mass was determined by SDS-PAGE. A DS ultrafiltrate was incubated at pH 5.2 and 27°C for 60 days. Lane 1: 60 days of incubation; lane 2: 30 day of incubation; lane 3: Initial time; lane 4: Molecular mass standards **B.** Evolution of DS activity during incubation

Figure 2. Rheological behaviour analysis of dextran (20 g/l) obtained in a Rheomat 120 rheometer (Contraves, Switzerland). Dextran was synthesized from two dextranase forms: 173 kDa  and 155 kDa .





VII. Bibliografía

- Alsop, R. 1983. Industrial production of dextrans. En: Process in industrial microbiology. Ed. Buschel, M.E. Elsevier. Vol. 18. pp.1-43. Scientific Publishing Co. Amsterdam.
- Abo, H., T. Matsuda, T. Kodama, H. Ohta, K. Fukui, K. Kato y H. Kogama. 1991. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthase). J. Bacteriol. 173:989-996.
- Belder, A.N. 1990. General applications of dextran and its derivatives. En: Dextran, 2a. Ed. Pharmacia LEO Therapeutics, 62-79. Uppsala, Sweden.
- Böcker, M., H. Jordering y K. Buchholz. 1993. Kinetics of leucrose from sucrose by dextransucrase. Biotechnol. Bioeng. 43:856-864.
- Borman, S. 1993. Glycotechnology drugs begin to emerge from lab. Chemical and Engineering news. Jun 28:27-34.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochim. 72: 248-254.
- Creighton, T.E. 199. Chemical properties of polypeptides. En: Protein Structure and Molecular Properties. Ed. Creighton, T.E. pp. 1-47. W. H. Freeman and Company, New York.
- Dedonder, R. 1972. Role and mechanism of transglycosylation reactions En: biochemistry of glycosidic linkages. pp. 21-78. Piras y Pontis, H.G. New York.
- Demuth, B., H. J. Jordering y K. Buchholz. 1999. Modeling of oligosaccharide synthesis by dextransucrase. Biotechnol. Bioeng. 65:583-592.
- Devulapelle, K. S., S. D. Goodman, Q. Gao, A. Hemsley y G. Mooser. 1997. Knowledge-base of glucosyltransferase from the oral bacteria group of mutants streptococci. Protein Sci. 6:2489-2493.
- Dols, M., M. Remaud-Simeon, R. M. Willemot, B. Demuth, H. J. Jordering, K. Buchholz y P. Monsan. 1999. Kinetic modeling of oligosaccharide synthesis catalyzed by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. Biotech. Bioeng. 63:308-315.
- Dongling, S. y J. Robyt. 1993. Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. Carbohydr. Res. 248:339-348.

Ebert, K. y G. Shenk. 1968. Mechanism of biopolymer growth: The formation of dextran and levan. 30:179-221. Adv. Enzymol. 30:190-202.

Ferretti, J., M. Gilpin y R. Russell. 1987. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. J. Bacteriol. 169:4271-4278.

Fu, D. y J. Robyt. 1988. Essential histidine residues in dextranase chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photooxidation. Carbohydr. Res. 183:97-109.

Fu, D. y J.F. Robyt. 1990. A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FM dextranase. Prep. Biochem. 20: 93-106.

Funane, K., M. Yamada, M. Shiraiwa, H. Takahara, N. Yamamoto, E. Ichishima y M. Kobayashi. 1995. Aggregated form of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:776-780.

Funane, K., T. Ookura y M. Kobayashi. 1998. Glucan binding regions of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:123-127.

Giffard, P. M. y N. A. Jaques. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in Streptococcal glucosyltransferase glucan binding regions and related sequences. J. Dent. Res. 73:1133-1141.

Goyal, A. y S. S. Katiyar. 1995a. Involvement of a lysine residue in the inactivation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranase by O-phthalaldehyde. Biochem. Mol. Biol. Int. 36:579-585.

Goyal, A. y S. S. Katiyar. 1995b. 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid as a probe for lysine at the active site of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Biochem. Mol. Biol. Int. 36:639-647.

Grahame D. A. y R. M. Mayer. 1984. The origin and composition of multiple forms of dextranase from *Streptococcus sanguis*. Biochim Biophys Acta 786:42-48.

Grahame D. A. y R. M. Mayer. 1985. Purification, and comparison, of two forms of dextranase from *Streptococcus sanguis*. Carbohydr Res 142:285-298.

Harrington, D. y R. Russell. 1994. Identification and characterization of two extracellular proteases of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol. Lett. 121:237-242.

- Heinke, K., B. Demuth, H. J. Jördening y K. Buchholz. 1999. Kinetics of the dextran sucrose acceptor reaction with maltose-experimental results and modeling. *Enzyme Microbial Technol.* 24:523-534.
- Hehre, E. 1946. Studies on the enzymatic synthesis of dextran from sucrose. *J. Biol. Chem.* 163:221-233.
- Henssen, C. y E. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activator in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. *Anal. Biochem.* 102:196-202.
- Homer, K. A., R. A. Whaley y D. Beighton. 1990. Proteolytic activity of oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 55, 257-60.
- Kato, C. y H. Kuramitsu. 1990. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 299-302.
- Kim D y J. F. Robyt. 1994a. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucanases. *Enzyme Microbiol Technol* 16:659-664.
- Kim D. y J. F. Robyt. 1994b. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextranase. *Enzyme Microb Technol* 16:1010-1015.
- King, T. P., A. C. Alagón, J. Kuan, A. K. Sobotka y L. M. Lichtenstein. 1983. Immunochemical studies of yellowjacket venom proteins. *Mol. Immunol.* 20: 297-308.
- Kitaoka M. y J. F. Robyt. 1998. Large-scale preparation of highly purified dextranase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. *Enzyme Microb. Technol.* 23:386-391.
- Kobayashi, M. y K. Matsuda. 1978. Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. *Carbohydr. Res.* 66:277-288.
- Kobayashi M. y K. Matsuda. 1980. Characterization of the multiple forms and main component of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim. Biophys. Acta* 614:46-62.
- Kobayashi, M., I. Yokoyama y K. Matsuda. 1984. Activation of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* by the substrate, dextran. *Agric. Biol. Chem.* 1:221-223.

Kobayashi, M., I. Yokoyama y K. Matsuda. 1985. Effectors differently modulating the dextranucrase activity of *Leuconostoc mesenteroides*. Agric. Biol. Chem. 49: 3189-3195.

Kobayashi M. y K. Matsuda. 1986. Electrophoretic analysis of multiple forms of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. J. Biochem. 100:615-621.

Kobayashi M., K. Mihara, y K. Matsuda. 1986. Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F: Characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. Agric. Biol. Chem. 50:551-556.

Kobayashi M., I. Yokoyama y K. Matsuda. 1986. Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextranucrase evaluated by inhibition kinetics. Agric. Biol. Chem. 50:2585-2590.

Kobayashi, S., K. Koga, O. Hayashida, Y. Kakano y Y. Hasegawa. 1989. Glucan-binding domain of glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Isolation of a 55-kilodalton peptide from a glucosyltransferase prebound to insoluble glucan. Infect. Immun. 57:2210-2213.

Koepsell, H., H. Tsuchiya, N. Hellman, A. Kazenko, C. Hoffman, E. Sharpe y R. Jackson. 1953. Enzymatic synthesis of dextran. J. Biol. Chem. 200:793-801.

Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87:15-42.

Kwon, K. S., J. H. Auh, S. K. Choi, G. J. Kang, J. W. Kim y K. H. Park. 1999. Characterization of branched oligosaccharides produced by *Bacillus licheniformis* maltogenic amylase. J. Food Sci. 64:258-261.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

Lis, M., T. Shiroza y K. Kuramitsu. 1995. Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. Appl. Environ. Microbiol. 61:2040-2042.

Mac Gregor, A. E., H. M. Jespersen y B. Svensson. 1996. A circularly permuted α -amylase type α/β barrel structure in glucan synthesizing glucosyltransferases. FEBS Lett. 378:263-266.

Martínez-Espíndola, J. P. y C. A. López-Munguía. 1985. On the kinetics of dextranucrase and dextran synthesis in batch reactors. Biotechnol. Lett. 7:483-486.

- Miller A. W. y J. F. Robyt. 1986a. Activation and inhibition of dextranucrase by calcium. *Biochim Biophys Acta* 880:32-39.
- Miller A. W. y J. F. Robyt. 1986b. Inhibition of dextranucrase by Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , and Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris). *Arch Biochem Biophys* 248:579-586.
- Miller, A. y J.F. Robyt. 1986. Functional molecular size and structure of dextranucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochim. et Biophys. Acta* 80:198-203.
- Miller, A., S. Eklund y J. Robyt. 1986. Milligram to grade scale purification and characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Carbohydr. Res.* 147:119-133.
- Mizutani, N., N. Yamada, K. Takayama y M. Shoda. 1994. Constitutive mutants for dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *J. Ferm. Bioeng.* 77:248-251.
- Monchois, V., M. Remaud-Simeon, R. R. B. Russell. P. Monsan y R. M. Willemot. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microb. Biotechnol.* 48:465-472.
- Monchois, V., A. Reverte, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, y R. M. Willemot. 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F dextranucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1644-1649.
- Monchois, V., R. M. Willemot y P. Monsan. 1999. Glucanases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol Rev* 23:131-151.
- Monsan, P. y Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.* 16:187-192.
- Mooser, G., D. Shur, M. Lyou y C. Watanabe. 1985. Kinetic studies on dextranucrase from the cariogenic oral bacterium *Streptococcus mutans*. *J. Biol. Chem.* 260:6907-6915.
- Mooser, G. y C. Wong. 1988. Isolation of a glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6- α -glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun.* 56:880-884.
- Mooser, G. y R. Iwaoka. 1989. Sucrose 6- α -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Characterization of a glucosyl-enzyme complex. *Biochim.* 28:443-449.

- Mooser, G., S. Hefta, R. Paxton, J. Shively y T. Lee. 1991. Isolation and sequence of an active peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α -glucosyltransferases. J. Biol. Chem. 266:8916-8922.
- Monsan, P. y F. Paul. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. FEMS Microbiol. Rev. 16:187-192.
- Nakano, Y. y H. Kuramitsu. 1992. Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. J. Bacteriol. 174:5639-5646.
- North, M.J. 1989. Prevention of unwanted proteolysis. En: Proteolytic enzymes a practical approach. Eds. Beynon, R.J. y Bond, J.S. pp. 105-123. IRL Press, Oxford University Press.
- Oriol, E., F. Paul, A. Heyraud, M. Rianudo y P. Monsan. 1987. Transfer reaction of glucosyl residues to maltose and purified oligosaccharides using highly active *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase. Enzyme Eng. 501:210-215.
- Paul, F. E. Oriol, D. Auriol y P. Monsan. 1986. Acceptor reactions of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides application to the synthesis of controlled-molecular weight dextrans. Carbohydr. Res. 149:433-441.
- Quirasco, M., A. Lopez-Munguia, M. Remaud, P. Monsan y A. Farres. 1999. Induction and transcription studies of the dextranucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Appl. Environ. Microbiol. 65:5504-5509
- Reh, K., H. Jördening y K. Buchholz. 1990. Kinetics of oligosaccharide synthesis by dextranucrase. Enzyme Eng. 613:723-729.
- Remaud-Simeon, M., A. López-Munguía, V. Pelenc, F. Paul y P. Monsan. 1994. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing α -(1-2) linkages. Appl. Biochem. Biotech. 44:101-117.
- Robyt, J., B. Kimble y T. Walseth. 1974. The mechanism of dextranucrase action (The direction of dextran biosynthesis). Arch. Biochem. Biophys. 165:634-640.
- Robyt, J. y H. Taniguchi. 1976. The mechanism of dextranucrase action. (Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran). Arch. Biochem. Biophys. 174:129-135
- Robyt, J. y T. Walseth. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. Carbohydr. Res. 61:433-445.

Robyt, J. 1979. Mechanism involved in the biosynthesis of polysaccharides. Trends Biochem Sci. 4:47-49.

Robyt, J. y S. Eklund. 1983. Relative, quantitative effects of acceptor in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. Carbohydr. Res. 121:279-286.

Robyt, J. 1986. Dextran. En: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol. 4 2a. ed. pp. 752-767. Eds Mak F., M. Bikales, G. Overberger y G. Menyes. John Wiley y Sons, Inc. N. York. E.U.A.

Robyt, J. 1991. Reactions of glucansucrases in the biomass conversion of sucrose. En: Enzymes in biomass conversion. No. 460 ACS Symposium Series. pp. 394-406. Eds. G.F. Leatham y M.E. Himell. American Chemical Society. Washington D.C., E.U.A.

Robyt, J. F. 1992. New products from the action of sucrose-glucosyltransferases. En: Carbohydrate in industrial synthesis. pp. 56-67. Eds. M. A. Clarke. Bartens, Berlin.

Robyt, J.F. 1995 Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. Adv. Carbohydr. Chem. Biochim. 51:133-168.

Seymour, F. E. Chen y S. Bishop. 1979a. Methylation structural analysis of unusual dextrans by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydr. Res. 68:113-121.

Seymour, F. R. Knapp, E. Chen, A. Jeanes y S. H. Bishop. 1979b. Structural analysis of dextrans containing 2-O- α -D-glycosylated α -D-glucopyranosyl residues at the branch points, by use of ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography-mass spectrometry. Carbohydr. Res. 71:231-250.

Shimamura, A., Y. Nakano, H. Mukasa y H. Kuramitsu. 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. J. Bacteriol. 58:4845-4850.

Simpson, C., P. Giffard y N. Jaques. 1995. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. Infect. Immun. 63:609-621.

Smith, M. R. y J.C. Zahnley. 1997. *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 mutant producing alternansucrases exhibiting decreases in apparent molecular mass. Appl. Environ. Microbiol. 63:581-586.

- Speicher, D. W. 1989. En: Techniques in Protein Chemistry. Ed. Hugli T. Academic Press, pp. 24-35.
- Stodola, F., E. Sharpe y H. J. Koepsell. 1956. The preparation properties and structure of the disaccharide leucrose. J. Am. Chem. Soc. 78:2514-2518.
- Stringer, C. y H. Tsuchiya. 1958. A kinetic study of dextranase. J. Am. Chem. Soc. 80:6620-6625.
- Sumner, J. y S. Howell. 1935. A method for determination of saccharase activity. J. Biol. Chem. 108:51-54.
- Tanriseven, A. y J. Robyt. 1992. Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextranase, and the demonstration of separate acceptor binding site. Carbohydr. Res. 225:321-329.
- Tanriseven, A., J. Robyt. (1993). Interpretation of dextranase inhibition at high sucrose concentrations. Carbohydr. Res. 245:97-104.
- Tecante A. y A. López-Munguía. 1986. Rheological characterization of dextran-enzymatic synthesis media. J Polymer Sci 31:2337-2350.
- Thiem, J. 1995. Applications of enzymes in synthetic carbohydrate chemistry. FEMS Microbiol. Rev. 16:193-211.
- Thomas, H. V., J. Elhalabi y Rice, K. 1998. Enzymatic synthesis of N-linked oligosaccharides terminating in multiple sialyl-Lewis^x and GalNAc-Lewis^x determinants: clustered glycosides for studying selectin interactions. Carbohydr. Res. 306:387-400.
- Tomamatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. Food Technol. 48:61-65.
- Tsumori, H., T. Minami y H. K. Kuramitsu. 1997. Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. J. Bacteriol. 179:3391-3396.
- Valette, P., V. Pelenc, Z. Djouzi, C. Andrieux, F. Paul, P. Monsan y O. Szyliet. 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. J. Sci. Food Agric. 62:121-127.
- Willemot, R. M., P. Monsan y G. Durand. 1988. Effects of dextran on the activity and stability of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides*. ANN. N. Y. Acad. Sci. 8:169-173.

Wilke-Douglas, M., J.T. Perchorowicz, C.M. Houck, y B.R. Thomas. December 1989. U. S. patent WO 89/12386.

Wong, C., S. Hefta, R. Paxton, J. Shively y G. Mooser. 1990. Size and subdomain architecture of the glucan-binding domain of sucrose: 3- α -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. Infect. Immun. 58:2165-2170.

Zhang, J. y P. Kovác. 1999. Studies on vaccines against cholera. Synthesis of neoglycoconjugates from hexasaccharide determinant of *Vibrio cholerae* O:1, serotype Ogawa, by single-point attachment or by attachment of the hapten in the form of clusters. Carbohydr. Res. 321:157-167

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA