

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS
DE LA LÉVANE-SUCRASE EXOCELLULAIRE
DE *Bacillus subtilis* MARBURG*

M PASCAL ET R DEDONDER

*Institut de Biologie Moléculaire, Service de Biochimie Cellulaire, 2 Place Jussieu,
75-Paris 5 (France)*

(Reçu le 30 novembre 1971, accepte apres modification le 19 février 1972)

ABSTRACT

Two inducible enzymes, namely a levansucrase and a sucrase, are responsible for the saccharolytic activity in *Bacillus subtilis* Marburg. In the strain QB 13 producing a high level of saccharolytic activity, up to 90% of this activity is excreted. The exocellular activity can be accounted for by levansucrase. This enzyme has been obtained in pure form from the supernatant of an induced culture by fractional precipitations with ethanol and ammonium sulfate, and chromatography on hydroxyapatite, mol wt is ca 40,000, $s_{w,20}^0 = 4.16$ S. The enzyme consists of a single polypeptide chain with lysin as the N-terminal amino acid. This enzyme catalyzes transfructosylation reactions; sucrose and low-molecular-weight levans may act as D-fructosyl donors, water, D-glucose, sucrose, and levans act as acceptors. The apparent Michaelis constants of levansucrase for sucrose and low-molecular-weight levans (mol wt 10,000) are respectively 27mM and 3mM (30 g/l), the yield in levan of the reaction catalyzed by levansucrase reaches 90% in the presence of low-molecular-weight levans acting as initiators. The exocellular levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg QB 13 appears to be identical with the previously studied enzyme of *Bacillus subtilis* var Nigra BS 5.

SOMMAIRE

Deux enzymes inductibles, une lévane-sucrase et une saccharase, sont responsables de l'activité saccharasique chez *Bacillus subtilis* Marburg. La souche QB 13, qui produit un niveau élevé d'activité saccharasique, excrète jusqu'à 90% de cette activité sous forme de lévane-sucrase exclusivement. La lévane-sucrase exocellulaire de QB 13 a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir du surnageant d'une culture induite par précipitation à l'éthanol, fractionnement au sulfate d'ammonium et chromatographie sur hydroxylapatite, p. mol ca 40 000, $s_{w,20}^0 = 4,16$ S. La molécule est constituée d'une seule chaîne polypeptidique dont l'extrémité

*Dédié au Professeur Jean-Émile Courtois à l'occasion de son 65ème anniversaire

N-terminale est la lysine. Cette enzyme catalyse des réactions de transfructosylation, le saccharose et les lévanes de faible poids moléculaire sont des donneurs du groupe D-fructosyle, l'eau, le D-glucose, le saccharose et les lévanes pouvant jouer le rôle d'accepteurs. Les constantes de Michaelis apparentes de la lévane-sucrase pour le saccharose et les lévanes ($\mu\text{mol } 10\,000$) sont respectivement 27mM et 3mM (30 g/l), le rendement en lévanes de la réaction catalysée par la lévane-sucrase atteint 90% en présence de lévanes initiateurs. La lévane-sucrase exocellulaire de *Bacillus subtilis* Marburg QB 13 paraît identique à celle de la souche BS 5 de *Bacillus subtilis* var *nigra* précédemment étudiée.

INTRODUCTION

Chez *Bacillus subtilis* Marburg, l'activité saccharasique est portée par deux enzymes inductibles, une saccharase et une lévane-sucrase¹ [(2→6)- β -D-fructane D-glucose-6-fructosyl-transférase E C 2 4 1 10], ces enzymes ont été séparées par chromatographie sur hydroxylapatite et se distinguent aisément par deux critères : production de lévanes et résistance à l'attaque trypsique, tous deux propres à la lévane-sucrase².

Dans la souche d'origine 168 le taux différentiel de synthèse (t d s) maximum de l'activité saccharasique totale est faible (0,35 U/mg de protéine, cf Matériel et Méthodes) et le rapport des activités lévane-sucrase (LS) à saccharase (S) est LS/S = 0,1, les deux activités sont essentiellement endocellulaires.

On peut obtenir³ par mutation ponctuelle des souches produisant dix fois plus d'activité saccharasique totale que la souche 168. L'examen de ces souches montre que le niveau d'activité saccharasique dû à la lévane-sucrase est augmenté par un facteur 100 environ, le niveau d'activité de la saccharase restant inchangé, le rapport lévane-sucrase à saccharase est alors LS/S = 10. Le phénotype de ces mutants est désigné* par Lvs^h (haute production de lévane-sucrase). QB 13 est l'une de ces souches dans laquelle la mutation a été localisée⁵ (SacU³²), elle excrète environ 90% de son activité saccharasique totale.

Nous montrerons tout d'abord que l'activité saccharasique exocellulaire de QB 13 est due à la lévane-sucrase, nous décrirons ensuite la purification et les propriétés de cette enzyme. L'existence de deux saccharases, l'une de type lévane-sucrase, l'autre de type invertase et le fait que ces enzymes soient l'objet d'une régulation commune, au moins en partie⁶, posent le problème de leurs relations aux niveaux structural et fonctionnel. Le présent travail s'inscrit dans le cadre de cette recherche, la purification de la saccharase de type invertase étant actuellement en cours.

Dedonder et coll^{7,8} ont étudié la lévane-sucrase excrétée par la souche BS 5 de *Bacillus subtilis* var *nigra*, également Lvs^h, nous avons comparé les lévane-sucra-

*Le phénotype sauvage antérieurement désigné LSH⁻ sera désigné ici par Lvs⁺, le phénotype haute production antérieurement désigné LSH⁺ sera désigné ici par Lvs^h, en conformité avec les règles proposées par Demerec *et al*⁴.

ses purifiées des souches QB 13 et BS 5 Nous présenterons brièvement les résultats obtenus dans ce domaine

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cultures bactériennes — Elles ont été réalisées à 37° en milieu minéral synthétique [K_2HPO_4 70mm, KH_2PO_4 30mm, $(NH_4)_2SO_4$ 25mm, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,5mm, $MnSO_4 \cdot 1 H_2O$ 0 01 mm, citrate ammoniacoferrique 22 $\mu g/ml$], dans des cuves de 12 l, aérées par agitation et barbotage d'air stérile, en présence de L-tryptophane (100 $\mu g/ml$) et de saccharose (0,24M) comme source de carbone et inducteur La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique à 650 nm (spectrophotomètre Beckman DU, 1 cm de trajet optique, 1 ml à densité optique 1 = ca 360 μg de protéines = ca 8×10^8 bactéries) Dans ces conditions le taux différentiel de synthèse de l'activité saccharasique de la souche QB 13 est de 3,5 U/mg La récolte est faite en phase de croissance exponentielle (densité optique 2 à 2,5), les bactéries sont éliminées par centrifugation (70 000 g, centrifugeuse Sharples)

Tampon — Le tampon phosphate potassique pH 6,0 (tampon I), à des molarités variant de 0,05 à 2M, a été utilisé dans toutes les expériences, sauf indication particulière

Lévanes — Les lévanes natifs sont des polymères branches de très haut poids moléculaire (10^8) constitués de restes D-fructofuranosyles formant une structure « en buisson » avec un embranchement tous les cinq restes en moyenne [liaisons β -D-(2→6) dans les chaînes et β -D-(2→1) aux embranchements]⁹ Les lévanes de faible poids moléculaire utilisés dans les expériences ont été préparés à partir de lévanes natifs, provenant de cultures sur saccharose de la souche BS 5 de *Bacillus subtilis* var *nigra*, par hydrolyse acide ménagée et fractionnement à l'éthanol¹⁰ Leur poids moléculaire (p mol) a été déterminé par mesure de leur pouvoir réducteur et par filtration sur Biogel P-60, il est de 10 000 environ et correspond à des molécules ayant 10 à 12 chaînes extérieures terminées par un groupement non-réducteur

Analyses et dosages — L'analyse des sucres a été réalisée par chromatographie descendante sur papier lave (2043 b Schleicher et Schull ou Whatman n° 1) avec le solvant alcool butylique-acide acétique-eau (4 l l, v/v) Les sucres radioactifs uniformément marqués par ¹⁴C (fournis par le Commissariat d'Énergie Atomique, Saclay, France) ont été localisés par autoradiographie Le D-fructose et ses dérivés ont été révélés par le réactif à l'urée, les sucres réducteurs par le réactif au chlorure de triphényltétrazolium¹¹

Les sucres réducteurs ont été dosés par la technique de Somogyi-Nelson¹², le D-fructose des lévanes par la méthode de Roe modifiée¹³ et le D-glucose avec le « Glucostat reagent » (Worthington Biochem Corp, Freehold, New Jersey)

Les protéines ont été dosées selon les techniques de Lowry¹⁴ ou de Bucher¹⁵, la sérumalbumine de bœuf a été utilisée comme référence

Dosage d'activité — L'activité enzymatique des solutions de lévane-sucrase est déterminée par mesure de la vitesse initiale de libération du D-glucose au cours de

la réaction d'hydrolyse du saccharose selon la technique précédemment décrite¹⁶, dans les conditions optimales suivantes : 37°, tampon I 50mM, saccharose 0,24M, lévanes (p mol 10 000) 100 g/l, 10mM L'unité de lévane-sucrase (U) est la quantité d'enzyme qui libère, dans ces conditions, une micromole de D-glucose par min

Rendement en lévanes — L'action de la lévane-sucrase sur le saccharose ne conduit pas à la libération de D-glucose et de D-fructose en quantités équimoléculaires. Le rendement en lévanes (Y) de cette réaction est le rapport du nombre de résidus D-fructosyles incorporés dans les lévanes au nombre total de résidus D-fructosyles transférés, il est défini par l'une des expressions suivantes

$$Y = \left[\frac{Fru_L}{Fru_L + Fru_I} \right] \times 100 = \left[1 - \frac{Fru_I}{G_I} \right] \times 100 = \left[1 - \frac{v_F}{v_G} \right] \times 100$$

Fru_L quantité de D-fructose intégré dans des lévanes de hauts poids moléculaires; Fru_I et G_I quantités de D-fructose et de D-glucose libres, v_F et v_G vitesses initiales de libération du D-fructose et du D-glucose

L'addition de lévanes de faible poids moléculaire au mélange réactionnel augmente le rendement de polymérisation, ainsi que la reproductibilité des dosages¹⁷. Sauf indication particulière les déterminations de rendement en lévanes ont été réalisées dans les conditions suivantes : le mélange réactionnel constitué de saccharose- $U-^{14}C$ (30 μ Ci/mole) 0,24M, de lévanes (p mol 10 000) 100 g/l et d'extrait enzymatique (0,1–1,5 U/ml) est incubé à 37° en tampon I 50mM pendant 60–120 min selon l'activité enzymatique. Pendant l'incubation, des prélèvements sont effectués, immédiatement séchés sur papier et chromatographiés. Les taches de lévanes, saccharose, D-glucose et D-fructose sont localisées par autoradiographie et leur radioactivité mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Techniques physico-chimiques — Les électrophorèses ont été réalisées selon la technique de Davis¹⁸ sur des gels à 5% d'acrylamide, en tampon 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (Tris)–glycine pH 8,7 à 4° sous un courant constant de 4 mA par tube pendant 30 min environ. Les gels ont été colorés par immersion pendant 1 h dans une solution d'Amido Schwartz (0,1% dans l'acide acétique 7%), puis décolorés par l'acide acétique 7%.

Le coefficient de sédimentation de la lévane-sucrase a été déterminé à l'aide d'une ultracentrifugeuse Spinco modèle E équipée d'une optique Schlieren, à 2,7°, à la vitesse de rotation de 59 780 tours par min avec un échantillon d'enzyme (d'activité spécifique 360 U/mg) à 7 mg/ml en tampon I 50mM.

La masse moléculaire de la lévane-sucrase a été déterminée par filtration sur Séphadex et équilibre de sédimentation en présence d'agents dissociants¹⁹.

Les filtrations ont été réalisées sur une colonne (1,5 × 60 cm) de Séphadex G-75 en tampon I M à 37°. L'étalonnage de la colonne a été obtenu par chromatographie de protéines de poids moléculaires connus. L'éluion de la lévane-sucrase a été suivie par dosage de l'activité saccharasique dans les fractions.

Les expériences d'équilibre de sédimentation en présence d'agents dissociants

ont été effectuées avec une ultracentrifugeuse Spinco modèle E équipée d'une optique interférentielle de Rayleigh à 25,2°, à la vitesse de rotation de 37 120 tours par min, les échantillons d'enzyme (d'activité spécifique 360 U/mg) ont été dialysés pendant 48 h contre le tampon suivant²⁰. Tris 20mM, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 10mM, chlorure de sodium 10mM, 2-hydroxy-1-ethanethiol 0,1M, chlorure de guanidine 5,94M (concentration déterminée par réfractométrie par rapport à une gamme de référence)

La masse moléculaire de la protéine analysée est donnée par la relation

$$m = \frac{2RT}{(1 - \phi' \rho)\omega^2} \sigma$$

dans laquelle ω (vitesse angulaire) = 3 880 rad/sec, ρ (densité du solvant²¹) = 1,143 g/cm³; ϕ' (volume partiel spécifique en guanidine²²) = 0,71 cm³/g La masse effective réduite (σ) est la pente de la courbe $\text{Ln} \Delta J = f(r^2)$ représentant le logarithme népérien du déplacement de la frange en fonction du carré de la distance à l'axe de rotation (voir Fig 2)

Techniques immunologiques — Des antisérums ont été préparés par injection de lévane-sucrase exocellulaire des souches QB 13 ou de BS 5 purifiées (360 U/mg) à des lapins

Les tests en milieu solide (agarose 1,5%, chlorure de sodium 0,85%, Merthiolate 0,01% dans l'eau distillée) ont été réalisés selon la technique d'Ouchterlony²³

Les points d'équivalence²⁴ ont été déterminés de la façon suivante à une quantité constante d'antisérum (0,1 ml) on ajoute des quantités croissantes de lévane-sucrase (0,1 à 0,5 ml d'une solution à ca 10 U/ml dans du tampon I 50mM) et du tampon I 50mM pour compléter le volume à 1 ml, le mélange est incubé pendant 1 h à 37° puis 24 h à 4°, après centrifugation (17 000 g pendant 30 min à 4°) on dose l'activité saccharasique dans le surnageant

RÉSULTATS

Nature de l'enzyme porteuse de l'activité saccharasique exocellulaire de QB 13 — Dans le surnageant d'une culture de bactéries QB 13 induites, on peut montrer par chromatographie et révélation à l'urée la formation de lévanes, substances absentes des cultures sur glycérol, D-glucose ou D-fructose. En présence de lévanes exogènes de faible poids moléculaire et de saccharose- $U^{14}C$, dans les conditions précédemment définies, on trouve un rendement en lévanes de 80 à 90% pour la réaction catalysée par l'activité enzymatique exocellulaire. L'activité saccharasique excrétée dans le milieu de culture par la souche QB 13 n'est donc pas due à une saccharase vraie seule (le rendement en lévanes de la réaction serait nul même en présence de lévanes initiateurs) mais pour tout ou partie à une lévane-sucrase

Préparation de la lévane-sucrase exocellulaire de QB 13 — La lévane-sucrase de QB 13 a été préparée à partir du milieu de culture selon la méthode mise au point par Dedonder *et al*⁷ utilisant l'hydroxylapatite. Toutes les étapes sont réalisées à

4° Après acidification du milieu de culture jusqu'à pH 4,5 par l'acide acétique, une partie des protéines est précipitée par addition d'éthanol (concentration finale 45%); le mélange est laissé au repos 30 min. Le précipité recueilli par centrifugation (70 000 *g*, centrifugeuse Sharples) est remis en solution dans du tampon I 50mM puis fractionné par précipitation au sulfate d'ammonium à pH 6,0. La fraction obtenue entre 65 et 95% de saturation, reprise dans le tampon I 0,5M est chromatographiée sur hydroxylapatite (Fig 1), l'élution des protéines est réalisée par le tampon I 0,5M suivie d'un

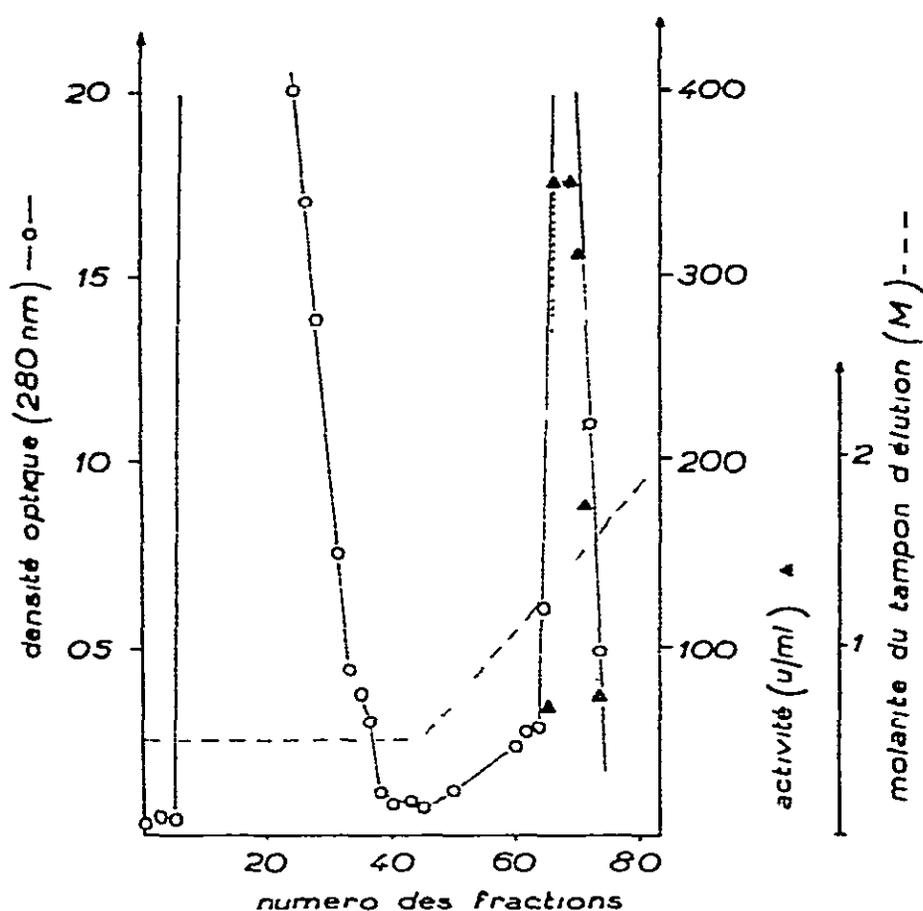


Fig 1 Chromatographie de la levane-sucrase de QB 13 sur hydroxylapatite. Conditions expérimentales : température 4°, colonne 3 × 20 cm hyapatite C Clarkson, dépôt protéique 200 mg, élution 400 ml de tampon I 0,5M, puis gradient linéaire 400 ml de tampon I 0,5 à 2M, volume des fractions 10 ml.

gradient linéaire du même tampon de 0,5 à 2M. Le matériel possédant l'activité saccharasique est élué dans les fractions correspondant à une molarité en phosphate proche de 1,5M. Le Tableau I résume les différentes étapes de la purification dont le rendement global est d'environ 30%.

TABLEAU I

ETAPES DE PURIFICATION DE LA LEVANE-SUCRASE DE QB 13 A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE

Étape	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Surnageant de culture	16	1	100
Précipité ethanolique	48	3	84
Précipité au sulfate d'ammonium	99	6,2	36
Éluat hydroxylapatite	405	25,2	28

Cristallisation — La lévane-sucrase de QB 13 a été cristallisée selon la méthode décrite par Delobbe²⁵ une solution de lévane-sucrase (10 à 20 mg/ml en tampon I M) est dialysée contre de l'eau distillée à 4°, les cristaux apparaissent au bout de quelques heures. L'activité spécifique n'est pas augmentée au cours de la cristallisation. Barbotin²⁶ a montré par diffraction optique de clichés de microscopie électronique que la lévane-sucrase cristallise dans le système orthorhombique.

Critères de pureté — Nous avons contrôlé l'homogénéité de la préparation de lévane-sucrase cristallisée, d'activité spécifique 360 U/mg, selon trois techniques (a) La révélation à l'Amido Schwartz du gel d'acrylamide dans lequel a été réalisée l'électrophorèse de la lévane-sucrase fait apparaître une seule bande protéique (voir Fig 7, gel n° 2) (b) Les clichés Schlieren pris en cours de centrifugation montrent un pic unique et symétrique, nous avons contrôlé sur des agrandissements des clichés pris entre 30 et 70 min après l'établissement de la vitesse de régime, la nature gaussienne de la courbe de gradient de concentration en protéine en fonction de la distance à l'axe de rotation (c) L'analyse du cliché interférentiel Rayleigh obtenu à l'équilibre de sédimentation en présence d'agents dissociants, montre qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme népérien du déplacement d'une frange et le carré de la distance à l'axe de rotation (Fig 2), ceci constitue un argument supplémentaire en faveur de l'homogénéité de la préparation.

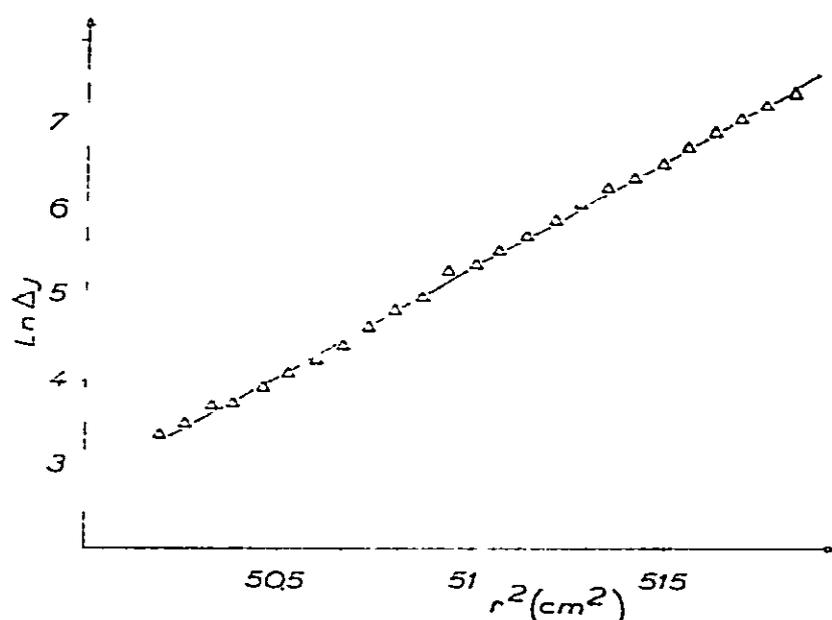


Fig 2 Ultracentrifugation de la lévane-sucrase de QB 13 Équilibre de sédimentation. Exploitation d'un cliché interférentiel Rayleigh. Représentation du logarithme népérien du déplacement d'une frange ($\ln \Delta_j$) en fonction du carré de la distance à l'axe de rotation (r^2). Les pointages au microcomparateur Nikon ont été faits sur cinq franges réelles. La pente de la droite est σ masse effective réduite de la protéine. Conditions expérimentales : température 25,2°, solution de lévane-sucrase à 200 $\mu\text{g/ml}$ dans le tampon Tris 20mM, EDTA 10mM, chlorure de sodium 10mM, 2-hydroxy-1-ethanethiol 0,1M, chlorure de guanidine 5,94M, vitesse de rotation 37 120 tours/min.

Propriétés physico-chimiques de la lévane-sucrase exocellulaire de QB 13 — Les valeurs de $39\,000 \pm 2\,000$ et de $45\,000 \pm 2\,500$ ont été trouvées pour la masse moléculaire de la lévane-sucrase de QB 13, respectivement par filtration sur gel de Séphadex G-75 et par équilibre de sédimentation en présence d'agents dissociants, la concordance

ce des résultats obtenus par ces deux techniques indique que la molécule de levane-sucrase est constituée d'une seule chaîne polypeptidique, résultat confirmé par la mise en évidence d'un seul amino-acide N-terminal, la lysine²⁷.

Le coefficient de sédimentation de la lévane-sucrase de QB 13 est égal à 2,56 S à 2,7°, soit $s_{w,20}^0 = 4,16$ S.

Propriétés catalytiques de la lévane-sucrase exocellulaire de QB 13 — La lévane-sucrase catalyse des réactions de transfructosylation

Scission du saccharose Cette scission est mesurée par la libération de D-glucose. La constante de Michaelis apparente de la lévane-sucrase de QB 13 pour le saccharose a été déterminée à 37° en tampon I 50mM en présence de saccharose à des molarités variant de 5 à 25mM; sa valeur est 27mM. Dans les conditions définies pour le dosage d'activité saccharasique (37°, tampon I 50mM, saccharose 0,24M) l'addition de lévanes initiateurs (p mol 10 000) à la concentration de 100 g/l (10mM) augmente la vitesse de libération du D-glucose par un facteur 2 à 3; cet effet activateur n'est pas sensiblement dépendant de l'état de purification de l'enzyme, les lévanes natifs de hauts poids moléculaires présents, en faible concentration, aux premiers stades de la purification ne le possédant pas. Le K_A mesurés pour les lévanes de p mol 10 000 est de 1 à 3mM ou 10 à 30 g/l.

Synthèse des lévanes En présence de saccharose seul (37°, tampon I 50mM, saccharose 0,24M) la lévane-sucrase catalyse la formation de lévanes, mais le rendement de synthèse est faible, de l'ordre de 30%. Outre l'effet activateur qu'ils exercent sur la vitesse de libération du D-glucose, les lévanes de faible poids moléculaire, entrant en compétition avec l'eau comme accepteur du résidu D-fructosyle, « inhibent » la formation de D-fructose libre, ce qui conduit à une augmentation du rendement en lévanes (Fig 3), celui-ci atteint 90% dans les conditions définies dans Matériel et Méthodes.

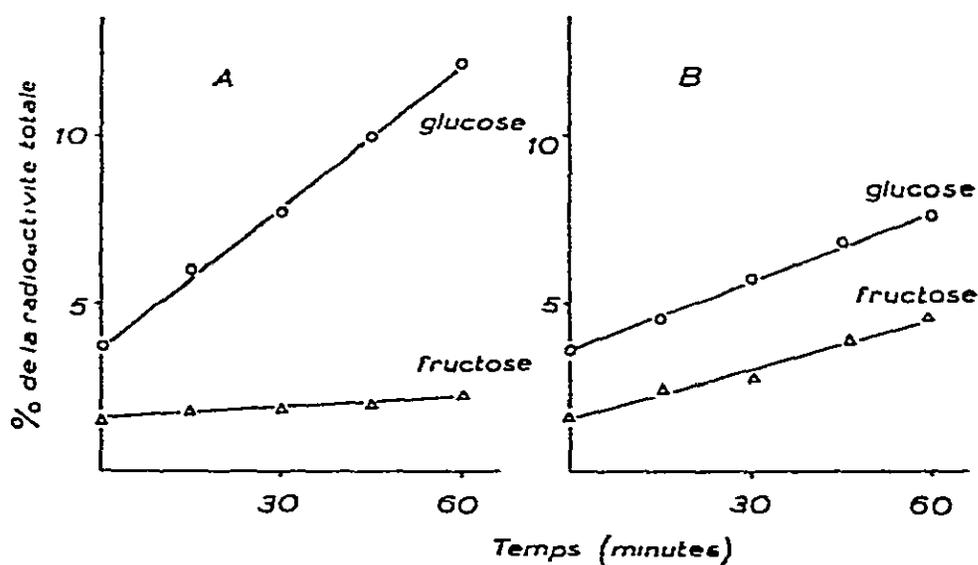


Fig 3 Vitesses initiales de libération du D-glucose et du D-fructose lors de la scission du saccharose catalysée par la lévane-sucrase de QB 13 en présence ou en absence de lévanes initiateurs. Conditions expérimentales : température 37°, saccharose- $U-^{14}C$ ($30 \mu Ci/m mole$) 0,24M, tampon I 50mM, activité enzymatique 0,8 u/ml, (A) en présence de lévanes (p mol 10 000, 100 g/l), $v_G = 81$, $v_F = 7$, $Y = 91\%$, (B) en absence de lévanes, $v_G = 40$, $v_F = 29$, $Y = 27\%$.

Hydrolyse des lévanes La levane-sucrase de QB 13 hydrolyse les lévanes de faible poids moléculaire en libérant du D-fructose, l'hydrolyse enzymatique n'est pas complète, 50% environ des résidus D-fructose des lévanes étant libérés (Fig 4), l'absence d'oligosaccharides, constatée par chromatographie, indique que la levane-sucrase se comporte comme une exohydrolase. L'arrêt ou le ralentissement considérable de la réaction conduisant à l'obtention de lévanes résiduels, caractérisés par chromatographie, n'est pas une conséquence de l'inactivation de l'enzyme mais provient de ce que celle-ci hydrolyse beaucoup plus lentement les liaisons (2→1) que les liaisons (2→6).

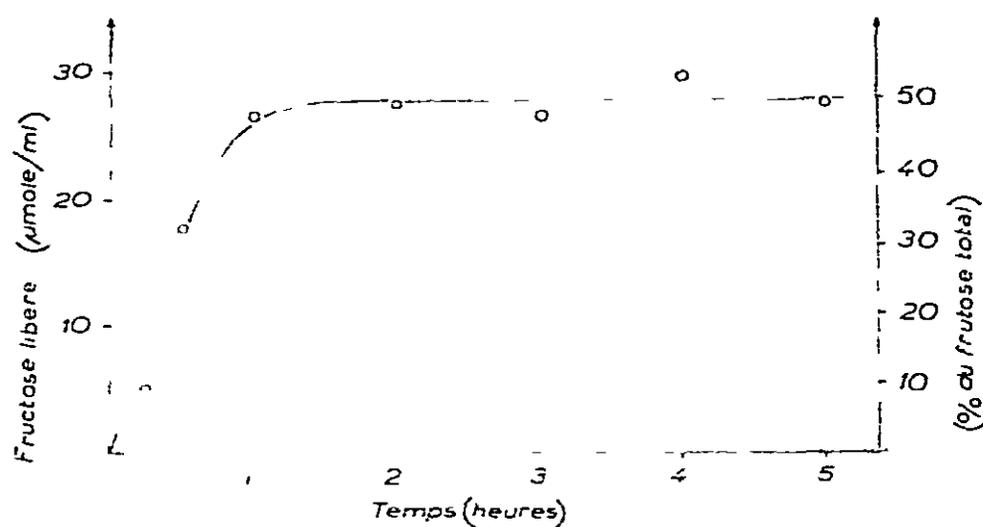


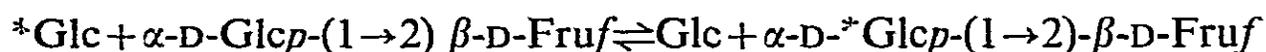
Fig 4 Hydrolyse des lévanes catalysée par la levane-sucrase de QB 13. Conditions expérimentales : température 37°, lévanes (p mol 10 000) 10 g/l, activité enzymatique 10 U/ml, tampon I 50mM.

La constante de Michaelis apparente de la levane-sucrase pour les lévanes de faible poids moléculaire a été déterminée, dans les conditions de vitesse initiale, à 37° en tampon I 50mM en présence de lévanes (p mol 10 000) à des concentrations variant de 5 à 50 g/l, sa valeur est de 3mM ou 30 g/l.

Synthèse du saccharose (réaction de « réversion ») En présence de D-glucose- $U-^{14}C$ 0,1M (50 $\mu Ci/mmole$) et de lévanes de faible poids moléculaire (p mol 10 000, 100g/l) la levane-sucrase de QB 13 (10 U/ml en tampon I 50 mM à 37°) catalyse la formation d'un sucre non réducteur que l'on peut identifier au saccharose de la manière suivante : (a) il cochromatographie avec le saccharose, (b) par hydrolyse il donne du D-glucose et du D-fructose en quantités égales, (c) réincube en présence de levane-sucrase, il donne du D-glucose et des lévanes, réaction qui ne peut être obtenue avec aucun autre disaccharide. Le saccharose est le seul produit formé pendant les deux premières heures de la réaction. Il y a ensuite formation d'une faible quantité d'un disaccharide réducteur comme cela a déjà été montré¹⁷ dans le cas de la levane-sucrase de la souche BS 5. La formation de saccharose dans ces conditions démontre la réversibilité de la réaction de synthèse des lévanes.

Reaction d'échange En présence de saccharose 0,3M et de D-glucose- $U-^{14}C$ 0,1M (50 $\mu Ci/mmole$) la levane-sucrase (2 U/ml, en tampon I 50mM à 37°) catalyse

l'incorporation du D-glucose radioactif dans le saccharose



La Fig 5 montre l'évolution de cette réaction en fonction du temps. Le fait que le D-glucose radio-actif est bien incorporé dans le saccharose est prouvé par l'absence complète d'apparition de pouvoir réducteur dans le disaccharide au cours de la réaction.

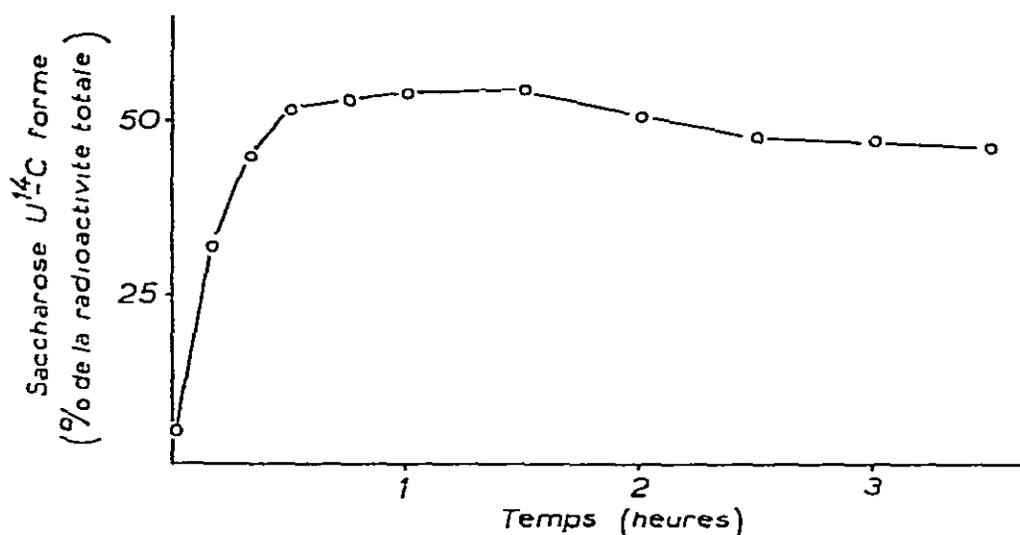


Fig 5 Réaction d'échange catalysée par la lévane-sucrase de QB 13. Conditions expérimentales : température 37°, saccharose 0,3M, D-glucose 0,1M (50 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$), activité enzymatique 2 U/ml, tampon I 50mM.

Comparaison des lévane-sucrases exocellulaires des souches QB 13 et BS 5 de Bacillus subtilis — Les lévane-sucrases de QB 13 et BS 5 sont purifiées selon la même technique à partir des surnageants de cultures induites. Elles ont les mêmes propriétés catalytiques pour les réactions étudiées à savoir synthèse des levanes, hydrolyse partielle des levanes de faible poids moléculaire, synthèse du saccharose et réaction d'échange. Elles ont les mêmes constantes cinétiques, des poids moléculaires et des constantes de sédimentation très voisines (Tableau II).

TABLEAU II

CONSTANTES CINÉTIQUES, POIDS MOLECULAIRES ET CONSTANTES DE SEDIMENTATION DES LÉVANE-SUCRASES DES SOUCHES QB 13 ET BS 5^a

Propriétés physico-chimiques	Lévane-sucrase de la souche	
	QB 13	BS 5
K_m^{sac} (mM)	27	20-50
K_m^{lev} (mM)	3	5
Masse moléculaire		
Filtration	39 200	42 000
Équil. de sédimentation	45 000	49 000
Coefficient de sédimentation (S)	2,56 (2,7°)	2,7 (5°)

^aLes conditions expérimentales sont celles définies pour les mesures faites avec la lévane-sucrase de QB 13.

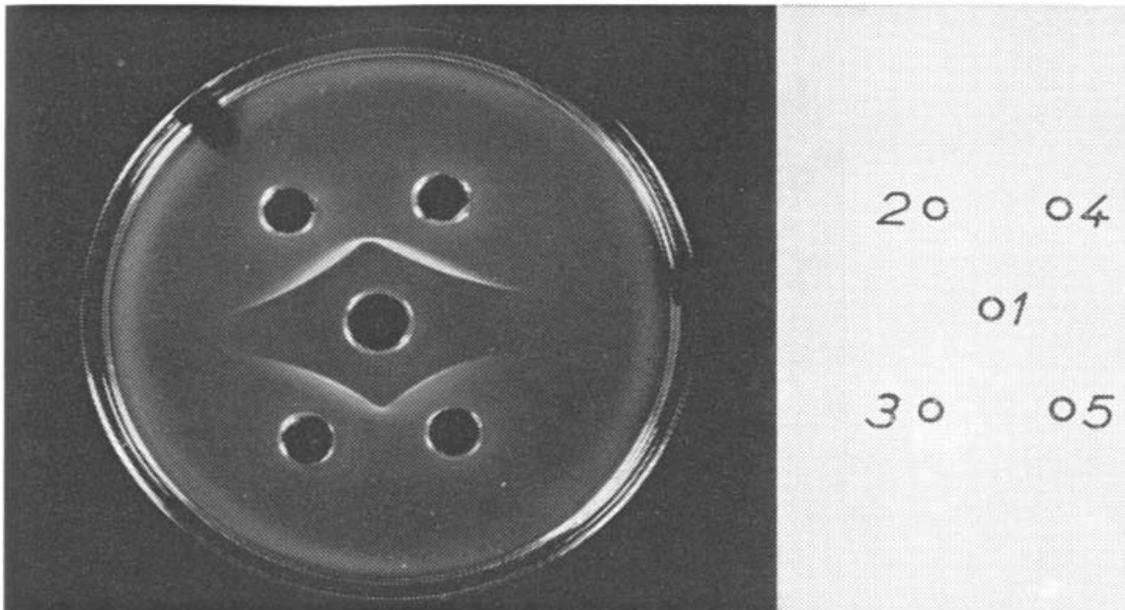


Fig 6 Reaction de précipitation en milieu gelifié. Les levane-sucrases purifiées des souches QB 13 et BS 5 sont opposées au serum anti-levane-sucrase de BS 5 selon la technique de double diffusion en milieu gelifié d'Ouchterlony. Conditions expérimentales : agarose 1,5%, chlorure de sodium 0,85%, Merthiolate 0,01% dans l'eau distillée ; serum anti-levane-sucrase de BS 5 non dilué, solutions de levane-sucrases en tampon I 50mM, (1) serum anti-levane-sucrase de BS 5, (2) et (3) levane-sucrase de BS 5 (30 et 60 U/ml) (4) et (5) levane-sucrase de QB 13 (30 et 60 U/ml)

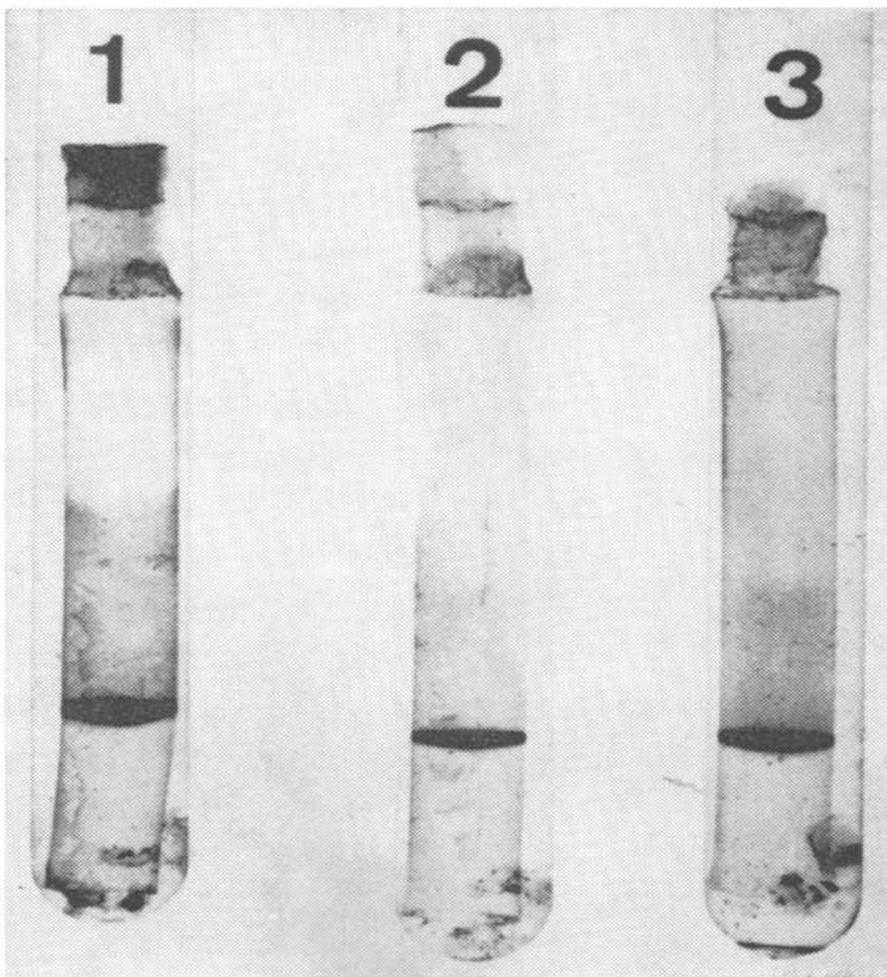


Fig 7 Coelectrophorese sur gel d'acrylamide des levane-sucrases de QB 13 et de BS 5. Conditions expérimentales : gel à 5% d'acrylamide, dépôts protéiques 80 μ g d'enzyme pur (360 U/mg de protéine), courant 4 mA par tube pendant 30 min à 4°, révélation à l'Amido Schwartz 0,1% dans l'acide acétique 7%, (1) 80 μ g de levane-sucrase de BS 5, (2) 80 μ g de levane-sucrase de QB 13, (3) mélange de 40 μ g de chaque enzyme

Les deux enzymes ont le même comportement immunologique. Opposées au serum anti-levane-sucrase de QB 13, elles ont des points d'équivalence très proches, 28 et 31 u/ml de sérum respectivement pour QB 13 et BS 5. Elles donnent en milieu gelifié une ligne continue de précipitation en présence de sérum anti-lévane-sucrase de BS 5 (Fig. 6).

Les deux levane-sucrases donnent une bande protéique unique par coelectrophorèse en gel d'acrylamide (Fig. 7). Elles sont toutes deux constituées d'une seule chaîne polypeptidique dont l'extrémité N-terminale est la lysine²⁷. Les analyses comparatives (autoanalyseur TSM Technicon) des produits d'hydrolyse acide des deux enzymes (acide chlorhydrique 6M, 24 h, à 108°, sous vide) donnent des résultats qualitativement et quantitativement identiques.

Les levane-sucrases exocellulaires des souches QB 13 et BS 5 de *Bacillus subtilis* ont donc des propriétés catalytiques et immunologiques identiques, un réexamen de leurs poids moléculaires dira si la différence observée est significative. L'étude de la structure primaire des deux enzymes est en cours²⁷, les cartes peptidiques obtenues par électrophorèse diagonale des peptides résultant de l'action du bromure de cyanogène appuient également l'hypothèse de deux molécules très semblables.

DISCUSSION

Il est possible d'obtenir, à partir du milieu de culture de bactéries QB 13 induites, une préparation de lévane-sucrase se comportant comme une espèce moléculaire homogène.

La levane-sucrase est responsable de la totalité de l'activité saccharasique exocellulaire de QB 13. L'égalité des valeurs trouvées pour les rendements en levanes des réactions catalysées par la préparation purifiée de levane-sucrase ou par l'activité enzymatique brute du milieu de culture exclut en effet une contamination de cette dernière par la saccharase dépassant 5 à 10%.

C'est donc bien la quantité d'activité saccharasique due à la levane-sucrase qui est augmentée lors du passage du phénotype Lvs^+ au phénotype Lvs^h , la saccharase étant présente en quantités équivalentes dans les souches 168 (Lvs^+) et QB 13 (Lvs^h). La levane-sucrase intracellulaire se comporte comme l'enzyme exocellulaire en chromatographie sur hydroxylapatite. Elle n'a toutefois pas été complètement purifiée et l'on ne peut affirmer sa complète identité avec l'enzyme exocellulaire. Il est cependant très vraisemblable que la modification $Lvs^+ \rightarrow Lvs^h$ consiste en une augmentation du taux différentiel de synthèse de la lévane-sucrase par un facteur 100 environ. La comparaison des lévane-sucrases externe et interne de QB 13 permettra de confirmer cette hypothèse et sera également utile pour la compréhension du mécanisme d'excrétion de l'enzyme, phénomène dont on ne sait pratiquement rien à l'heure actuelle.

Enfin si les données génétiques indiquent que la saccharase et la levane-sucrase sont produites par deux gènes de structure différents, l'existence de mutants constitutifs pour les deux enzymes implique l'existence d'une régulation au moins partielle-

ment commune de la synthèse de ces deux protéines de poids moléculaires voisins. L'étude parallèle des deux enzymes sera doublement intéressante, elle permettra d'une part de savoir si les deux gènes de structure ont une origine commune, et d'autre part de comparer les structures de deux protéines catalysant des réactions de transfructosylation mais dont une seule possède l'aptitude à polymériser le radical transféré.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de crédits du Commissariat à l'Énergie Atomique et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

RÉFÉRENCES

- 1 L S PRESTIDGE ET J SPIZIZEN, *J Gen Microbiol*, 59 (1969) 285
- 2 M PASCAL, F KUNST J-A LEPESANT ET R DEDONDER, *Biochimie*, 53 (1971) 1059
- 3 J-A LEPESANT ET R DEDONDER, *C R Acad Sci Paris, Ser D*, 266 (1969) 1442
- 4 M DEMEREC, E A ADELBERG, A J CLARK ET P E HARTMAN, *Genetics*, 54 (1966) 61
- 5 J-A LEPESANT, F KUNST, A CARAYON ET R DEDONDER, *C R Acad Sci Paris, Ser D*, 269 (1969) 1712
- 6 J-A LEPESANT, F KUNST, J LEPESANT-KEJZLAROVA ET R DEDONDER, *Mol Gen Genet*, sous presse
- 7 R DEDONDER E JOZON G RAPOPORT, Y JOYEUX ET A FRITSCH, *Bull Soc Chim Biol*, 45 (1963) 477
- 8 G RAPOPORT ET R DEDONDER, *Bull Soc Chim Biol*, 45 (1963) 493, *ibid*, 48 (1966) 1311, *ibid* 48 (1966) 1323
- 9 D J BELL ET R DEDONDER, *J Chem Soc*, (1954) 2866
- 10 R DEDONDER ET P SLIZEWICZ, *Bull Soc Chim Biol*, 40 (1958) 873
- 11 R DEDONDER dans E LEDERER (Ed), *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique*, 2^e ed, Masson, Paris, 1960, p 1
- 12 N NELSON *J Biol Chem*, 153 (1944) 375, M SOMOGYI, *J Biol Chem*, 160 (1945) 61
- 13 S W COLE C S HANES H J JACKSON ET B C LOUGHMAN cites par D J BELL dans *Modern Methods in Plant Analysis*, Springer, Berlin, vol 2, 1955, p 21
- 14 O H LOWRY, N J ROSENBROUGH, A L FARR ET R J RANDAL, *J Biol Chem*, 193 (1951) 265
- 15 T BUCHER, *Biochim Biophys Acta*, 1 (1947) 292
- 16 R DEDONDER, *Methods Enzym*, 8 (1966) 500
- 17 R DEDONDER, *Bull Soc Chim Biol*, 42 (1960) 1745
- 18 B J DAVIS, *Ann N Y Acad Sci* 121 (1964) 404
- 19 D A YPHANTIS, *Biochemistry*, 3 (1966) 297
- 20 A ULLMAN, M E GOLDBERG, D PERRIN ET J MONOD, *Biochemistry*, 7 (1968) 261
- 21 C TANFORD, K KAWAHARA ET S LAPANJE, *J Amer Chem Soc*, 89 (1967) 729
- 22 K KAWAHARA ET C TANFORD, *J Biol Chem*, 241 (1966) 3228
- 23 O OUCHTERLONY *Acta Pathol Microbiol Scand*, 32 (1953) 231
- 24 H HEIDELBERG ET F E KENDALL, *J Exp Med*, 50 (1929) 809
- 25 A DELOBBE, *Bull Soc Chim Biol*, 50 (1968) 643
- 26 J-N BARBOTIN, resultats non publies
- 27 A DELFOUR, resultats non publies