

# OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA FORMA ENZIMÁTICA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F

Sandra T. del Moral, Martha A. Argüello y Agustín López-Munguía.  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM  
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C.P.62210, Cuernavaca, Mor. Fax (77) 711 4903  
e-mail: [sandit@ibt.unam.mx](mailto:sandit@ibt.unam.mx)

*Palabras clave:* Dextranasa, proteasas, DSR4.

**Introducción.** Las dextranazas (DSR) son enzimas producidas por bacterias lácticas, principalmente de los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus*<sup>(1)</sup>. Estas catalizan la transferencia del residuo glucosilo de la sacarosa a moléculas aceptoras, liberando fructosa y formando un polímero denominado "dextrana". La DSR más estudiada, debido a la importancia de sus productos a nivel industrial es la sintetizada por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Esta enzima presenta una masa molecular de 170 kDa, sin embargo los valores reportados oscilan entre 65-280 kDa<sup>(2, 3, 4)</sup>

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó por primera vez una proteasa de los cultivos de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y *L. mesenteroides* NRRL B512FMC (mutante que produce constitutivamente DSR). Esta proteasa es probablemente la responsable de los cambios en el peso molecular de la DSR durante el almacenamiento.

El objetivo de este trabajo es producir y caracterizar bioquímicamente diferentes formas enzimáticas producidas por proteólisis de la DSR nativa.

**Metodología.** El sobrenadante del cultivo de *L. mesenteroides* B512FMC se concentró por ultrafiltración y se incubó a temperatura ambiente y pH 5.2 durante 60 días. La proteólisis se monitoreó por medio de geles SDS-PAGE que fueron tratados para detectar actividad enzimática. *in situ*. Para secuenciar el N-terminal, las formas enzimáticas proteolizadas se transfirieron a una membrana de PVDF y se teñieron con azul de comassie. El análisis hidrofóbico de la proteína se realizó con el algoritmo SEQweb-GCG y el servidor Molecular Biology ExpASY. La cuantificación de la actividad DSR se midió por medio de azúcares reductores empleando DNS. Todos los protocolos de biología molecular se hicieron de acuerdo a Current Protocols in Molecular Biology.

**Resultados y discusión.** Por un proceso de proteólisis limitada de la DSR *L. mesenteroides* NRRL-512FMC se obtuvieron tres formas enzimáticas activas de aproximadamente 155, 129 y 48 kDa. Se secuenciaron los extremos N-terminal de las dos primeras formas proteolizadas (155 y 129 kDa) y los péptidos obtenidos fueron prácticamente los mismos, indicándonos un mismo sitio de corte (FDKGSSDELTLG y FDKGSSDELTL). A partir de estos datos se desarrolló un análisis sobre la DSR donde se buscó el tetrapéptido YY-FD que es la región donde la proteasa podría escindir a la enzima nativa. De esta

manera, se identificaron las regiones que dan lugar a las formas proteolizadas. En un primer tiempo, decidimos trabajar únicamente con la forma enzimática de 48 kDa que hemos denominado DSR4 ya que hasta el momento no se ha reportado ninguna forma enzimática de DSRs activa de esa masa molecular. Se amplificó y clonó el fragmento de ADN que codifica para la DSR4 en el vector de expresión pBAD/TOPO que es regulado positivamente por L-arabinosa. Se iniciaron los ensayos de expresión heteróloga utilizando *E. coli* como hospedero. Hicimos cultivos a diferentes temperaturas y con diferentes medios. Hasta el momento no hemos detectado actividad DSR en la fracción pequeña, aunque sabemos que hay proteína (geles SDS teñidos con comassie) lo que nos indica que la enzima tiene problemas de plegamiento.

Por otro lado, intentamos obtener la DSR4 por proteólisis limitada a través de proteasas presentes en *L. mesenteroides* B512F y utilizando algunas proteasas comerciales que reconocen el tetrapeptido YY-FD.

**Conclusiones.** Se ha resuelto la pregunta acerca de la variación en la masa molecular de la DSR de *L. mesenteroides* B512F. Hemos encontrado tres formas enzimáticas activas de menor peso molecular. Se han encontrado sitios de corte a lo largo de la DSR los cuales son reconocidos por proteasas encontradas en esta misma bacteria. Hemos expresado la DSR4 en sistemas heterólogos sin encontrar actividad, tal vez se debe a la falta de estabilidad que le confiere el resto de la estructura.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado por CONACyT proyecto 169929 y la beca DGEP otorgada por la UNAM. Agradecemos la asistencia técnica del T.L. Fernando Glez.

## Bibliografía.

1. Mooser. G. y Wong, C., (1988). Isolation of glucan-binding domain of glucosyltransferase (1,6- $\alpha$ -glucan synthase) from *Streptococcus sobrinus*. Infect. Immun., 56:880-884.
2. Wilke-Douglas, M., Perchorowicz, J.T., Houck y Thomas, B.R. (1989). Methods and compositions of altering physical characteristic of fruit products. US patente WO 89/12386.
3. Ebert, K. and Schenk, G. (1968). Mechanism of biopolymer growth: the formation of dextran and levan. Adv. Enzymol., 30:179-210.
4. Sánchez-González M, Alagón, A., Rodríguez-Sotres, R., López-Munguía, A., (1999). Proteolytic processing of dextranase of *Leuconostoc mesenteroides*. Microb. Lett. 181:25-30.

