

03088

8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE  
LA DEXTRANSACARASA PRODUCIDA  
POR *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

277066

Presenta

M. en B. Maricarmen Quirasco Baruch

México, D.F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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. Agustín López Munguía Canales	Presidente
Dra. Guadalupe Espín Ocampo	Secretario
Dr. Pierre Monsan	Vocal
Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Vocal
Dr. Enrique Merino Pérez	Vocal
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Suplente
Dr. Francisco Ruíz Terán	Suplente

Este trabajo se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, INSA, Toulouse, Francia.

Sustentante: M. en B. Maricarmen Quirasco Baruch  
Tutor principal: Dra. Amelia Farrés González Saravía

Tepeui Xiuitl  
(La caída de las hojas)

Sesen xiuitl tepeui xiuitl  
kuauitl ixíuíyo payani  
uan imako tlaltipaktli onmokaua  
īnik maxoxouiyakaj kuantinij

Cada año se caen las hojas  
las hojas de los árboles se pulverizan  
y retornan a las entrañas de la tierra  
para reverdecer a los árboles.

Mariana: Gracias por haberme acompañado desde el principio en esta aventura y por ser ese motorcito que me ha impulsado en todo momento.

Luis Carlos: Una vez más... gracias. Ya verás que este esfuerzo mutuo nos traerá cosas mejores.

Quisiera dedicar este trabajo a mi familia que, ahora más que nunca, estuvo conmigo en las buenas y en las no tan buenas. Lástima que no estemos todos para poder compartir juntos el final de este proyecto.

Señor, estás presente en todo momento y cada vez me asombro más al descubrir tu Creación.

Agradezco a la Dra. Farrés por la confianza, la amistad y el apoyo "integral" que me brindó en todo momento. Realmente ha sido una experiencia enriquecedora formar parte de su grupo de trabajo.

Externo mi agradecimiento al Dr. Agustín López, a la Dra. Magali Remaud-Simeon y al Dr. Pierre Monsan por la oportunidad de colaborar con ellos y por el apoyo que me brindaron.

Agradezco el apoyo recibido de parte del Dr. Miguel Ángel Cevallos, la Dra. Herminia Loza y el Dr. Enrique Merino.

También debo reconocer el apoyo de mis compañeros de laboratorio: Alicia, Idalia, Carolina, Adelfo, Ismael, Rodolfo, Jesús. Así como de los compañeros del INSA: Martha, Gabriela, Julio, Marilyne, Marguerite, Patricia, Thierry, Pascal.

Este proyecto fue financiado por el PADEP-UNAM no. 5351 y el PCP-CONACyT no. 39. La alumna fue distinguida con beca DGAPA-UNAM para la realización de sus estudios.

# INDICE

---

	Pág.
	RESUMEN 1
	ABSTRACT 3
Capítulo 1	INTRODUCCIÓN 4
	Objetivos. 6
	Generalidades. 6
	Dextranas y dextransacarosas. 6
	Aspectos metabólicos y genéticos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . 11
Capítulo 2	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F 15
	Objetivos. 16
	Materiales y métodos. 16
	Cepas utilizadas y condiciones de cultivo. 16
	Determinación del patrón de azúcares fermentables. 16
	Extracción de DNA total. 16
	Extracción de DNA plasmídico. 17
	Diseño de oligonucleótidos y condiciones para la PCR. 17
	Resultados y discusión. 18
	Patrón de azúcares fermentables. 18
	Determinación de la presencia de plásmidos. 20
	Amplificación de regiones variables de genes que codifican para glucosiltransferasas. 21
	Resumen de resultados y conclusiones. 23
Capítulo 3	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO 24
	Objetivos. 25
	Materiales y métodos. 25
	Cepa utilizada y condiciones de cultivo. 25
	Análisis de azúcares de los medios de cultivo. 26

	Pág.
Concentración de la actividad dextransacarasa.	26
Medición de la actividad dextransacarasa.	27
Electroforesis de proteínas y detección de actividad glucosiltransferasa <i>in situ</i> .	27
Síntesis de oligosacáridos y dextrana.	28
Análisis de oligosacáridos.	28
Análisis de dextrana.	29
Resultados y discusión.	29
Cinética de fermentación de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F en sacarosa.	29
Cinética de crecimiento en fuentes alternas a la sacarosa.	30
Determinación de la actividad dextransacarasa en las diversas fuentes de carbono.	33
Caracterización electroforética de las proteínas obtenidas en fuentes de carbono alternas a la sacarosa.	34
Caracterización de los productos de reacción de las dextransacarosas obtenidas en las diferentes fuentes de carbono.	36
Resumen de resultados y conclusiones.	38
<b>Capítulo 4</b>	
<b>ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA EN <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F</b>	<b>40</b>
Objetivos.	40
Materiales y métodos.	41
Condiciones de cultivo.	41
Concentración y determinación de la actividad dextransacarasa.	42
Determinación de la osmolaridad de soluciones de azúcares.	42
Resultados y discusión.	42
Efecto de la sacarosa como inductor de actividad dextransacarasa sobre células previamente cultivadas en diversas fuentes de carbono.	42
Determinación de la concentración mínima de sacarosa necesaria para inducir la actividad dextransacarasa.	44
Resumen de resultados y conclusiones	46



	Pág.	
<b>Capítulo 5</b>	<b>ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>dsr-S</i> DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F</b>	47
	Objetivos.	48
	Materiales y métodos.	48
	Condiciones de cultivo.	48
	Extracción de RNA total.	48
	Diseño de sonda y condiciones para la hibridación tipo Northern.	49
	Determinación del sitio de inicio de transcripción.	50
	Análisis de la curvatura del DNA.	50
	Resultados y discusión.	51
	Extracción de RNA.	51
	Análisis de hibridación.	51
	Determinación del sitio de inicio de transcripción.	53
	Análisis de la región del promotor.	56
	Resumen de resultados y conclusiones.	62
<b>Capítulo 6</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	63
<b>Capítulo 7</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	66
<b>Capítulo 8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	67
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	69
<b>Anexo A</b>	Metodología para la extracción de DNA total.	
<b>Anexo B</b>	Metodología para la extracción de DNA plasmídico.	
<b>Anexo C</b>	Metodología para la extracción de RNA total.	
<b>Anexo D</b>	Alineamiento de secuencias del gen <i>dsr-S</i> con secuencias de glucosiltransferasas de <i>Streptococcus</i> .	
<b>Anexo E</b>	Secuencias de los productos de amplificación de los extremos 3' del cDNA obtenido a partir del mRNA del gen <i>dsr-S</i> de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F.	
<b>Anexo F</b>	Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F. Quirasco, M., A. López-Munguía, M. Remaud-Simeon, P. Monsan and A. Farrés. Appl. Environ. Microbiol. 1999. 65: 5504-5509.	

# RESUMEN

---

Las dextrantransferasas (E.C. 2.4.1.5.) son glucosiltransferasas que participan en la síntesis de dextrana, homopolisacárido de alto peso molecular compuesto de unidades de D-glucopiranosas unidas con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Catalizan la transferencia de residuos glucosilo de la sacarosa hacia una cadena creciente de dextrana. Entre de los microorganismos productores de glucosiltransferasas se encuentran algunas especies de *Streptococcus* y de *Leuconostoc*. En el género *Leuconostoc* las dextrantransferasas se inducen en presencia de sacarosa. Por su importancia industrial, *L. mesenteroides* NRRL B-512F es una de las cepas productoras de dextranas más estudiadas desde el punto de vista de ingeniería bioquímica. En lo que respecta a la caracterización genética molecular de esta cepa, sólo se ha reportado un gen que codifica para una dextrantransferasa (*dsr-S*). Sin embargo, no se sabe si existen otros genes que codifiquen para dextrantransferasas en esta cepa, y tampoco se han realizado estudios sobre la regulación de la expresión de este gen.

En este trabajo se reporta por primera vez la producción de actividad dextrantransferasa utilizando varias fuentes de carbono alternas a la sacarosa en *L. mesenteroides* B-512F, así como estudios para elucidar el efecto de la sacarosa sobre la producción de la dextrantransferasa. Los resultados indican que esta enzima se produce en presencia de sacarosa, glucosa y fructosa. Utilizando sacarosa como fuente de carbono se obtuvo aproximadamente 450 veces más actividad que la producida por células crecidas con xilosa, este último se podría considerar como el nivel basal de actividad dextrantransferasa. La caracterización electroforética de las dextrantransferasas obtenidas en las diversas fuentes de carbono, y los análisis de RMN-<sup>13</sup>C y de HPLC del polímero y oligosacáridos, respectivamente, sintetizados con estas enzimas sugieren que, bajo las condiciones estudiadas, se expresa un solo gen que codifica para la dextrantransferasa en *L. mesenteroides* B-512F, el *dsr-S*.

Los resultados de los experimentos de inducción con sacarosa no corresponden al comportamiento de un inductor típico, por lo que se propone la hipótesis de un fenómeno de regulación positivo relacionado con algún producto del metabolismo de la sacarosa.

El estudio del mensajero del gen *dsr-S* indicó que este gen se encuentra en un operón monocistrónico, que se transcribe con una alta eficiencia durante la fase exponencial de crecimiento. Adicionalmente, se identificó el sitio de inicio de transcripción y la región promotora. Ésta presenta una región -10 canónica pero una región -35 alejada del consenso en procariotes, así como un alto grado de curvatura. Lo anterior sugiere que el inicio de la transcripción del gen *dsr-S* depende de la topología del DNA en la región promotora.

# ABSTRACT

---

Dextranases (E.C. 2.4.1.5.) are glucosyltransferases that synthesize dextran (a high molecular weight homopolysaccharide of D-glucopyranosyl units linked through  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glucosidic bonds); they catalyze the glucoside transfer from sucrose to dextran. Among the glucosyltransferase-producing microorganisms, there are some *Streptococcus* and *Leuconostoc* species. Dextranases from *Leuconostoc* are induced with sucrose. Because of its industrial applications, *L. mesenteroides* NRRL B-512F is one of the dextran-producing strains most widely studied from the biochemical engineering approach. About to molecular genetics concerns, only one dextranase gene from this strain has been reported, the *dsr-S*. However, it is not known if there are other genes that encode for dextranases in this strain, nor studies related to the regulation of *dsr-S* gene expression have been reported.

In this work, *L. mesenteroides* B-512F dextranase production with carbon sources other than sucrose is reported for the first time. Likewise, studies about the effect of sucrose on the dextranase production are discussed. The results demonstrate that dextranase is produced with sucrose, glucose and fructose. When using sucrose as carbon source a 450-fold larger activity was obtained when comparing to the activity produced by cells grown in xylose. The latter could be considered as the basal dextranase level. The electrophoretic analysis of dextranases obtained in the various carbon sources, as well as  $^{13}\text{C}$ -RMN and HPLC analyses of the products synthesized with these enzymes suggest that, under the conditions studied, just one dextranase gene is expressed, *dsr-S*.

The results of the sucrose induction experiments were not what were expected from a typical inducer. These lead to a hypothesis of the presence of a positive regulation phenomenon related to some product of the sucrose metabolic pathway.

Studies of the *dsr-S* mRNA showed that this gene is located in a monocistronic operon, which is efficiently transcribed during exponential growth phase. The transcription initiation site and the promoter region were identified. The promoter showed a -10 canonic region but a -35 region different to the consensus sequence in prokaryotic cells, and a large level of curvature. These facts suggest that the initiation of *dsr-S* transcription depends on the topology of the promoter region.

# INTRODUCCIÓN

---

La biotecnología conjunta varias disciplinas cuyo objetivo es el desarrollo de nuevas tecnologías, aprovechando las capacidades metabólicas del material biológico, con el fin de producir bienes que tengan impacto, principalmente, en las áreas de salud, alimentación y mejoramiento del medio ambiente. En algunos países se han hecho inversiones cuantiosas en esta área e incluso se le ha considerado como estratégica para su desarrollo. Es innegable que este fin de siglo ha presenciado avances en el campo biotecnológico que han incidido en la calidad de vida del ser humano, como es el caso de la síntesis de nuevos medicamentos o de vegetales con propiedades sensoriales y calidad mejorada. A nivel más superfluo, pero no menos importante, en la producción de insumos que satisfacen nuevas exigencias de los consumidores, siendo éste el caso de la producción de detergentes biodegradables, de edulcorantes no calóricos o de productos nutracéuticos.

Durante la última década ha existido un interés creciente en la síntesis de azúcares, ya que poseen propiedades funcionales interesantes para la industria química, alimentaria y en aplicaciones médicas. Es sobresaliente el hecho de que los oligo y polisacáridos posean una excepcional diversidad estructural y funcional, reflejo de la complejidad de las enzimas responsables de su hidrólisis (glicosidasas), rearrreglos (transglicosidasas) y biosíntesis (glicosiltransferasas). Estas reacciones son cruciales para el funcionamiento celular, como en el caso de las interacciones huésped-parásito, en el marcaje celular, la biosíntesis y degradación de polisacáridos estructurales y de almacenamiento, etc., por lo que presentan un gran potencial de aplicación.

La síntesis química a gran escala de carbohidratos complejos es costosa y poco específica, por lo que su síntesis enzimática presenta grandes ventajas debido a la estereo y regioselectividad

---

de las enzimas. Las opciones enzimáticas para la producción de azúcares sintéticos que han sido exploradas hasta ahora, consisten en la utilización de glicosidasas bajo condiciones de reacción en las que la catálisis se lleva a cabo en “sentido contrario” (utilizando enzimas mutadas o modificando la cantidad de agua disponible en el medio de reacción), o la utilización de glicosiltransferasas. Dentro del último grupo se encuentran las glucosiltransferasas (ej. dextrantransferasas, alternansacarasas, mutansacarasas, amilosacarasas) que catalizan la transferencia de residuos glucosilo de la sacarosa a moléculas aceptoras de diversa naturaleza. Una característica importante de estas enzimas es que no requieren de cofactores ni de intermediarios de alta energía para llevar a cabo la transferencia; la energía necesaria para la catálisis se obtiene de la ruptura del enlace glucosídico de la sacarosa, por lo que su aplicación para la producción industrial de azúcares sintéticos es de gran interés (Monsan & Paul, 1995).

Las glucosiltransferasas se encuentran principalmente en bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*, estas últimas son las productoras de las dextrantransferasas (Alsop, 1983). La investigación de genética molecular de glucosiltransferasas realizada en *Streptococcus* ha sido abundante debido a la importancia que presenta para la salud humana (Gilpin *et al*, 1985; Ferreti *et al*, 1987; Russell *et al*, 1987; Banas *et al*, 1990; Gilmore *et al*, 1990; Abo *et al*, 1991; Giffard *et al*, 1991) al ser este microorganismo un huésped de la flora bucal responsable de la formación de la placa dental. Sin embargo hasta hace un lustro poco se sabía sobre las dextrantransferasas bajo esa perspectiva. Por otra parte, el estudio de las mismas desde la óptica de tecnología e ingeniería enzimática ha sido abundante, siendo sobresaliente el realizado por los grupos del Dr. Pierre Monsan y el Dr. Agustín López-Munguía, sobre todo en el caso específico de las cepas NRRL B-512F, B-1299 y B-1355, por la importancia y potencial industrial que poseen (Paul *et al*, 1986; Remaud-Simeon *et al*, 1994; López-Munguía *et al*, 1993). En ambos grupos de investigación se han observado fenómenos de interés potencial durante la fermentación de algunas cepas de *L. mesenteroides*, como la pérdida de capacidad de producción de dextrantransferasas al término de varias resiembras, la variabilidad en el peso molecular de las enzimas obtenidas, el nivel de la sacarosa necesario para inducir la enzima, entre otras. Sin embargo, no se había abordado el

---

estudio de la genética molecular, ni la fisiología del microorganismo por lo que, con el fin de contribuir al conocimiento a estos niveles sobre las dextran-sacarosas, así como de aportar mayor información en lo que respecta a la organización y regulación de genes en bacterias lácticas, se utilizó como modelo de estudio el gen de la dextran-sacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, planteándose los siguientes objetivos.

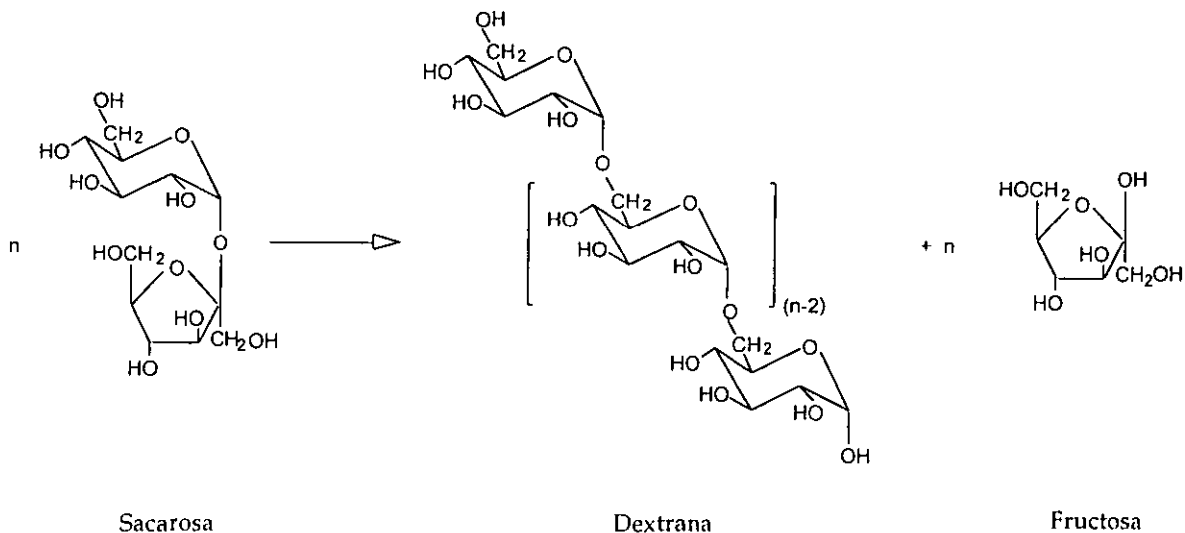
## OBJETIVOS

- Determinar el efecto sobre la producción de la dextran-sacarasa de las siguientes fuentes de carbono: sacarosa, fructosa, glucosa y xilosa.
- Determinar si *L. mesenteroides* NRRL B-512 F posee uno o varios genes que codifican para actividad de dextran-sacarasa.
- Identificar el sitio de inicio de transcripción, la región promotora y la presencia de otras posibles regiones reguladoras de la expresión del gen.

## GENERALIDADES

### Dextranas y dextran-sacarosas

Las dextran-sacarosas (EC 2.4.1.5.) son enzimas que transfieren el residuo glucosilo de la sacarosa a moléculas aceptoras, con la liberación simultánea de fructosa (Fig. 1). El producto de la reacción es un polisacárido de alto peso molecular denominado dextrana, compuesto por unidades de D-glucopiranosas con enlaces  $\alpha$ -(1→6) en la cadena principal y con un grado de ramificación variable que presenta enlaces  $\alpha$ -(1→3),  $\alpha$ -(1→4),  $\alpha$ -(1→6) ó  $\alpha$ -(1→2). Adicionalmente a la síntesis del polisacárido, las dextran-sacarosas también catalizan reacciones de síntesis de oligosacáridos. Éstas ocurren cuando en el medio de reacción, además de la sacarosa, se encuentran presentes carbohidratos de bajo peso molecular, siendo la maltosa el aceptor más eficiente (Robyt & Walseth, 1978).



**Figura 1. Reacción de síntesis de dextrana.**

Las dextranas presentan diferentes tamaños y estructuras, dependiendo del microorganismo productor de la glucosiltransferasa. Éstas son producidas por bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. En este último, las glucosiltransferasas son constitutivas, mientras que en *Leuconostoc* son inducibles (Neely & Nott, 1962; Hamada & Slade, 1980). En la Tabla 1, se resumen algunas características de varias enzimas y polisacáridos sintetizados por *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

Las glucosiltransferasas producidas por estreptococos de la flora bucal, como *S. mutans* y *S. salivarius*, tienen un papel primordial en el proceso de formación de caries dental, ya que el polímero que sintetizan favorece la colonización y adhesión de las bacterias cariogénicas. Debido al interés médico que presentan, desde hace varios años se han aislado y caracterizado los genes que codifican para las glucosiltransferasas presentes en estos microorganismos. Algunos de éstos se presentan también en la Tabla 1.



**Tabla 1. Principales características de glucosiltransferasas de *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Monchois *et al*, 1999; Argüello-Morales *et al*, 2000).**

Microorganismo	Polisacárido <sup>1</sup>	Gen	M <sub>r</sub> <sup>2</sup> (KDa)
<i>S. mutans</i> GS5	87% α-(1→3) 13% α-(1→6)	<i>gtf-B</i>	150
	85% α-(1→3) 15% α-(1→6)	<i>gtf-C</i>	140
	30% α-(1→3) 70% α-(1→6)	<i>gtf-D</i>	155
<i>S. downei</i> Mfe28	88% α-(1→3) 12% α-(1→6)	<i>gtf-I</i>	160
	10% α-(1→3) 90% α-(1→6)	<i>gtf-S</i>	147
<i>S. salivarius</i> ATCC 25975	90% α-(1→3) 10% α-(1→6)	<i>gtf-J</i>	168
	100% α-(1→6)	<i>gtf-K</i>	176
	50% α-(1→3) 50% α-(1→6)	<i>gtf-L</i>	157
	5% α-(1→3) 95% α-(1→6)	<i>gtf-M</i>	171
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512 F	5% α-(1→3) 95% α-(1→6)	<i>dsr-S</i>	170
	15% α-(1→3) 85% α-(1→6)	<i>dsr-A</i>	146
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1299	5% α-(1→3) 95% α-(1→6)	<i>dsr-B</i>	167
	35% α-(1→2) 65% α-(1→6)	n.d	42-212 <sup>2A</sup>
<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355	50% α-(1→3) 50% α-(1→6)	<i>nsr</i>	229
	5% α-(1→3) 95% α-(1→6)	<i>dsr-C</i>	164

<sup>1</sup> Estructura del polisacárido producido. Porcentaje del total de enlaces en la estructura del polisacárido.

<sup>2</sup> Peso molecular de la enzima deducido de la estructura primaria.

<sup>2A</sup> Peso molecular observado en gels de electroforesis.

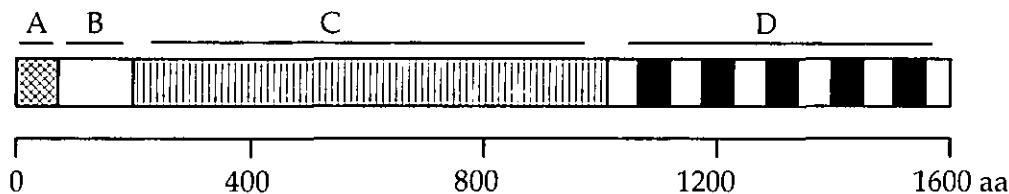
n.d. No determinado.

Por otra parte, las dextran-sacarasas de *L. mesenteroides* son de interés industrial. La dextrana producida por *L. mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los primeros biopolímeros que se produjo en gran escala, debido a que este polímero y sus derivados han sido utilizados en la producción de compuestos de interés médico (ej. sustituto de plasma sanguíneo) y en la síntesis de químicos finos (ej. Sephadex). En el caso de la cepa NRRL B-1299, los oligosacáridos que se obtienen en presencia de maltosa, contienen enlaces  $\alpha$ -(1→2) lo que los hace resistentes a las enzimas digestivas, sin embargo, son preferentemente metabolizados por la flora benéfica del intestino y de la piel, por lo que se han utilizado como agentes preprobióticos en alimentación animal y en la formulación de cosméticos (Remaud-Simeon *et al*, 1994; Valette *et al*, 1993).

La dextran-sacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F ha sido la más estudiada. Por su potencial aplicación en el mejoramiento de la textura de los tomates, se identificó y secuenció un gen que codifica para una dextran-sacarasa proveniente de esta cepa (*dsr-S*) (Wilke-Douglas *et al*, 1989). Adicionalmente, se ha reportado que *L. mesenteroides* B-512F produce dextran-sacarasas extracelulares en formas agregadas de diversos pesos moleculares: 158 y 177 KDa, cuyo monómero tendría un peso molecular de 65 (Kobayashi & Matsuda, 1986; Miller *et al*, 1986; Funane *et al*, 1995). Hasta la fecha, no se ha demostrado que las formas en que se ha obtenido la dextran-sacarasa son productos de la expresión de genes diferentes al *dsr-S*. Esto no sería excepcional, ya que se ha demostrado la presencia de varias dextran-sacarasas en una misma cepa. Por ejemplo, se había considerado que la cepa NRRL B-1299 producía sólo dextrana con enlaces  $\alpha$ -(1→2) (Remaud-Simeon *et al*, 1994), la cual es producida por una enzima cuyo peso molecular también ha sido inconsistente. Sin embargo, recientemente se encontraron dos genes que codifican para otras dextran-sacarasas (Monchois *et al*, 1996 y 1998b) tal como se muestra en la Tabla 1. Existe también el caso de la cepa NRRL B-1355, que produce dos glucosiltransferasas: una dextran-sacarasa (no secuenciada todavía) y una alternansacarasa (Coté & Robyt, 1983; López-Munguía *et al*, 1993) cuyo gen se reportó recientemente (Argüello-Morales *et al*, 2000).

Los genes que codifican para las glucosiltransferasas de *Streptococcus* y *Leuconostoc* están muy relacionados y tienen una estructura en común. En todos los casos se trata de genes que

codifican para enzimas muy grandes, con un peso molecular promedio de 165 KDa, siendo la más grande la alternansacarasa con un peso de 240 KDa. Estas proteínas presentan, después del péptido señal, una región variable seguida de un dominio N-terminal muy conservado de cerca de 900 aminoácidos donde se encuentra el sitio catalítico (Mooser *et al*, 1991; Funane *et al*, 1993; Shimamura *et al*, 1994) y un dominio C-terminal compuesto por series de unidades repetidas, que podrían ser responsables de la unión al polímero teniendo, probablemente, influencia en la estructura del polímero producido (Giffard & Jacques, 1994; Monchois *et al*, 1998a). En la Figura 2 se esquematiza la estructura de las glucosiltransferasas.



**Figura 2. Estructura esquemática de las glucosiltransferasas .**

A Péptido señal ; B región variable ; C dominio catalítico N-terminal; D dominio C-terminal de unión al polímero.

Ninguna de estas enzimas ha sido cristalizada, por lo que sólo se han podido hacer predicciones de su estructura terciaria. Tomando en cuenta que presenta secuencias homólogas a la superfamilia de la  $\alpha$ -amilasa, se ha podido predecir que las glucosiltransferasas, hasta ahora secuenciadas, poseen una estructura de barril  $(\alpha/\beta)_8$ , como las glicosidasas (ej,  $\alpha$ -amilasa), ciclodextrin glucosiltransferasa, y la isoamilasa (MacGregor *et al*, 1996). Esta estructura se caracteriza por la presencia de 8 cadenas  $\beta$ -plegadas en el interior de la proteína, alternando con 8  $\alpha$ -hélices localizadas en la superficie. En los últimos 5 años se ha proporcionado mucha información sobre los genes que codifican para las glucosiltransferasas, sin embargo su mecanismo de acción todavía no se ha elucidado completamente.

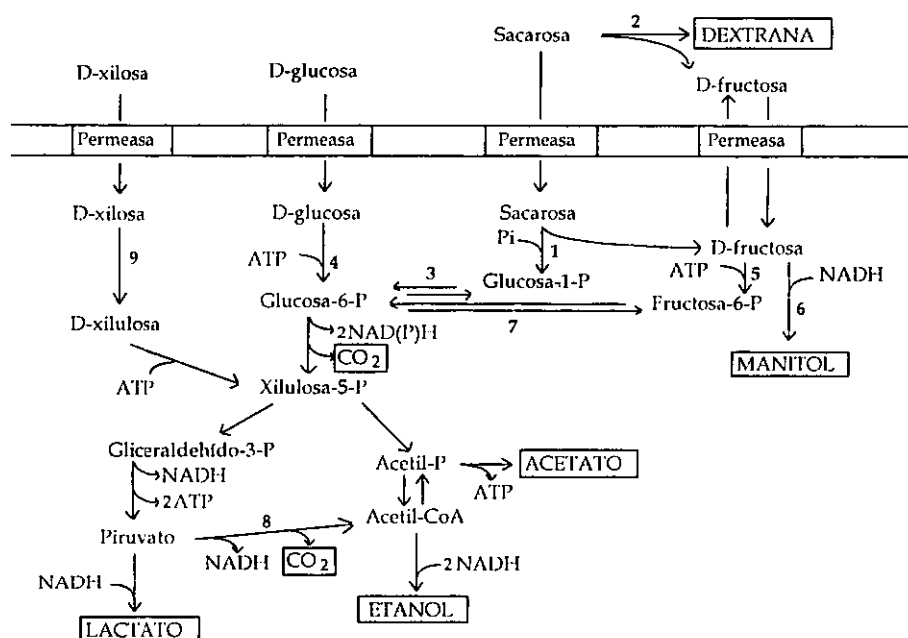
### Aspectos metabólicos y genéticos de *Leuconostoc mesenteroides*

Las bacterias del género *Leuconostoc* se caracterizan por ser cocos, gram positivos, anaerobias facultativas, no móviles e incapaces de formar esporas. Son quimio-organótrofos, requieren aminoácidos y factores de crecimiento complejos (Garvie, 1986). La utilización de azúcares en este género es heterofermentativa, las hexosas son metabolizadas por la vía de fosfocetolasa produciendo lactato, acetato y etanol (Figura 3). Las bacterias lácticas heterofermentativas carecen del sistema de fosfotransferasa dependiente de piruvato (PTS) (de Vos, 1996). En éste se catalizan simultáneamente la fosforilación y la translocación de mono y disacáridos por medio de una cadena de reacciones enzimáticas que transfieren el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato hacia el azúcar que está entrando a la célula. Sin embargo, las bacterias lácticas homofermentativas sí presentan PTS (Vadeboncoeur & Pelletier, 1997). Incluso se ha reportado que en *Streptococcus mutans* Ingbritt, cultivado en quimiostato, se presenta represión del PTS en presencia de sacarosa (Ellwood & Hamilton, 1982).

Respecto al catabolismo de sacarosa en *Leuconostoc* se ha inferido que ésta es transportada dentro de la célula por una permeasa específica. Una vez dentro, la sacarosa es sustrato de la sacarosa-fosforilasa y produce fructosa y glucosa-1-fosfato; esta última se incorpora en la ruta de fosfocetolasa como glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucomutasa (Dols *et al*, 1997b). La fructosa no se consume en este momento, por lo que es excretada. La sacarosa presente en el medio de cultivo también es sustrato para la dextransacarasa que se va produciendo conforme transcurre la fermentación, por lo que sintetiza a la vez dextrana liberándose más fructosa. Cuando la sacarosa se agota, el microorganismo comienza a consumir la fructosa acumulada produciendo manitol (Neely & Nott, 1962; Tsuchiya *et al*, 1952):

Las bacterias del género *Leuconostoc* son capaces de utilizar diversas fuentes de carbono, entre las que se encuentran arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, sacarosa y xilosa (Garvie, 1986); sin embargo, el único inductor de la actividad dextransacarasa es la sacarosa (Tsuchiya *et al*, 1952). No se han reportado inductores gratuitos así como tampoco el

mecanismo de inducción. En la Figura 3 se presentan las rutas catabólicas de algunos azúcares de interés en *L. mesenteroides*.



**Figura 3.** Algunas rutas catabólicas de carbohidratos en *Leuconostoc mesenteroides*.

1: Sacarosa-fosforilasa; 2: dextranasa; 3: fosfoglucomutasa; 4: glucocinasa; 5: fructocinasa; 6: manitoldeshidrogenasa; 7: glucosa-6-P isomerasa; 8: piruvato-deshidrogenasa; 9: cetol-isomerasa.  
(Kandler, 1983; Dols *et al*, 1997b)

Los organismos que producen grandes cantidades de ácido láctico como subproducto metabólico se han utilizado desde la antigüedad como agentes para la preservación de alimentos, entre los que se encuentran una gran variedad de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados. La mayoría de los organismos que participan en estas fermentaciones son miembros de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium*. El análisis de los genomas de estos organismos apenas comenzó en la década de los ochenta y desde entonces el progreso en la generación de conocimiento ha variado considerablemente de género a género (de Vos & Vaughan, 1994; de Vuyst & Degeest, 1999). Debido al interés industrial en la producción de yogurt y leches fermentadas, compañías

---

como Nestlé han hecho una gran inversión en la investigación del material genético de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, principalmente. Por el contrario existe muy poca información publicada que describa a los genomas de *Leuconostoc*, *Pediococcus* o *Carnobacterium* (Davidson *et al*, 1996). El conocimiento generado sobre el genoma y los mecanismos de regulación en *Leuconostoc* es muy pobre. Además de la información sobre los genes de dextransacararas se cuenta con algunos reportes sobre genes relacionados con el metabolismo de citratos (Marty-Teyssset *et al*, 1996; Bekal *et al*, 1998), en los que la proteína transportadora específica de citrato (CitP) se reporta como la responsable del paso limitante de la vía catabólica de este compuesto. Es interesante observar que la capacidad de metabolizar citratos está vinculada a la presencia de un plásmido de 22 Kb, ya que contiene al gen *citP* (Vaughan *et al*, 1995; Bandell *et al*, 1998). De igual manera, los genes responsables de la síntesis de bacteriocinas en *Leuconostoc* generalmente se encuentran codificados en plásmidos. Este es el caso de la leucocina A producida por *Leuconostoc gelidum*, donde la localización del operón *leuA* es plasmídica (Barefoot & Nettles, 1993; Klaenhammer, 1993). Por otra parte, se han encontrado secuencias de elementos de inserción en *L. mesenteroides* subespecie *cremoris* (IS 1165) y en *Leuconostoc lactis* (IS 1070) (Johansen & Kibenich, 1992; Vaughan & de Vos, 1995).

En las bacterias lácticas se han reportado casos en que genes relacionados metabólicamente están organizados en "clusters" u operones policistrónicos, ya que de esta manera son regulados simultáneamente (Giffard *et al*, 1991; McLaughlin & Ferretti, 1996; Bekal *et al*, 1998; Bekal *et al*, 1999). En *Leuconostoc*, la dextransacarasa y la sacarosa-fosforilasa son inducidas por sacarosa; existen evidencias bioquímicas de que ambas enzimas son inducidas en momentos diferentes durante la fermentación (Dols *et al*, 1997b), pero no se ha hecho un análisis molecular para comprobar que estén reguladas bajo diferentes promotores.

Es relevante el hecho de que *Leuconostoc* no posea sistema PTS desde la óptica de los posibles mecanismos de regulación de la expresión de las dextransacararas, ya que las proteínas de este sistema forman parte esencial de los modelos más aceptados de redes globales de regulación metabólica en bacterias (Saier, 1996). Por otra parte, la información de operones completos, incluyendo secuencias de promotores de glucosiltransferasas en *Leuconostoc* o *Streptococcus*, es muy escasa y se limita al reporte de promotores putativos (Ferreti *et al*, 1987;

Wilke-Douglas *et al*, 1989; Gilmore *et al*, 1990; Abo *et al*, 1991; Simpson *et al*, 1995; Monchois *et al*, 1996; Argüello-Morales *et al*, 2000). No es el caso del promotor de una fructosiltransferasa de *S. mutans*, que fue determinado experimentalmente (Smorawinska & Kuramitsu, 1995).

Adicionalmente, existe el interés industrial de producir dextransacararas libres de dextrana, por lo que se han obtenido cepas constitutivas por técnicas de mutagénesis al azar (Funane *et al*, 1995; Kim & Robyt, 1994; Kim & Robyt, 1995). Otra alternativa para alcanzar este objetivo y para obtener cepas hiperproductoras sería la aplicación de ingeniería genética, para lo cual el conocimiento de la región promotora y del mecanismo de regulación de estos genes es fundamental.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

Se decidió abordar el modelo de estudio desde varias perspectivas, comenzando por una caracterización bioquímica clásica, seguida de un estudio preliminar, a nivel molecular de algunas de las cepas de colección, haciendo énfasis en la B-512F.

Considerando que en el grupo de trabajo no se contaba con información sobre el perfil bioquímico de algunas cepas de colección con las que se trabaja habitualmente, esta primera etapa proporcionaría dicha información básica.

Al trabajar con *L. mesenteroides* habían surgido algunas de las preguntas de interés. Por ejemplo, en vista de la inestabilidad en la producción de dextransacararas al término de varias resiembras, era importante verificar la presencia de plásmidos en esta cepa, ya que esto podría aportar información para explicar tal comportamiento.

Por otra parte, se han reportado dextransacararas de diversos pesos moleculares producidas por la cepa B-512F, y se podría sospechar que éstas provinieran de la expresión de diferentes genes. Sin embargo, no se ha identificado el número de genes que codifican para dextransacararas en esta cepa, por lo que se exploró un acercamiento por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos específicos para regiones conservadas en las glucosiltransferasas, esperando obtener información preliminar sobre el número de dextransacararas presentes en algunas cepas de *L. mesenteroides* de interés.



## OBJETIVOS

- Determinar el patrón de azúcares fermentables de las cepas de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B-1299 y B-1355.
- Determinar la presencia de plásmidos en la cepa NRRL B-512F.
- Determinar el número y tamaño de productos de amplificación obtenidos utilizando oligonucleótidos específicos para regiones conservadas de glucosiltransferasas a partir del DNA las cepas de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B-1299 y B-1355.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *L. mesenteroides* se obtuvieron de la colección del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) Peoria, Illinois. Se partió de células liofilizadas que se reactivaron en el medio descrito en la Tabla 2. El pH del medio se ajustó a 6.9 con ácido ortofosfórico, antes de esterilizar. Las células reactivadas en fase exponencial de crecimiento se conservaron a -20°C en una solución de glicerol al 15% (v/v) y se utilizaron como inóculos para las siguientes fermentaciones.

### Determinación del patrón de azúcares fermentables.

Se utilizó el sistema Api 50 CHL (bioMérieux, SA), que consiste en una placa con 50 mini celdas que contienen diversos sustratos fermentables por las bacterias lácticas. Se inocula con 50 µL de una suspensión de células y se observa el vire del indicador de pH (púrpura de bromocresol) en caso de que el carbohidrato haya sido utilizado, al término de 24 y 48 h de incubación anaerobia a 29°C. Para identificar al microorganismo, el perfil bioquímico obtenido se compara con una base de datos computarizada.

### Extracción de DNA total.

Se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Murphy *et al* (1987) y Miller *et al* (1988). Es importante considerar que *L. mesenteroides* es una bacteria gram positiva, por lo que al

procedimiento reportado se le incorporó un paso de digestión con lisozima. El procedimiento se describe en el Anexo A.

**Tabla 2. Composición del medio de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.**

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa	40
Extracto de levadura	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.02
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
NaCl	0.01

#### Extracción de DNA plasmídico.

Se realizó utilizando una metodología combinada entre el método de extracción de DNA total y el método propuesto por Kado y Liu (1981). El procedimiento se describe en el Anexo B.

Para comprobar la existencia de plásmidos se realizó un gradiente discontinuo de cloruro de cesio, por la metodología descrita por Towner (1991).

#### Diseño de oligonucleótidos y condiciones para la PCR.

Se llevó a cabo un alineamiento de las estructuras primarias de glucosiltransferasas reportadas hasta ese momento en la literatura: *Streptococcus downei* (gtf-S), *S. mutans* (gtf-C), *S. sobrinus* MFe28 (gtf-I), *S. salivarius* ATCC 25975 (gtf-J) y una de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (dsr-S) (Gilpin *et al*, 1985; Ferreti *et al*, 1987; Gilmore *et al*, 1990; Giffard *et al*, 1991; Wilke-Douglas *et al*, 1989). El alineamiento múltiple se realizó con el programa Clustal W, cuyo resultado se muestra en el Anexo D.

Se encontraron 5 regiones altamente conservadas. Tomando como referencia la secuencia de aminoácidos de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* (secuencia 4 del Anexo D) tales regiones son las siguientes: D<sub>338</sub> - P<sub>349</sub>, L<sub>482</sub> - G<sub>491</sub>, L<sub>507</sub> - N<sub>525</sub>, R<sub>549</sub> - Q<sub>562</sub>, I<sub>981</sub> - L<sub>993</sub>, en donde las primeras cuatro corresponden al extremo catalítico N-terminal.

Tomando en cuenta el alineamiento anterior, se seleccionaron las dos regiones consenso extremas: del N-terminal D<sub>338</sub> - P<sub>349</sub> y del C-terminal I<sub>981</sub> - L<sub>993</sub>, y se sintetizaron dos oligonucleótidos para ser usados como primers en la PCR, con las siguientes secuencias nucleotídicas:

#### Oligo 1-D

5' CGC-TAG-TTC-ATG-GTA-TCG-TCC 3'      T<sub>m</sub>=62.6°C      52.4% G+C

#### Oligo 2-I

5' GAT-CCG-TGA-ATG-CAT-ACC-CG 3'      T<sub>m</sub>=62.5°C      55% G+C

La reacción se llevó a cabo utilizando 2.5 U de Taq (Gibco BRL), 100 ng de templado y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Después de calentar la mezcla de reacción 3 min a 92°C, se hicieron 30 ciclos de 92°C por 1.5 min, 42°C por 45 s y 72°C por 2 min, terminando con un período de extensión a 72°C por 5 min.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Patrón de azúcares fermentables

En la Figura 4 se muestra el patrón de azúcares utilizados por tres cepas de *L. mesenteroides* de la colección del NRRL: B-512, B-1299 y B-1355. Se eligieron las cepas B-1299 y B-1355, además de la B-512F, debido a que son las que han presentado mayor importancia en el ámbito industrial.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

Se realizó también el análisis a otra cepa que había sido aislada en el laboratorio. Se sospechaba que era una mutante espontánea de la cepa B-512. Debido a que la morfología de la colonia en placa era no mucoide, podría tratarse de una cepa dextranosa negativa (*dsr-S<sup>-</sup>*). El contar con una mutante de este tipo podría ser de mucha utilidad, por lo que se le hizo el análisis bioquímico básico con el fin de comprobar su identidad.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
					△	△	△				△	△	△	△						△		
					●		●					●	●	●						●		
					●		●					●	●	●						●		
					■	■					■	■	■	■								
CODE:																						
Control																						
Glycerol																						
Erythritol																						
D-Arabinose																						
L-Arabinose																						
Ribose																						
D-Xylose																						
L-Xylose																						
Adonitol																						
β Methyl-xylósíde																						
Galactose																						
D-Glucose																						
D-Fructose																						
D-Mannose																						
L-Sorbose																						
Rhamnose																						
Dulcitol																						
Inositol																						
Mannitol																						
Sorbitol																						
α Methyl-D-mannoside																						

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
	△	△		△	△	△		△	△	△	△	△			△						△								△	
	●	●		●	●	●		●			●	●									●									
	●	●	●	●	●	●		●			●	●									●						●			
CODE:																														
α Methyl-D-glucoside																														
N Acetyl glucosamine																														
Amygdaline																														
Arbutin																														
Esculine																														
Salicin																														
Cellobiose																														
Maltose																														
Lactose																														
Melibiose																														
Saccharose																														
Trehalose																														
Inuline																														
Melzitose																														
D-Raffinose																														
Amidon																														
Glycogen																														
Xilytol																														
β Geniobiose																														
D-Turanose																														
D-Lyxose																														
D-Tagatose																														
D-Fucose																														
L-Fucose																														
D-Arabitol																														
L-Arabitol																														
Glucamate																														
2 ceto-gluconate																														
5 ceto-gluconate																														

Figura 4. Patrón de fermentación de azúcares de varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. △ B-512F, ● B-1299, ● B-1355, ■ cepa no identificada.

Los resultados indican un patrón muy similar de consumo de azúcares entre las tres cepas de *Leuconostoc*; aunque la B-512 tiene mayor capacidad de utilización de carbohidratos, ya que es

capaz de utilizar azúcares que las otras dos cepas de colección no pueden metabolizar. Éste es el caso de la ribosa, galactosa, lactosa, melibiosa, D-rafinosa y 5-cetogluconato.

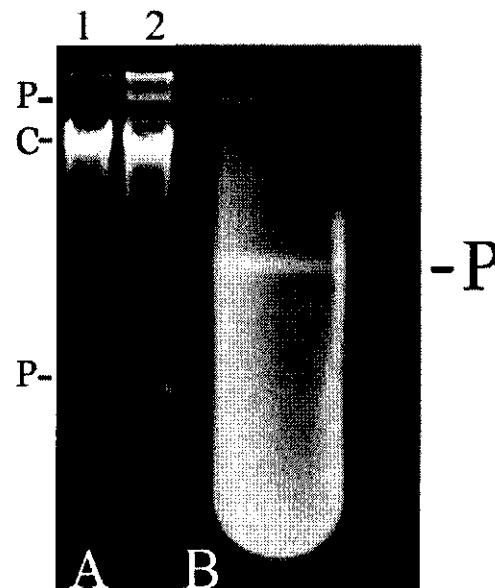
De acuerdo a la base de datos computarizada, las tres cepas de colección presentan un 99.9% de identidad con *L. mesenteroides*. Lo que no ocurrió con la supuesta mutante, ya que tuvo un 93.6% de identidad con *Lactococcus fermentum*, por lo que dejó de ser de interés para ser utilizada como célula huésped para experimentos de clonación. Sin embargo, cabe aclarar que la herramienta concluyente para la identificación de este microorganismo sería la secuenciación del rRNA 16s.

#### Determinación de presencia de plásmidos.

Al extraer el DNA total de las cepas estudiadas, se encontró la presencia de varios plásmidos en la cepa B-512F al igual que en otras cepas (Figura 5, panel A). La migración del DNA (carriles 1 y 2) corresponde a la descrita por Kado & Liu (1981) para plásmidos de alto peso molecular. Se realizó un gradiente discontinuo de cloruro de cesio (Figura 5, panel B), con el que se confirmó la presencia de DNA plasmídico en la cepa B-512F. Adicionalmente, se modificó la metodología para la extracción de plásmidos con el fin de adecuarla para bacterias lácticas, la cual se reporta en el anexo B.

En las bacterias lácticas existen diversas actividades enzimáticas codificadas en plásmidos, en especial algunas relacionadas con metabolismo de carbohidratos. Esto, aunado a la variabilidad de actividad dextransacarasa al término de varias resiembras, que ha sido observada repetidamente en varias cepas de *L. mesenteroides*, puede ser elemento para sostener la hipótesis, de que el gen o genes que codifican para la actividad dextransacarasa pudieran estar codificados en elementos extracromosomales. Las dextransacarasas son proteínas de alto peso molecular, por lo que los genes que las codifican deben ser de varias kilo bases. Específicamente, el gen *dsr-S* tiene un tamaño de aproximadamente 4,800 pb; por lo que, de encontrarse en plásmido, éste debería ser de alto peso molecular. Hasta la fecha se ha reportado la caracterización parcial de dos plásmidos en *L. mesenteroides*, uno de los cuales

contiene los genes que codifican para las mesenterocinas G, B, H y F (Biet *et al*, 1999; Hechard *et al*, 1999).

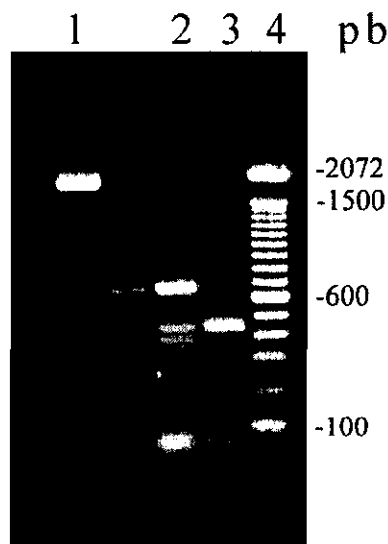


**Figura 5.** DNA total de *Leuconostoc mesenteroides*. (A) Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1, NRRL B-512F; carril 2, NRRL B-1299. C: DNA cromosomal. P: DNA plasmídico. (B) Gradiente discontinuo de cloruro de cesio, cepa B-512F.

#### Amplificación de regiones variables de genes que codifican para glucosiltransferasas.

En este análisis se hizo la amplificación de regiones localizadas entre dos secuencias altamente conservadas en los genes que codifican para dextrantransferasas. En la sección de Materiales y Métodos se describe el diseño de los oligonucleótidos usados como primers. En la Figura 6 se muestran los productos de amplificación obtenidos. Se sometieron a este análisis las cepas de colección B-512F, B-1299 y B-1355 (carriles 1, 2 y 3, respectivamente).

De acuerdo a la secuencia del gen *dsr-S* (Wilke-Douglas *et al*, 1989), para la cepa B-512F se esperaba obtener un producto de amplificación de 1,965 pb. Los resultados de la Figura 6 muestran sólo un producto de amplificación para esta cepa, cuyo tamaño corresponde al esperado, de aproximadamente 2,000 pb.



**Figura 6. Productos de la amplificación de regiones variables de genes que codifican para glucosiltransferasas en varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Gel de agarosa al 1.5%. Carriles: 1, B-512F; 2, B-1299; 3, B-1355. Carril 4, marcador de DNA repetitivo de 100 pb.**

En las cepas B-1299 y B-1355 se obtuvieron varios productos de amplificación. En el momento en que se llevó a cabo este experimento, todavía no se conocían los genes de las dextranacararas de estas cepas. Ahora, tomando en cuenta las secuencias de los genes *dsr-A* y *dsr-B* de la cepa B-1299 (Monchois *et al*, 1996 y 1998b) y *dsr-C* y *asr* de la cepa B-1355 (Argüello-Morales *et al*, 2000; Argüello-Morales, 2000), se sabe que los productos de amplificación esperados para estos genes tendrían un tamaño entre 1,962 y 2,133 pb. Por lo

que se puede inferir que las bandas que se observan en la Figura 6 son producto de una hibridación no específica de los oligonucleótidos utilizados como primers. Sin embargo, cabe mencionar que las regiones conservadas identificadas como resultado del alineamiento del Anexo D, también están presentes en los genes ahora ya identificados.

Los resultados anteriores nos llevaron a la implementación de otra metodología para poder identificar el número de genes que pudieran estar presentes en la cepa B-512F.

### RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de plásmidos de alto peso molecular en las cepas B-512F, B-1299 y B-1355. Por lo anterior, sería de interés verificar la localización de los genes que codifican para dextranacararasas en estas cepas.

En la cepa B-512F sólo se obtuvo un producto de amplificación con el tamaño esperado de acuerdo a la secuencia reportada para el gen *dsr-S*, sin embargo este resultado no aporta evidencias sustentables para asegurar que sólo exista un gen que codifica para dextranacararasas en esta cepa.



# PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

---

Comúnmente se ha considerado que *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F produce una dextransacarasa (DSR-S) cuando se encuentra en un medio con sacarosa, molécula esta última que actúa como fuente de carbono y como inductor. Los resultados del Capítulo 2 indican que probablemente sólo exista un gen que codifique para dextransacarasas en esta cepa. Sin embargo, este resultado no es concluyente ya que los oligonucleótidos utilizados como primers fueron diseñados tomando en cuenta regiones conservadas en varias glucosiltransferasas y en la DSR-S, pero cabría la posibilidad de la existencia de otras dextransacarasas que no presentaran homología en esas regiones o que los productos de amplificación fueran de tamaño tan parecido que no pudieran distinguirse en un gel de agarosa.

La evidencia de que la dextransacarasa presenta varios pesos moleculares y el hecho de que otras cepas (como la B-1299 y la B-1355) produzcan varias dextransacarasas, nos llevó a plantear la hipótesis de que pudieran existir otras enzimas de este tipo en la cepa B-512F y de que éstas fueran reguladas de manera diferente que la DSR-S, por lo que se podría evidenciar su presencia al cultivar al microorganismo en un medio libre de sacarosa.

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

Se persigue comprobar la hipótesis determinando la presencia y la naturaleza de la actividad dextranacarasa obtenida en diferentes fuentes de carbono. Adicionalmente, esta información podría contribuir al esclarecimiento del mecanismo de regulación de la producción de la actividad dextranacarasa en esta cepa.

**OBJETIVOS**

- Detectar la presencia de actividad dextranacarasa en sobrenadantes de fermentaciones con fuentes de carbono alternas a la sacarosa: glucosa, fructosa y xilosa.
- Determinar el peso molecular de las dextranacarasas producidas y caracterizar el tipo de productos sintetizados por dichas enzimas.

**MATERIALES Y MÉTODOS****Cepa utilizada y condiciones de cultivo.**

Se partió de células liofilizadas de la cepa B-512F que se reactivaron en cada una de las fuentes de carbono que se mencionan más adelante. Con el fin de asegurar que cualquier resto de sacarosa fuera eliminado, se llevaron a cabo tres cultivos sucesivos a 29°C y 200 rpm, en los medios con las fuentes de carbono alternas, utilizando como inóculos células en fase logarítmica de crecimiento del cultivo anterior en cada fuente de carbono. Células en fase exponencial de crecimiento de la tercera resiembra, con una concentración de  $1.95 \times 10^9$  UFC/mL, se conservaron a -20°C en una solución de glicerol al 15% (v/v) y se utilizaron como inóculos para las siguientes fermentaciones.

Se utilizó el mismo medio de cultivo descrito en la Tabla 2 (Capítulo 2). Para los cultivos con otras fuentes de carbono, la sacarosa fue reemplazada por (a) D-glucosa, (b) una mezcla equimolar de D-fructosa y D-glucosa, (c) D-fructosa y (e) D-xilosa. En todos los casos, la concentración de la fuente de carbono fue de 117 mM que, para el caso de la sacarosa, equivale a 40 g/L.

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

Las fermentaciones se llevaron a cabo a nivel matraz, Erlen-Meyer de 250 mL, en incubadoras (New Brunswick Scientific, modelo G-25) con agitación orbital a 200 rpm. Para la caracterización cinética de la fermentación con sacarosa se utilizó un volumen de 50 mL (relación volumen de medio/capacidad del matraz de 0.2) y una temperatura de 29°C. Las fermentaciones con fuente de carbono alterna a sacarosa se llevaron a cabo en un volumen de 100 mL (relación volumen de medio/capacidad del matraz de 0.4) y se incubaron a 25°C.

Se determinó el crecimiento del microorganismo por turbidez a 600 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer  $\lambda$ 3A. La densidad óptica se correlacionó con el número de microorganismos por medio de curvas de calibración. Las unidades formadoras de colonias se determinaron por cuenta en placa después de incubar, 24 h a 29°C, en medio para cuenta de mesófilos en placa.

**Análisis de azúcares de los medios de cultivo.**

Las concentraciones de D-glucosa y D-fructosa se determinaron por un método enzimático (Boehringer Mannheim GmbH) en el que se genera NADPH en cantidad estequiométrica a la de los azúcares, el NADPH es posteriormente cuantificado espectrofotométricamente. La sacarosa se determinó por el mismo método, previo tratamiento con invertasa (Sigma).

**Concentración de la actividad dextransacarasa.**

Todos los cultivos se detuvieron al alcanzar la mitad de la fase exponencial de crecimiento. En este momento se registró el pH final el cultivo y éste se ajustó con buffer de acetatos 1 M, pH 5.4, hasta alcanzar una concentración de 20 mM. Entonces, se procedió a separar las células del volumen total de cultivo, por centrifugación (10,000 X g, 15 min, 4°C) y posterior filtración por membrana (Millipore con diámetro de poro de 0.2  $\mu$ m). Posteriormente, la enzima extracelular se concentró utilizando un método de partición líquido/líquido; en éste se agrega un volumen de PEG 1500 al 50% (w/v) a un volumen de sobrenadante de cultivo (Paul *et al*, 1986), se utilizó en todos los casos el volumen total del sobrenadante del cultivo. A los sobrenadantes libres de sacarosa se les adicionó dextrana T70 a una concentración final de 5 g/L y se incubaron 12 h a 4°C como paso previo a la extracción con PEG.

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

En el proceso de extracción de la enzima con PEG se producen dos fases. La inferior, rica en dextrana (asociada a la dextransacarasa), se separó por centrifugación (7,000 X g, 20 min, 4°C). La pastilla obtenida se lavó y resuspendió en un volumen no mayor a 2 mL de buffer de acetatos 20 mM pH 5.4. La preparación enzimática se conservó a -20°C.

**Medición de la actividad dextransacarasa.**

La actividad glucosiltransferasa de la preparación enzimática concentrada con PEG como se describió previamente, se determinó en todos los casos por triplicado, midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de sacarosa a 30°C en buffer de acetatos pH 5.4. Los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Sumner y Howell (1935). Para las preparaciones enzimáticas concentradas obtenidas a partir de sacarosa, se utilizó una alícuota de 50 µL, mientras que para las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de las fuentes alternas a sacarosa, se utilizó una alícuota de 200 a 400 µL dependiendo de la actividad presente. En todos los casos, el volumen total de la reacción fue de 800 µL.

Una unidad de actividad dextransacarasa se define como la cantidad de enzima que libera una µmol de fructosa por minuto a pH 5.4 y a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa, 0.05 g/L de CaCl<sub>2</sub> y 1 g/L de NaN<sub>3</sub>. La actividad específica se reportó como unidades por gramo de proteína total del cultivo. Para determinar la concentración de la proteína total se precipitó un volumen de cultivo con un volumen de ácido tricloroacético al 10% (w/v). Después de mantener en congelación un mínimo de 3 h, se separó la pastilla por centrifugación (10,000 X g, 10 min, 4°C) y se resuspendió en un volumen de NaOH 0.1 N. La cuantificación de la proteína soluble se llevó a cabo por el método de Lowry (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

**Electroforesis de proteínas y detección de actividad glucosiltransferasa *in situ*.**

Con el fin de detectar directamente la actividad glucosiltransferasa extracelular en el gel de electroforesis, 6 mL de cultivo con D-glucosa y D-fructosa respectivamente (una vez separadas las células y tras ajustar el pH a 5.2) se concentraron aproximadamente 40 veces.

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

Se utilizó el sistema de centrifugación - ultrafiltración Centricon 30 (Amicon). Se depositaron en el gel 20  $\mu\text{L}$  de cada una de estas muestras concentradas. 9  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de las fermentaciones con sacarosa se depositaron en el gel sin ningún tratamiento previo para su análisis. Las muestras de sobrenadantes se aplicaron en paralelo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Después de llevar a cabo la electroforesis a un voltaje constante de 100 V, el gel se cortó por el eje de simetría y una mitad se tiñó con azul de Coomassie R-250. Para estimar el peso molecular de las bandas proteicas, se utilizaron estándares de alto rango de peso molecular para SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories). La otra mitad del gel se lavó dos veces (20 min, en baño de hielo) con una solución de tritón 100X al 0.1% (w/v) en buffer de acetatos 20 mM, pH 5.4, con 0.05 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente en una solución con la misma composición que la anterior, pero en presencia de 100 g/L de sacarosa y 1 g/L de  $\text{NaN}_3$ . Para la detección de actividad levansacarasa se siguió el mismo procedimiento, utilizando rafinosa a una concentración de 100 g/L como sustrato en lugar de sacarosa.

**Síntesis de oligosacáridos y dextrana.**

Las reacciones de aceptor para la síntesis de oligosacáridos se llevaron a cabo a 30°C, en una solución con 100 g/L de sacarosa, 33.3 g/L de maltosa, 0.05 g/L de  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/L de  $\text{NaN}_3$  y 0.25 U/mL de dextranasa en buffer de acetatos 20 mM, pH 5.4, en un volumen final de 2 mL. Después de 17 h, la reacción se detuvo por calentamiento a 75°C por 5 minutos.

La mezcla de reacción para la síntesis de dextrana fue la misma, pero en ausencia de maltosa. El tiempo de reacción fue el necesario para tener una conversión del 100%.

**Análisis de oligosacáridos.**

Una vez inactivada la enzima, los 2 mL de muestra se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  y se diluyeron 10 veces en agua bidestilada. Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra para el análisis de oligosacáridos, el que se realizó en un cromatógrafo Waters-Millipore con detector de índice de refracción, utilizando una columna  $\mu\text{BONDA-PAK C18}$

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

Waters-Millipore. Como eluyente se utilizó agua bidestilada y desionizada a un flujo de 0.5 mL/min.

**Análisis de dextrana.**

El polímero se sintetizó en un volumen de 6 mL y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, la pastilla se recuperó por centrifugación y se lavó con etanol al 75% antes de ser resuspendida en agua desionizada. El polisacárido resuspendido se liofilizó para ser analizado por el método previamente reportado de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (Dols *et al*, 1997a). Los desplazamientos químicos fueron asignados a cada carbono de acuerdo al reporte de Seymour *et al* (1976).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Cinética de fermentación de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F en sacarosa.**

El perfil del desarrollo de una fermentación con sacarosa bajo las condiciones habituales de producción de dextransacarasa (29°C y 117 mM de sacarosa) se muestra en la Figura 7.

Con respecto al perfil de azúcares presentes en el cultivo, se puede observar que durante las primeras cuatro horas existe liberación de fructosa al medio. Al consumirse la sacarosa, la fructosa empieza a ser utilizada por el microorganismo. Por otra parte, existen reportes de la presencia de actividad invertasa en esta cepa de *L. mesenteroides* (Robyt & Walseth, 1979), pero debido a que no se pudo detectar glucosa en el sobrenadante se infiere que la actividad invertasa, en caso de estar presente, es muy baja.

Se observa que la producción de dextransacarasa está asociada al crecimiento y se obtiene un máximo de actividad al final de la fase exponencial (1.8 U/mL). Es notoria la caída de actividad después de este punto, la cual se puede explicar por el descenso de pH a valores menores de 5, ya que el rango de actividad de esta enzima es entre 6.2 y 4.8. A valores de pH menores se presenta un fenómeno de inactivación irreversible (Miller *et al*, 1986).

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

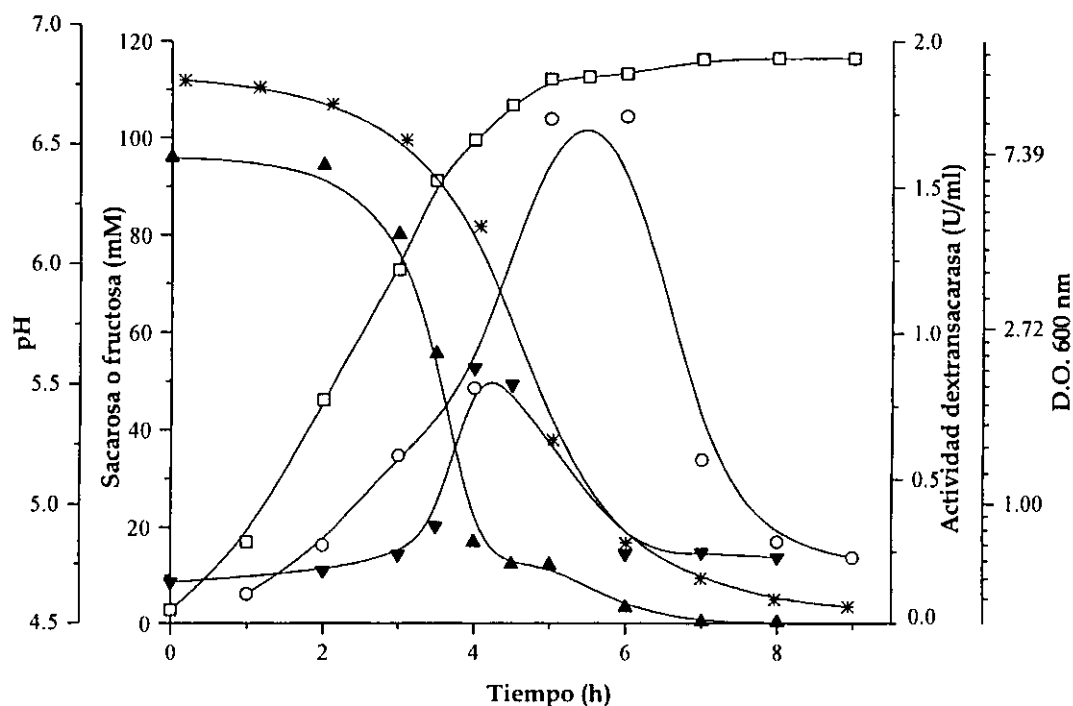


Figura 7. Perfil de la fermentación de *L. mesenteroides* NRRL B-512F en las condiciones estándar de producción de dextran sacarasa.

▲ Sacarosa, ▼ fructosa, \* pH, ○ actividad dextran sacarasa, □ densidad óptica.

#### Cinética de crecimiento en fuentes alternas a la sacarosa.

Se estudió el comportamiento del microorganismo cultivado en diferentes azúcares. Se eligieron como fuentes de carbono alternas a la sacarosa a la glucosa y la fructosa, por ser sus productos de hidrólisis y, además, porque tienen en común algunas reacciones de la ruta de fosfoetolasa (Figura 3, Introducción). Las diferencias encontradas en lo que respecta al crecimiento y a la producción de dextran sacarasa podrían aportar información sobre el metabolismo de carbohidratos y sobre los probables mecanismos de regulación de la síntesis de la dextran sacarasa. La xilosa se incorpora a la vía de fosfoetolasa en un punto que tienen

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

en común las vías catabólicas de los otros tres azúcares, por lo que el comportamiento de *L. mesenteroides* cultivado en este carbohidrato es de interés.

En la Figura 8 se muestran los perfiles de crecimiento a 25°C en cada uno de los carbohidratos mencionados anteriormente. Se eligió esta temperatura para evitar una posible pérdida de actividad dextransacarasa por desnaturalización térmica. La concentración de fuente de carbono fue de 117 mM en todos los casos.

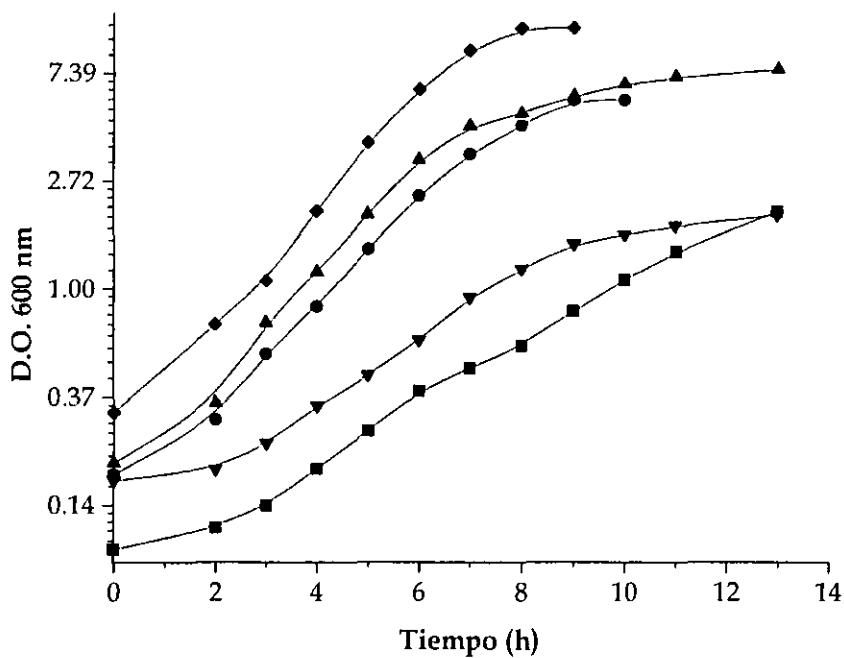


Figura 8. Curvas de crecimiento de *L. mesenteroides* en diferentes fuentes de carbono  
♦ Sacarosa, ▲ fructosa+glucosa, ● glucosa, ■ fructosa, ▼ xilosa.

De acuerdo a las curvas de crecimiento, se calcularon las siguientes velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ): 0.64, 0.50, 0.49, 0.32 y 0.29  $\text{h}^{-1}$  para sacarosa, la mezcla equimolar de fructosa y glucosa, D-glucosa, D-xilosa y D-fructosa, respectivamente. A partir de la  $\mu$  con sacarosa, se calculó un tiempo promedio de generación de 1 h.



PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

Garvie (1986) reporta que varias especies de *Leuconostoc* prefieren utilizar como fuente de carbono fructosa en lugar de glucosa, pero no es el caso de la cepa NRRL B-512F. En la fermentación con la mezcla de glucosa y fructosa, como se muestra en la Figura 9, a pesar de que ambos carbohidratos se consumen simultáneamente, existe un consumo preferencial de glucosa y no se aprecia crecimiento diáuxico. Esto concuerda con lo observado en la cepa NRRL B-1299 de *L. mesenteroides* (Dols, et al, 1997b).

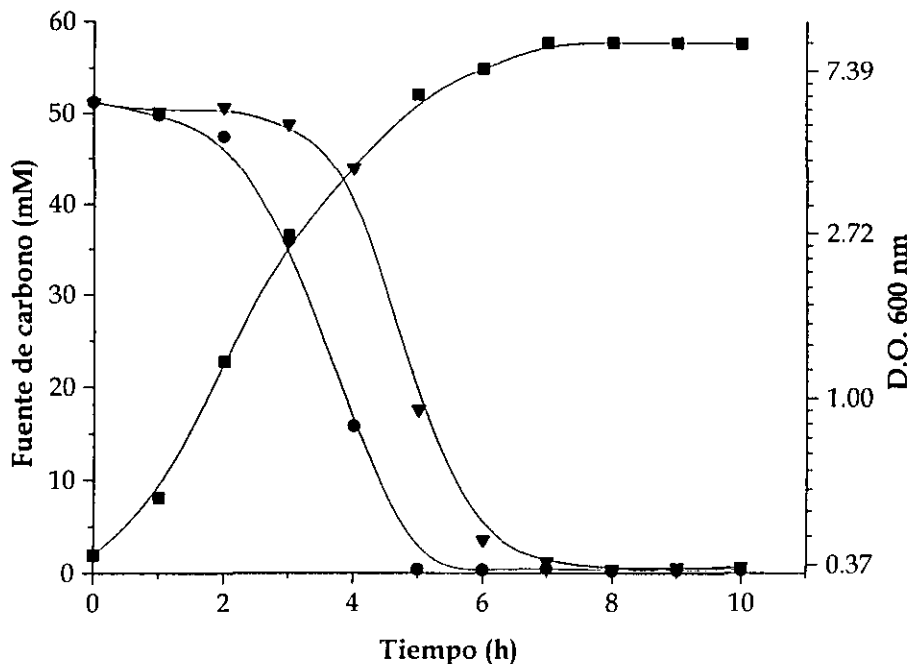


Figura 9. Perfil de consumo de azúcares por *L. mesenteroides* en un medio con una mezcla equimolar de glucosa y fructosa. ▼ Fructosa, ● glucosa, ■ densidad óptica.

Así mismo en ambas cepas se observa que la  $\mu$  en sacarosa es aproximadamente el doble que la obtenida en fructosa. Esto podría explicarse debido a que se obtienen más moléculas de ATP cuando la fuente de carbono es sacarosa o glucosa, debido a que cuando se utiliza fructosa una parte de ésta se utiliza en la síntesis de manitol (ver Figura 3). Adicionalmente,

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

como la sacarosa fosforilasa no utiliza ATP, sino  $P_i$ , esto representa una ganancia de energía para la célula que crece en sacarosa.

**Determinación de actividad dextransacarasa en las diversas fuentes de carbono.**

Se determinó la actividad dextransacarasa en los sobrenadantes concentrados de las fermentaciones descritas anteriormente. Se detuvo la fermentación al llegar a la fase exponencial tardía, para evitar la desnaturalización por efecto del pH o por algún efecto proteolítico. Como se muestra en la Tabla 3, se encontró actividad dextransacarasa en todos los sobrenadantes analizados. En todos los casos los resultados fueron reproducibles ya que presentaron un coeficiente de variación menor al 5%.

**Tabla 3. Producción de actividad dextransacarasa por *L. mesenteroides* B-512F en medios de cultivo con fuentes de carbono diversas.**

Fuente de carbono (117 mM)	pH final	Actividad dextransacarasa (U/mg proteína)	Factor de inducción
D-xilosa	6.7	0.005	1
D-glucosa	5.9	0.039	8
D-fructosa	5.9	0.050	10
D-glucosa + D-fructosa	5.5	0.104	21
Sacarosa	6.0	2.390	478

Es importante señalar que utilizando el método de concentración con PEG, se obtienen preparaciones libres de azúcares reductores; así fue posible detectar por el método de DNS actividades tan pequeñas como la obtenida con xilosa. Ésta podría ser considerada como la expresión basal de la dextransacarasa, mientras que el nivel obtenido con sacarosa es resultado de un fenómeno de inducción. Sin embargo, al considerar las diferencias en el metabolismo de cada carbohidrato, es interesante que con glucosa o fructosa también se haya obtenido un leve efecto de inducción. Es importante hacer notar que la producción de

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

dextransacarasa con otras fuentes de carbono diferentes a la sacarosa no se había reportado con anterioridad en esta cepa.

En *Leuconostoc*, la xilosa se incorpora a las rutas metabólicas centrales de catabolismo de carbohidratos, al nivel de la xilulosa-5-P (ver Figura 3). De acuerdo a esto, se puede suponer que las diferencias en los niveles de inducción de la dextransacarasa se deben a la presencia o diferencias en concentración de algún compuesto involucrado en los pasos iniciales del metabolismo de los otros azúcares. Es probable que la diferencia en el metabolismo de sacarosa, respecto al de glucosa y fructosa sea a nivel del transporte hacia dentro de la célula, o en el paso de fosforilación de la hexosa que se incorpora a la ruta de fosfoacetolasa. Otro aspecto que llama la atención es la diferencia en el nivel de inducción entre la sacarosa y la mezcla de glucosa y fructosa. En el siguiente capítulo se abordarán otros aspectos sobre el efecto inductor de la sacarosa en la producción de dextransacarasa.

**Caracterización electroforética de las proteínas obtenidas en fuentes de carbono alternas a la sacarosa.**

Con el objeto de conocer el tamaño de las proteínas presentes en las preparaciones enzimáticas descritas anteriormente y para distinguir aquéllas capaces de sintetizar polímero en presencia de sacarosa, se llevó a cabo un análisis electroforético y un ensayo de actividad *in situ*. En la Figura 10 (panel B) se presenta el resultado de este análisis para las proteínas extracelulares de fermentaciones con fructosa y glucosa. En el panel A se muestra la tinción con azul de Coomasie de un sobrenadante con sacarosa, como referencia.

En la tinción con azul de Coomasie, carril 1, se pueden observar dos bandas de alto peso molecular, una intensa de 170 KDa y una más tenue de 160 KDa; adicionalmente se aprecian dos bandas tenues, de 116 y 97 KDa respectivamente. Este mismo patrón se presentó en los sobrenadantes de los cultivos con glucosa y fructosa, sin embargo, como las bandas eran demasiado tenues, no se muestran aquí. En el ensayo de actividad *in situ* (carriles 2, 3 y 4), se pueden observar claramente dos bandas que sintetizan polímero a partir de sacarosa: una de 170 y otra de 116 KDa. Adicionalmente, en el carril 4 se puede observar una banda de 160 KDa más tenue que las anteriores, y en los carriles 2 y 3 existe una ligera banda de 97 KDa.

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

Es importante hacer notar que las bandas de 170 y 116 KDa se observaron después de incubar por 24 h, mientras que las demás se hicieron evidentes después de varios días de incubación con sacarosa.

La dextranasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F tendría un peso molecular de 170 KDa, de acuerdo a la secuencia del gen *dsr-S* (Wilkie-Douglas, 1989); sin embargo, también se ha reportado la presencia de dextranastas con un peso de 158 KDa en esta cepa (Miller *et al.*, 1986; Funane *et al.*, 1995). Por lo anterior, se puede concluir que las bandas de 170 y 160 KDa son dextranastas.

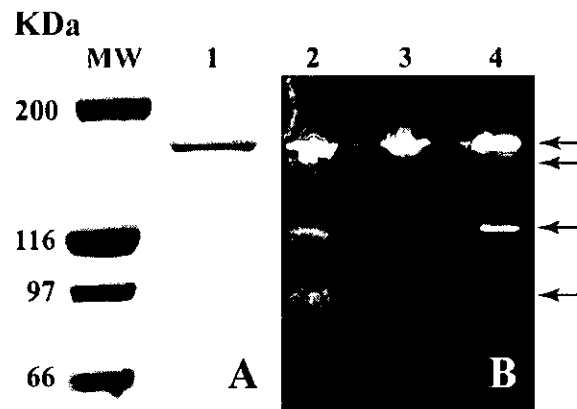


Figura 10. Análisis electroforético y detección de actividad *in situ* de sobrenadantes obtenidos con diversas fuentes de carbono. (A) Gel teñido con azul de Coomassie: marcadores de peso molecular y sobrenadante de cultivo con sacarosa, carriles MW y 1. (B) Producción de polímero *in situ* a partir de sacarosa: sobrenadantes de cultivo con fructosa, glucosa y sacarosa, carriles 2, 3 y 4 respectivamente.

Las proteínas de 116 y 97KDa corresponden a levansacarasa. Esto se comprobó al realizar otro ensayo de actividad *in situ* utilizando como sustrato rafinosa (sustrato específico para la levansacarasa), en lugar de sacarosa. En el ensayo con rafinosa, se observó que sólo las bandas mencionadas eran capaces de sintetizar un polímero (levana). Los resultados obtenidos confirman lo reportado por Miller *et al.* (1986), sobre la presencia de levansacarasa, de 92,000 y 116,000 KDa, en esta cepa. El hecho de que se necesitara un tiempo de incubación

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

largo para evidenciar esta actividad, se puede explicar considerando que estas enzimas estuvieran presentes en muy bajas concentraciones.

**Caracterización de los productos de reacción de las dextranasacarasas obtenidas en las diferentes fuentes de carbono.**

Una característica importante de las dextranasacarasas es la especificidad en la síntesis de enlaces glucosídicos entre las unidades de D-glucosa. Como ya se ha mencionado, esta cepa se caracteriza por sintetizar una dextrana lineal con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) en la cadena principal y con una pequeña proporción de enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) en las ramificaciones.

Por otra parte, en la síntesis de oligosacáridos la dextranasacarasa B-512F transfiere una molécula de D-glucosa a la maltosa con enlace  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), produciendo un trisacárido (panosa o DP3) que, a su vez, es una molécula aceptora de otra glucosa, sintetizando un tetrasacárido (DP4) con el mismo tipo de enlace. De esta manera se sintetiza una serie de oligosacáridos con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6), donde cada oligosacárido es el producto de transferencia de una unidad glucosilo sobre un oligosacárido de grado de polimerización inferior, presentando un residuo maltosilo en el extremo reductor.

Las enzimas producidas en las diferentes fuentes de carbono presentan un peso molecular semejante, pero esto no significa que sinteticen el mismo tipo de dextrana y de oligosacáridos. Analizando la estructura de los productos de reacción se puede comprobar si tienen las mismas características. En las Figuras 11 y 12 se presentan los resultados de los análisis de RMN de  $^{13}\text{C}$  y de HPLC, respectivamente para la dextrana y los oligosacáridos producidos con las preparaciones enzimáticas ya descritas.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , muestra que la estructura del polímero sintetizado con las enzimas obtenidas en fructosa y glucosa es muy similar al producido con la enzima obtenida en sacarosa, que fue utilizada como referencia. Los desplazamientos químicos (ppm) que se observan son los característicos de una dextrana lineal con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6): 99.9 al carbono 1 (C-1), 75.6 al C-3, 73.6 al C-2, 72.4 al C-5, 71.9 al C-4 y 68.2 al C-6. Los carbonos 1 y 6 están desplazados de su posición normal (105 y 60 ppm, respectivamente), ya que están formando

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

el enlace glucosídico. Es interesante que no se haya detectado la producción de levana en este análisis. Como se había mencionado anteriormente, es muy probable que la actividad levansacarasa sea muy baja a comparación de la dextransacarasa, que bajo estas condiciones, utiliza al sustrato con más rapidez.

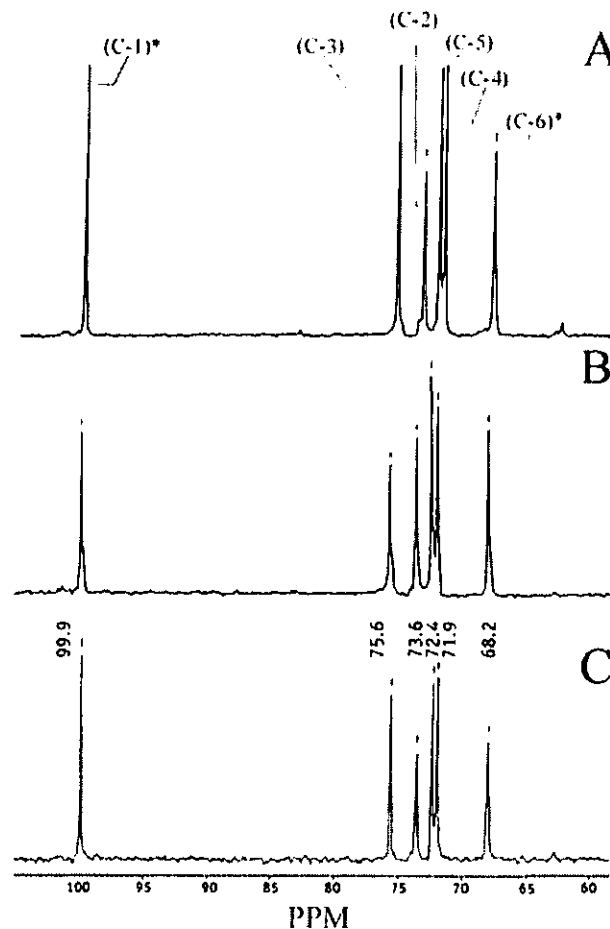


Figura 11. Análisis de RMN-<sup>13</sup>C de dextransa producida con dextransacarasa obtenida en medios con fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C).

Respecto a las reacciones de aceptor, también se observa que con las tres preparaciones enzimáticas se obtiene el mismo tipo de oligosacáridos, productos de la transferencia de glucosas con enlaces  $\alpha$ -(1→6) a la maltosa, mismos que ya han sido reportados para la enzima de la cepa B-512F (Paul *et al*, 1986).

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

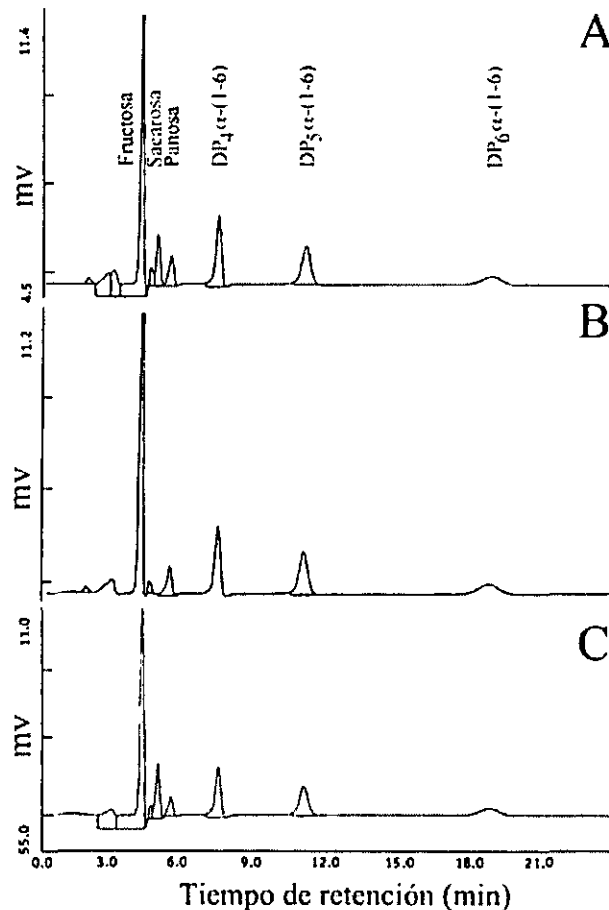


Figura 12. Análisis de HPLC de oligosacáridos producidos con dextransacarasa obtenida en medios con fructosa (A), glucosa (B) y sacarosa (C).

## RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se produjo actividad dextransacarasa en los medios de cultivo con fructosa, glucosa, sacarosa y xilosa, con diferentes niveles de inducción. La mayor producción se dio en presencia de sacarosa, mientras que la actividad obtenida en el cultivo con xilosa se considera el nivel basal de producción de actividad dextransacarasa.

Los geles de proteína demuestran que *L. mesenteroides* NRRL B-512F produce dos dextransacarasas con especificidad similar. Éstas tienen pesos moleculares de 170 y 160 KDa.

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA  
DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F EN DIVERSAS FUENTES DE CARBONO**

---

Adicionalmente, en esta cepa se determinó la presencia de levansacarosas, con pesos de 116 y 97 KDa.

Las dos dextranasacarosas que se observan en los geles de poliacrilamida podrían provenir de la expresión de genes diferentes. Como hasta ahora no se tienen resultados concluyentes sobre el número de genes para dextranasacarosas en esta cepa, más adelante se volverá a abordar el tema con otro enfoque de genética molecular.



# ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

Desde los primeros estudios sobre las dextransacarasa de *Leuconostoc*, se ha considerado que la sacarosa se debe utilizar como fuente de carbono y como inductor en la producción de enzima. No obstante, en este trabajo se demostró que existe un nivel bajo de producción de dextransacarasa utilizando otros azúcares en el medio de cultivo, como en el caso de la fructosa y la glucosa (Capítulo 3). De acuerdo a estos resultados surge la inquietud de abordar el modelo de estudio desde esta perspectiva, con la finalidad de aportar información sobre el papel de la sacarosa en la expresión de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F.

## OBJETIVOS

- Estudiar el efecto de la sacarosa como inductor de la actividad dextransacarasa sobre células de *L. mesenteroides* NRRL B-512F.
- Determinar el nivel mínimo de sacarosa que induce la actividad dextransacarasa en este microorganismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de cultivo.

Las fermentaciones se llevaron a cabo a nivel matraz, Erlen-Meyer de 250 mL, en incubadoras con agitación orbital a 200 rpm, en un volumen de 100 mL y se incubaron a 25°C. Se empleó la misma composición del medio de cultivo que en el Capítulo 2, con diversos azúcares como fuente de carbono en una concentración de 50 mM. Como inóculos se utilizaron células de la tercera resiembra en cada fuente de carbono (conservadas en glicerol al 15% (v/v) a -20°C) con una concentración de  $1.95 \times 10^9$  UFC/mL.

En una primera serie de experimentos se realizaron cultivos en las siguientes fuentes de carbono: (a) D-fructosa, (b) D-glucosa y (c) D-xilosa. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm. Al llegar a la mitad de la fase exponencial, las células provenientes de 100 mL de cultivo se lavaron dos veces con 50 mL de medio de producción de dextranasacarasas (ver Tabla 2) diluido al 50%. Posteriormente, las células se transfirieron a 50 mL de medio de producción de dextranasacarasas (sin diluir), que contenía una concentración de sacarosa de 117 mM. Después de incubar a 25°C por tres horas, se detuvo la fermentación, se ajustó el pH a 5.2 y se separaron las células del sobrenadante por centrifugación de acuerdo a lo descrito en el capítulo anterior. Una vez incubado el sobrenadante 12 h con dextrana T70 (5 g/L), se concentró la actividad dextranasacarasa extracelular por extracción con PEG 1500 y se cuantificó la actividad de las preparaciones enzimáticas siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3.

En otra serie de experimentos se realizaron varios cultivos del microorganismo utilizando como fuente de carbono D-fructosa 50 mM, hasta la mitad de la fase exponencial. En ese momento se agregaron volúmenes variables de una solución de sacarosa 1.8 M para alcanzar concentraciones finales de sacarosa en cada medio de 1, 10, 50 y 102 mM. Después de tres horas de incubación a 25°C se detuvo la fermentación, se ajustó el pH a 5.2 y se separaron las células del sobrenadante. La dextranasacarasa extracelular se concentró por extracción con

ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

PEG 1500 y se cuantificó la actividad de las preparaciones enzimáticas de acuerdo a lo descrito anteriormente.

**Concentración y determinación de la actividad dextran sacarasa.**

Se siguió el mismo procedimiento descrito en el Capítulo 3: la concentración se llevó a cabo por precipitación con PEG 1500 al 50%. La pastilla obtenida, se lavó y resuspendió en un volumen no mayor a 3 mL de buffer de acetatos 20 mM pH 5.4. La preparación enzimática se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La actividad glucosiltransferasa se determinó en todos los casos por triplicado, midiendo los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática en presencia de sacarosa a  $30^{\circ}\text{C}$  en buffer de acetatos pH 5.4. Los azúcares reductores se determinaron por el método de DNS.

**Determinación de la osmolaridad de soluciones de azúcares.**

La osmolaridad de las diferentes soluciones de azúcares se determinó con el osmómetro Osmette, modelo 2007, Precision Systems, Inc. El volumen utilizado para la determinación fue de 2 mL.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****Efecto de la sacarosa como inductor de actividad dextran sacarasa sobre células previamente cultivadas en diversas fuentes de carbono.**

Con el fin de poder detectar el efecto del inductor se llevaron a cabo fermentaciones en fuentes de carbono alternas a la sacarosa en condiciones de baja producción de dextran sacarasa, esto es, con una concentración baja de fuente de carbono (50 mM). Se eligieron como fuentes de carbono xilosa, fructosa y glucosa. La primera, por que la actividad obtenida con esta fuente de carbono se considera el nivel basal. Los otros dos azúcares se escogieron debido a que con ellos se había observado un nivel bajo de inducción. En algún otro estudio (Dols, 1997b) se había considerado que la fructosa ejercía algún tipo de represión, por lo que los resultados que se obtuvieran con este azúcar en específico serían de interés.

**ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F**

Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial, donde la actividad metabólica está al máximo, las células de cada cultivo se transfirieron al medio de producción de dextran-sacarasa (con sacarosa 117 mM). Tomando como modelo la expresión del operón de lactosa en presencia de su inductor en *Escherichia coli*, se esperaba tener la respuesta de inducción inmediata (Lewin, 1997), pero no fue así. Se hicieron muestreos cada hora, y no fue sino hasta la tercera hora en que se pudo determinar la aparición de actividad dextran-sacarasa. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos, comparando con la actividad presente en los cultivos en cada fuente de carbono antes de ponerlos en contacto con la sacarosa.

**Tabla 4. Producción de dextran-sacarasa por *L. mesenteroides* NRRL B-512F con células cultivadas en varias fuentes de carbono, después de inducir con sacarosa.**

Fuente de carbono (50 mM)	Actividad dextran-sacarasa (U/mg proteína)	
	Antes de adicionar sacarosa	Después de adicionar sacarosa <sup>a</sup>
D-fructosa	0	0.025
D-glucosa	0.011	0.207
D-xilosa	0	0.569
Sacarosa	N.D. <sup>1</sup>	2.392

<sup>a</sup> Actividad después de 3 h de cultivo. <sup>1</sup>N.D. No determinado.

Es notorio que en ninguno de los casos se llegó a tener un nivel de expresión similar al que presentaron las células que siempre se habían cultivado en sacarosa. Adicionalmente, también llama la atención que se necesitó que las células permanecieran tres horas en

**ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F**

---

presencia de sacarosa para que se generara suficiente actividad dextranacarasa, que pudiera ser detectada. Pareciera necesaria la acumulación de algún compuesto que fuera el que indujera o potenciara la expresión del gen.

**Determinación de la concentración mínima de sacarosa necesaria para inducir la actividad dextranacarasa.**

Con el fin de determinar el nivel mínimo de sacarosa requerido para inducir la producción de dextranacarasa, se agregaron diversas cantidades de ésta directamente sobre cultivos en fase log de fructosa. Se eligió este azúcar como fuente de carbono, considerando que, de acuerdo a los experimentos anteriores, es donde existe una menor producción de actividad dextranacarasa al ponerse en contacto con la sacarosa. Se podría pensar que la fructosa o algún compuesto de su metabolismo tuviera el efecto represor antes mencionado. Adicionalmente, se determinó la actividad dextranacarasa producida en varias concentraciones de fructosa, como referencia. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos.

Se observó que la sacarosa presentó un comportamiento muy diferente con respecto a un inductor típico, ya que fue necesaria una concentración muy alta para inducir la expresión. Las concentraciones usuales de un inductor están en el orden de un 0.1%, mientras que en este caso se necesitó casi un 2% (w/v). Aunado a ello, se requirió de un tiempo elevado de exposición a la molécula inductora, lo cual tampoco es usual.

El posible efecto represor de la fructosa, reportado por Dols *et al* (1997b) para la cepa NRRL B-1299, se descarta desde el momento en que se induce la producción de dextranacarasa con concentraciones mayores de 100 mM de fructosa. Más adelante se aportarán elementos a nivel molecular que también contradicen el posible efecto represor de la fructosa.

ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

**Tabla 5. Producción de dextransacarasa por *L. mesenteroides* NRRL B-512F en medios con fructosa después de la adición de sacarosa.**

Concentración (mM)		Actividad dextransacarasa (U/mg proteína)
Fructosa	Sacarosa	
200	-	0.054
117	-	0.050
50	-	0
50	1	0.005 <sup>a</sup>
50	10	0.013 <sup>a</sup>
50	50	0.105 <sup>a</sup>
50	102	1.930 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Actividad determinada después de 3 h de contacto con la sacarosa.

Estos resultados sugieren que el fenómeno que se presenta no es la inducción de la actividad dextransacarasa, ya que existe producción de enzima con otras fuentes de carbono, aunque sea en una menor cantidad. Sin embargo, la presencia de la sacarosa, o de algún compuesto de las primeras reacciones de su metabolismo, pareciera activar la expresión del gen, o podría activar a algún regulador positivo. Un hecho que soportaría esta hipótesis es que cuando la célula se ha cultivado en otra fuente de carbono necesita que pase un tiempo largo para que se sintetice un nivel adecuado de tal activador, que dispare la expresión del gen.

Otra explicación consideraría que un metabolito en común en el catabolismo de la sacarosa, glucosa y fructosa fuera el elemento que activara al regulador positivo. La diferencia en los niveles de expresión, se podría deber a que la velocidad de transporte de la sacarosa hacia dentro de la célula sea mucho mayor que la de los otros carbohidratos, por lo que se generaría mayor concentración de tal metabolito en presencia de sacarosa. Esta hipótesis

ESTUDIO SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD  
DEXTRANSACARASA EN *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

habría que probarla utilizando células premeabilizadas para la producción de la dextransacarasa en las tres fuentes de carbono.

Otra posibilidad sería que el fenómeno de aumento drástico de actividad dextransacarasa se deba a un efecto osmótico causado por la alta concentración de sacarosa que se necesita para que se dispare la expresión del gen. Explorando esta posibilidad, se determinó la osmolaridad en soluciones con una concentración de 117 mM de cada uno de los carbohidratos utilizados como fuente de carbono. En todos los casos se determinó un valor de  $110 \pm 6$  mOsm/kg de agua. Por otra parte, en el experimento donde se cultiva al microorganismo en 50 mM de fructosa con la posterior adición de 50 mM de sacarosa (Tabla 5), se genera un aumento de osmolaridad de 36 a 93 mOsm/kg de agua, y no se aprecia una respuesta en la producción de enzima que alcance el nivel de la obtenida con 117 mM de sacarosa (2.39 U/mg de proteína, Tabla 3, Capítulo 3). Estos resultados, al ser relacionados con los reportados en la Tabla 3, sugieren que la expresión de la dextransacarasa es independiente de la osmolaridad del medio, fenómeno que habría que comprobar con otras aproximaciones experimentales.

## RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La sacarosa no presenta el comportamiento de un inductor típico, ya que se requirió de un tiempo de contacto con las células de tres horas y de una concentración mínima de 50mM de sacarosa para inducir actividad dextransacarasa. En ningún caso se obtuvo la misma actividad dextransacarasa que la presente en células que siempre se habían mantenido en presencia de sacarosa.

Estos resultados aportan evidencias para suponer que la sacarosa *per se* no es un inductor de la actividad dextransacarasa, sino un elemento activador, y sugieren que la osmolaridad del medio de cultivo no tiene efecto sobre la producción de esta enzima en *L.mesenteroides* NRRL B-512F.

# ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

En los últimos años se han hecho grandes avances en el conocimiento de las secuencias de los genes estructurales de las dextransacararas, así como en el estudio de la relación estructura-función de estas proteínas. No obstante, todavía quedan varias preguntas por contestar en lo que respecta al estudio de la expresión de los genes que las codifican.

Concretamente, en las bacterias del género *Leuconostoc* es muy limitada la información sobre regiones promotoras o de regulación. Sólo se han determinado experimentalmente los promotores de los genes *mae* y *clyR*, involucrados en el metabolismo de citratos en *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Bekal-Si *et al*, 1999).

En el Capítulo 4 de este trabajo se analizaron algunos aspectos del papel de la sacarosa en el mecanismo de inducción de la dextransacarasa en *L. mesenteroides* NRRL B-512F, sin embargo no se pueden obtener conclusiones definitivas con estos resultados. Tal situación despertó el interés de llevar a cabo una serie de experimentos orientados al estudio de la expresión de gen *dsr-S* desde una óptica molecular, que abordara el análisis del mensajero producido bajo diferentes condiciones de cultivo. Así como la identificación y el análisis de la región promotora del gen *dsr-S*.



## OBJETIVOS

- Identificar el nivel al que se regula el gen de la dextranasa:
  - Inicio de la transcripción
  - postraduccional
- Determinar el tamaño del mensajero.
- Identificar el sitio de inicio de la transcripción y región promotora
- Identificar posibles regiones reguladoras.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de cultivo.

*L. mesenteroides* B-512F se cultivó en medios con la composición ya descrita, con las siguientes fuentes de carbono en una concentración de 117mM: sacarosa, D-fructosa, D-glucosa y D-xilosa. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 29°C, en matraces Erlen-Meyer de 250 mL, con agitación orbital (200 rpm). Se determinó la curva de crecimiento en cada caso por densidad óptica a 600 nm. Ésta se correlacionó con el número de microorganismos por medio de curvas de calibración. Las unidades formadoras de colonias se determinaron por cuenta en placa después de incubar, 24 h a 29°C, en medio para cuenta de mesófilos en placa.

### Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total de células cultivadas en sacarosa, se hizo a la hora de iniciada la fermentación, a las 3.5 horas (fase exponencial) y a las 6 horas de fermentación (fase estacionaria). En el caso de los cultivos en glucosa, fructosa o xilosa, se extrajo RNA total sólo de células en fase exponencial de crecimiento.

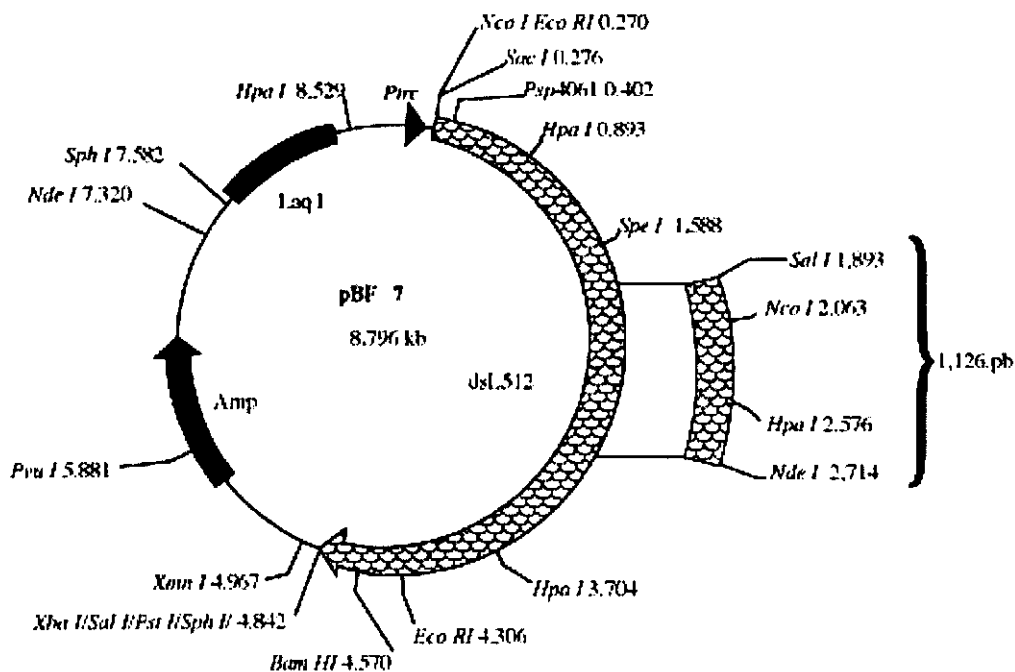
El RNA se extrajo a partir de  $1 \times 10^8$  células. Éstas fueron sometidas a un tratamiento con lisozima, para aplicar posteriormente el método de tiocianato de guanidinio (Chomczynski *et al*, 1987). Al RNA obtenido se le eliminó el DNA contaminante con DNAsaI (Amplification

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

Grade, Gibco BRL) antes de ser utilizado para el análisis de hibridación. El procedimiento seguido se reporta en el Anexo C.

**Diseño de sonda y condiciones para la hibridación tipo Northern.**

El plásmido pBF7, que se encuentra en una cepa de *E. coli* DH1, fue construido por Monchois *et al* (1997) y tiene clonado el gen *dsr-S*, Figura 13. La región de 1.1 kb comprendida entre los sitios de restricción *Sall* y *NdeI*, contiene el dominio catalítico de la dextranasa, reportado previamente (Funane *et al*, 1993; Mooser *et al*, 1991; Shimamura *et al*, 1994), por lo que tal fragmento se utilizó como sonda específica para la *dsr-S*. Se marcó con  $^{32}\text{P}$  utilizando el sistema Megaprime DNA labelling system (Amersham), siguiendo las recomendaciones del proveedor.



**Figura 13.** Plásmido pBF7. El gen *dsr-S* está comprendido entre la base 270 y la base 4,842.

Para el análisis de hibridación, 7 µg de RNA total de cada muestra se separaron por electroforesis en gel desnaturalizante de formaldehído-agarosa de acuerdo a la metodología descrita por Farrell (1993) y posteriormente se transfirieron a membrana. Se utilizó una

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

temperatura de hibridación de 57°C por 12 h. Posteriormente, la membrana se lavó dos veces a temperatura ambiente con SSC 2X + 0.1% SDS y dos veces con SSC 1X + 0.1% SDS.

**Determinación del sitio de inicio de transcripción.**

Se determinó el extremo 5' del mensajero obtenido de células cultivadas en sacarosa, glucosa y xilosa. Se utilizó el Sistema para Amplificación Rápida de Extremos 5' de cDNA (5'-RACE, Gibco BRL). Este consiste en la síntesis de cDNA a partir del mensajero que se quiere estudiar, seguido de la amplificación con PCR del extremo 3' del cDNA, que corresponde al 5' del mensajero.

Para la síntesis del cDNA se utilizó la Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL) y el oligonucleótido Oligo 2-I descrito en el Capítulo 2, con una temperatura de hibridación de 42°C.

Para la amplificación del extremo 3' del cDNA se necesitó un primer específico complementario a la región del N-terminal del gen que se va a estudiar. En este caso se escogió una región a 300 pb de distancia de la primera metionina del gen *dsr-S*, cuya secuencia es la siguiente:

Oligo InvII

5' CGC-TTG-CAG-CTG-TTG-TTA-CAT-TGT-C 3'      T<sub>m</sub>=64.6°C    48% G+C

La amplificación se llevó a cabo utilizando 2.5 U de Taq (Gibco BRL) y 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Después de calentar la mezcla de reacción 2 min a 94°C, se hicieron 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min y 72°C por 1 min, terminando con un período de extensión a 72°C por 5 min.

Los productos de amplificación se purificaron, antes de secuenciar, con el High Pure PCR Product Purification kit (Boehringer Mannheim GmbH).

**Análisis de la curvatura del DNA.**

Para calcular el grado de curvatura de la región de promotor del gen *dsr-S*, se utilizó una versión modificada del algoritmo BEND (Goodsell & Dickerson, 1994; Satchwell *et al*, 1986).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción de RNA.

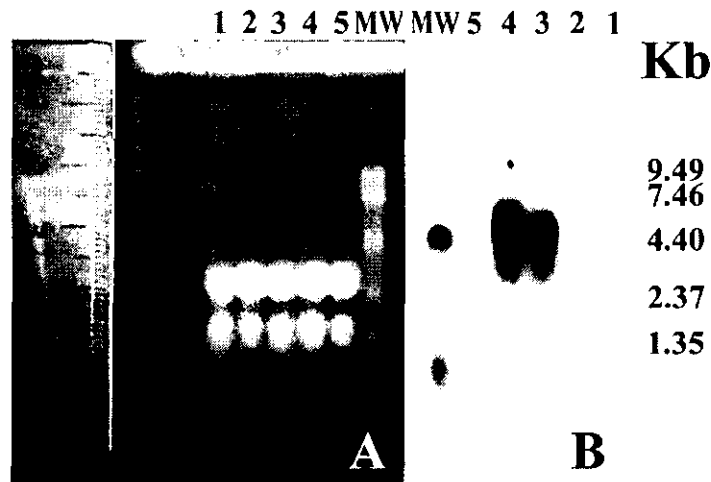
Con la metodología utilizada se pudo obtener RNA de muy alta calidad. Esto se puede verificar en la Figura 14, panel A, donde se observa una muy buena definición de las bandas de rRNA 23s de 2.9 kb, y de rRNA 16s de 1.5 kb. Llamó la atención el hecho de que, partiendo del mismo número de células, se obtuvo un rendimiento de recuperación de RNA total aproximadamente cinco veces mayor para el caso de las células cultivadas en sacarosa (en cualquier fase de crecimiento) a comparación de las cultivadas en las otras fuentes de carbono.

### Análisis de hibridación.

Para conocer el tamaño de mRNA del gen *dsr-S* y para evaluar los niveles en los que se produce en las diferentes fuentes de carbono, se hicieron extracciones de RNA total de células crecidas en (1) fructosa, (2) glucosa y (3) sacarosa. Adicionalmente, para saber el nivel de transcripción en las diferentes etapas de crecimiento del microorganismo cultivado en sacarosa, se extrajo RNA de células en fase exponencial (al inicio y en un punto intermedio) y en fase estacionaria. A las muestras de RNA mencionadas, se les hizo un análisis de hibridación con una sonda específica para el gen *dsr-S*. Los resultados se muestran en la Figura 14, panel B.

Como se puede observar, el mensajero del gen *dsr-S* tiene un tamaño aproximado de 4.8 kb, correspondiendo al tamaño del gen reportado por Wilke-Douglas *et al* (1989). Esto indica que dicho gen se encuentra en un operón monocistrónico. Al no encontrarse bajo el mismo promotor se explican las diferencias en los niveles de producción de la dextransacarasa y la sacarosa fosforilasa observados por Dols *et al* (1997b), durante el transcurso de la fermentación.

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F



**Figura 14.** Análisis de RNA extraído *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Cultivado en fructosa (carriles 1), glucosa (carriles 2), sacarosa inicio fase log (carriles 3), sacarosa fase log (carriles 4) y fase estacionaria (carriles 5). MW Marcador de peso molecular de RNA (Gibco BRL). A. Electroforesis de RNA total. Gel agarosa-formaldehído. B. Autorradiografía de la transferencia Northern.

Respecto a la transcripción del gen *dsr-S* en las células cultivadas en diversas fuentes de carbono, en la Figura 14, panel B sólo se puede observar señal de hibridación en los cultivos con sacarosa. Al dejar la película por un tiempo de exposición mucho más largo, se hacían evidentes señales tenues en los otros carriles, sin embargo las de los cultivos en sacarosa (fase log) eran sumamente intensas. De acuerdo a estos resultados, se vuelve a hacer patente la importancia de la presencia de sacarosa para disparar la síntesis de mensajero. Por otra parte, relacionando la concentración de mensajero y la actividad enzimática obtenida con las diferentes fuentes de carbono (Capítulo 3), se concluye que el control de la regulación del gen *dsr-S* se lleva a cabo a nivel del inicio de la transcripción.

Sobre la expresión temporal del gen *dsr-S* en el cultivo en sacarosa, se observa que la mayor concentración de mensajero se produce durante la fase exponencial de crecimiento (a las 3.5 h de cultivo). Este resultado era predecible, tomando en cuenta que la dextransacarasa es una enzima asociada al crecimiento. Sin embargo, hay dos sucesos que llaman la atención. Uno es que en la fase estacionaria (a las 6 h de cultivo) el nivel del mensajero sea tan bajo como en

las células cultivadas en las fuentes alternas a la sacarosa. La baja concentración de mensajero, aunada al decremento de pH explica la caída drástica en la actividad enzimática descrita en el Capítulo 3 (ver Figura 7). Por otra parte, se puede deducir que el tiempo de vida media del mensajero es corto, como ya se ha reportado en otras bacterias (Janda & Kuramitsu, 1976). La disminución en el nivel de mensajero se produce cuando la concentración de sacarosa ha disminuido a menos de 20 mM, por consiguiente no se alcanza el nivel mínimo necesario para inducir la síntesis de más mensajero.

El otro aspecto que llama la atención es que aún a la primera hora de fermentación en sacarosa, la cantidad de mensajero sea considerablemente mayor que la presente en células (fase log) cultivadas en cualquier otra fuente de carbono. Hay que recordar que las células con que se inocularon las fermentaciones con fuentes de carbono diferentes a la sacarosa, provienen de la tercera resiembra en la respectiva fuente de carbono. Este resultado nos lleva a pensar que las células crecidas en sacarosa contienen una concentración alta de algún compuesto relacionado con el metabolismo de este azúcar, situación que no se presenta en las células cultivadas en otras fuentes de carbono y que este metabolito pueda ser el verdadero inductor o activador de la expresión del gen *dsr-S*. Quizá así se explicaría por qué es necesario el crecimiento de varias generaciones en sacarosa, a partir de células cultivadas en fuentes alternas, ya que se necesita que transcurra un tiempo para poder alcanzar una concentración de dicho metabolito y, entonces, poder inducir la expresión del gen *dsr-S*.

Tomando como referencia las concentraciones de azúcares de la Figura 7 (Capítulo 3), se observa que la mayor concentración de mensajero se detecta cuando en el medio de cultivo se tiene 20 mM de fructosa y 55 mM de sacarosa, por lo que se comprueba que la fructosa no tiene un efecto represor, como se había sugerido por Dols *et al* (1997b). Estos resultados son consistentes con los reportados en el Capítulo 4.

#### **Determinación del sitio de inicio de transcripción.**

Se determinó el inicio de transcripción del gen de la dextranasa con el fin de localizar la secuencia del promotor. Se analizaron mensajeros obtenidos de células cultivadas en fructosa o xilosa, además de en sacarosa, porque así se podría comprobar la presencia de mensajero y,

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

por consiguiente, el nivel al que se lleva a cabo la regulación. Además, se podrían comparar las secuencias obtenidas del extremo 5' del gen transcrito para verificar si se trata del mismo gen en todos los casos. Para tal efecto se utilizó el método de 5'-RACE, que es recomendado para el estudio de mensajeros que se encuentran en muy bajas concentraciones, como es el caso de los mensajeros sintetizados en medios en ausencia de sacarosa. En el Anexo E se muestran las secuencias de los productos de amplificación del extremo 3' del cDNA sintetizado a partir de mensajeros obtenidos de células cultivadas en sacarosa ("S"/PII), fructosa ("F"/PII) y xilosa ("X"/PII):

La secuenciación de los productos de PCR demuestra que en todos los casos se tienen las mismas bases nucleotídicas en el extremo 3' del cDNA (a partir de la cadena de poli-C), por lo que se concluye que bajo las condiciones de cultivo se expresa un mismo gen que codifica para dextransacarasa, el *dsr-S*. Por consiguiente, la presencia de varias bandas de actividad enzimática *in situ* (Figura 10, Capítulo 3) se puede deber a la acción de proteasas sobre la dextransacarasa DSR-S. Esta hipótesis es consistente con el trabajo de Sánchez-González *et al* (1999), en el que se detecta una actividad proteolítica sobre la dextransacarasa que da como resultado la disminución en el peso molecular de la enzima obteniéndose varias dextransacarosas activas con diversos pesos moleculares, entre ellas las identificadas en este trabajo.

En la Figura 15 se muestra el extremo 5' de gen *dsr-S* y el N-terminal de la dextransacarasa. En la región del -10 se encuentra la secuencia canónica para procariotes. Hacia arriba, a 12pb de distancia del -10, se observa una región que se parece mucho a la región conservada de -35. Sin embargo, el espacio entre estas dos regiones no corresponde a lo observado en los promotores de *Escherichia coli* o de *Bacillus subtilis* (Harley & Reynolds, 1987; Plaskon & Wartell, 1987; Priest & Sharp, 1989). A 17pb de la región -10 se encuentra la secuencia CTGTTT, que sólo tiene 2 bases idénticas a la región -35 canónica.

En la Tabla 6 se presenta una comparación entre el promotor identificado, los únicos dos promotores de genes de *Leuconostoc* determinados experimentalmente (Bekal *et al*, 1999) y las

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

regiones consenso para procariotes. En el caso de los genes *mae* y *clyR* existe una separación de 17pb entre la región -10 y -35.

```

1... AATAATAATTAACATTGTTAACTTATCACTAGATAAGTTAACAATGTTTTTTTATAAAAAATTAATGTT
      |-----|-----|
      |-----|-----|
71  TATAATATTAATATAAATCTCTGATTGACTGTTTTTACAATGTTTTTTAAAAATATGTCGATTGTGTATT
      |-----|-----|
141 GAAATTTTTACTGTTTTTACAAATAAATTAAGTTATAATTTTTCAATGTAATAGAAGAGAATATTATAAG
      -35          -10          mRNA
211 GAGAAAATTTATGCCATTTACAGAAAAAGTAATGCGGAAAAAGCTTTATAAAGTTGGGAAAAGTTGGGTA
      SDS          M P F T E K V M R K K L Y K V G K S W V
281 GTTGGTGGGGTTTGTGCTTTTGCATTAACCGCCTCATTGCTTTAGCAACACCAAGTGTTTTAGGAGACA
      V G G V C A F A L T A S F A L A T P S V L G D
351 GTAGTGACCTGATGTGAGTGCGAATAACGTTCAATCTGCTTCAGATAATACAACGGATACGCAGCAGAA
      S S V P D V S A N N V Q S A S D N T T D T Q Q N
421 CACTACGGTTACCGAAGAAAATGATAAAGTACAGTCTGCAGCTACTAATGACAATGTAACAACAGCTGCA
      T T V T E E N D K V Q S A A T N D N V T T A A
491 AGCGACACAACACAATCTGCTGATAATAATGTGACAGAAAAACAGTCAGATGATCATGCACTTGAT...
      S D T T Q S A D N N V T E K Q S D D H A L D ...

```

**Figura 15.** Secuencia del extremo 5' del gen *dsr-S*. SDS-posible sitio de unión a ribosoma. Las flechas opuestas indican un posible terminador. Otros palíndromes de encuentran subrayados. Los nucleótidos encerrados en una caja son complementarios al primer utilizado para la PCR.

**Tabla 6.** Comparación de promotores en *Leuconostoc* con el promotor consenso en procariotes.

Microorganismo	Gen	Región -10	Región -35
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>mae</i>	TAGAAT	TTGAAT
	<i>clyR</i>	TACAAT	TTGATA
<i>L. mesenteroides</i> NRRLB-512F *	<i>dsr-S</i>	TATAAT	CTGTTT
Consenso en procariotes		TATAAT	TTGACA

\* Determinado en este trabajo.



ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

Estos resultados indican que el gen *dsr-S* se encuentra bajo un promotor atípico. Existen reportes de genes donde se describe que la transcripción no depende de una secuencia específica en la región -35, ya que la arquitectura de los complejos RNA polimerasa-promotor puede variar dependiendo de la presencia o ausencia de la región -35 consenso (Chan *et al*, 1990) o a la participación de una subunidad  $\sigma$  de la RNA polimerasa diferente a la  $\sigma^{70}$  de *E. coli* (Espinosa-Urgel & Tormo, 1993; Marschall *et al*, 1998) o a la  $\sigma^{43}$  de *B. subtilis* (Priest & Sharp, 1989). Por otra parte, el gen *dsr-C* de la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355, fue recientemente aislado y secuenciado (Argüello-Morales, 2000) pero se reporta no haber encontrado una región promotora típica por lo que se concluye que probablemente este gen no se exprese. En ese estudio no se contempló el análisis de la expresión del gen *dsr-C*, por lo que sería muy interesante hacer una hibridación tipo Northern para saber si tal gen se expresa, así como determinar el inicio de la transcripción y la región reguladora de este gen.

**Análisis de la región del promotor.**

Hacia arriba de la región -10 del promotor se observan varias secuencias palindrómicas, señaladas en la Figura 15. La primera, de 38 pb (región entre la base 10 y la 48, Figura 15), podría ser el terminador del gen anterior al *dsr-S*. Con el fin de encontrar regiones reconocidas por proteínas reguladoras que pudieran estar relacionadas con las otras secuencias palindrómicas, se analizó la secuencia hacia arriba del inicio de la transcripción, utilizando el algoritmo BLAST. Se encontró una región que es reconocida por la proteína IHF (Integration Host Factor). Esta región corresponde a la cuarta secuencia palindrómica, señalada en la Figura 15 entre las bases 110 y 125. La proteína IHF reconoce regiones específicas hacia arriba de algunos promotores y puede tener un papel de activador de la transcripción, al ocasionar un cambio conformacional del DNA cerca de la región del promotor. Se ha postulado que interactúa entre una región curva del DNA y la RNA polimerasa, pudiendo incrementar la velocidad de formación del complejo abierto facilitando el desapareamiento de bases en la región promotora (Pegel *et al*, 1992). Esta proteína está relacionada con la activación del inicio de la transcripción de genes de respuesta a condiciones de estrés en *E. coli* y otros microorganismos, como *Pseudomonas putida*, por

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

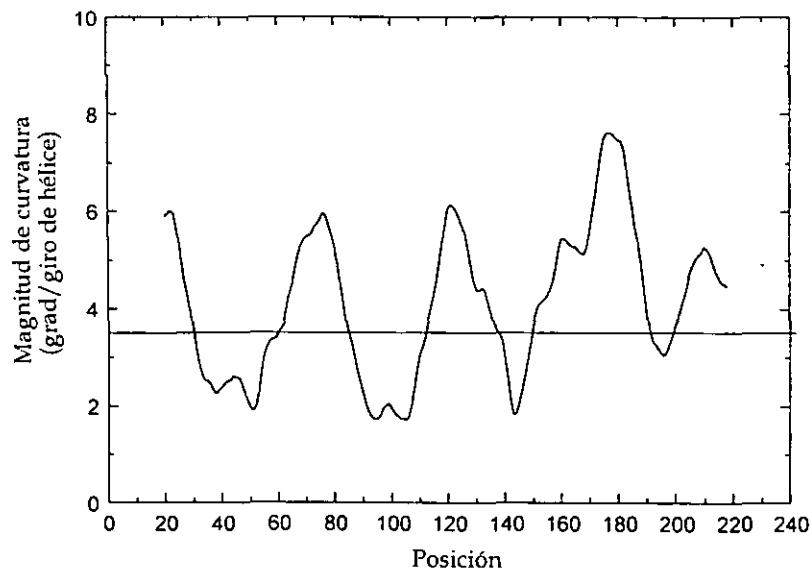
ejemplo, como respuesta a la presencia de compuestos como tolueno o xileno y como respuesta a estrés osmótico (Goosen & van de Putte, 1995). Sin embargo, no se ha reportado la presencia de esta proteína en bacterias gram positivas, como es el caso de los géneros *Bacillus* y *Leuconostoc*.

Por otra parte, la presencia de regiones ricas en adeninas y en timinas consecutivas en la región hacia arriba del promotor sugiere un alto grado de la curvatura del DNA (Plaskon & Wartell, 1987). Por ello se decidió analizar la curvatura del DNA en la región promotora del gen *dsr-S* y de los tres genes de dextranacararasas de *L. mesenteroides* reportados (*dsr-A*, *dsr-B* y *dsr-C*). En la Figura 16 se muestra gráficamente este análisis. En todos los casos se analizó una región de 240pb hacia arriba del inicio de los respectivos genes estructurales, la posición 220 es la más cercana a cada gen estructural. Se observa que en todos los casos se encuentran máximos de curvatura en las regiones putativas del promotor, considerando que la curvatura promedio del DNA es de 3.5grados/giro de hélice. Específicamente en el caso del gen *dsr-S*, se observa que el promotor se encuentra en una región de alta curvatura; además de que se predicen curvas marcadas de manera periódica cada 50pb, lo que correspondería a 5 vueltas de la hélice del DNA. Es interesante que en el promotor del gen *dsr-C* se observe un máximo de curvatura cerca del gen estructural, esto indica que pudiera tener un promotor diferente del consenso, como en el caso del gen *dsr-S*.

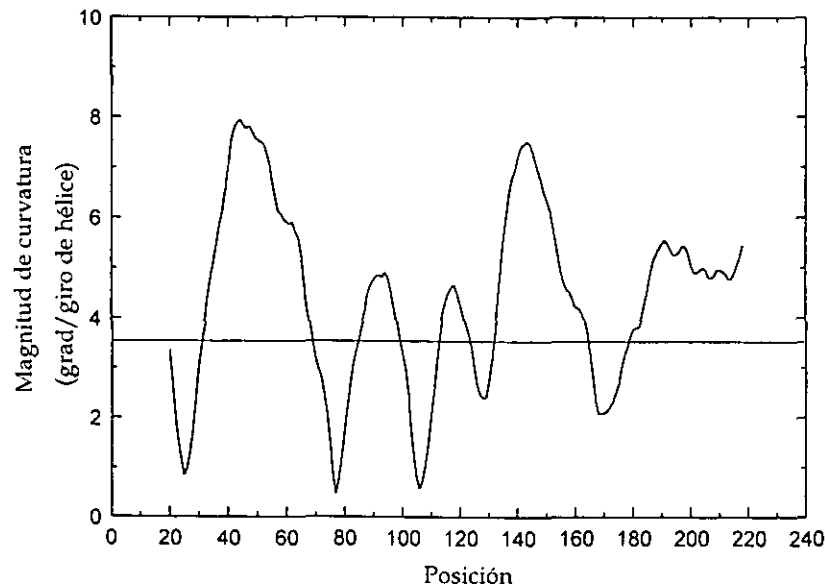
En la Figura 17 se presenta el análisis de la curvatura de promotores de algunos genes de estado estacionario en *E. coli*. Éstos tienen una región -35 alejada del consenso y se ha reportado que su expresión está relacionada con la localización de sus promotores en regiones con alta curvatura (Espinosa-Urgel & Tormo, 1993). Se observa que los promotores de las dextranacararasas de *L. mesenteroides* (Figura 16) no presentan regiones con tan alta curvatura como el promotor de *kat E*, pero presentan regiones con curvaturas periódicas del mismo grado que podrían tener influencia en el proceso de inicio de la transcripción.

En la Figura 18 se presenta el análisis de curvatura de algunos promotores de genes de *E. coli* y regiones de genes estructurales de *Leuconostoc*. En las regiones de DNA de *E. coli* se observa que la curvatura está cercana al promedio de 3.5° y en el DNA de *Leuconostoc* se

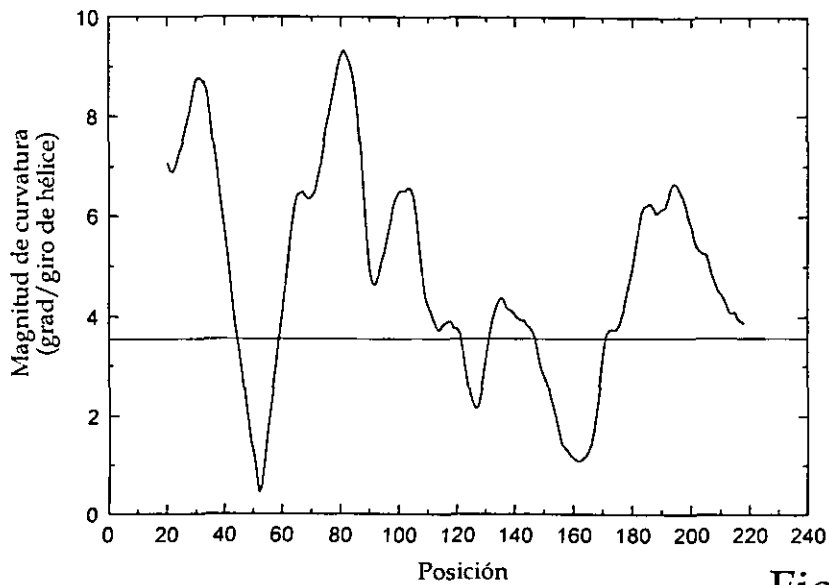
Promotor *dsr-S* L.m. B-512F



Promotor *dsr-A* L.m. B-1299



Promotor *dsr-B* L.m. B-1299



Promotor *dsr-C* L.m. B-1355

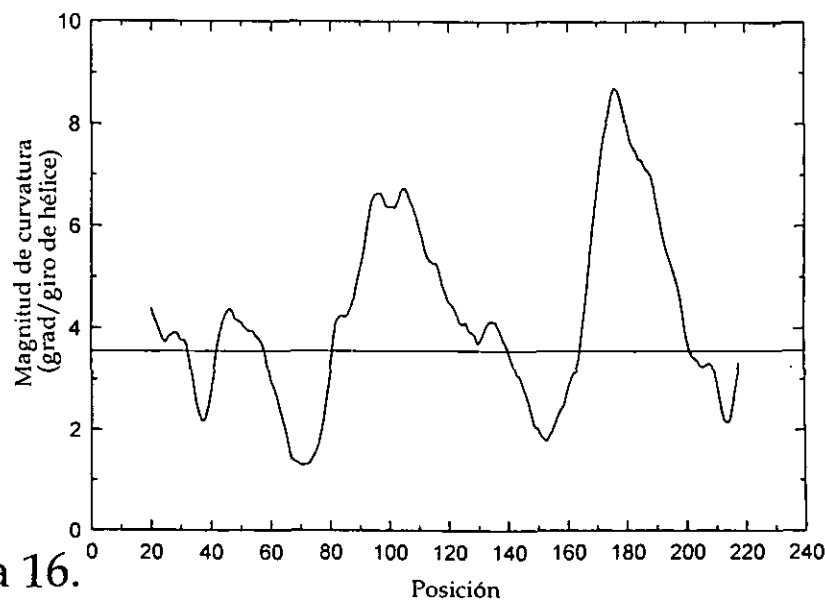
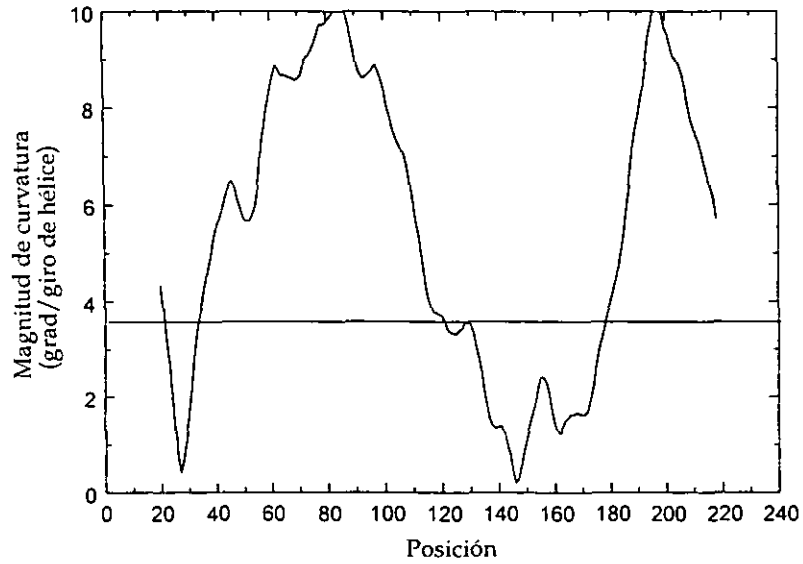
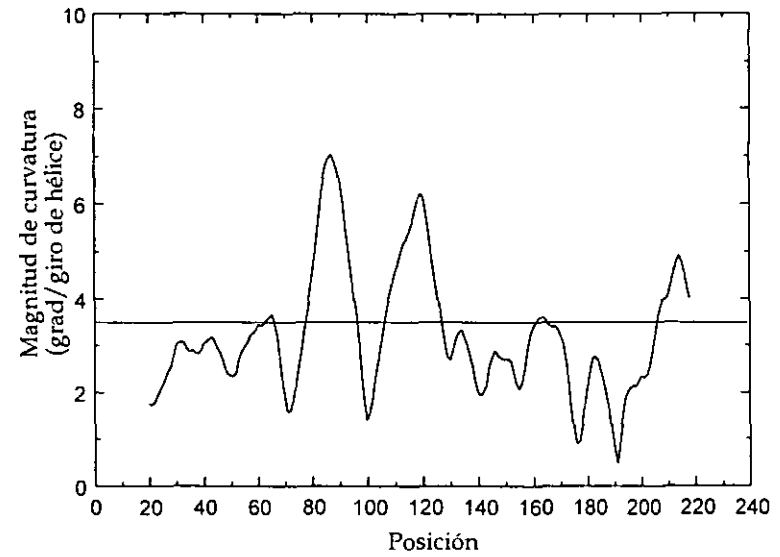


Figura 16.

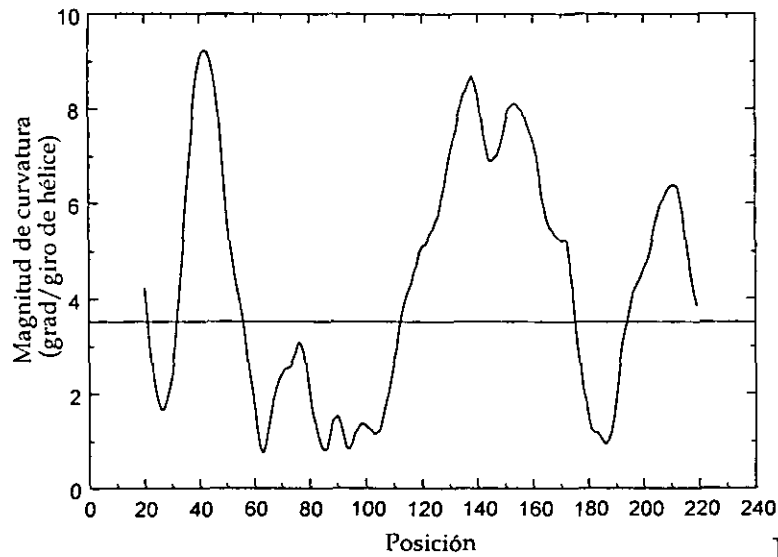
Promotor *kat E E. coli*



Promotor *glg S E. coli.*



Promotor *pex B E. coli*



Promotor *xth A E. coli.*

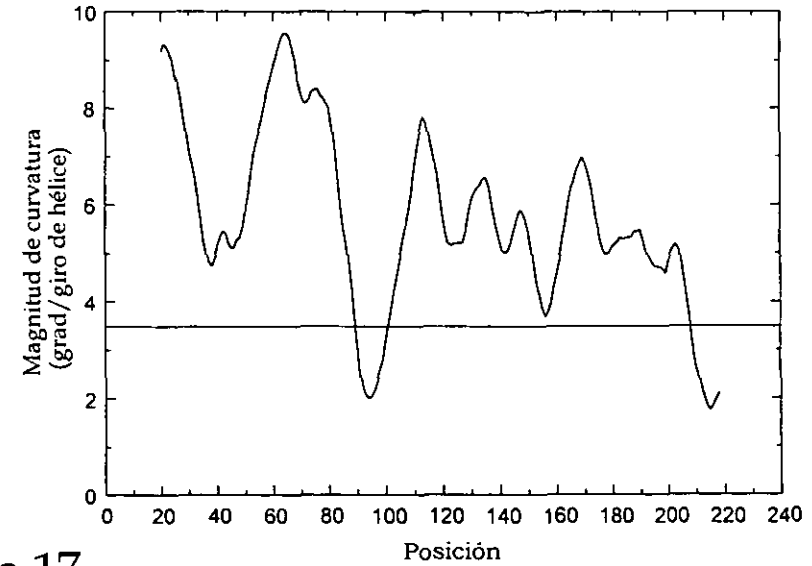
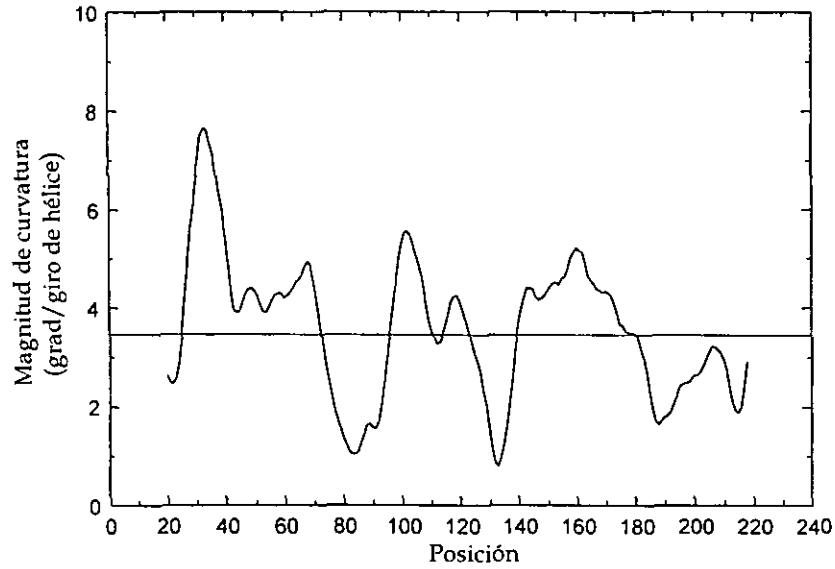
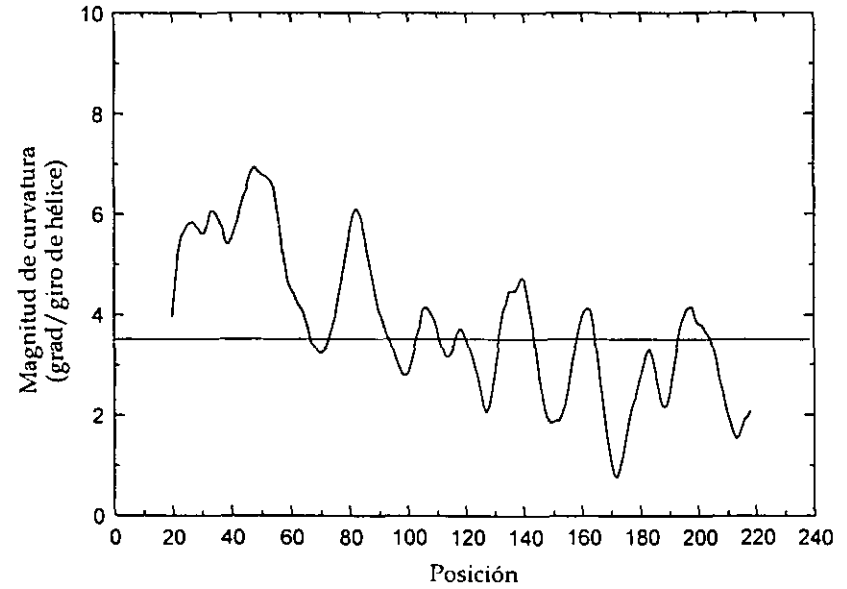


Figura 17.

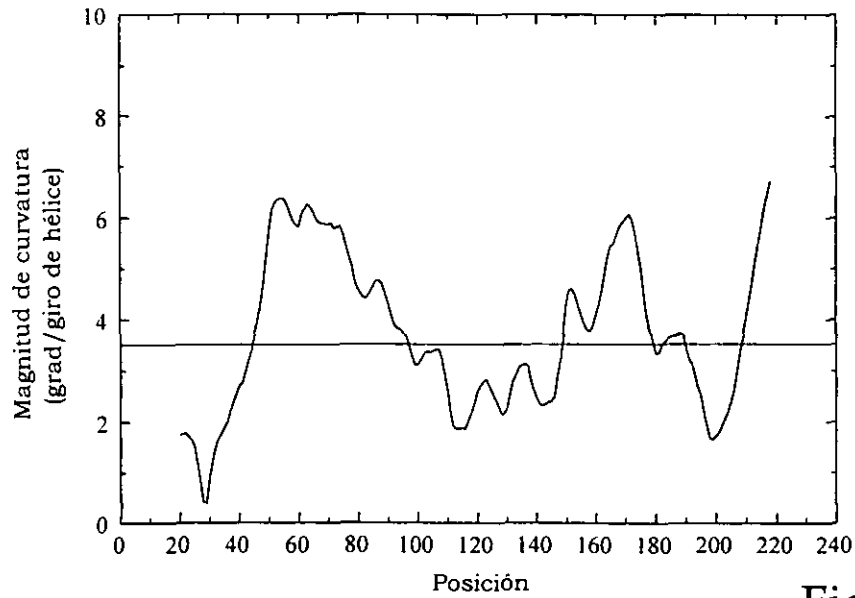
Glucocinasa *E. coli*



Sacarosa permeasa *E. coli*



*dsr-S* (gen estructural) *L.m.* B-512F



*mle* (gen estructural) *L.mesenteroides*

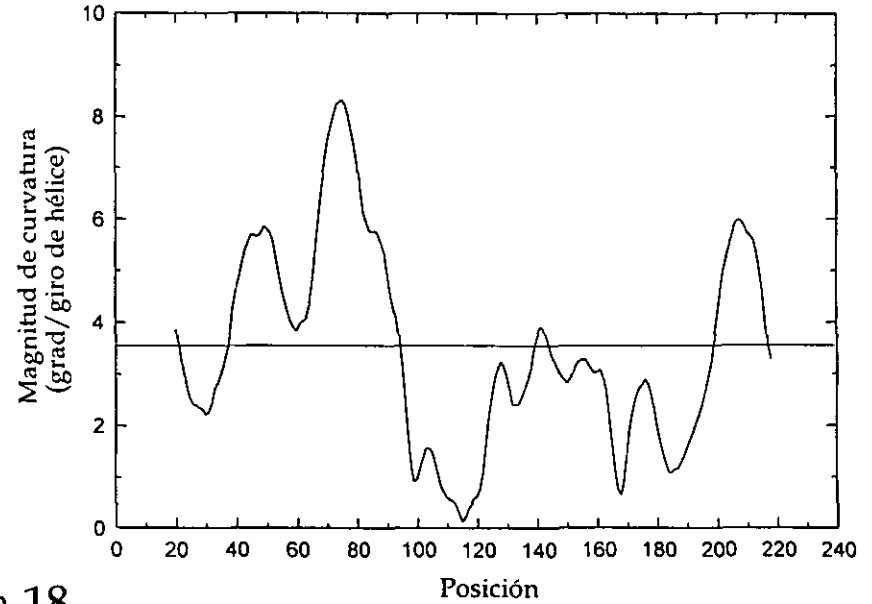
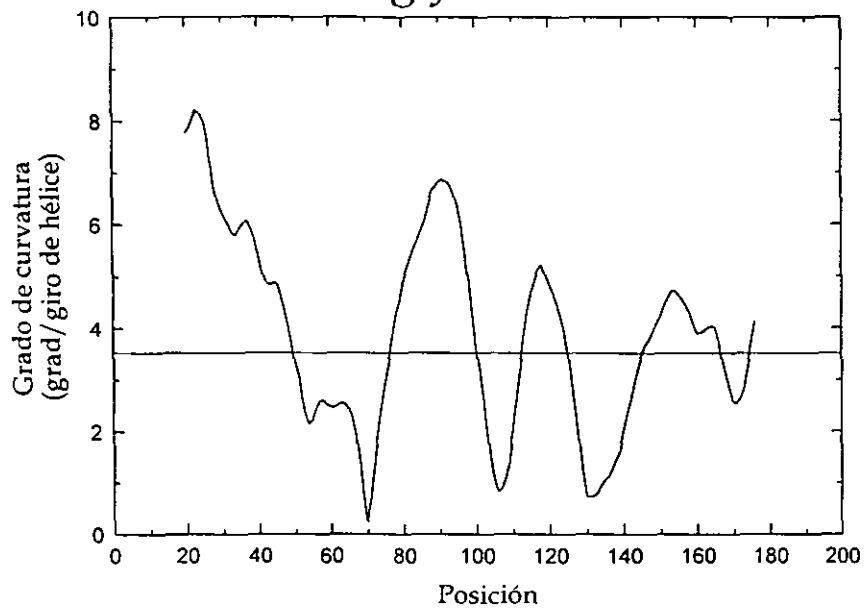
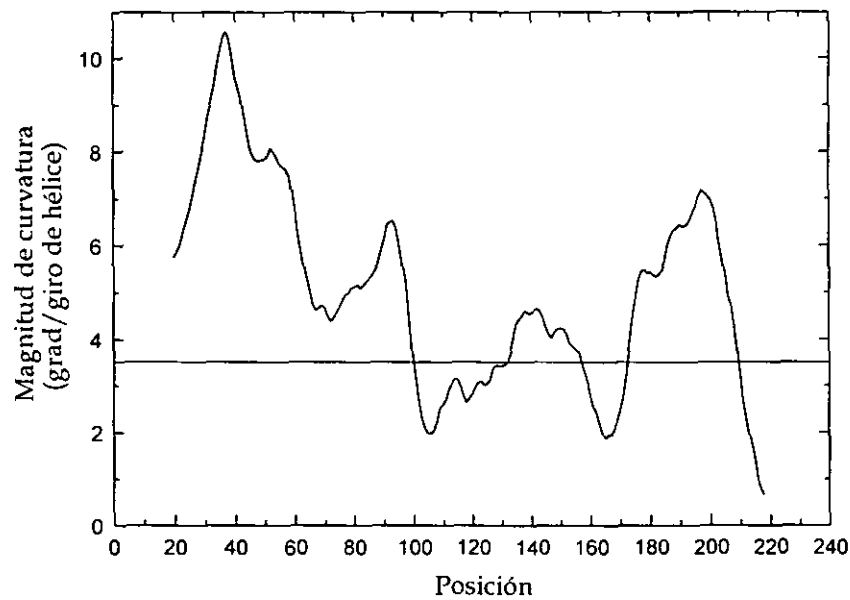


Figura 18.

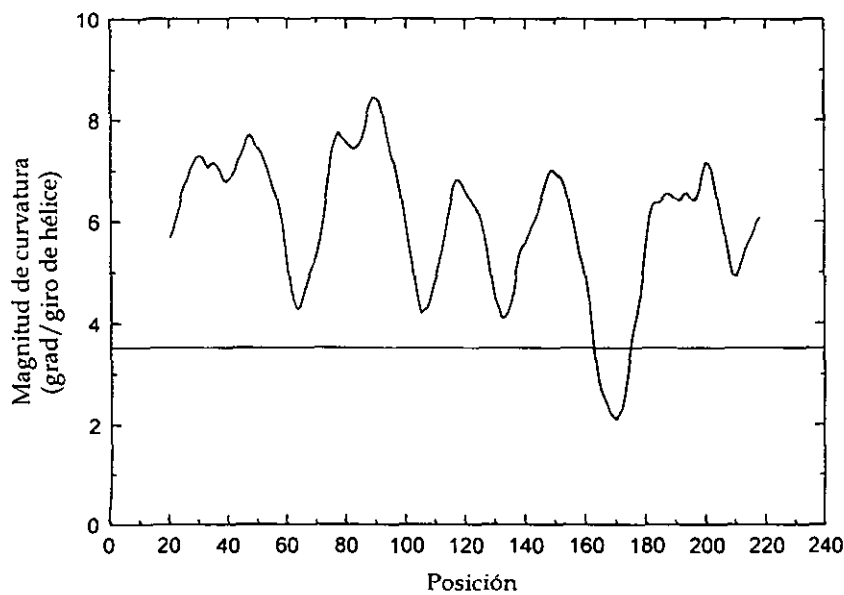
Promotor *gtf-C S.mutans*



Promotor *gtf-D S.mutans*



Promotor *gtf-I S. sobrinus*



Promotor *gtf-S S. mutans*

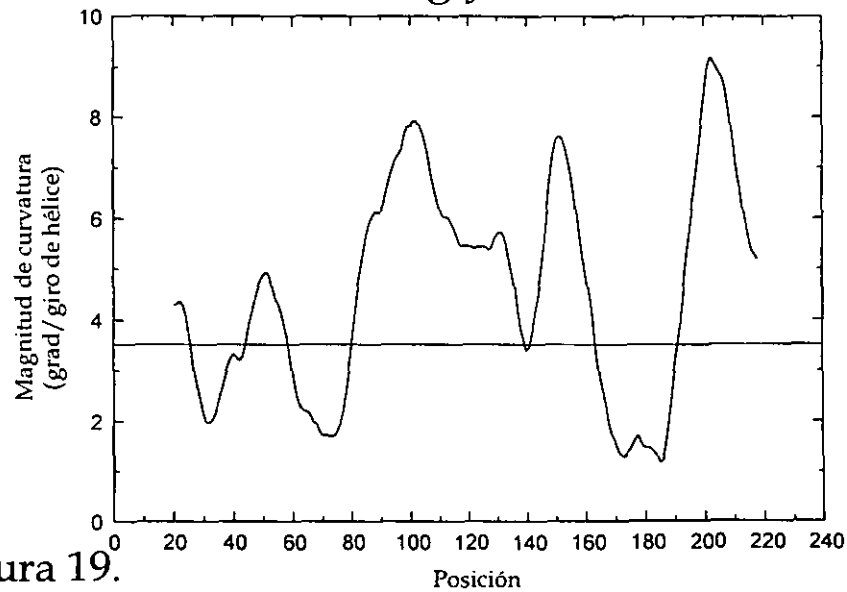


Figura 19.

ESTUDIO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEL GEN *dsr-S* DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

---

observa una curvatura un poco mayor, pero no en patrones repetitivos como en el promotor de la *dsr-S*.

Lo anterior podría apoyar la hipótesis de que la topología y el grado de curvatura cerca del promotor ayuda que se inicie la transcripción, aún con una región -35 poco homóloga con la secuencia consenso.

Es interesante observar que también existe un grado de curvatura importante en las regiones promotoras putativas de glucosiltransferasas de *Streptococcus* (Figura 19), al considerar que la expresión de estos genes es constitutiva. Lo anterior sugiere que la curvatura del DNA en la región del promotor no estaría relacionada con el efecto inductor o activador de la sacarosa en la transcripción de las dextransacarasas de *Leuconostoc*, al menos de que la supuesta molécula activadora tenga alguna afinidad por regiones curvas de DNA.

## RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El gen *dsr-S* se expresa tanto en los medios con sacarosa como con las fuentes de carbono alternas.

Se presentan fenómenos de regulación del gen *dsr-S* a nivel del inicio de la transcripción.

El promotor del gen *dsr-S* es atípico, ya que tiene la región -10 idéntica al consenso pero una región -35 no canónica.

Se encontró un alto grado de curvatura en la región del promotor del gen *dsr-S*, que podría favorecer el inicio de la transcripción a pesar de que la región -35 está alejada del consenso.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

Una vez habiendo encontrado indicios de la presencia de plásmidos en las cepas de *Leuconostoc* estudiadas queda abierta la opción de que el gen que codifica para la actividad dextransacarasa se encuentre en elementos extracromosomales. Quedaría por explorar si la presencia de plásmidos tiene relación con la inestabilidad de la producción de estas enzimas. La presencia de sitios de inserción en estas cepas podría ser otra causa de tal comportamiento, ya que se han reportado este tipo de secuencias en otras especies de *Leuconostoc* (Vaughan *et al*, 1995; Bandell *et al*, 1998). La movilidad de material genético causaría rearrreglos cromosomales que pudieran afectar la expresión de genes estructurales a varios niveles, por lo que valdría la pena explorar esta posibilidad.

Por otra parte se comprobó que, bajo cualquier condición de cultivo, se expresa el gen *dsr-S* que codifica para dextransacarasas en la cepa B-512F. Por lo tanto, la presencia de varias proteínas con esta actividad en esta cepa, sólo puede tener un origen post-traducciona. Se ha comprobado la existencia de proteasas en la cepa B-512F capaces de hidrolizar a la dextransacarasa dando como resultado proteínas de menor peso molecular que conservan actividad enzimática (Sánchez-González *et al*, 1999), pero queda abierta la pregunta sobre cuál es la función de tal procesamiento y si es un fenómeno que se presenta también en otras cepas de *L. mesenteroides*.

En *L. mesenteroides* B-1299 existen varias dextransacarasas, además de la ampliamente estudiada que produce dextrana con una alta proporción de enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) (Remaud-Simeon *et al*, 1994; Monchois *et al*, 1996 y 1998b). Dichas enzimas no fueron detectadas sino hasta que se cultivó al microorganismo en fuentes de carbono diferentes a la



sacarosa. Las diferencias en las dextransacararas se caracterizaron por el análisis de los productos de la enzima (Dols *et al*, 1998). Por ello es relevante que en el caso de la cepa B-512F se haya comprobado tanto por medio de una caracterización bioquímica de la enzima, como por el análisis de los productos de la misma y por análisis de mRNA que, independientemente de la fuente de carbono, sólo se expresa una dextransacarasa, la DSR-S. Cabe aclarar en este punto, que muy recientemente se reportó la presencia en la cepa B-512F de un gen que codifica para una dextransacarasa truncada, el *dsr-T* (Funane *et al*, 2000). De acuerdo a la interpretación de los autores, este gen presenta una deleción de 5 pb, por lo que la proteína que se sintetiza a partir de él ya no presenta la capacidad de sintetizar dextrana. Estos resultados son consistentes con los nuestros, ya que uno de los elementos básicos de nuestro acercamiento fue la búsqueda de actividad dextransacarasa, que se observó tanto en la actividad *in vitro* de los geles de electroforesis, como en la síntesis de productos (dextrana y oligosacáridos). En caso de que la enzima DSR-T fuera activa, se habría detectado seguramente en el gel de actividad *in situ*, ya que, de acuerdo a los autores, la proteína activa tendría un peso de 210 KDa (Funane *et al*, 2000).

Con respecto a la inducción de la expresión del gen *dsr-S*, al haber encontrado un nivel de producción con otros azúcares (glucosa y fructosa) aunque fuera muy bajo y en vista del comportamiento atípico de la sacarosa como inductor, hace pensar que ésta no tiene sólo un papel de inductor, sino de potenciador o activador de la expresión del gen. Se propone un modelo de regulación positivo, donde una proteína reguladora interactuaría con alguna región del promotor incrementando la eficiencia de transcripción. Esta proteína reguladora se activaría en presencia de sacarosa o de glucosa-1-P o glucosa-6-P, metabolitos que tendrían la función de verdadero inductor. Las diferencias en los niveles de inducción en sacarosa, glucosa y fructosa se podrían deber a las diferencias en las concentraciones de tal metabolito bajo las tres condiciones de cultivo. En este punto sería importante considerar la velocidad de entrada a la célula de cada carbohidrato, ya que éste podría ser el paso limitante en la síntesis del "verdadero inductor". Algo semejante ocurre en cepas de *L. mesenteroides* Cit<sup>+</sup>, donde el transporte del citrato a

---

través de la membrana (por la proteína transportadora específica CitP) es el paso limitante de la vía catabólica completa (Lin *et al*, 1991; Marty-Teyssset *et al*, 1996).

El otro acercamiento para explicar la inducción de la expresión del gen *dsr-S* que se exploró fue el posible efecto osmótico que tuviera la sacarosa sobre la célula. Así se explicaría también la necesidad de altas concentraciones de este azúcar para poder disparar la expresión del gen. Sin embargo, al determinar la osmolaridad de las soluciones de carbohidratos que se utilizaron como fuentes de carbono, se encontró que ésta era alta en todos los casos, lo que no explicaría las diferencias en actividad dextransacarasa observadas con las diferentes fuentes de carbono.

El gen *dsr-S* se encuentra en un operón monocistrónico, lo que explica la diferencia de expresión en el tiempo de la dextransacarasa y la sacarosa fosforilasa, a pesar de que ambas actividades se inducen en presencia de sacarosa.

El gen *dsr-S* presenta un promotor atípico, con una región -35 alejada del consenso en procariotes. La curvatura del DNA en la región promotora podría explicar por qué a pesar de tener un promotor débil, el gen se expresa con alta eficiencia. Se han caracterizado genes de *E. coli* que se expresan en la fase estacionaria y algunos se encuentran en regiones de alta curvatura, como *kat E*, *xth A*, *glg S*, *dps* y *bol A* (Espinosa-Urgel & Tormo, 1993; Pérez-Martín *et al*, 1994). Probablemente, como sucede en los casos antes mencionados, en el proceso de inicio de la transcripción del gen *dsr-S* intervenga una subunidad diferente a la  $\sigma^{70}$  o  $\sigma^{43}$ . Es importante señalar que la curvatura en el promotor parece no estar relacionada con el fenómeno de inducción por la sacarosa, ya que promotores de genes constitutivos en *Streptococcus* también presentan una curvatura elevada. Sin embargo, se podría dar el caso de que la supuesta proteína activadora tuviera una preferencia de unión a DNA curvo, en tal caso sí habría una relación directa entre la presencia de regiones curvas de DNA en el promotor y la inducción del gen.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

*L. mesenteroides* NRRL B-512F produce una dextransacarasa que tiene un peso molecular de 170 KDa y dos levansacarosas con pesos de 116 y 97 KDa.

Las siguientes fuentes de carbono inducen la producción de dextransacarasa en *L. mesenteroides* NRRL B-512F: fructosa, glucosa y sacarosa. La mayor inducción se observa en presencia de sacarosa. La actividad obtenida al cultivar al microorganismo en xilosa se considera el nivel de expresión basal. Los estudios realizados sugieren que la sacarosa *per se* no es el verdadero inductor de actividad dextransacarasa sobre células de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, y que la alta osmolaridad de los medios de cultivo no incide en el fenómeno de inducción.

La caracterización de la enzima y de sus productos, así como los estudios de hibridación DNA-RNA permiten concluir que, en las condiciones estudiadas, sólo se expresa un gen que codifica para dextransacarasas en la cepa B-512F, el *dsr-S*.

El gen *dsr-S* se regula bajo un promotor atípico. El promotor se encuentra en una región de alta curvatura, lo que sugiere que el inicio de la transcripción se favorece por la topología del DNA, como es el caso de algunos genes que se expresan en fase estacionaria en *E. coli*.

## PERSPECTIVAS

---

Los resultados de este trabajo abren perspectivas en lo que respecta a los siguientes aspectos:

- ❖ Dada la poca información sobre la organización genómica de *Leuconostoc*, resulta de interés caracterizar los plásmidos presentes, para saber si en ellos están codificados los genes de dextransacarasa o alguna función importante, o simplemente para indagar si pueden ser utilizados como vehículos de clonación en *Leuconostoc* y en otras bacterias lácticas. Esto último proporcionaría herramientas moleculares para estudiar este grupo poco caracterizado de bacterias.
- ❖ En el grupo de trabajo se cuenta con una mutante constitutiva de la cepa B-512F obtenida por mutagénesis al azar. Se podría determinar la secuencia de la región promotora de esta cepa, y al compararla con la cepa nativa se podrá obtener mayor información sobre la regulación de este gen y la naturaleza del fenómeno de inducción.
- ❖ Estudiar la expresión del gen *dsr-C* de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 por medio de un análisis de hibridación tipo Northern, así como la determinación del sitio de inicio de transcripción y la caracterización del promotor.
- ❖ Profundizar en el estudio de los mecanismos de inducción de la dextransacarasa. Se podría trabajar con células permeabilizadas para averiguar si el paso limitante en la regulación está a nivel de velocidad de transporte de azúcares hacia dentro de la célula.

- ❖ A partir de los resultados de este trabajo, se sugiere un modelo de regulación positivo en la expresión de la dextransacarasa en *L. mesenteroides*, en el cual un factor regulador, en presencia de sacarosa, actúa como activador de la transcripción de la dextransacarasa. Por lo que otro tópico consistiría en buscar al verdadero inductor y a la supuesta proteína activadora del gen *dsr-S*. Así como identificar la o las regiones del promotor que pudieran ser reconocidas por los factores reguladores.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ◆ Abo, H., T. Matsumura, T. Kodama, H. Ohta, K. Fukui, K. Kato, and H. Kagawa. 1991. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthase). *J. Bacteriol.* 173: 989-996.
- ◆ Alsop, R.M. 1983. Industrial production of dextrans. En: Progress in industrial microbiology. Vol. 18. pp. 1-43. Buschel, M.E. (Ed.). Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Holanda.
- ◆ Argüello-Morales, M. A. 2000. Aislamiento y caracterización de las glucosiltransferasas de *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Tesis Doctoral. INSA-Toulouse.
- ◆ Argüello-Morales, MA., M. Remaud-Simeon, S. Pizzut, P. Sarçabal, R. Willemot and P. Monsan. 2000. Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 81-85.
- ◆ Banas, J.A., R.R. Russell, and J.J. Ferretti. 1990. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.* 58: 667-673.
- ◆ Bandell, M., M.E. Lhotte, C. Marty-Teysset, A. Veyrat, H. Prévost, V. Dartois, C. Diviès, W.N. Konings and J.S. Lolkema. 1998. Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1594-1600.
- ◆ Barefoot, S.F. and C.G. Nettles. 1993. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J.Dairy Sci.* 76: 2366-2379.
- ◆ Bekal, S., J. Van Beeumen, B. Samyn, D. Garmyn, S. Henini, C. Diviès and H. Prévost. 1998. Purification of *Leuconostoc mesenteroides* citrate lyase and cloning and characterization of the *citCDEFG* gene cluster. *J. Bacteriol.* 180: 647-654.
- ◆ Bekal, S., C. Diviès and H. Prévost. 1999. Genetic organization of the *citCDEFG* locus and identification of *mae* and *clyR* genes from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 181: 4411-4416.
- ◆ Biet, F., Y. Cenatiempo and C. Fremaux. 1999. Characterization of pFR18, a small cryptic plasmid from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52, and its use as a food grade vector. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 375-383.
- ◆ Coté, G.L., and J.F. Robyt. 1983. Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1-6), (1-3)- $\alpha$ -D-glucan. *Carbohydr. Res.* 111: 127-142.

- ◆ Chan, B., A. Spassky and S. Busby. 1990. The organization of open complexes between *Escherichia coli* RNA polymerase and DNA fragments carrying promoters either with or without consensus -35 region sequences. *Biochem. J.* 270: 141-148.
- ◆ Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156.
- ◆ Davidson, B.E., N. Kordias, M. Dobos and A.J. Hillier. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 161-183.
- ◆ de Vos, W.M. and Vaughan, E.E. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 217-234.
- ◆ de Vos, W.M. 1996. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70: 223-242.
- ◆ de Vuyst, L. and B. Deggest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.
- ◆ Espinosa-Urgel, M. and A. Tormo. 1993. Sigma s-dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA regions with intrinsic curvature. *Nucleic Acids Res.* 21: 3667-3670
- ◆ Dols, M., M. Remaud-Simeon, R. Willemot, M. Vignon, and P. Monsan. 1997a. Characterization of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Applied Biochem. Biotechnol.* 62: 47-59.
- ◆ Dols, M., W. Chraibi, M. Remaud-Simeon, N.D. Lindley, and P.F. Monsan. 1997b. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2159-2165.
- ◆ Dols, M., M. Remaud-Simeon, R. Willemot, M. Vignon & P. Monsan. 1998. Characterization of the different dextransucrases excreted in glucose, fructose or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1298-1302.
- ◆ Dyson, N.J. 1991. Immobilization of nucleic acids and hybridization analysis. En: *Essential molecular biology. Vol.II* pp. 111-151. T.A. Brown (Ed.). IRL Press. New York, E.U.A.
- ◆ Ellwood, D.C. and I.R. Hamilton. 1982. Properties of *Streptococcus mutans* Ingbritt growing on limiting sucrose in a chemostat: repression of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase transport system. *Infect. Immun.* 36: 576-581.
- ◆ Farrell, R.E. 1993. The Northern blot. En: *RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization.* Pp. 158-173. H.B. Jovanovich (Ed.), Academic Press Co., San Diego, U.S.A.
- ◆ Ferretti, J.J., M.L. Gilpin, and R.R. Russell. 1987. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfe28. *J. Bacteriol.* 169: 4271-4278.

- Funane, K., M. Shiraiwa, K. Hashimoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi. 1993. An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochem.* 32: 13696-13702.
- Funane, K., M. Yamada, M. Shiraiwa, H. Takahara, N. Yamamoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi. 1995. Aggregated forms of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 776-780.
- Funane, K., K. Mizuno, H. Takahara and M. Kobayashi. 2000. Gene encoding a dextransucrase-like protein in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 29-38.
- Garvie, H. 1986. Genus *Leuconostoc*. En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Pp. 1071-1075. Peter H.A. (Ed.). Sneath Willams & Wilkins. USA.
- Giffard, P.M. and N.A. Jacques. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* 73: 1133-1141.
- Giffard, P.M., C.L. Simpson, C.P. Milward and N.A. Jacques. 1991. Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2577-2593.
- Gilmore, K.S., R.R. Russell, and J.J. Ferretti. 1990. Analysis of the *Streptococcus downei gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infect. Immun.* 58: 2452-2458.
- Gilpin, M.L., R.R.B. Russell, and P. Morrissey. 1985. Cloning and expression of two *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in *E. coli* K-12. *Infect. Immun.* 49: 414-416.
- Goodsell, D.S. and R.E. Dickerson. 1994. Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic Acid Res.* 22: 5497-5503.
- Goosen, N and P. van de Putte. 1995. The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol.* 16: 1-7.
- Hamada, S., and H.D. Slade. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* 44: 331-384.
- Harley, C.B., and R.P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15: 2343-2361.
- Hechard, Y., J.M. Berjeaud and Y. Cenatiempo. 1999. Characterization of the *mesB* gene and expression of bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Curr. Microbiol.* 39: 265-269.
- Janda, W.M., and H.K. Kuramitsu. 1976. Regulation of extracellular glucosyltransferase production and the relationship between extracellular and cell-associated activities in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 14: 191-202.



- ◆ Johansen, E. and A. Kibenich. 1992. Isolation and characterization of IS1165, an insertion sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and other lactic acid bacteria. *Plasmid*. 27: 200-206.
- ◆ Kado C.I. and S.T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- ◆ Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49: 209-224.
- ◆ Kim, D., and J.F. Robyt. 1994. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 659-664.
- ◆ Kim, D., and J.F. Robyt. 1995. Dextranucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 1050-1056.
- ◆ Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microb. Rev.* 12: 39-86.
- ◆ Kobayashi, M., and K. Matsuda. 1986. Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biochem.* 100: 615-621.
- ◆ Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- ◆ Lin, J., P. Schmitt and C. Diviès. 1991. Characterization of a citrate-negative mutant of *Leuconostoc mesenteroides* supsp. *mesenteroides*: metabolic and plasmidic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 628-631.
- ◆ Lewin, B. 1997. The operon. Cap. 12. En: *Genes VI*. Pp. 335-393. Oxford University Press, U.S.A.
- ◆ López-Munguía, A., V. Pelenc, M. Remaud, J. Biton, J.M. Michel, C. Lang, F. Paul, and P. Monsan. 1993. Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of aligalternans. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 77-85.
- ◆ Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- ◆ MacGregor, A.E., H.M. Jespersen and B. Svensson. 1996. A circularly permuted  $\alpha$ -amylase type  $\alpha/\beta$  barrel structure in glucan synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* 378: 263-266.
- ◆ Marschall, C., V. Labrousse, M. Kreimer, D. Weichart, A. Kolb and R. Hengge-Aronis. 1998. Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on  $\sigma^s$  and requires activation by cAMP-CRP. *J. Mol. Biol.* 276: 339-353.
- ◆ Marty-Teyssset, C., J. S. Lolkema, P. Schmitt, C. Diviès and W. Konings. 1996. The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and  $\alpha$ -ketocarboxylate transport. *J. Bacteriol.* 178: 6209-6215.

- ◆ McLaughlin, R.E., and J.J. Ferretti. 1996. The multiple-sugar metabolism (*msm*) gene cluster of *Streptococcus mutans* is transcribed as a single operon. **FEMS Microbiol. Lett.** 140: 261-264.
- ◆ Miller, A.W., S.H. Eklund, and J.F. Robyt. 1986. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydr. Res.** 147: 119-133.
- ◆ Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucl. Acid Res.** 16:1215.
- ◆ Monchois, V., A. Reverte, M. Remaud-Simeon, P. Monsan and RM. Willemot. 1998a. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharides synthesis. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:1644-1649.
- ◆ Monchois, V., M. Remaud-Simeon, R.R.B. Russell, P. Monsan and RM. Willemot. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSR S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 465-472.
- ◆ Monchois, V., M. Remaud-Simeon, P. Monsan and RM. Willemot. 1998b. Cloning and sequencing of an extracellular dextransucrase (DSR B) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only  $\alpha(1-6)$  glucan. **FEMS Microb. Lett.** 159: 307-315.
- ◆ Monchois, V., RM. Willemot and P. Monsan. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. **FEMS Microb. Rev.** 23: 131-151.
- ◆ Monchois, V., R. Willemot, M. Remaud-Simeon, C. Croux, and P. Monsan. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only  $\alpha(1-6)$  and  $\alpha(1-3)$  linkages. **Gene.** 182: 23-32.
- ◆ Monsan, P. and F. Paul. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **FEMS Microb. Rev.** 16: 187-192.
- ◆ Mooser, G., S.A. Hefta, R.J. Paxton, J.E. Shively, and T.D. Lee. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferases. **J. Biol. Chem.** 266: 8916-8922.
- ◆ Murpy, N.B., D.J. McConnel & T.F.R. Schwarz. 1987. Expression of the gene for NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* cloned in *E. coli* K-12. **J. Bacteriol.** 169: 334-339.
- ◆ Neely, W.B., and J. Nott. 1962. Dextransucrase, an induced enzyme from *L. mesenteroides*. **Biochemistry.** 1: 1136-1140.
- ◆ Paul, F., E. Oriol, D. Auriol, and P. Monsan. 1986. Acceptor reactions of a highly purified dextransucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled molecular weight dextrans. **Carbohydr. Res.** 149: 433-441.

- ◆ Pagel, J.M., J.W. Winkelman, C.W. Adams and G.W. Hatfield. 1992. DNA topology-mediated regulation of transcription initiation from the tandem promoters of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 224:919-935.
- ◆ Pérez-Martín, J., F. Rojo & V. de Lorenzo. 1994. Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* 58: 268-290.
- ◆ Plaskon, R.R. and R.M. Wartell. 1987. Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters. *Nucleic Acids Res.* 15: 785-796.
- ◆ Priest, F.G. and R.J. Sharp. 1989. Fermentation of Bacilli. En: Fermentation Process Development of Industrial Organisms. Pp. 73-132. J.O. Neway (Ed.). Marcel Dekker, Inc., N. Y., U.S.A.
- ◆ Remaud-Simeon, M., A. López-Munguía, V. Pelenc, F. Paul, and P. Monsan. 1994. Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing  $\alpha$ -(1-2) linkages. *Applied Biochem. Biotechnol.* 44: 101-117.
- ◆ Robyt, J.F., and T.F. Walseth. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr. Res.* 61: 433-445.
- ◆ Robyt, J.F., and T.F. Walseth. 1979. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. *Carbohydr. Res.* 68: 95-111.
- ◆ Russell, R.R.B., M.L. Gilpin, H. Musaka and G. Dougan. 1987. Characterization of glucosyltransferase expressed from a *Streptococcus sobrinus* gene cloned in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 935-944.
- ◆ Saier, M.H. 1996. Regulation of carbon metabolism in bacteria. En: 14<sup>th</sup> Forum in Microbiology. *Res. Microbiol.* 147: 439-587.
- ◆ Sánchez-González, M., A. Alagón, R. Rodríguez-Sotres and A. López-Munguía. 1999. Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microb. Lett.* 181: 25-30.
- ◆ Satchwell, S.C., H.R. Drew and A.A. Travers. 1986. Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA. *J. Mol. Biol.* 191: 659-675.
- ◆ Seymour, F.R., R.D. Knapp, and S.H. Bishop. 1976. Determination of the structure of dextran by C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 51: 179-194.
- ◆ Shimamura, A., Y.J. Nakano, H. Musaka, and H.K. Kuramitsu. 1994. Identification of amino-acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. *J. Bacteriol.* 176: 4845-4850.
- ◆ Simpson, C.L., P.M. Giffard, and N.A. Jacques. 1995. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. *Infect. Immun.* 63: 609-621.

- ◆ Smorawinska, M., and H.K. Kuramitsu. 1995. Primer extension analysis of *Streptococcus mutans* promoter structures. *Oral Microbiol. Immunol.* 10: 188-192.
- ◆ Sumner, J.B., and S.F. Howell. 1935. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54.
- ◆ Towner, P. 1991. Purification of DNA. En: *Essential molecular biology*. Vol.I. Pp. 65-68. T.A. Brown (Ed.). IRL Press. New York, U.S.A.
- ◆ Tsuchiya, H.M., H.J. Koepsell, J. Corman, G. Bryant, M.O. Bogard, V.H. Feger, and R.W. Jackson. 1952. The effect of certain cultural factors on the production of dextransucrases by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 64: 521-527.
- ◆ Valette, P., V. Pelenc, Z. Djouzi, C. Andrieux, F. Paul, P. Monsan & O. Szylit. 1993. Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food. Agric.* 62:121-127.
- ◆ Vadeboncoeur, C. and Pelletier M. 1997. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev.* 19: 187-207.
- ◆ Vaughan, E.E. and W.M. de Vos. 1995. Identification and characterization of the insertion element IS1070 from *Leuconostoc lactis* NZ6009. *Gene.* 155: 95-100.
- ◆ Vaughan, E.E., S. David, A. Harrington, C. Daly, G.F. Fitzgerald and W.M. de Vos. 1995. Characterization of plasmid-encoded citrate permease (*citP*) genes from *Leuconostoc* species reveals high sequence conservation with the *Lactococcus lactis citP* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3172-3176.
- ◆ Wilke-Douglas, M., J.T. Perchorowicz, C.M. Houck, and B.R. Thomas. 1989. Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products. PCT patent WO 89/12386.

# Anexo A

## Metodología para la extracción de DNA total.

---

Partiendo de un volumen inicial de 25 mL de cultivo:

1. Lavar con 1/4 de volumen de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, 1 ó 2 veces.
2. Resuspender en 1/50 de volumen de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.
3. Agregar lisozima (en polvo) a una concentración final de 4 mg/mL. Agregar RNasa.
4. Incubar a 37°C por 0.5 h y otra 0.5 h en hielo.
5. Centrifugar por 5 min a 6,000 rpm y resuspender en 2 mL de buffer de pronasa (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01 M EDTA, 0.5% SDS).
6. Agregar 0.2 mL de SDS al 10% y 0.5 mL de pronasa (1 mg/mL) (Incubar la preparación de pronasa 0.5 h a 37°C antes de agregar).
7. Digerir por 1 h a 37°C.
8. Agregar 1 mL de NaCl 6 M.
9. Agitar suavemente por 15 s.
10. Centrifugar 15 min a 6,000 rpm.
11. El DNA del sobrenadante se extrae con 1 volumen de fenol + 1 volumen de cloroformo.
12. El DNA del sobrenadante se lava con 1 volumen de mezcla cloroformo-isoamílico (24:1).
13. Precipitar con etanol absoluto.
14. Reposo a -20°C por 1 h.
15. Centrifugar y lavar la pastilla con etanol al 70%.
16. Resuspender la pastilla en buffer TE.

# Anexo B

## Metodología para la extracción de DNA plasmídico.

---

Partiendo de un volumen inicial de 25 mL de cultivo:

1. Lavar con 1/4 de volumen de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, 1 ó 2 veces.
2. Resuspender en 1/50 de volumen de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.
3. Agregar lisozima a una concentración final de 4 mg/mL. Agregar RNasa.
4. Incubar a 37°C por 0.5 h y otra 0.5 h en hielo.
5. Centrifugar por 5 min a 6,000 rpm y resuspender en 2 mL de buffer de pronasa (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.01 M EDTA, 0.5% SDS).
6. Agregar 0.5 mL de pronasa (1 mg/mL). Digerir por 1 h a 37°C.
8. Agregar 2.8 mL de solución de lisis (SDS al 3% en Tris 50 mM, pH 12.6).
9. Agitar suavemente por inversión.
10. Incubar 20 min a 50°C.
11. Enfriar en hielo por 15 min.
12. Agregar 2.6 mL de solución de acetato de potasio 3 M, pH 4.8 (ajustado con ácido acético glacial).
13. Reposo en hielo 5 min.
14. Centrifugar a 10000 rpm, 15 min.
15. Precipitar el DNA del sobrenadante con etanol absoluto.
16. Reposo a -20°C por 1 h.
17. Centrifugar y lavar la pastilla con etanol al 70%.
18. Resuspender la pastilla en buffer TE.
19. Limpiar el DNA con 1 volumen de fenol + 1 volumen de cloroformo.
20. El sobrenadante se lava con 1 volumen de mezcla cloroformo-isoamílico (24:1).
21. Volver a precipitar con etanol absoluto, lavar con etanol al 70% y resuspender en buffer TE.

## Metodología para la extracción de RNA total.

---

Todas las soluciones y material deben estar libres de RNasas. El agua debe ser tratada con DEPC al 0.1% y autoclaveada por 1 h. El material de vidrio se debe calentar a 180°C por 8 h. Se debe trabajar con guantes en todo momento.

Soluciones necesarias:

### PBS

NaCl	8 g/L
KCl	0.2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g/L

### Solución desnaturalizante

Tiocianato de guanidinio	4 M
Acetato de sodio (pH 7)	25 mM
N-lauroilsarcosinato de sodio	0.5%
2-mercapto etanol	0.1 M

Ajustar el pH a 7.4 con HCl

### Fenol ácido bidestilado.

Equilibrado con buffer de acetatos pH 4.3

Protocolo:

Partiendo de  $1 \times 10^8$  células,

1. Lavar con 500  $\mu$ L de PBS frío 1 ó 2 veces. Centrifugar a 3000 rpm a 4°C.
2. Resuspender 500  $\mu$ L de PBS frío.
3. Agregar lisozima en polvo a una concentración final de 4 mg/mL. Incubar a 37°C por 0.5 h.
4. Agregar 5  $\mu$ L de Preteinasa K (Boehringer-Manheim). Incubar 20 min en hielo.
5. Agregar 50  $\mu$ L de SDS al 10%. Incubar en hielo 10 min. Luego, 1 h a 37°C y finalmente en hielo 30 min.
6. Vortexear vigorosamente por 30 s.
7. Pasar por una aguja de insulina dos veces.
8. Agregar 200  $\mu$ L de etanol al 95%.
9. Vortexear brevemente.
10. Incubar en hielo 5 min.

**Metodología para la  
extracción de RNA total.**

---

11. Centrifugar a 14,000 rpm, 15 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no desprender la pastilla.
12. Agregar 150 µL de solución desnaturalizante.
13. Disolver la pastilla con vortexeo vigoroso.
14. Agregar 15 µL de acetato de sodio 2 M, pH 4.2 y 150 µL de una mezcla fenol ácido:cloroformo 10:4 (v/v)
15. Vortexear vigorosamente por 15 s. Reposo en hielo 10 min.
16. Centrifugar a 14,000 rpm, 10 min a 4°C.
17. Precipitar el sobrenadante con un volumen de isopropanol.
18. Mezclar invirtiendo el tubo.
19. Reposo a -20°C por 12 h.
20. Centrifugar a 14,000 rpm, 15 min a 4°C.
21. Resuspender la pastilla en 20 µL de agua libre de RNAasas.
22. Cuantificar por absorbancia a 260 nm.
23. Hacer tratamiento con DNAsa I (Amplification grade, Gibco BRL) siguiendo el procedimiento que recomienda al proveedor.
24. Volver a lavar con la mezcla fenol:cloroformo.
25. Precipitar con propanol.
26. Lavar con etanol al 75%
27. Resuspender la pastilla en 20 µL de agua libre de RNAsas.
28. Cuantificar y verificar pureza midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.



## Anexo D

Alineamiento de secuencias del gen *drs-S*  
de *Leuconostoc mesenteroides* con secuencias  
de glucosiltransferasas de *Sreptococcus*.

---

0 downei  
 1 mutans  
 2 salivarius  
 3 sobrinus  
 4 B-512

RELATIONSHIP BETWEEN PAIRS OF SEQUENCES:

lower triangle distance between pairs  
 upper triangle percent homology in alignment

	0	1	2	3	4
0		42	41	46	39
1	2766		44	55	45
2	2628	2666		45	40
3	3092	2622	3125		43
4	3507	2510	3389	3313	

weight of insertion-deletion of length k:  $8 + k*3$   
 number of sequences: 5  
 total number of pairwise comparisons used: 14  
 1793 is the total length of alignment

TABLES OF GENETIC EVENTS:

lower triangle: symmetrized substitutions  
 upper triangle: mutation distance matrix

	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W	B
C		2	4	4	4	3	4	5	6	5	4	4	6	4	4	4	4	3	3	3	4
S	0		1	2	1	1	1	2	3	3	3	3	3	4	4	4	2	3	3	4	1
T	0	104		2	1	2	2	3	3	3	4	3	2	3	3	4	2	4	4	5	2
P	0	10	15		1	2	4	3	3	3	3	3	4	4	4	3	2	3	4	4	3
A	0	82	82	28		1	3	2	2	3	4	4	3	3	4	4	1	3	4	4	2
G	0	43	21	7	29		3	2	2	4	5	3	4	5	4	4	2	4	4	3	2
N	0	63	54	5	25	27		1	2	3	2	3	2	5	4	5	4	4	3	6	0
D	0	39	26	10	40	41	99		1	2	3	4	3	4	5	5	3	5	4	6	1
E	0	12	7	2	37	21	22	50		2	4	3	2	4	5	5	2	4	5	5	0

Q 0 18 24 5 29 9 19 34 37 2 3 2 4 5 4 4 5 4 5 2  
 H 0 2 5 3 3 2 7 12 1 7 2 3 4 4 3 5 4 3 5 2  
 R 0 12 10 3 11 5 8 5 4 16 7 1 4 4 4 4 5 5 4 3  
 K 0 21 48 2 34 17 52 24 28 51 6 24 4 4 4 3 5 5 5 2  
 M 0 1 3 1 5 2 2 0 1 5 0 2 2 2 1 2 3 4 3 4  
 I 0 6 11 1 9 1 7 3 0 4 0 2 14 14 1 4 2 3 3 4  
 L 0 14 17 4 13 3 9 7 11 12 0 3 8 37 50 4 2 3 2 5  
 V 0 32 43 9 65 11 8 5 17 10 2 11 19 10 47 25 2 3 3 2  
 F 0 7 6 5 5 4 4 5 3 2 1 2 4 3 12 21 16 1 3 4  
 Y 0 9 9 1 5 5 11 9 4 7 9 3 8 2 11 19 13 56 3 3  
 W 0 1 2 1 0 2 1 0 0 2 1 2 0 2 3 4 5 4 8 5  
 B 0

INSERTION-DELETIONS :

lengths: 1 2 3 4 5 6 7 9 11 12 13 14 15 17 18 19 22 23 39 48  
 numbers: 28 12 8 2 4 2 2 1 1 1 1 1 3 2 1 3 1 1 1 2

total weight of history: 7860

ALIGNMENT OF SEQUENCES:

M---EKNLRYKHLHKVKKQWVA-----IGVTTVT-LSFLAGGQVVAADTNNNDG-TS 46 0  
 T---QDK-----TV-----TQSNSGT-TASLVTSPPEATKADKR-T-NT 33 2  
 M---EKNERFKMHKVKRWVT-----ISVASATMLASALGASVASADTETV-S-ED 46 3  
 MPFTEKVMRKKLYKVGKSWVVGGVCAFALTASFALATPSVLGDSSVP-DVSANNVQSASDNTTDT-QQNT 68 4  
 M---EKKVREKLRKVKRWVTVS-----IASAVVT-LTSLSGSLVKADSTDDR-QQAV 48 1  
  
 VQVNMVPSDPKF-----DAQAQNQLAQAMFKAANQA-----DQTATSQVSPAT 91 0  
 KEADVLTPAKETN-----AVETATTTINTQATAEAA-----TTATTADVAV 73 2  
 SNQAVLTADQTTTINQDTEQTSVAATATSEQSASTDAATD-----QASATDQASAAE 97 3  
 TVTEENDKVQSAATNDNVTTAASDTTQASADNNVTEKQSDHALDNEKVDNKQDEVAQTNVTSKNEESAVA 138 4  
 TESQASLVTTSEAAKETLTATDTSTATSATSQPTATVID-----NVSTTNQSTNTT 99 1

DGRVDNQVTPAANQPAANVANQD-----VANPATDAG 123 0  
 AAVENKEAVVTTDAPAVTTEKAE-----EQPATVKAE 105 2  
 QTQGITASTDTAAQTITNANEAK-----WVPTENENQ 129 3  
 STDTDPAETTTIDETQOVVSGKYVEKDGSWYYYFDDGKNAKGLSTIDNNIQYFYESGKQAKGQYVTIDNQTY 208 4  
 ANTANFVVKP'TTTSEQAKTDNSDK-----IITTSKAVNRLT-----ATGKFVPANNNTA 148 1

----ALN-----RQSAADTSTDGKAVPQTSQDPGH-----LETVDGKTYVDANGQ 165 0  
 ----VVN-----TEVKAPEAALKDSEVEAALS LKN-----IKNIDGKYYYYVNEDGS 147 2  
 ----VFTDEM-----LAEAKNVATAESNSIPSDLAKMSN-----VKQVDGKYYYYDQDGN 175 3  
 YFDKSGDELITGLQSIDGNI VAFNDEGQQIFNQYYQSENGTYYFDDKGHAATGIKNI EGKNYYFDNLGQ 278 4  
 H-PKTVTDKIVP IKPKIGK LKQPSSLSQDDLAALGWKN-----IRKVNKYYYYKEDGT 202 1  
 \*\* \*\* \*

RLKNYSMVIDGKTYFYFD-GQTGEAQTDLPKTGQANQDN---V--PDSYQANNQAYSNEASSFETVDNYLT 229 0  
 HKENFAITVNGQLLYFG-KDGALTSSTYSFPTPGTTNI---V--DGFSINNRAYDSSEAS-FELIDGYLT 210 2  
 VKKNFAVSVGEKIYYFD-ETGAYKDTSKVEADKSGSDI SKEE--TTFANNRAYSTSAEN-FEADNYLT 241 3  
 LKKGFSGVIDGQIMTFDQETGQEVSNITSEIKEGLTTO---N--TDYSEHNAAHGTD AED-FENIDGYLT 342 4  
 LQKNYALNINGKTFFFD-ETGALSNNITLPSKKGNI TNN---DNINSFAQYNQVYSTDVAN-FEHVDHYLT 267 1  
 \* \* \*\* \* \*\* \*

ADSWYRPRKILKNGQSWQASSEGDLRPTIMTIWWPDAATKAAYANFWA--KEGLISGSYRONS--ANLDA 295 0  
 ADSWYRPASIKDGVWQASTAEDFRPLIMAWWPNDTQVNYLNYS--KVFNLDAKYSSTDKQETLKVA 278 2  
 ADSWYRPKSILKDGKTWTESSKDDFRPLIMAWWPDTETKRNYYNMYN--KVVGIDKTYTAETSQADLTAA 309 3  
 ASSWYRPTGILLRNGTDWEPSTDIDFRPILSVWWPDKNTQVNYLNYMADLGFISNADSFETGDSQSLLNEA 412 4  
 AESWYRPKYILKDGKTWITQSTEKDFRPLIMTIWWPQDETQRQVNYMN--AQLGIHQTYNTATSPLQLNLA 335 1  
 \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

TQNIQSAIEKTIASEGNINWLRDKMSQFVKSQNQS LASENETVYPNQDHMQGALLFSNSKD-TEHANS 364 0  
 AKDIQIKIEQKIQA EKSTQWLRETI SAFVKTPQOWNKETENYSKGGGEDHLQGGALLYVND SR-TPWANS 347 2  
 AELVQARIEQKITTEQNTKWLREI SAFVKTPQOWNGESEK-----PYDDHLQNGALKFDNQSDLTPTDQS 375 3  
 SNYVQKSIEMKIS AQQSTEWLKDAMA AFIVAQPQWNETSED-----MSNDHLQNGALTYVNSP-LTPDANS 477 4  
 AQTIQTKIEEKITAEKNINWLRQTI SAFVKTPQSAWNSDSEK-----PFDDHLQKGALLYSNNSKLT SQANS 401 1  
 \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

DWRLINRNPTEQTGK-----QK---Y-----FTTNYAGYELL L LANDVDNSNPVVQAEQLNHLHYLMNW 419 0  
 DYRRLNRTATNQTGTIDKSILDEQ---S-----DPNHMGGFDFLLANDVDLSNPVVQAEQLNQIHYLMNW 409 2  
 NYRLLNRTPTNQTGS-----LD---SRETYNANDPLGGYELL L LANDVDNSNP IVQAEQLNWLHYLLNF 435 3  
 NERLLNRTPTNQTGE-----QA--YN-----LDNSKGGFELL L LANDVDNSNPVVQAEQLNWLHYLLMNF 533 4  
 NYRLLNRTPTNQTGK-----KDPRYT-----ADRTIGGYEFL L LANDVDNSNPVVQAEQLNWLHFLMNF 459 1  
 \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*





4  
VEDGKGYVY-YSTSGNQAKNAFI--SLGNNWYYFDNNGYMTGA--QSINGANYYFLSNGIQLRNAIYDNG 1164  
1

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

KKAYYYDDNGRIWTNKGFVEFRVDG-----QDK-----WRYF 1153

0

NGNTYLYNSKQMYKGGYTKFDVSE-----TDKDGKESK-----VVKFRYF 1203

2

QGQNHYYGNDGKRYENGYQQFGNDSWRYFKNGVMALGLITVDGHVQYFDKDGVOAKDKIIVTRDGKVRVF 1207

3

DGTIVYFDKKGHQVFDQYITDQNGN-----A-----YYFD 1261

4

NKVLSSYYGNDGRRYENGYLLFGQQW-----R-----YF-- 1192

1

N-----GDGTIAIGLVSLDNRTLIFDAYGYQVKGQTVTIN-GKSYTFDADQG 1199

0

T-----NEGVMAKGVTVIDGFTQYFGEDEGFQAKDKLVTFK-GKTYFFDAHTG 1249

2

DQHNGNAVINTFVADKTGHWYLLGKDGVAVTGAQTIVGQHLIFEANGQQVKGDFVTAKDGKLYFYDVDSG 1277

3

D-----AGVMLKSLATIDGHQQYFDQNGVQVKDFVIGTDGYKYFEPGSG 1308

4

-----QNGIMAVGLTRVHGAVQYFDASGFQAKGQFITTADGKLRVDRDSG 1238

1

\* \* \* \* \*

D-----LVQTDNANPAPQGGAGWKLLEDNQWYRK----- 1229

0

NGIKDT-WRNINGKWYFDANGVAATGAQVINGQKLYFNEDGSQVKGGVVKNADGTYSKYKEGFGELVTN 1318

2

DMWINTFIEDKAGNWFYLGKDGAAVTGAQTIKGQKLYFKANGQQVKGDIVKDADGKIRYYDAQTGEQVFN 1347

3

NLAILRYVQNSKNQWFYFDGNGHAVTGFQTINGKKQYFYNDGHQSKGEFIDADGDTF-YTSATDGRLVTG 1377

4

NQISNRFVRNSKGEWFLFDHNGVAVTGTVTFNGQRLYFKPNGVQAKGEFIRDANG----- 1293

1

\* \* \*

-----DGQLLTG 1236

0

EFFTTDGNVWYYAGA-----NGKTVTG 1340

2

KSVSVNGKTYFVSGDGTQATQANPKGQTFKDGSGVLRFYNLEGQYVSGSGWYETAHEHWVYVKS GKVL TG 1417  
 3  
 VQKINGITYAFDNTG-----NLITNQY 1399  
 4  
 -----YLRYYDPNSG-----NEVRNRF 1310  
 1

EQTIDGQKVFFQDNGVQVKGGTATDASGVLRFYDRDQGHQVKGWYSTSDDNWVYVNES----- 1295  
 0  
 AQVINGQHLFYFNADGSQVKGGVVKADGTYSKYNASTGERLTNEFFTTGDNNWYYIGAN----- 1399  
 2  
 AQTIGNQRVYFKDNHGHQVKGQLVTGNDGKLRYYDANSGDQAFNKSVTVNGKTYFVSGDGTQATQANPKGQ 1487  
 3  
 YQLADGKYMLLDDSGRAKTGFVL--QDGVLRFYFDQNGEQVKDAIIVDPDTNLSYYFNAT----- 1456  
 4  
 VRNSKGEWFLFDHNGIAVTGARV--VNG-----HASILSLMVFRL----- 1348  
 1

\* \* \*

-----GQVLTGLQTFIDGQTVYFDDKGIQAKGKAVWDEN 1328  
 0  
 -----GKSVTGEVKIGDDTYFFAKDGKQVKGQTVSAGN 1432  
 2  
 TFKDGSGVLRFYNLEGQYVSGSGWYKNAQGQWLYVKDGKVLTLGLQTVGNQKVYFDKNGIQAKGKAVRTSD 1557  
 3  
 -----QGVAVKNDYFEYQGNWYLTADANYQLIKGFKAVD 1489  
 4  
 -----RESSLQSVKVVSNMILIPEMKFVIVMMENKIH 1381  
 1

GNLRVFDADSGNMLRDRWK-NVDGNWY-YFNRNGLATRW---- 1365 0  
 GRISYYYGDSGKRAVSTWI-EIQPGVYVYFDKNGLAYPPRVLN 1474 2  
 GKVRVFDENSGSMITNQWK-FVYGQYY-YFGSDG-AAVYRGWN 1597 3  
 DSLQHFHEVTGVQTKDSALISAQKVY-QFDNNG-NAVS---A 1527 4  
 YKLHKVKKQWVTIAVASVALATVVGGL-SVTTSS-VSAD---E 1419 1

number of completely conserved sites: 318



## Anexo E

**Secuencias de los productos de amplificación  
de los extremos 3' del cDNA obtenido  
a partir del mRNA del gen *drs-S*  
de *L. mesenteroides* NRRL B-512F.**

---



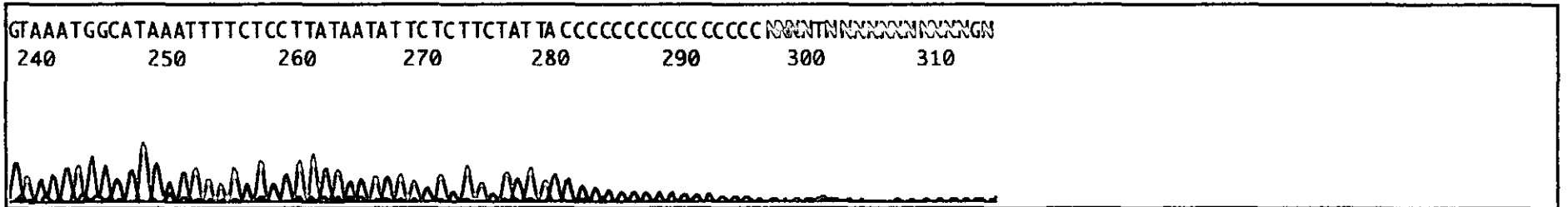
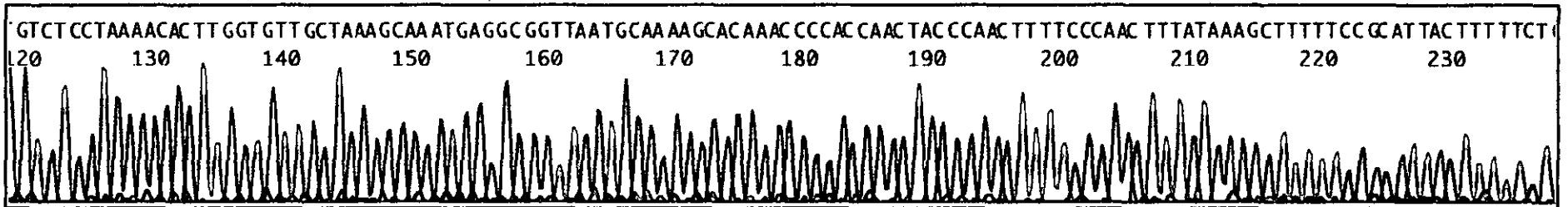
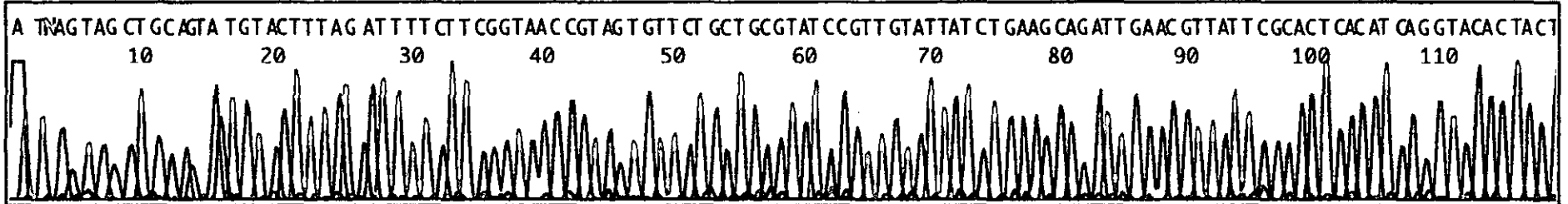


Model 310  
Version 3.0  
SemiAdaptive  
Version 3.0

"F"/PII  
Maricarmen Quirasco  
536  
Lane 2

Signal G:840 A:533 T:663 C:567  
DT POP6{BD Set-Any Primer}  
dRhod matrix  
Points 1202 to 5200 Base 1: 1202

Page 1 of 1  
Wed, Dec 16, 1998 10:48 AM  
Tue, Dec 15, 1998 6:43 PM  
Spacing: 12.49(12.48)



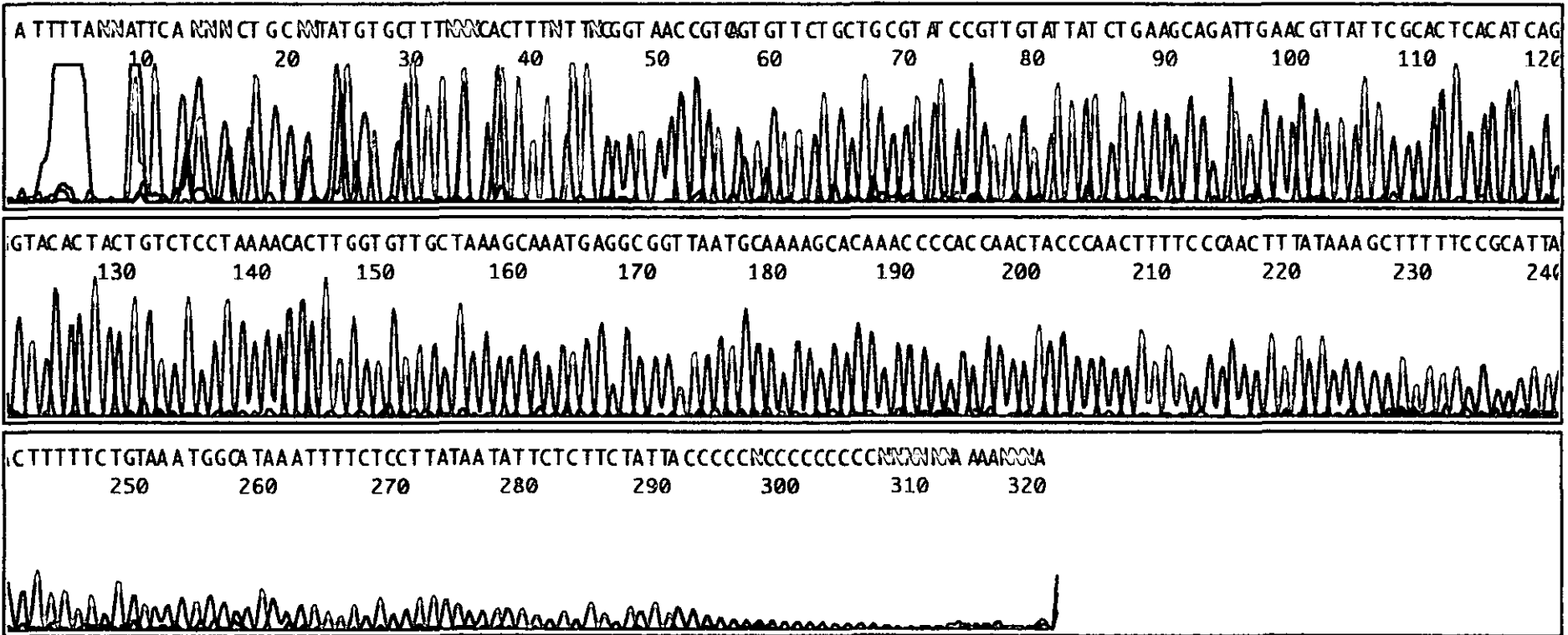


Model 310  
Version 3.0  
SemiAdaptive  
Version 3.0

"X"/PII  
Maricarmen Quirasco  
537  
Lane 2

Signal G:1749 A:1187 T:1750 C:1144  
DT POP6(BD Set-Any Primer}  
dRhod matrix  
Points 1160 to 5250 Base 1: 300

Page 1 of 1  
Tue, Dec 15, 1998 4:23 PM  
Tue, Dec 15, 1998 12:52 PM  
Spacing: 12.49(12.48)



## Anexo F

Induction and transcription studies of the  
dextransucrase gene in *Leuconostoc*  
*mesenteroides* NRRL B-512F.

Quirasco, M., A. López-Munguía, M. Remaud-  
Simeon, P. Monsan and A. Farrés.

Appl. Environ. Microbiol. 1999. 65: 5504-5509.

---

## Induction and Transcription Studies of the Dextranucrase Gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

M. QUIRASCO,<sup>1</sup> A. LÓPEZ-MUNGUÍA,<sup>2</sup> M. REMAUD-SIMEON,<sup>3</sup> P. MONSAN,<sup>3</sup> AND A. FARRÉS<sup>1\*</sup>

*Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510 Federal District,<sup>1</sup> and Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62250 Cuernavaca, Morelos,<sup>2</sup> Mexico, and Centre de Bioingénierie Gilbert Durand, Institut National des Sciences Appliquées, 31 077 Toulouse Cedex, France<sup>3</sup>*

Received 7 June 1999/Accepted 8 September 1999

Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F in media containing carbon sources other than sucrose is reported for the first time. Dextranucrases were analyzed by gel electrophoresis and by an in situ activity assay. Their polymers and acceptor reaction products were also compared by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques, respectively. From these analyses, it was found that, independently of the carbon source, *L. mesenteroides* NRRL B-512F produced dextranucrases of the same size and product specificity. The 5' ends of dextranucrase mRNAs isolated from cells grown under different culture conditions were identical. Based on this evidence, we conclude that dextranucrases obtained from cells grown on the various carbon sources result from the transcription of the same gene. The control of expression occurs at this level. The low dextranucrase yields from cultures in D-glucose or D-fructose and the enhancement of dextranucrase gene transcription in the presence of sucrose suggest that an activating phenomenon may be involved in the expression mechanism. Dextranucrase mRNA has a size of approximately 4.8 kb, indicating that the gene is located in a monocistronic operon. The transcription start point was localized 34 bp upstream from the ATG start codon. The -10 and -35 sequences found, TATAAT and TTTACA, were highly homologous to the only glycosyltransferase promoter sequence reported for lactic acid bacteria.

Dextranucrases (DS) (EC 2.4.1.5.) are enzymes that transfer the glucosyl moiety from sucrose to acceptor molecules, with a concomitant fructose release. They are used in the synthesis of dextran. In the presence of sucrose and an acceptor like maltose, they synthesize gluco-oligosaccharides (25). Dextran and dextran derivatives have found several valuable applications in the production of fine chemicals such as plasma substitutes and Sephadex. Particularly, gluco-oligosaccharides are used as specialty sugars in the food and cosmetic industries (21).

Several lactic acid bacteria produce DS. Expression is constitutive in *Streptococcus* strains, while it is inducible in *Leuconostoc* strains (8). Until now sucrose has been considered to be the only inducer of DS expression in *Leuconostoc* spp. (32). No gratuitous inducers are known, and the mechanism of DS induction has not yet been reported.

Sugar metabolism in the genus *Leuconostoc* is heterofermentative. When sucrose is used as a carbon source, a specific permease is responsible for its transport into the cell, where it is transformed by sucrose-phosphorylase into fructose and glucose-1-phosphate. The latter is incorporated into the phosphoketolase pathway as glucose-6-phosphate by the action of a mutase, while fructose is excreted to the culture medium (3). Extracellular DS also uses sucrose for dextran production, with additional fructose liberation. When sucrose is depleted, the accumulated fructose is consumed (23, 32).

*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F produces an extracellular DS that synthesizes a soluble polymer, 95% of

which is composed of  $\alpha$ -(1-6) linkages in the main chain and 5% of which is composed of  $\alpha$ -(1-3) branched linkages. Only one DS gene in this strain has been reported (33), while DS has been found in multiple forms of different molecular weights (8, 13, 18). There is insufficient genetic evidence to explain if the various proteins found result from the expression of different genes or from posttranslational modifications. There is no information concerning either the DS gene regulation mechanism or the characterization of the transcript. Although constitutive mutants have been obtained by nonspecific mutation strategies (8, 11, 12), the identification of the promoter region in *L. mesenteroides* DS would allow the construction of constitutive strains by site-directed mutagenesis.

In lactic acid bacteria, some metabolically related genes are organized in clusters or polycistronic operons that are regulated simultaneously (9, 17). Sucrose induces both DS and sucrose-phosphorylase genes in *Leuconostoc*. However, biochemical data support the fact that these enzymes are induced at different stages during fermentation (3). In this work, genetic evidence to elucidate if both genes are under the control of the same promoter is given. In addition, the production of DS from *L. mesenteroides* NRRL B-512F under different induction conditions is examined. Through the isolation and characterization of mRNA, molecular information on the transcript is also provided.

### MATERIALS AND METHODS

**Strain conditions.** *L. mesenteroides* NRRL B-512F was kindly provided by the Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria, Ill. Three successive cultures were carried out with each of the various carbon sources (see culture conditions). Cells from the exponential growth phase of the third culture were stored in 15% (wt/vol) glycerol at -20°C and used to inoculate subsequent cultures.

**Culture conditions.** *L. mesenteroides* was cultured in 100-ml flasks on a rotary shaker at 200 rpm in the standard medium reported by Dols et al. (3) at 25°C

\* Corresponding author. Mailing address: Depto. Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 04510, Mexico. Phone: (52) 56-22-53-05. Fax: (52) 56-22-53-29. E-mail: farres@servidor.unam.mx.

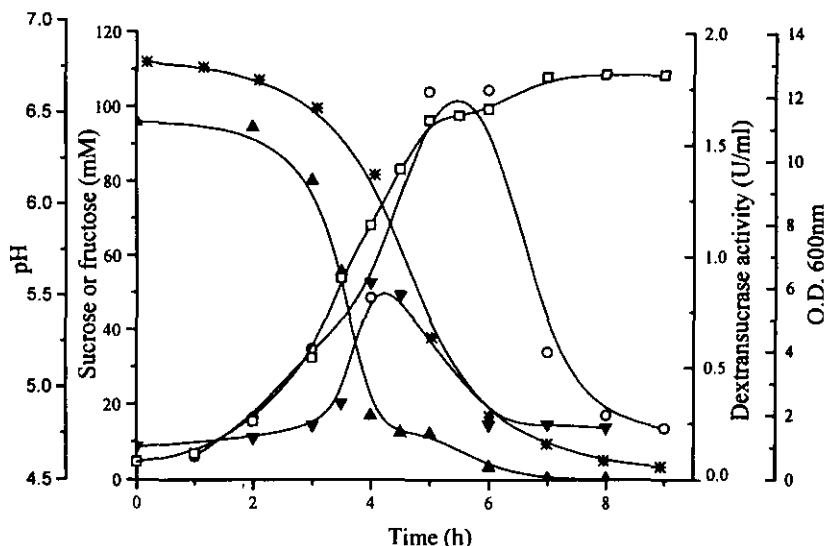


FIG. 1. Batch fermentation profile of *L. mesenteroides* NRRL B-512F under standard conditions at 29°C. ▲, sucrose; ▼, fructose; \*, pH; O, DS activity; □, optical density (O.D.).

unless otherwise specified. For cultures grown with other carbon sources, sucrose was replaced by (i) D-glucose, (ii) equimolar quantities of D-fructose and D-glucose, (iii) D-fructose, and (iv) D-xylose (all purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). The carbon source concentration was 50 or 117 mM, as specified below. In induction studies, 50 mM fructose cultures were grown until the mid-logarithmic phase was reached. At this point, 1.8 M sucrose was added to obtain a final concentration ranging from 1 to 102 mM.

**Biomass measurements.** Bacterial growth was estimated by measuring the absorbance at 600 nm. The optical density value was converted to CFU by means of a calibration graph constructed during the culture on each carbon source. CFU were determined after a 24-h cultivation in plate count agar.

**DS recovery and assay.** After cell removal, the pH was adjusted to 5.2 and the supernatant was filtered through a membrane with a pore size cutoff of 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Subsequently, DS was concentrated by aqueous two-phase partition with 25% (wt/vol) polyethylene glycol 1500 (24). One-half percent dextran T 70 (Sigma) was included in supernatants produced from carbon sources other than sucrose. After centrifugation ( $7,000 \times g$ , 20 min, 4°C), the pellet was dispersed in 20 mM acetate buffer (pH 5.4) and DS activity was measured by monitoring the release of reducing sugars by a 3,5-dinitrosalicylic acid assay (31). One unit of DS activity is defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu\text{mol}$  of fructose per min from a 100-g  $\cdot$  liter $^{-1}$  sucrose solution at 30°C in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 0.05 g of  $\text{CaCl}_2$  and 1 g of  $\text{NaN}_3 \cdot \text{liter}^{-1}$ . Specific activity is given as units per gram of total culture protein. Protein was determined after precipitation with 10% (wt/vol) trichloroacetic acid, followed by dispersion in 0.1 N NaOH. Quantification of the soluble proteins was made as described by Lowry et al. (16), with bovine serum albumin as a standard. Unless otherwise specified, all experiments were carried out in triplicate. The variation coefficients were less than 5% in all cases.

**Protein electrophoresis and in situ activity analysis.** Supernatants from D-glucose and D-fructose cultures were concentrated approximately 40 times by centrifugal ultrafiltration with Centricon 30 tubes (Amicon Inc., Lexington, Mass.). DS from sucrose cultures was analyzed without further concentration. Protein samples were applied in parallel to sodium dodecyl sulfate (SDS)-7% polyacrylamide gels (14). After electrophoresis at a constant current of 30 mA, the gel was cut in two and one-half was stained with Coomassie R-250. The molecular mass was estimated with the High Range SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) molecular weight standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.). The other half of the gel was washed and incubated in the presence of sucrose for the in situ DS assay as previously described (20). For a specific levansucrase assay, raffinose was used as a substrate instead of sucrose.

**Oligosaccharide and dextran synthesis.** Oligosaccharide synthesis was carried out at 30°C with 100 g of sucrose  $\cdot$  liter $^{-1}$  and 33.3 g of maltose  $\cdot$  liter $^{-1}$  in a solution of 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 0.05 g of  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{liter}^{-1}$ , 1 g of  $\text{NaN}_3 \cdot \text{liter}^{-1}$ , and 0.25 U of DS. For dextran synthesis a reaction mixture with the same composition, but lacking maltose, was used. In all cases, DS was inactivated at 75°C.

**Carbohydrate analysis.** D-Glucose and D-fructose concentrations were determined by an enzymatic UV method (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Sucrose was determined by the same method after treatment with invertase (Sigma). Oligosaccharide analysis was carried out by high-pressure

liquid chromatography (HPLC) in a Waters-Millipore  $\text{C}_{18}$  column equipped with a refractive index detector as previously described (19). Dextran analysis was performed after polymer precipitation with 2 volumes of absolute ethanol; the pellet was recovered by centrifugation and washed three times with deionized water before being freeze-dried.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of the polymer were obtained with an AC300 Bruker spectrometer, at 75.4768 MHz, as described by Dols et al. (4). The chemical shifts were assigned to each carbon according to the method of Seymour et al. (27).

**RNA isolation and hybridization analysis.** For RNA isolation,  $10^9$  cells were washed twice and incubated for 30 min at 37°C with  $4 \times 10^{-3}$  mg of lysozyme (Sigma)  $\mu\text{l}^{-1}$  and for 1 h with 1% (vol/vol) proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH). The isolation procedure was then continued by following the guanidinium thiocyanate method (2) in combination with acidic phenol extraction and treatment with DNase I (amplification grade; Gibco BRL, Rockville, Md.). The molecular weight marker (RNA ladder; Gibco BRL) and 7  $\mu\text{g}$  of total RNA of each sample were separated by electrophoresis with a denaturing formaldehyde-agarose system. Afterwards, the samples were transferred and fixed to a Hybond N nylon membrane (Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.) by applying the standard procedure (5). RNA blotted membranes were hybridized according to the manufacturer's instructions with 10 to 20 ng of the DNA probe labeled with  $^{32}\text{P}$  by using the Megaprime DNA labeling system (Amersham). The probe was obtained from the *L. mesenteroides* NRRL B-512F DS gene described by Wilke-Douglas et al. (33) (Calgene Inc., Davis, Calif.) after digestion with *SalI* and *NdeI* (Gibco BRL). The enzyme digestion gave one 1.13-kb fragment that includes the region encoding the catalytic domain previously reported (7, 22, 28).

**mRNA 5'-end determination.** RNA analysis was carried out with the system for rapid amplification of cDNA 5' ends (Gibco BRL) by following the manufacturer's procedure, which consists of cDNA synthesis and cDNA 3'-end amplification by PCR. cDNA was obtained with Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL) and the synthetic oligonucleotide 5'-GATCCGTGAATGCA TACCCG-3', which is complementary to a conserved sequence in the N-terminal region of the DS gene (33). cDNA 3' ends were amplified with *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL) and the gene-specific primer shown in Fig. 5. The PCR amplification conditions were one cycle of 94°C for 1 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and one final cycle of 72°C for 5 min. The reaction products were purified with a High Pure PCR product purification kit (Boehringer Mannheim GmbH) before being sequenced.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The following accession numbers have been assigned by the EMBL nucleotide sequence database: AJ250903 and AJ250904 (artificial oligonucleotide complementary primer used for gene sequence and oligonucleotide sequence used for the rapid amplification of cDNA 5' ends, respectively).

## RESULTS

***L. mesenteroides* NRRL B-512F DS synthesis with several carbon sources.** Batch fermentation evolution under standard DS production conditions (29°C and 117 mM sucrose) is shown

TABLE 1. DS production in *L. mesenteroides* NRRL B-512F grown with different carbon sources<sup>a</sup>

Carbon source (117 mM)	DS activity (U · mg of protein <sup>-1</sup> )	Production (fold)
D-Xylose	0.005	1
D-Glucose	0.039	8
D-Fructose	0.050	10
D-Glucose + D-fructose	0.104	21
Sucrose	2.390	478

<sup>a</sup> Cells were cultured at 25°C. Activity was measured after the late exponential growth phase. Supernatants were concentrated 40-fold.

in Fig. 1. Fructose was released during the first four hours and was later consumed once sucrose was depleted. DS activity reached a maximum of 1.8 U · ml<sup>-1</sup> at the end of the exponential growth phase, followed by a remarkable decrease in activity closely related to culture acidification.

The effects of different carbon sources on DS production were studied at 25°C to minimize enzyme deactivation. At this temperature, a mean generation time of 1 h was determined for sucrose cultures. DS activity was found in all the concentrated supernatants (Table 1). Final pHs ranged between 5.5 and 6.7 in all cases.

**Protein characterization.** Electrophoretic analyses were performed with supernatants, with glucose or fructose as carbon sources, and in situ activity assays were carried out to distinguish protein bands able to synthesize a polymer from sucrose. A supernatant obtained under the standard DS production conditions was used as a reference (Fig. 2, lane 1). In the stained gel, two high-molecular-mass bands can be observed (Fig. 2A): an intense band of 170 kDa and a faint one of 160 kDa. Protein profiles after Coomassie staining of proteins from glucose or fructose supernatants were similar to the one from the sucrose culture. After the in situ activity assay was performed (Fig. 2B), two bands of 170 and 116 kDa with polymer-synthesizing activity could be observed (lanes 2, 3, and 4). An additional low-activity band of 160 kDa could be observed in lane 4, and faint bands of 97 kDa were also observed (lanes 2 and 3). While the 170- and 160-kDa bands were distinguished

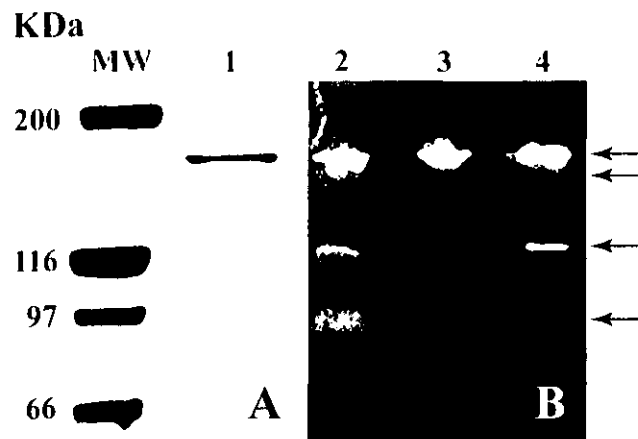


FIG. 2. SDS-PAGE analysis of *L. mesenteroides* NRRL B-512F DS obtained from cells grown with different carbon sources. (A) Coomassie blue-stained gel. Lane MW, molecular mass markers; lane 1, supernatant from sucrose. (B) In situ polymer production from sucrose. Lane 2, supernatants from fructose culture; lane 3, supernatant from glucose culture; lane 4, supernatant from sucrose culture.

TABLE 2. *L. mesenteroides* NRRL B-512F DS production in fructose medium with sucrose addition at the mid-logarithmic stage

Concn (mM) of:		DS activity (U · mg of protein <sup>-1</sup> )
D-Fructose	Sucrose	
50		0
50	1	0.005 <sup>a</sup>
50	10	0.013 <sup>a</sup>
50	50	0.105 <sup>a</sup>
50	102	1.930 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Activity measured after 3 h of sucrose addition. All cells were cultured at 25°C.

after incubation for 24 h, longer incubation times were required to observe the 116- and 97-kDa activity bands.

**Analysis of the DS products.** The dextran <sup>13</sup>C-NMR analysis and the HPLC profile of the acceptor products synthesized by the enzymes obtained from sucrose, fructose, or glucose medium are shown (Fig. 3). It may be observed that the oligosaccharide profile and the polymer structures are the same.

**Induction experiments.** In order to explore the induction effect of sucrose, *L. mesenteroides* was initially grown under low-level-enzyme-producing conditions with D-fructose, D-glucose, and D-xylose as carbon sources. At the mid-logarithmic stage the cells were washed and transferred to a fresh 117 mM sucrose standard medium for DS production. Appropriate cell densities were reached in order to allow the comparison of results. Before sucrose induction, the highest activity obtained was 0.011 U · mg of protein<sup>-1</sup>, corresponding to the cells grown in glucose. In all cases, the DS activity was increased after the transfer to the sucrose medium and it could be detected only after 3 h of incubation with sucrose. The highest activity was obtained from cells first grown in xylose (0.569 U · mg of protein<sup>-1</sup>), while the lowest DS expression was observed when the cells were initially grown in fructose.

Different amounts of sucrose were added directly to fructose cultures, in order to study the sucrose level that is required to induce DS activity (Table 2). It may be observed that large amounts of sucrose (102 mM) are needed to obtain the maximum level of activity. This is 20% less than the level obtained in cultures where the cells were always grown in sucrose (refer also to Table 1).

**DS transcription analysis.** In order to evaluate the DS messenger in terms of size and level, total RNA was extracted from cells grown under different culture conditions and analyzed by Northern blotting. Well-defined rRNA bands were observed in the denaturing gel (Fig. 4A), indicating a good RNA preparation quality. The hybridization analysis (Fig. 4B) showed that the size of the DS mRNA was approximately 4.8 kb and that the highest concentration was found in the exponential growth phase of the sucrose culture. A fainter hybridization signal was observed in the sample obtained from the lag phase of the same culture. Hybridization bands were not observed for RNA samples from cells grown in alternative sugars and stationary-phase sucrose-grown cultures. They became visible after a longer time exposure, at which time the hybridization signal from the log-phase sucrose culture RNA was extremely high (results not shown).

In order to determine the promoter sequence of the DS gene, the 5' ends of the mRNA were analyzed by rapid amplification of cDNA 5' ends. This method is adequate for analyzing traces of mRNA, as with the messenger extracted from cells grown in fructose or xylose. The 5' ends of the transcripts were compared with the ones obtained from cells



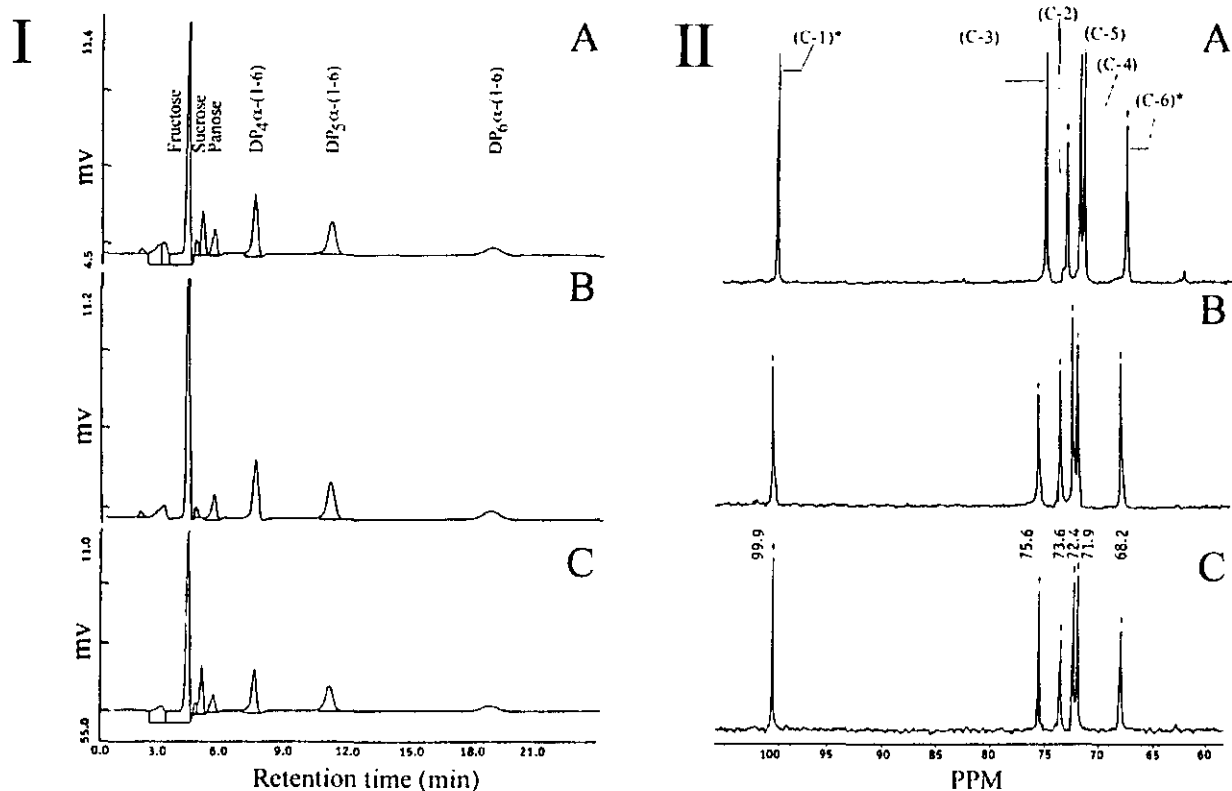


FIG. 3. Analysis of products synthesized by DS obtained from cells grown in fructose (A), glucose (B), and sucrose (C). (Graphs I) HPLC chromatogram of the oligosaccharides produced. These are designated DP<sub>n</sub>, with n being the oligosaccharide degree of polymerization (DP). (Graphs II) <sup>13</sup>C-NMR spectra of dextran synthesized. \*, Carbons involved in the α-(1-6) linkage. Reaction and analysis conditions are reported in Materials and Methods. mv, millivolts.

grown in sucrose. According to the PCR sequencing analysis, it was verified that under the three conditions, the sequences of the 5' ends of the messengers were the same (Fig. 5).

## DISCUSSION

DS yields obtained with *L. mesenteroides* NRRL B-512F grown in sucrose were similar to what has been reported previously (8). An important loss of activity occurred when the pH fell to values that were lower than 5.0 because DS are active in a pH range between 4.8 and 6.2 (18). The results presented here demonstrate that there is a substantial reduction in DS mRNA expression at this moment. Therefore, it may be concluded that at this stage there is activity loss due to enzyme inactivation, which is irreversible according to Miller et al. (18), but also due to the absence of DS gene transcription.

The experiments whose results are reported in Table 1 demonstrate the evident inducing role of sucrose. However, a low-level-induction effect of D-glucose and D-fructose was observed, since DS activities could be detected in the concentrated supernatants. The enzyme yield obtained when D-xylose was used as the carbon source represents the basal DS level. The different enzyme concentration obtained from the cultures with sucrose compared to that of the glucose-fructose mixture might indicate a selectivity difference in the regulatory mechanism. It is interesting that xylose in *Leuconostoc* is assimilated through D-xylulose-5P but that glucose or fructose is assimilated through the phosphoketolase pathway (3). Moreover, as mentioned before, the sucrose uptake pathway differs in its

first steps from that of fructose and glucose metabolism. Therefore, differences in enzyme activity might be explained by the presence of a metabolite that plays a role as an activator of gene expression. A molecule involved in the initial sucrose uptake or initial metabolic steps may be such an activator.

It was verified that the main protein bands found in supernatants of all carbon sources studied are DS. The protein of 170 kDa corresponds to the product of the gene described by Wilke-Douglas et al. (33), and the 160-kDa protein corresponds to a DS previously reported (8, 18). We have recently found a very low proteolytic activity in this strain, which could be detected in the concentrated supernatant (26). This result suggests that the 160-kDa band may be produced from digestion of the original 170-kDa protein. The 116- and 97-kDa proteins correspond to levansucrases. This fact was verified with raffinose (specific levansucrase substrate) in an in situ assay, where only these bands were observed (result not shown). Levansucrases of the same molecular mass were also reported by Miller et al. (18). Due to the very small amount of levansucrase, the polymer production was observed only after several days of incubation.

From the analyses of the DS products (dextran and oligosaccharides), it may be concluded that the enzymes obtained in media with different carbon sources have the same specificity. That is, the <sup>13</sup>C-NMR spectra of the polymers synthesized with each DS were similar to that of an α-(1-6)-linked linear dextran (20). In all three enzymes, glucosyl is specifically transferred to maltose, producing a series of α-(1-6)-linked oligosaccharides. Accordingly, we conclude that the enzymes obtained in media with different carbon sources are the same in

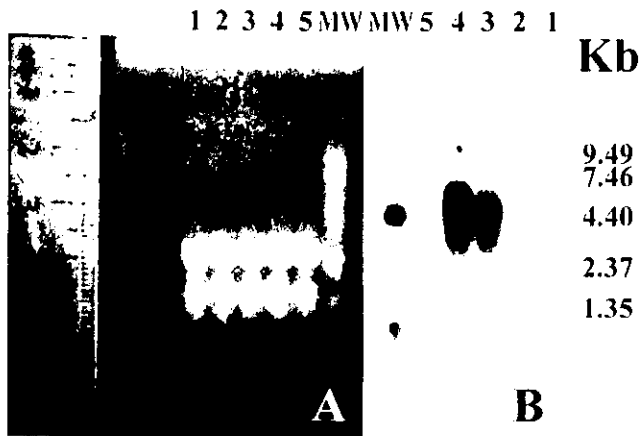


FIG. 4. Analysis of RNA samples extracted from cells grown in fructose (lanes 1), glucose (lanes 2), sucrose lag phase (lanes 3), sucrose log phase (lanes 4), and sucrose stationary phase (lanes 5). (A) Total RNA denaturing formaldehyde-agarose gel electrophoresis. (B) Autoradiogram obtained from the Northern blot. Lanes MW contain the Gibco RNA ladder. In all cases, 7  $\mu$ g of RNA was analyzed.

terms of protein size and product specificity. It is interesting that although some levansucrase activity was detected in the electrophoretic assay, no levansucrase products were observed in the polymer synthesis reaction, because of the very high dextransucrase/levansucrase ratio.

A classical induction phenomenon requires contact with the cells and the inducer for only a few minutes to allow gene expression. In this case, sucrose behavior as an inducer is atypical since DS activities could be detected only after several hours of contact with sucrose and since the sucrose concentration required to stimulate enzyme production was extremely high (Table 2). These results also show that the growth of three generations in the presence of sucrose was not enough to recover the DS activity levels reached by cells that had always grown in this carbon source.

The correlation between DS mRNA amount and enzyme activity produced under different culture conditions confirms that gene regulation occurs at the transcriptional level. Northern blotting shows that even in the first hour of the sucrose culture, the amount of DS mRNA is considerably higher than

the maximum obtained with any other carbon source, a fact supporting the activator hypothesis.

The low enzyme activity of cells transferred to a sucrose medium after growth in fructose may be explained by a fructose repression effect. However, when time-related gene expression was analyzed, it was found that the largest amount of mRNA was observed when 20 mM fructose and 55 mM sucrose were present in the culture, after 3.5 h of fermentation (Fig. 1). These results are consistent with the enzyme production behavior in fed-batch cultures, where in spite of the high fructose concentrations reached, an increase in DS production was obtained. According to López and Monsan, the sucrose concentration should be kept between 15 and 30 mM in order to maintain the microorganism at the maximum growth rate (15). When those results are compared to the ones obtained in this work, it may be concluded that under such culture conditions, the microorganism is also kept at the maximum stage of mRNA synthesis, despite fructose accumulation.

The size of the DS messenger corresponds to the size of the previously reported gene (33), so it is possible to conclude that the DS gene of the B-512F strain is located in a monocistronic operon. This possibility also explains the differences found by Dols et al. (3) in the expression of DS and sucrose-phosphorylase during the culture time, as they claimed that these enzymes were not coinduced by their common substrate. As the 5' ends of all the analyzed mRNAs were the same, it is concluded that only one gene is transcribed under any culture condition.

Six putative glucosyltransferase promoter sequences have been reported for *Leuconostoc* (19, 33) and *Streptococcus* (1, 6, 10, 29) species. Only one fructosyltransferase promoter sequence, from *Streptococcus mutans*, has been determined experimentally (30). In this work, one transcription start point was found 34 bp upstream from the ATG start codon. The DS promoter presents the sequence TATAAT in the -10 region, which is totally homologous to the conserved region in prokaryotic cells and the reported region for *S. mutans*. The -35 region, TTTACA, presents high homology to the hexamer consensus sequence  $T_{82}T_{84}G_{78}A_{65}C_{54}A_{45}$ , and the sequence reported for *S. mutans* has four additional base substitutions. The identification of the DS promoter sequence will allow further studies of the gene regulation mechanism in lactic acid bacteria and allow the rational construction of constitutive mutants by site-directed mutagenesis techniques.



FIG. 5. Nucleotide sequence of the N-terminal DS gene and its preceding region. The -10 and -35 promoter regions are underlined, and the transcription start site and direction of transcription are indicated by arrows. SD is the possible ribosome-binding site. The boxed nucleotides correspond to the primer used for PCR amplification of the mRNA 5' end.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by PCP-CONACyT program 39 and by UNAM-PADEP program 5351. M. Quirasco acknowledges the support of an UNAM-DGAPA scholarship.

We also thank M. Vignon for NMR analysis and G. Espin and M. Cevallos for their helpful comments.

## REFERENCES

- Abo, H., T. Matsumura, T. Kodama, H. Ohta, K. Fukui, K. Kato, and H. Kagawa. 1991. Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthase). *J. Bacteriol.* **173**:989-996.
- Chomezynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156.
- Dols, M., W. Chraïbi, M. Remaud-Simeon, N. D. Lindley, and P. F. Monsan. 1997. Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextranucrase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2159-2165.
- Dols, M., M. Remaud-Simeon, R. Willemot, M. Vignon, and P. Monsan. 1997. Characterization of dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **62**:47-59.
- Farrell, R. E. 1993. The Northern blot, p. 158-173. In H. B. Jovanovich (ed.), *RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Ferretti, J. J., M. L. Gilpin, and R. R. Russell. 1987. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* Mfc28. *J. Bacteriol.* **169**:4271-4278.
- Funane, K., M. Shiraiwa, K. Hashimoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi. 1993. An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochemistry* **32**:13696-13702.
- Funane, K., M. Yamada, M. Shiraiwa, H. Takahara, N. Yamamoto, E. Ichishima, and M. Kobayashi. 1995. Aggregated forms of dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and its constitutive mutant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**:776-780.
- Giffard, P. M., C. L. Simpson, C. P. Milward, and N. A. Jacques. 1991. Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2577-2593.
- Gilmore, K. S., R. R. Russell, and J. J. Ferretti. 1990. Analysis of the *Streptococcus downei* *gfs* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infect. Immun.* **58**:2452-2458.
- Kim, D., and J. F. Robyt. 1994. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucanucrases. *Enzyme Microb. Technol.* **16**:659-664.
- Kim, D., and J. F. Robyt. 1995. Dextranucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb. Technol.* **17**:1050-1056.
- Kobayashi, M., and K. Matsuda. 1986. Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biochem.* **100**:615-621.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- López, A., and P. Monsan. 1980. Dextran synthesis by immobilized dextranucrase. *Biochimie* **62**:323-329.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- McLaughlin, R. E., and J. J. Ferretti. 1996. The multiple-sugar metabolism (*msm*) gene cluster of *Streptococcus mutans* is transcribed as a single operon. *FEMS Microbiol. Lett.* **140**:261-264.
- Miller, A. W., S. H. Eklund, and J. F. Robyt. 1986. Milligram to gram scale purification and characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.* **147**:119-133.
- Monchois, V., R. Willemot, M. Remaud-Simeon, C. Croux, and P. Monsan. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only  $\alpha$ -(1-6) and  $\alpha$ -(1-3) linkages. *Gene* **182**:23-32.
- Monchois, V., M. Remaud-Simeon, R. R. B. Russell, P. Monsan, and R. 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. Microbiol. Biotechnol.* **48**:465-472.
- Monsan, P., and F. Paul. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:187-192.
- Mooser, G., S. A. Hefta, R. J. Paxton, J. E. Shively, and T. D. Lee. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **266**:8916-8922.
- Neely, W. B., and J. Nott. 1962. Dextranucrase, an induced enzyme from *L. mesenteroides*. *Biochemistry* **1**:1136-1140.
- Paul, F., E. Oriol, D. Auriol, and 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.
- Robyt, J. F., and T. F. Walseth. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextranucrase. *Carbohydr. Res.* **61**:433-445.
- Sánchez-González, M., A. Alagón, R. Rodríguez-Sotres, and A. López-Munúga. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press.
- Seymour, F. R., R. D. Knapp, and S. H. Bishop. 1976. Determination of the structure of dextran by C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **51**:179-194.
- Shimamura, A., Y. J. Nakano, H. Musaka, and H. K. Kuramitsu. 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. *J. Bacteriol.* **176**:4845-4850.
- Simpson, C. L., P. M. Giffard, and N. A. Jacques. 1995. *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. *Infect. Immun.* **63**:609-621.
- Smorawinska, M., and H. K. Kuramitsu. 1995. Primer extension analysis of *Streptococcus mutans* promoter structures. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**:188-192.
- Sumner, J. B., and S. F. Howell. 1935. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* **108**:51-54.
- Tsuchiya, H. M., H. J. Koepsell, J. Corman, G. Bryant, M. O. Bogard, V. H. Feger, and R. W. Jackson. 1952. The effect of certain cultural factors on the production of dextranucrases by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **64**:521-527.
- Wilke-Douglas, M., J. T. Perchorowicz, C. M. Houck, and B. R. Thomas. December 1989. U.S. patent WO 89/12386.