



Studium syntezy lewanu, katalizowanej przez lewanosacharazy bakteryjne

Artur Szwengel, Leonarda Gruchała, Halina Roszyk,
Maria Czarnecka, Zbigniew Czarnecki

Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Rolniczego,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Study of levan synthesis – bacterial levansucrases as biocatalysts

Summary

The paper reviews study of levan synthesis with bacterial enzymes. The following main subjects are discussed 1) levan description (molecular weight, fructans as substrate in depolymerisation reaction) 2) systematic and profile of bacterial levansucrases (substrate specificity, kinetic of transfructosylation reaction, effects of various agents on synthesis of levan, secretion mechanism and isolation of levansucrase, *in vivo* and *in vitro* efficiency of levan production process).

Key words:

levan, levansucrase, fructo-oligosaccharides, fructans, prebiotic.

Adres do korespondencji

Artur Szwengel,
Instytut Technologii
Żywności Pochodzenia
Rolniczego,
Wydział Nauk o Żywności
i Żywieniu,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 28,
60-637 Poznań;
e-mail:
artursz@au.poznan.pl

1. Wstęp

Ciągle poszukuje się nowych źródeł polisacharydów poprawiających właściwości technologiczne żywności lub charakteryzujących się specyficznymi właściwościami funkcjonalnymi. Do takich należą wodorosty morskie, z których pochodzą alginiany (*Laminaria*, *Ascophyllum*), karagen (*Sarcotalia*, *Gigartina*, *Chondrus*), a także bakterie syntetyzujące alginiany (*Azotobacter*, *Pseudomonas*), ksantany (*Xanthomonas*) i dekstrany (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) (1-3).

Bakteryjne polisacharydy to potencjalnie źródło nowych funkcjonalnych biopolimerów dla przemysłu spożywczego. Do produktów żywnościowych są wprowadzane najczęściej jako zagęstniki i czynniki żelujące w celu modyfikacji tekstury żywności (4). Niosą one ze sobą często wymierne korzyści ekonomiczne dzięki swej produktywności chemicznej, stabilnych kosztów wytwarzania oraz niezachwianej podaży (5).

Docelowo użyteczne polisacharydy mogą być wytwarzane bezpośrednio w produkcji lub też wprowadzone do niego jako jeden ze składników pozyskanych uprzednio na drodze syntezy *in vivo*, jak i *in vitro*. Wiele bakterii wytwarzających egzopolisacharydy bezpośrednio w produkcji spożywczym kształtuje jego strukturę. Powszechnie wiadomo, że bakterie fermentacji mlekowej (LAB, ang. *Lactic Acid Bacteria*) zdolne są do wytwarzania homopolisacharydów, tj. dekstranu, mutanu, alternanu, lewanu, inuliny i heteropolisacharydów, które zbudowane są najczęściej z podjednostek glukozy, galaktozy i ramnozy. Polimery te charakteryzują się zróżnicowaną masą cząsteczkową, co z kolei rzutuje na reologię produktu. Znane są aplikacje kultur starterowych, wytwarzających egzopolisacharydy w jogurcie i kefirze.

Przykładowe gatunki LAB, zdolne do syntezy homopolimerów to: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides*, a heteropolisacharydów: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lb. sake*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. Helveticus* i *Streptococcus thermophilus* (6-8).

Generalnie, liczba egzopolisacharydów wytwarzanych przez LAB w matrycy produktu spożywczego jest niska, a ich synteza niestabilna. Wynika to z faktu utraty plazmidów lub obecności mobilnych elementów genomu, przegrupowania genomu; dotyczy to szczególnie bakterii mezofilnych (9). Z tych powodów poszukuje się nowych szczepów bakteryjnych. Mikroorganizmy te powinny syntetyzować z wysoką wydajnością egzopolisacharydy o zdefiniowanych właściwościach technologicznych i prozdrowotnych, które można wprowadzić również do produktów niefermentowanych (10).

2. Charakterystyka lewanu – polisacharydu pochodzenia bakteryjnego

Lewan jest homopolimerem fruktozy z wiązaniami $\beta(2\rightarrow6)$ -fruktofuranozydowymi, należy do fruktanów bakteryjnych serii 6-kestozy. Wytwarzany jest z sacharozy w reakcji transfruktozylacji, którą katalizuje lewanosacharaza (β -2,6-fruktan: D-glukozy-1-fruktozylotransferaza, E.C. 2.4.1.10.) (11). Drugim, szeroko rozpowszechnionym fruktanem jest inulina, fruktan roślinny, serii 1-kestozy o wiązaniach $\beta(2\rightarrow1)$ -glikozydowych (12). Wiele prac z zakresu pro- i prebiotyków koncentruje się na inulinie, m.in. ze względu na udowodnione właściwości prebiotyczne, jak i tendencję do żelowania w wodnych roztworach (13). Lewan w przeciwieństwie do inuliny nie

żeluje i rozważany jest generalnie jako polimer niepęczniejący w wodzie w temperaturze pokojowej (14). Jego prebiotyczne właściwości wciąż nie zostały jednoznacznie udokumentowane (15,16). Właściwości te zawężają zatem spektrum aplikacyjne lewanu. Wiele wcześniejszych badań koncentrowało się na lewaniu głównie z powodu jego syntezy przez mikroflorę wywołującą próchnicę zębów (17). Jednakże większość ostatnich prac dotyczy roli lewanu w patogenezie roślin (18), jego właściwości przeciwnowotworowych (19), przeciwolesterolowych (16) oraz prebiotycznych.

2.1. Pochodzenie i budowa lewanu

Fruktany typu lewanu syntetyzowane są przez różne gatunki bakterii – m.in. *Zymomonas mobilis* (20), *Bacillus subtilis* (21), *Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia herbicola*, *Serratia* sp. (22), *Rahnella aquatilis* (23), *Pseudomonas syringae* (24), *Acetobacter xylinum* NCI 1005 (25), *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (26), *Lactobacillus reuteri* LB 121, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 (27).

W zależności od źródła i warunków syntezy pozyskiwany lewan charakteryzuje się zróżnicowaną masą cząsteczkową i odmienną strukturą przestrzenną. Czynniki decydujące o zmienności tych podstawowych cech powinny zatem być szczegółowo zdefiniowane, ponieważ zarówno masa cząsteczkowa jak i przestrzenna konformacja cząsteczki wpływa na właściwości fizyczne.

2.1.1. Podział sacharydów – polimerów fruktozy

Sacharydy fruktozowe można podzielić przyjmując jako kryterium stopień polimeryzacji (DP). Pierwszą grupę stanowią fruktoooligosacharydy (FOS) – krótkołańcuchowe fruktany zbudowane z 2-10 reszt fruktofuranozydowych. Występują jako oligosacharydy homogenne, złożone wyłącznie z fruktozy, oraz jako oligosacharydy heterogenne zbudowane z jednej cząsteczki sacharozy i 7-8 reszt fruktozy. W przyrodzie oraz w produktach otrzymanych w wyniku biokonwersji fruktanów lub sacharozy występują mieszaniny fruktoooligosacharydów o stopniu polimeryzacji od 3 do 7. Do fruktoooligosacharydów zalicza się również inulobiozę o DP = 2 (28). Druga grupa to polisacharydy fruktozowe – związki powstające wskutek kondensacji cząsteczek monosacharydów przy jednoczesnym wydzielaniu cząsteczek wody. Za polisacharyd uważa się cząsteczkę o stopniu polimeryzacji większym niż 10 (29).

Drugim kryterium podziału sacharydów jest rozpuszczalność w 80% (v/v) etanolu i odporność na proces trawienia w przewodzie pokarmowym. Często oligosacharydy o DP między 2 a 50 określane są jako niestrawne oligosacharydy. Podział oparty na rozpuszczalności oligosacharydów i polisacharydów w etanolu pozwala uniknąć zacierania granicy między tymi grupami sacharydów. Obecnie jako błonnik pokar-

mowy rozumie się frakcje polisacharydową nierozpuszczalną w 80% etanolu. W zaproponowanym podziale (30) można zaklasyfikować sacharydy fruktozowe w cztery grupy zgodnie z tabelą 1.

Tabela 1

Klasyfikacja sacharydów fruktozowych (opracowanie własne)

Grupa	Przykładowe sacharydy
monosacharydy i disacharydy	fruktoza, sacharoza
krótkołańcuchowe sacharydy fruktozowe (rozpuszczalne w 80% etanolu)	fruktooligosacharydy (1-kestoza, nystoza, fruktozylo-nystoza), oligomery inuliny (inulobioza) i lewanu (lewulany, lewanobioza), cykliczne formy dimeryczne powstałe z inuliny i lewanu
polimery fruktozy	inulina, lewan
heteropolisacharydy	obecne w ścianach komórkowych roślin (błonnik pokarmowy) inne polisacharydy (gumy, słuzy roślinne i inne izolowane nieskrobiowe polisacharydy w tym i bakteryjne)

Powszechnie lewan występuje w formach polimerycznych o $DP > 10$. Zalicza się go do β -(2 \rightarrow 6)-(frukto)polimerów. Obecność terminalnej glukozy w łańcuchu kwalifikuje produkty enzymatycznej syntezy lewanu do grupy heteropolisacharydów. Jednakże w literaturze, ze względu na znikomy procentowy udział monomerów glukozy w stosunku do fruktozy, lewan określany jest jako homopolimer fruktozy. Znane są też β -(2 \rightarrow 6)-fruktooligosacharydy lewanu – lewulany. Oligosacharydy te otrzymywane są w wyniku częściowej depolimeryzacji lewanu.

2.1.2. Masy cząsteczkowe lewanu

Masy cząsteczkowe lewanu determinowane są przez warunki reakcji syntezy. Temperatura to jeden z ważniejszych parametrów takiej reakcji. Według jednych autorów synteza lewanu o dużej masie cząsteczkowej przebiega wydajniej w wyższych temperaturach, tj. 50°C (11), inni twierdzą, że temperatury powyżej 18°C powodują spadek stopnia polimeryzacji lewanu, przypuszczalnie na skutek spadku powinowactwa enzym-lewan i częściowej hydrolizy lewanu w wysokich temperaturach (24). Tezy te nie mają jednakże praktycznego przełożenia w odniesieniu do wszystkich syntez prezentowanych w piśmiennictwie. Profil mas cząsteczkowych lewanu otrzymanego w wyniku syntezy *in vitro* (lewanosacharaza z *Bacillus subtilis* C4) był niezależny od temperatury syntezy, jak i stężenia początkowego sacharozy. Otrzymywano dwie frakcje lewanu – wysokocząsteczkową (10⁷ Da) oraz niskocząsteczkową (od 0,5 do 10 kDa). Wysoko- i niskocząsteczkowy lewan syntetyzowany był jednocześnie, co wskazuje, że krótkołańcuchowe cząsteczki nie powstawały w koń-

cowej fazie, kiedy to stężenie sacharozy było zbyt niskie do wydajnej transformacji przez enzym (31).

Masy cząsteczkowe frakcji o wysokim stopniu polimeryzacji mogą osiągać wartości rzędu nawet mega daltonów (MDa). W warunkach *in vivo*, w temp. 37°C (enzym pozyskiwano z hodowli *Bacillus subtilis* [natto] Takahashi) uzyskiwano lewan o profilu mas odpowiednio dla frakcji wysokocząsteczkowej 1,8 MDa, a dla niskocząsteczkowej 11,9 kDa (32). *Lactobacillus reuteri* 121 syntetyzował natomiast lewan o masie cząsteczkowej ponad 2 MDa i 150 kDa (33). Istnieją również metody indukowania syntezy wysokopolimeryzowanego lewanu o masie cząsteczkowej rzędu MDa poprzez wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej 2-metylo-2-propanolu (34).

Proces immobilizacji enzymu także wpływa na wielkość cząsteczek syntetyzowanego lewanu. Unieruchomiona na hydroksypatycie lewanosacharaza wytwarza większe ilości lewanu o niższej masie cząsteczkowej niż forma natywna enzymu (35).

Rozgałęzienia boczne łańcuchów decydują o strukturze przestrzennej polisacharydu, co może nastęrczać pewne trudności w szacowaniu mas cząsteczkowych lewanu. Stwierdzono, że liczba łańcuchów bocznych wzrasta wraz z rosnącą masą cząsteczkową lewanu (36). Zatem szacowane na podstawie objętości hydrodynamicznych masy cząsteczkowe prawdopodobnie nie są adekwatne do wartości rzeczywistych.

Niska lepkość specyficzna przy wysokiej masie cząsteczkowej lewanu sugeruje zwartą sferyczną powierzchnię makročąsteczki. Na podstawie wyników badań z użyciem mikroskopii elektronowej wskazuje się na elipsoidalny kształt molekuł lewanu (37). Globularny kształt wykazuje również wysokocząsteczkowa inulina (M_w 10⁶ Da) syntetyzowana *in vitro* z wykorzystaniem fruktozylotransferazy (EC 2.4.1.9.) ze *Streptococcus mutans* i konidii *Aspergillus sydowi* (inkubowanych w 20% roztworach sacharozy), zawierająca około 5-7% wiązań β -(2→6) glikozydowych (38). Sugeruje to, że elipsoidalna struktura determinowana jest obecnością wiązań β -(2→6) glikozydowych, a wiązania β -(2→1) glikozydowe łańcuchów bocznych lewanu powodują gwałtowny wzrost objętości hydrodynamicznej cząsteczki. Stąd też może wynikać duża rozbieżność mas cząsteczkowych szacowanych metodami chromatografii żelowej.

3. Enzymatyczna synteza lewanów

Wykazana zmienność masy cząsteczkowej syntetyzowanego lewanu skłania do rozpoznania przyczyn tak dużej różnorodności oraz możliwości kształtowania tego parametru jakościowego na drodze modelowania warunków syntezy.

Obliczono, że w enzymatycznej syntezie polifruktanów można otrzymać aż 720 różnych trisacharydów z trzech różnych heksopiranoz. Dlatego istotne jest rozpoznanie szlaków metabolicznych, na drodze których byłyby syntetyzowane polisacharydy o właściwościach najbardziej pożądanym. Istotna jest zatem znajomość stereo- i regioselektywności enzymów uczestniczących w syntezie polisacharydów (39).

Do katalizowania syntezy oligosacharydów używane są dwa główne typy enzymów: hydrolazy (glikozydazy: E.C. 3.2.) oraz transferazy (transferazy glikozylowe: E.C. 2.4.) (40).

3.1. Synteza lewanu przy użyciu hydrolaz

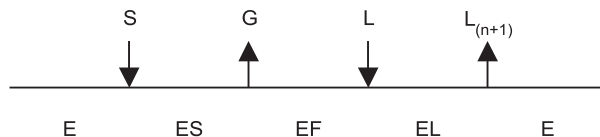
Klasyfikację sacharaz można przeprowadzić na podstawie specyficzności działania oraz swoistości katalizy (z czego wynika klasyfikacja E.C. – system podziału enzymów w czteroliczbowej klasyfikacji). Podział sacharaz uwzględniający podobieństwo genów kodujących te enzymy klasyfikuje je w grupie hydrolaz typu drożdżowego (β -D-fruktofuranozydaz – β -FF-azy) kodowanych przez *suc2* – jak w przypadku *Saccharomyces cerevisiae* (41), które są podobne do: β -fruktofuranozydazy (*bff*) (42), wewnątrzkomórkowych sacharaz z *Bacillus subtilis* (*sacA*) (43), zewnątrzkomórkowych lewanaz (E.C. 3.2.1.65., *sacC*) (44) oraz wewnątrzkomórkowej hydrolazy sacharozowej z *Escherichia coli* (*rafD*) (45).

Glikozydazy, w tym i hydrolazy typu drożdżowego, mogą sprzęgać glikozyłowe cząsteczki w reakcji rewersji (odwróconej hydrolizy) lub też przenosić glikozydowe reszty z aktywowanych donorów na akceptory. Zgodnie z efektem mas, przesunięcie reakcji w kierunku syntezy może zostać uzyskane poprzez wzrost stężenia reaktantów, obniżenie aktywności wody, usuwanie produktów reakcji z mieszaniny poprzez precypitację, ekstrakcję lub też transformację do innego produktu (40). Na tej drodze są syntetyzowane gluko-, manno- i galaktooligosacharydy (46).

Glikozydazy ponadto są szeroko rozpowszechnione i dostępne, mogą wykazywać wysoką termostabilność, co pozwala na operowanie w czasie syntezy wysokimi temperaturami, a także stężonymi roztworami sacharydów. Jednakże głównymi czynnikami limitującymi reakcje rewersji są: niska aktywność glikozydaz w stężonych roztworach, mała wydajność konwersji połączona z otrzymywaniem produktu będącego izomeryczną mieszaniną (47). Glikozydazy katalizują także przeniesienie grup glikozyłowych z pochodnych glikozydowych na molekuly będące akceptorami, które generalnie zawierają grupy hydroksylowe. W tym przypadku wydajność reakcji jest kontrolowana kinetycznie, jako że produkt reakcji stanowi potencjalny substrat dla glikozydazy (40).

3.2. Synteza lewanu przy użyciu transferaz

Druga grupa enzymów katalizujących syntezę oligosacharydów – transferazy – przenosi specyficzne grupy nawet w mieszaninach o dużym rozcieńczeniu. Energia niezbędna w tego typu reakcji syntezy, pochodząca z wiązań glikozydowych substratów jest przechowywana w kowalentnych przejściowych połączeniach glikozyl-enzym (48).



Rys. Sekwencja reakcji enzym-sacharyd w trakcie reakcji transfruktozylacji, gdzie: E – enzym (lewanosacharaza), S – sacharoza, ES – kompleks enzym-sacharoza, G – glukoza, EF – kowalentny kompleks przejściowy fruktozyl-enzym, L – lewan (akceptor), EL – elongowana cząsteczka polimeru, $L_{(n+1)}$ lewan po procesie elongacji (48).

W obrębie transferaz fruktozylowych można wyodrębnić dwie grupy enzymów: transferazy zaliczane do klasy E.C. 2.4.1.9. odpowiedzialne za przeniesienie podjednostek fruktofuranozylowych z sacharozy na akceptor z wytworzeniem wiązań $\beta(2\rightarrow1)$ -glikozydowych oraz zaszeregowane do klasy E.C. 2.4.1.10. tworzące homopolisacharyd o wiązaniach $\beta(2\rightarrow6)$ -glikozydowych (49). Najpowszechniej lewan syntetyzowany jest z udziałem lewanosacharazy – enzymu należącego do grupy transferaz, czyli jest to swoisty transfer podjednostek monomeru z donora na akceptor. Lewanosacharazy (LS) z *Bacillus subtilis* – kodowane przez gen *sucB* (50), wykazują podobieństwo z fruktozylotransferazą (FF) ze *Streptococcus mutans* (E.C. 2.4.1.9., gen *ftf*) (51) oraz LS-zą i β -FF-azą z *Zymomonas mobilis* (*sucZE2*) (52).

W badaniach nad kinetyką transfruktozylacji katalizowanej przez enzymy klasyfikowane w grupie lewanosacharaz z *Bacillus subtilis* dowodzi się, że reakcja ta przebiega zgodnie ze schematem określanym mianem *pinp-pong* (48). Mechanizm ten zilustrowany jest na rysunku i opiera się na istnieniu stanu pośredniego – kompleksu fruktozyl-enzym (48). Część fruktozylowa tego kompleksu jest kowalentnie związana z enzymem przez wiązanie estrowe, gdzie uczestniczy β -karboksylowa grupa kwasu asparaginowego i drugi węgiel (C-2) fruktozowy.

Produkcja nieredukujących oligosacharydów (1-kestozy, nystozy, fruktozylony-stozy) znanych jako *Neosugar*[®], przebiega również z udziałem transferaz fruktozylowych izolowanych z *Aspergillus niger* i *Aureobasidium pullulans* (53). Znana jest także transferaza cyklofruktanowa syntetyzowana przez *Bacillus circulans*, która katalizuje syntezę cząsteczek cyklofruktanu z inuliny, będącego oligosacharydem zawierającym od 6 do 8 podjednostek fruktofuranozy połączonych w pierścień przez cykliczne wiązanie $\beta(2\rightarrow1)$ -glikozydowe (54). Można zatem oczekiwać, że w najbliższej przyszłości zostaną wyizolowane i scharakteryzowane tego typu $\beta(2-6)$ -transferazy.

3.3. Charakterystyka lewanosacharazy

Lewanosacharaza izolowana z *Bacillus subtilis* jest jednym z nielicznych, szczególnie udokumentowanych enzymów katalizujących syntezę lewanu. Enzym ten ma strukturę pojedynczego polipeptydowego łańcucha, nie zawierającego cysteiny (48). Enzym ten wykazuje wysoką rozpuszczalność w roztworach zawierających jony

fosforanowe, natomiast jest nierozpuszczalny w wodzie, co wykorzystywane jest w procesie krystalizacji. Molekuła lewanosacharazy przedstawia wydłużoną strukturę wzdłuż osi y , którą owija, wskutek czego uzyskuje kształt wydłużonej elipsoidy o przybliżonych wymiarach $26 \times 32 \times 117 \text{ \AA}$ (55).

Rozpuszczalne jony żelaza indukują tetrameryzację lewanosacharazy (56). Od sześciu do ośmiu atomów żelaza jest zasocjowanych z tetramerem. Stała powinowactwa metal-proteina jest w tym przypadku niska i wynosi $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Taka struktura powoduje wysoką termostabilność enzymu oraz przyczynia się do wzrostu uporządkowania lewanosacharazy w strukturę helikoidalną (57).

Czynniki warunkujące pofałdowanie lewanosacharazy (z *Bacillus subtilis*, badania *in vitro*), pozwalającymi na uzyskanie odpowiedniej struktury trzeciorzędowej enzymu są: odpowiednie pH, obecność jonów metali i substancji je wiążących (58).

3.3.1. Masa cząsteczkowa lewanosacharazy

Lewanosacharaza występuje w formach różniących się strukturą cząsteczki. Nie stwierdzono dotychczas występowania wielorakich form tego enzymu, czyli produktów wtórnej modyfikacji enzymu, zachowujących jego aktywność biologiczną. Jednakże lewanosacharaza występuje w postaci wielu izoenzymów – powstaje przy udziale różnych genów strukturalnych. Masy cząsteczkowe lewanosacharaz oznaczone techniką SDS – PAGE (elektroforeza w warunkach denaturujących, ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) zawierają się w szerokim zakresie, tj. od 45 do 120 kDa. Zestawienie danych źródłowych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Masy cząsteczkowe lewanosacharaz syntetyzowanych przez wybrane mikroorganizmy

Mikroorganizm	Masa cząsteczkowa lewanosacharazy (kDa)	Literatura
<i>Pseudomonas syringae</i>	45	(24)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	52	(26)
<i>Bacillus</i> sp. TH4-2	56	(59)
<i>Zymomonas mobilis</i>		(60,61)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>		(62)
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	60	(63)
<i>Bacillus circulans</i>	64	(22)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392	90	(64)
<i>Rabnella aquatilis</i> JCM-1683	120	(65)

3.3.2. Specyficzność substratowa lewanosacharazy

Specyficzność substratowa lewanosacharaz oraz różnorodność końcowych produktów zależą od źródła pochodzenia enzymu. Lewanosacharaza z *Microbacterium laevaniformans* katalizuje syntezę 1-kestozy (GF₂), nystozy (GF₃), 1-fruktozylo-nystozy (GF₄), chociaż liczba tych oligosacharydów jest nieznaczna w stosunku do lewanu. Różnorodne oligosacharydy fruktozytowe powstają w czasie reakcji, jeżeli w medium poza sacharozą obecne są inne sacharydy. Wykazano, że disacharydy są lepszymi fruktozyłowymi akceptorami niż monosacharydy, a sacharydy zawierające pierścień piranowy (galaktoza, maltoza, laktoza, melibioza, celobioza) są lepszymi akceptorami niż sacharydy zawierające pierścień furanowy (arabinoza, ksyloza, rafinoza) (63). Uogólnienia te mogą być jedynie stosowane w obrębie testowanego izoenzymu, tak np. lewanosacharaza z *Bacillus macerans* EG-6, określana przez autorów jako nowa fruktozylotransferaza – FTA-za, wydajnie katalizowała transfer reszt fruktozowych na D-ksylozę, jako najlepszy akceptor wśród testowanych sacharydów. Ustalono następującą kolejność przydatności poszczególnych sacharydów jako akceptorów: D-ksyloza, L-arabinoza, L-sorboza, D-galaktoza, maltoza, D-mannoza, laktoza, rafinoza (66). W wyniku zastosowania ksylozy otrzymano fruktozylo-ksylozę (FX). Wydajna synteza FX pozwala na aplikację uzyskanego oligosacharydu jako substancji słodzącej, inhibującej glukozylotransferazę wytwarzaną w jamie ustnej przez *Streptococcus mutans*. Powstały D-glukan sprzyja powstawaniu próchnicy (67).

Lewanosacharaza może również być zastosowana do syntezy fruktozydu metylu (MF), będącego alkilem fruktozydowym syntetyzowanym m.in. przez inwertazę. Większość hydrolaz nie wykazuje transferycznej aktywności w obecności niskich stężeń rozpuszczalników organicznych, ponieważ równowaga reakcji jest przesunięta w stronę hydrofilową, tj. transferu reszt fruktozylowych na wodę, co skutkuje spadkiem ogólnej liczby wiązań glikozydowych w mieszaninie reakcyjnej. W przypadku lewanosacharazy, będącej transferazą nie obserwowano niekorzystnego, nadmienionego efektu (68). Enzymatyczna kataliza MF może być substytutem syntez chemicznych, ponieważ chroni węgiel anomeryczny w czasie reakcji. Metody chemiczne nie pozwalają uzyskać czystego anomerycznie fruktozydowego alkilu. Wydajna synteza (70%) MF jest możliwa w reakcji z wykorzystaniem rekombinowanej lewanosacharazy (transferazy) z *Rahnella aquatilis*, gdzie jest wymagany metanol jako akceptor acylowy. Większość lewanosacharaz, jak wykazano we wcześniejszych pracach, jest inhibowana przez MF, a w szczególności hamowana jest synteza lewanu (23).

3.3.3. Aktywność lewanosacharazy

Pierwsze, a zarazem jedyne prace, w których w sposób kompleksowy opisuje się wpływ siły jonowej i primerów lewanu na pomiar aktywności lewanosacharazy opublikowano w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych (22,74,75). W później-

szych pracach w sposób szczegółowy określa się wpływ czynników fizykochemicznych na reakcje katalizowane przez lewanosacharazę.

Wykazano, że suplementacja mieszaniny reakcyjnej lewanem jako akceptorem (zarówno nisko- (DP = 120) i wysokocząsteczkowym (DP = 1200)) powoduje dwukrotny wzrost szybkości reakcji. Oligomery o DP od 2 do 5 nie wpływały na aktywność enzymu, a lewan o DP = 9 powodował 50% wzrost aktywności. Rosnąca koncentracja soli fosforanowych znosiła dodatni efekt wzrostu szybkości reakcji uzyskiwany pierwotnie poprzez suplementację mieszaniny reakcyjnej lewanem o zróżnicowanym DP. Podobne rezultaty uzyskano stosując NaCl. Rosnące stężenie buforu fosforanowego powodowało obniżenie ilości syntetyzowanego lewanu o wysokim stopniu polimeryzacji (69). Inhibicję transferu reszt fruktozylowych oraz obniżenie syntezy lewanu o wysokiej masie cząsteczkowej przez wzrost siły jonowej mieszaniny reakcyjnej potwierdzono w późniejszych, niezależnych badaniach (70). Obecność lewanu w medium reakcyjnym znacząco wówczas skracała czas reakcji. Autorzy sugerują ponadto, że wyższe stężenia buforu fosforanowego mogą być wykorzystane jako jeden z czynników regulujących stopień polimeryzacji lewanu syntetyzowanego enzymatycznie.

3.3.4. Kinetyka reakcji transfruktozylacji

Lewanosacharaza przenosi reszty fruktozylowe z sacharozy na alkohol pierwszorzędowy przy szóstym węglu (C-6) fruktozy; na nieredukujący koniec łańcucha fruktanu. Enzym ten aktywuje przebieg trzech charakterystycznych reakcji, tj. syntezę lewanu z sacharozy w wyniku transfruktozylacji, z uwolnieniem glukozy; hydrolizę lewanu do fruktozy oraz reakcje wymiany podjednostek [^{14}C]glukozy w reakcji fruktozo-2,1-glukoza + [^{14}C]glukoza w wyniku czego powstaje fruktozo-2,1-[^{14}C]glukoza + glukoza. Lewanosacharaza wykazuje także hydrolityczną aktywność w stosunku do lewanów o niskiej masie cząsteczkowej (24).

Lewan, sacharoza, woda, alkohole oraz mono- i oligosacharydy mogą służyć jako akceptory reszt fruktozylowych. Rafinoza jako substrat reakcji transfruktozylacji katalizowanej przez lewanosacharazę z *Bacillus subtilis* prowadzi do syntezy lewanu z wydzieleniem melibiozy. Lewanobioza – dwucukier z wiązaniem eterowym utworzonym między węglem drugim (C-2) podjednostki fruktozowej przeniesionej z sacharozy a szóstym węglem (C-6) wolnej fruktozy jest syntetyzowana, wtedy gdy w medium reakcyjnym donorem reszt fruktozylowych jest sacharoza, a akceptorem wolna fruktoza (70).

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku potwierdzono, że lewan wzmaga aktywność transferyczną lewanosacharazy, co dowodzi, iż jest on lepszym akceptorem dla reszt fruktozylowych niż woda czy glukoza. Obecność lewanu powoduje dostrzegalny wzrost aktywności lewanosacharazy z jednoczesnym przesunięciem aktywności enzymu – z hydrolitycznej do transferycznej, ukierunkowanej na syntezę

polimeru (31). Najważniejszy parametr kinetyczny – stała Michaelisa-Menten – K_m – jest mocno zróżnicowana w zależności od mikroorganizmu syntetyzującego (tab. 3).

Tabela 3

Wartości stałych Michaelisa dla lewanosacharaz izolowanych z podłoży bakteryjnych

Mikroorganizm	K_m [M]	Literatura
<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	0,007	(33)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	0,012	(62)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.392	0,013	(64)
<i>Bacillus</i> sp. TH4-2	0,017	(11)
<i>Bacillus subtilis</i>	0,020	(21)
<i>Rabnella aquatilis</i> JCM-1683	0,050	(65)
<i>Zymomonas mobilis</i>	0,122	(60)
<i>Pseudomonas syringae</i>	0,160	(24)

3.3.5. Wpływ czynników fizykochemicznych na aktywność lewanosacharazy

Najważniejszym czynnikiem decydującym o aktywności lewanosacharazy jest temperatura. W jednych z pierwszych badań nad termostabilnością lewanosacharazy wykazano, że enzym pozyskany z podłoży hodowlanych *Bacillus subtilis* traci połowę swojej aktywności w czasie 22 min inkubacji w temp. 22°C, natomiast niemal natychmiastowa inaktywacja następowała w 60°C. Wykazano, że dodatek jonów żelaza, glinu lub cynku powodował wzrost termostabilności enzymu. Pozyskana lewanosacharaza była natomiast stabilna podczas przechowywania w temperaturze -20°C. Powtarzająca się procedura zamrażania i odmrażania powodowała jednakże obniżenie aktywności preparatu enzymatycznego (21).

Na podstawie badań dotyczących lewanosacharaz izolowanych z różnych źródeł stwierdzano duże różnice w charakterystyce, jak i właściwościach enzymu kwalifikowanego w tej samej klasie (E.C.) (24). Kilka ze scharakteryzowanych lewanosacharaz wykazywało wysoką aktywność katalityczną w wysokich temperaturach. Wyższe temperatury sprzyjały jednakże przede wszystkim hydrolizie. Zestawienie zakresu temperatur hydrolizy sacharozy i syntezy lewanu dla poszczególnych lewanosacharaz opisanych w literaturze przedstawiono w tabeli 4.

Znane są również lewanosacharazy, których aktywność jest niezmienna w szerokim zakresie pH, jak i temperatury, np. lewanosacharaza z *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 (64). Różnice między ilością sacharozy ulegającej procesowi hydrolizy w przypadku lewanosacharazy z *Bacillus subtilis* C4 niwelowano poprzez zastosowanie wyższych stężeń sacharozy (2,6 M). Uzyskiwano wówczas taki sam stosunek aktywności hydrolitycznej do transferycznej w temperaturze 60 jak i 37°C (31).

Tabela 4

Wartości temperatur w których lewanosacharazy izolowane z różnych bakterii wykazują najwyższe aktywności transferyczne (synteza lewanu) i hydrolityczne (hydroliza sacharozy)

Mikroorganizm	Optymalne temperatury (°C) dla:		Literatura
	syntezy lewanu	hydrolizy sacharozy	
<i>Bacillus</i> sp. TH4-2	50	60	(11)
<i>Bacillus circulans</i>	40	45	(22)
<i>Pseudomonas syringae</i>	18	60	(24)
<i>Zymomonas mobilis</i> (lewanosacharaza z rekombinowanej <i>E. coli</i>)	30	60	(61)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	40	60	(71)

Wysoka stabilność enzymu w skrajnych temperaturach, zarówno niskich jak i wysokich jest ważna z dwóch powodów. Z jednej strony zmniejsza ryzyko rozwoju mikroflory zanieczyszczającej, a z drugiej przyczynia się do obniżenia aktywności innych enzymów. Istotne jest, aby przy tym skojarzyć najkorzystniejszą temperaturę z najwyższym poziomem aktywności transferycznej enzymu. Temperatura 4°C była optymalną dla syntezy lewanu przy zastosowaniu rekombinowanej lewanosacharazy, immobilizowanej na hydroksyapatycie (35). Aktywność enzymu po 40. dobach przechowywania przy tej temperaturze wynosiła 67% aktywności początkowej. Najstabilniejszą termicznie lewanosacharazą, jak dotychczas, jest fruktotransferaza wyizolowana z podłoża *Bacillus* TH4-2, która nie wykazywała utraty swej aktywności biologicznej po jednodzinnej inkubacji w temperaturze 50°C (11). Lewanosacharaza z *Zymomonas mobilis* jest stabilna w 37°C (60). Istnieją zatem duże rozbieżności w wartościach temperatur będących inaktywującymi dla lewanosacharaz w zależności od ich pochodzenia.

Wzrost termostabilności enzymu można uzyskiwać m.in. poprzez obniżenie aktywności wody środowiska reakcji lub też przez modyfikację enzymu w celu wytworzenia form wielorakich. Zatem w wyniku modyfikacji lewanosacharazy z *Bacillus natto* otrzymano koniugat enzym-glukomannan drożdżowy stabilny w temperaturze 45°C. Równocześnie uzyskano przesunięcie optimum temperaturowego z 40 do 50°C i znaczące wydłużenie czasu połowicznej utraty aktywności w 45°C (z 22 min do ponad 1 h) (59).

Najwyższe aktywności dla większości lewanosacharaz uzyskiwano przy zakresie pH od 5,0 do 6,5 (11,24,59,61,62,71,72). W większości przypadków odczyn zasadowy środowiska powoduje jedynie obniżenie poziomu aktywności lewanosacharazy. Wyjątek stanowi lewanosacharaza izolowana z *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392, która wykazuje najwyższą aktywność w medium o odczynie kwaśnym, a przy wartościach pH powyżej 7,0 traci aktywność (64).

Duży wpływ na aktywność poszczególnych lewanosacharaz mają jony metali, a także ich stężenie w medium. Wysoką aktywację enzymu jonami Fe²⁺ wykazano w stosunku do lewanosacharazy z *Bacillus* sp. TH4-2. Jony te w stężeniu 5 mM pod-

wyższą czterokrotnie aktywność enzymu w stosunku do próbki kontrolnej (59). W przypadku lewanosacharaz z *Acetobacter diazotrophicus* (62) oraz *Rahnella aquatilis* JCM-1683 (0) jony Fe^{2+} powodowały jednak nieznaczną utratę aktywności. Interesujące jest, że lewanosacharaza w badaniach Ammara i wsp. (0) była w 100% inaktywowana przez jony Zn^{2+} . W pracy Parka i wsp. (63) jony cynku działały inhibująco w 60% (lewanosacharaza z *Microbacterium laevaniformans*) podczas gdy enzym izolowany z *Zymomonas mobilis* był stymulowany tymi jonami; aktywność enzymu była wyższa o 28% (35).

3.3.6. Inhibicja lewanosacharazy

Glukoza jest silnym inhibitorem lewanosacharazy, głównie poprzez reakcję przenoszenia podjednostek fruktozy na glukozę z jednoczesnym uwolnieniem cząsteczek glukozy z sacharozy. W wyniku tego pula wiązań glikozydowych, ani skład mieszaniny reakcyjnej nie ulega zmianie (31). Reakcję tej wymiany można ująć równaniem: $\text{G}^* + \text{G-F} \rightarrow \text{G}^* \cdot \text{F} + \text{G}$ (G^* , G – glukoza, F – fruktoza, G-F – sacharoza). Stężenia sacharozy powyżej 300 mM również powodowały obniżenie aktywności transferycznej lewanosacharazy izolowanej z *Bacillus circulans*. Aktywność hydrolityczna enzymu pozostawała na tym samym poziomie, a stymulujący efekt lewanu wywoływał wzrost transferu (22).

Inhibującemu działaniu glukozy przeciwdziała aktywujący wpływ niskocząsteczkowego lewanu. Jednak początkowo w medium reakcyjnym, pomimo wprowadzenia primerów reakcji, przeważa hydroliza sacharozy. Badając przebieg syntezy lewanu obserwowano odwrotnie proporcjonalną zależność – obniżeniu szybkości powstawania wolnej fruktozy towarzyszyła wzrastająca szybkość powstawania lewanów (31). Jest to sprzeczne z doniesieniami o stałym poziomie aktywności hydrolitycznej, odnotowanej w badaniach nad lewanosacharazą z *Bacillus circulans* (22). W większości przypadków wzrost wydajności/szybkości syntezy lewanu można tłumaczyć zniesieniem inhibicji wywoływanej przez wolną glukozę. Znany efekt hamowania hydrolizy z zastosowaniem primerów reakcji (niskocząsteczkowych lewanów) nie zawsze przyczynia się do uzyskania wymiernych rezultatów, co stanowi o wyjątkowości każdej z izolowanych lewanosacharaz.

W badaniach *in vivo* dowiedziono, że NaCl lub KCl stymuluje syntezę lewanu w czasie fermentacji z *Zymomonas mobilis* (73). W późniejszych badaniach *in vitro* surowego ekstraktu lewanosacharazy potwierdzono aktywujące działanie NaCl, w zakresie stężeń 0,03-0,7 M NaCl (74). Aktywujący efekt soli był odwrotnie proporcjonalny do stężenia sacharozy – przy 23,4 mM koncentracji sacharozy aktywność wzrastała 17-krotnie, tylko 3-krotnie przy stężeniu 158 M. Autorzy pracy sugerują, że lewanosacharaza ma właściwości alosterycznego enzymu, ze wskazaniem na NaCl i KCl jako heterotropowe aktywatory. Wyniki te są z kolei sprzeczne z rezultatami uzyskanymi dla lewanosacharazy z *Bacillus subtilis* (69).

3.3.7. Synteza, sekrecja i izolacja lewanosacharazy

Lewanosacharaza jest enzymem produkowanym przez wiele szczepów bakterii. Najbardziej intensywne badania wykonywano dotychczas nad lewanosacharazą izolowaną z *Bacillus subtilis*, enzymem indukcyjnym oraz zewnątrzkomórkowym. Znane są także konstytucyjne i wewnątrzkomórkowe lewanosacharazy, np. fruktozylo-transferaza izolowana z *Aerobacter levanicum* (21). Większość spośród egzoenzymów syntetyzowana jest przez *Bacillus subtilis* w czasie stacjonarnej fazy wzrostu, jedynie lewanosacharaza należy do unikatowych w tym względzie protein, ponieważ jej sekrecja do zewnętrznego medium wzrostowego odbywa się w czasie wykładniczej fazy wzrostu (75). Opatentowano także metody opisujące syntezę zewnątrzkomórkowej lewanosacharazy z *Bacillus licheniformis* NRRL B-18962, które nie wymagają suplementacji podłoża hodowlanego sacharozą (76).

W badaniach nad sekrecją lewanosacharazy przez mutant charakteryzujący się nadprodukcją tego enzymu – *Bacillus subtilis* QB 2010 – dowiedziono, że wydzielanie enzymu jest zależne od czynników powodujących fizykochemiczne interakcje z membraną komórkową, a nie zależą od wewnątrzkomórkowej syntezy lipidów. Rezultaty te są rozbieżne z mechanizmem syntezy wewnątrzkomórkowych enzymów, których produkcja jest ściśle powiązana z obecnością fosfolipidów w komórkach bakterii z rodzaju *Bacillus*. Dowodzi to znaczenia połączeń membranowych (form membranowych) w sekrecji lewanosacharazy (77), a także o konieczności doboru odpowiednich czynników środowiskowych warunkujących poprawny przebieg procesu syntezy i sekrecji.

Jednym z takich czynników jest zasolenie środowiska. System regulacyjny, odpowiedzialny za wzrost bakterii w podłożach o dużych stężeniach soli, stymuluje ekspresję m.in. genu *sacB* kodującego lewanosacharazę. Stres spowodowany obecnością soli powoduje zatem dziewięciokrotny wzrost ekspresji tego genu przy 1 M stężeniu NaCl u laseczek z rodzaju *Bacillus* (78).

Kolejnym czynnikiem warunkującym powstawanie aktywnej formy lewanosacharazy poza mechanizmem ekspresji genu jest translokacja enzymu przez błonę komórkową bakterii *Bacillus subtilis*, która przebiega dwuetapowo. Forma ostateczna enzymu jest poprzedzona membranową formą prekursorową, która ulega przeobrażeniu w procesie proteolizy (75). Drugi etap procesu sekrecji lewanosacharazy ma cechy aktywnego transportu przez błony komórkowe, co z kolei jest ściśle powiązane z dostępnością żelaza dla komórek bakteryjnych *Bacillus subtilis* (56). W badaniach *in vivo* potwierdzono znaczącą rolę stężenia jonów H^+ i/lub jonów metali (Ca^{2+}) w procesie sekrecji lewanosacharazy z *Bacillus subtilis*. Określono, że stężenie Ca^{2+} powyżej 5 mM działa aktywująco na proces przejścia konformacyjnego – uzyskania trzeciorzędowej struktury w $pH \geq 7$, co jest czynnikiem determinującym sekrecję enzymu. W kwasowym środowisku (pH 5,8), sekrecja lewanosacharazy była wydajna bez udziału jonów wielowartościowych metali. Natomiast podczas wzrostu bakterii w wyższych temperaturach zarówno kwasowy od-

czyn podłoża hodowlanego jak i jony Ca^{2+} były niezbędne do wydajnej sekrecji lewanosacharazy (79).

Uzyskanie wzmożonej sekrecji enzymu nie gwarantuje jednak pozyskania preparatów lewanosacharazy o wysokich parametrach jakościowych. W wielu pracach pierwszy etap izolacji lewanosacharazy z płynu hodowlanego (podłoża wzrostowego) to precypitacja etanolem. Przyłączenie do enzymu łańcucha peptydowego złożonego z sześciu aminokwasów histydyny prowadzi do wymiernego postępu w zakresie izolacji. Umożliwiając metodą chromatografii powinowactwa wyizolować preparat enzymatyczny o 95% homogenności. Tak uzyskano rekombinowaną lewanosacharazę z *Escherichia coli* BL21 (72).

3.3.8. Reakcje syntezy lewanu i ich wydajność

Synteza lewanu może być zainicjowana jedynie przez komponenty zakończone przez nieredukującą fruktozę z wolną grupą alkoholową przy węglu C-6 (56).

Zróżnicowane wydajności syntez rejestrowano w zależności od rodzaju syntezy (*in vivo* albo *in vitro*), warunków reakcji i pochodzenia zastosowanej lewanosacharazy. Zestawienie zaprezentowano w tabeli 5.

Tabela 5

Wydajność syntezy lewanu przy danej temperaturze i stężeniu sacharozoy

Mikroorganizm	Synteza	Temperatura syntezy (°C)	Stężenie sacharozoy (%)	Wydajność (%)	Uwagi	Literatura
1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>in vivo</i>	37	15	36	–	(80)
<i>Bacillus subtilis</i> (natto) Takahashi	<i>in vivo</i>	37	20	25	symultaniczna produkcja lewanu i kwasu poli- γ -glutaminowego możliwa jest po suplementacji podłoża – L-glutaminianem	(32)
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>in vivo</i>	30	15	67	wydajność określona przy jednoczesnej syntezie lewanu i etanolu	(81)
<i>Bacillus</i> sp. TH-2	<i>in vitro</i>	50	36	55	–	(11)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> SRT4	<i>in vitro</i>	40	60	90	główne produkty to 1-kestoza i nystoza	(71)
<i>Bacillus natto</i>	<i>in vitro</i>	30	10	5,7	wzrost wydajności syntezy lewanu do 23,0% po związaniu lewanosacharazy w kowalentny kompleks z glukomannanem	(59)
<i>Bacillus subtilis</i> C4	<i>in vitro</i>	37	od 34 do 89	30	uzyskiwano ten sam efekt w 60°C przy 2,25 i 2,6 M stężeniu sacharozoy	(31)

1	2	3	4	5	6	7
<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>in vitro</i>	0	20	27	wykorzystano rekombinowaną lewanosacharazę, ekspresja w <i>E. coli</i>)	(72)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>in vitro</i>	37	15	21	suplementacja medium jonami Mn ²⁺ powodowała wzrost wydajności do 29%	(82)

3.3.9 Degradacja enzymatyczna lewanu

Egzopolisacharydy bakteryjne mogą być degradowane przez hydrolazy lub też liazy polisacharydowe. Pomimo że szczepy bakteryjne dysponują potencjałem enzymatycznym pozwalającym na depolimeryzację makrocząstek sacharydowych, jednak rzadkością jest asymilacja syntetyzowanych polisacharydów jako źródła węgla i energii przez bakterie, które dany polimer uprzednio wytworzyły. Hydrolazy polisacharydowe można podzielić na endogenne i egzogenne. Często stanowią kompleks enzymów wytwarzanych przez pojedyncze szczepy lub też kultury mieszane. Wiele bakterii z otoczkami polisacharydowymi jest jednocześnie gospodarzem dla wirulentnych bakteriofagów z wbudowanymi enzymami degradującymi polisacharydy w tym i lewan (83).

Enzymatyczna degradacja lewanu katalizowana jest przez egzo- β -fruktofuranozydazy (E.C. 3.2.1.26) – lewanazę z *Bacillus subtilis* lub z drożdży (*Rhodotorula* sp.) (84,85). Typowa dla tych enzymów jest również kataliza reakcji hydrolizy sacharozy i inuliny oprócz rozkładu lewanu. Drugą grupę stanowią enzymy prowadzące do degradacji lewanu z wytworzeniem: szeregu fruktooligosacharydów – endo-lewanazy (E.C. 3.2.1.65.) (86,87), disacharydu (lewanobiozy) – lewanobiozy (E.C. 3.2.1.64.) (88). Przykładem endo-lewanazy jest enzym wyizolowany z *Bacillus* sp. L7 (89). Katalizuje on endo-hydrolizę lewanu z wytworzeniem obok wolnej fruktozy wielu oligosacharydów o DP od 2 do 12 monomerów.

Specyficzną lewanazą jest lewanobioza, produkowana jako zewnątrzcząsteczkowy enzym przez *Streptomyces exfoliatus* F3-2, która hydrolizuje lewan do difruktozy (lewanobiozy) (90). Lewanaza z *Pseudomonas* sp. no. 43 hydrolizuje lewan z *Zymomonas mobilis* i *Serratia* sp. również tylko do lewanobiozy bez formowania produktów pośrednich (91).

Lewanazy można w związku z tym zaklasyfikować do sześciu użytecznych grup, tj. produkujące wyłącznie fruktozę, hydrolizujące lewan w przewodzie do lewanobiozy, wytwarzające głównie lewanobiozę i lewanotriozy, produkujące DFA IV – cykliczną formę difruktozy, depolimeryzujące lewan do frukto-oligosacharydów z DP w przedziale od 5 do 9, endolewanazy konwertujące lewan do szeregu frukto-oligosacharydów (86).

Trzecią ciekawą grupę enzymów odpowiedzialnych za wewnątrzcząsteczkowy transfer fruktanów stanowią fruktozylotransferazy lewanu (LFTaza), które w wyniku

swojej aktywności biologicznej prowadzą do degradacji lewanu z wytworzeniem nowych fruktooligosacharydów (FOS). Ekspresja LFT-azy jest indukowana obecnością substratu w podłożu wzrostowym. Procedura izolacji kultur wytwarzających enzym przebiega na podłożach suplementowanych lewanem (2% w/v), a produktami reakcji są: DFA IV (di-D-fruktozo-2,6':6,2'-dibezwodnik, główny produkt), fruktoza, dimery fruktozy i oligosacharydy (F2 do F4) (92,93). Znane są także di-D-fruktozo-1,2':2,1'-dibezwodnik (DFA I) i di-D-fruktozo-1,2':2,3'-dibezwodnik (DFA III), produkowane z inuliny (94-96).

3.4. Podsumowanie

Wydajna synteza lewanu wymaga szczegółowego doboru warunków reakcji syntezy właściwych dla danego enzymu. Przytoczone dane literaturowe pozwalają wskazać zakres czynników, które w sposób znaczący determinują wydajność syntezy. Tak jak zasygnalizowano w ostatnim rozdziale, lewan nie musi być końcowym produktem, a może zostać wykorzystany do otrzymywania wielu, nowych i użytecznych oligosacharydów.

Literatura

1. Falshaw R., Bixler H. J., Johndro K., (2003), *Food Hydrocolloids*, 17, 129-139.
2. Sharma A., Gupta M. N., (2008), *Carbohydr. Polym.*, 48, 391-395.
3. Lapasin R., Prich S., (1995), *Rheology of industrial polysaccharides. Theory and applications*, Chapman & Hall, Great Britain.
4. Gandhi H. P., Ray R. M., Patel R. M., (1997), *Carbohydr. Polym.*, 34, 323-327.
5. McCormick C. A., Harris J. E., Jay A. J., Ridout M. J., Colquhoun I. J., Morris V. J., (1996), *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 419-424.
6. Vaningelgem F., van der Meulen R., Zamfir M., Adriany T., Laws A. P., de Vuyst L., (2004), *Int. Dairy J.*, 14, 857-864.
7. van der Meulen R., Grosu-Tudor S., Mozzi F., Vaningelgem F., Zamfir M., Font de Valdez G., de Vuyst L., (2007), *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 250-258.
8. de Vuyst L., Degeest B., (1999), *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 153-177.
9. de Vuyst L., de Vin F., Vaningelgem F., Degeest B., (2001), *Int. Dairy J.*, 11, 687-707.
10. van Geel-Schutten G. H., Faber E. J., Smit E., Bonting K., Smith M. R., Ten Brink B., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. G., Dukhuizen K., (1999), *Appl. Environ. Microb.*, 65, 3008-3014.
11. Ammar Y. B., Takayoshi M., Ito K., Iizuka M., Limpaseni T., Pongsawasdi P., Minamiura N., (2002), *J. Biotechnol.*, 99, 111-119.
12. Kubik C., Piasecka K., Anyszka A., Bielecki S., (2006), *Biotechnologia*, 2, 103-116.
13. Huebner J., Wehling R. L., Parkhurst A., Hutkins R. W., (2008), *Int. Dairy J.*, 18, 287-293.
14. Arvidson S. A., Rinehart B. T., Gadala-Maria F., (2006), *Carbohydr. Polym.*, 65, 144-149.
15. Marx S. P., Winkler S., Hartmeier W., (2000), *FEMS Microbiol. Lett.*, 182, 163-169.
16. Yamamoto Y., Takahashi Y., Kawano M., Iizuka M., Matsumoto T., Sacki S., Yamaguchi H., (1999), *J. Nutr. Biochem.*, 10, 13-18.
17. Ehrlich J., Stivalia S., Bahary W., Garg S., Long L., Newbrun E., (1975), *J. Dent. Res.*, 54, 290-297.
18. Kasapis S., Morris E., Gross M., Rudolph K., (1994), *Carbohydr. Polym.*, 23, 55-64.

19. Calazans G. M. T., Lima R. C., de França F. P., Lopez C. E., (2000), *Int. J. Biol. Macromol.*, 27, 245-247.
20. Bekers M., Upite D., Kaminska E., Laukevics J., Grube M., Vigants A., Linde R., (2005), *Process Biochem.*, 40, 1535-1539.
21. Dedonder R., (1966), *Method. Enzymol.*, 8, 500-506.
22. Oseguera M. A. P., Guereca L., Lopez-Munguia A., (1996), *Appl. Microbiol. Biot.*, 45, 465-471.
23. Kim M. G., Kim C. H., Lee J. S., Song K. B., Rhee S. K., (2000), *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 646-651.
24. Hettwer U., Gross M., Rhudolph K., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 2834-2839.
25. Tajima K., Uenishi N., Fujiwara M., Erata T., Munekata M., Takai M., (1998), *Carbohydr. Res.*, 305, 117-122.
26. Trujillo L. E., Arrieta J. G., Dafnis F., Garcia J., Valdés J., Tambara Y., Pérez M., Hernández L., (2001), *Enzyme Microb. Tech.*, 28, 139-144.
27. Tiekling M., Gänzle M. G., (2006), *Trends in Food Sci. Tech.*, 16, 79-84.
28. Król K., Klewicki R., (2005), *Żywn. Pol. Tow. Technol. Żywn.*, 2, 5-22.
29. IUB-IUPAC, (1982), *J. Biol. Chem.*, 257, 3352-3354.
30. Englyst H. N., Hudson G. J., (1996), *Food Chem.*, 57, 15-21.
31. Euzenat O., Guibert A., Combes D., (1997), *Process Biochem.*, 32, 237-243.
32. Shih I.-L., Yu Y.-T., (2005), *Biotech. Lett.*, 27, 103-106.
33. van Hijum S. A. F. T., Bonting K., van der Maarel M. J. E. C., Dijkhuizen L., (2001), *FEMS Microbiol. Lett.*, 205, 323-328.
34. Castillo E., López-Munguia A., (2004), *J. Biotechnol.*, 114, 209-217.
35. Jang K. H., Song K. B., Kim J. S., Kim C. H., Chung B. H., Rhee S. K., (2000), *Bioproc. Eng.*, 23, 89-93.
36. Tanaka T., Oi S., Yamamoto T., (1980), *J. Biochem.*, 87, 297-303.
37. Newborun E., Lacy R., Christie T., (1971), *Arch. Oral Biol.*, 16, 862-872.
38. Wolff D., Czapla S., Heyer A. G., Radosta S., Mischnick P., Springer J., (2000), *Polymer*, 41, 8009-8016.
39. Schmidt R. R., (1986), *Angew. Chem. Int. Edit.*, 25, 212-235.
40. Monsan P., Paul F., (1995), 16, 187-192.
41. Taussing R., Carlson M., (1983), *Nucl. Acids Res.*, 11, 1943-1954.
42. Kurimoto M., Tsusaki K., Kubota M., Fukuda S., Tsjisaka Y., (1999), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 63, 1107-1111.
43. Fouet A., Llier A., Rapoport G., (1986), *Gene*, 45, 221-225.
44. Martin I., Debarbouille M., Ferrari E., Klier A., Rapoport G., (1987), *Mol. Gene. Genomics*, 208, 177-184.
45. Aslandis C., Schmid K., Schmitt R., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 6753-6763.
46. Monsan P., Paul F., Remaud M., Lopez A., (1989), *Food Biotechnol.*, 3, 11-29.
47. Ajsaka K., Fujimoto H., (1989), *Carbohydr. Res.*, 185, 139-146.
48. Chambert R., Treboul G., Dedonder R., (1974), *European J. Biochem.*, 41, 285-300.
49. Gorrec K. L., Connes C., Guibert A., Uribelarra J.-L., Combes D., (2002), *Enzyme Microb. Tech.*, 31, 44-52.
50. Steinmetz M., Coq D. L., Aymerich S., Gnzy-Treboul A., Gay P., (1985), *Mol. Gene Genomics*, 200, 220-228.
51. Shiroza T., Kuramitsu H. K., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 810-816.
52. Kyono K., Yanase H., Tonomura K., Kawasaki H., Sakai T., (1995), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 59, 289-293.
53. Hidaka H., Hirayama M., Yamada K., (1991), *J. Carbohydr. Chem.*, 10, 509-522.
54. Kawamura M., Uchiyama T., Kuramoto T., Tamura Y., Mizutani K., (1989), *Carbohydr. Res.*, 192, 83-90.
55. LeBrun E., van Rapenbusch R., (1980), *The J. Biol. Chem.*, 255, 12034-12036.
56. Chambert R., Petit-Glatron M.-F., (1988), *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1205-1214.
57. Grof P., Aslanian D., Chambert R., (1988), *J. Raman Spectrosc.*, 19, 143-148.
58. Chambert R., Petit-Glatron M.-F., (1990), *FEBS Lett.*, 275, 61-64.
59. Ammar Y. B., Takayoshi M., Ito K., Iizuka M., Minamiura N., (2002), *Enzyme Microb. Tech.*, 30, 875-882.
60. Yanase H., Iwata M., Nakahigashi R., Kita K., Kato N., Tonomura K., (1992), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 56, 1335-1337.

61. Sangiliyandi G., Gunasekaran P., (1998), *J. Microbiol. Meth.*, 33, 153-156.
62. Hernandez L., Arrieta J., Menendez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G., Petit-Glatron M. F., Chambert R., (1995), *Biochem. J.*, 309, 113-118.
63. Park H.-E., Park N. H., Kim M.-J., Lee T. H., Lee H. G., Yang J.-Y., Cha J., (2003), *Enzyme Microb. Tech.*, 32, 820-827.
64. Tiekling M., Ehrmann M. A., Vogel R. F., Gänzle M. G., (2005), *Appl. Microbiol. Biot.*, 66, 655-663.
65. Ohtsuku K., Hino S., Fukushima T., Ozawa O., Kanematsu T., Uchida T., (1992), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 56, 1373-1377.
66. Nam S.-W., Yun H.-J., Ahn J.-H., Kim K.-H., Kim B.-W., (2000), *Biochem. Lett.*, 22, 1243-1246.
67. Nisizawa T., Takeuchi K., Imai S., (1986), *Carbohydr. Res.*, 147, 135-144.
68. Mirzarakhmetova D. T., Rakhimov M. M., Abdurazakova S. Kh., Akhmedova Z. R., (2006), *Appl. Biochem. Microbiol.*, 42, 150-155.
69. Tanaka T., Oi S., Yamamoto T., (1979), *J. Biochem.*, 85, 287-293.
70. Yamamoto S., Iizuka M., Tanaka T., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 343-349.
71. Támbara Y., Hormaza J. V., Pérez C., León A., Arrieta J., Hernández L., (1999), *Biotech. Lett.*, 21, 117-121.
72. Belghith H., Song K., Kim C. H., Rhee S. K., (1996), *Biotech. Lett.*, 18, 467-472.
73. Vigants A., Zikmanis P., Bekers M., (1996), *Acta Biotechnol.*, 16, 321-327.
74. Vigants A., Ramona K., Bekers M., Zikmanis P., (1998), *Biotech. Lett.*, 20, 1017-1019.
75. Petit-Glatron M. F., Benyahia F., Chambert R., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 163, 379-387.
76. US patent 5380661: *Bacillus licheniformis* NRRL B-18962 capable of producing levan sucrose in the absence of sucrose, <http://www.freepatentsonline.com>.
77. Petit-Glatron M.-F., Chambert R., (1981), *Eur. J. Biochem.*, 119, 603-611.
78. Kunst F., Raport G., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 2403-2407.
79. Chambert R., Haddaoui E. A., Petit-Glatron M.-F., (1995), *Microbiology*, 141, 997-1005.
80. Szwengiel A., Czarnecka M., Roszyk H., Czarnecki Z., (2004), *EJPAU*, 7, <http://www.ejpau.media.pl/volume7/issue2/food/art-12.html>.
81. Ananthalakshmy V. K., Gunasekaran P., (1999), *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 214-217.
82. Szwengiel A., Czarnecka M., Czarnecki Z., (2007), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57, 433-440.
83. Sutherland I. W., (1999), *Carbohydr. Polym.*, 38, 319-328.
84. Kunst F., Steinmetz M., Lepesant L.-A., Dedonder R., (1977), *Biochimic*, 59, 287-292.
85. Chaudhary A., Gupta L. K., Gupta J. K., Banerjee U. C., (1996), *J. Biotechnol.*, 46, 55-61.
86. Murakami H., Muroi H., Kuramoto T., Tamura Y., Mizutani K., Nakano H., Kitahata S., (1990), *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2247-2255.
87. Murakami H., Kuramoto T., Mizutani K., Nakano H., Kitahata S., (1992), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 56, 608-613.
88. Yokota A., Kondo K., Nakagawa M., Kojima I., Fusao T., (1993), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 57, 745-749.
89. Miasnikov A. N., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 154, 23-28.
90. Saito K., Kondo K., Kojima I., Yokota A., Tomita F., (2000), *ASM*, 66, 252-262.
91. Kang E. J., Lee S. O., Lee J. D., Lee T. H., (1999), *Biotech. Appl. Biochem.*, 29, 263-268.
92. Song K.-B., Bae K.-S., Lee Y.-B., Lee K.-Y., Rhee S.-K., (2000), *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 212-218.
93. Tanaka K., Uchiyama T., Yamauchi K., Suzuki U., Hashiguchi S., (1982), *Carbohydr. Res.*, 99, 197-204.
94. Tanaka K., Uchiyama T., Ito A., (1972), *Carbohydr. Res.*, 99, 197-204.
95. Kushibe S., Sashida R., Morimoto Y., Ohkishi H., (1993), *Biosci. Biotech. Bioch.*, 57, 2054-2058.
96. Park J. B., Kim S. J., Choi Y., (1996), *Korean Journal of Appl. Microbiol. Biot.*, 24, 619-623.