

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (6) :601 - 607; 4 June 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.001

Levan 蔗糖酶及其在 Levan 果聚糖合成中的应用

陆娟^{1,2}, 卢丽丽¹, 肖敏^{1*}

¹ 山东大学微生物技术国家重点实验室, 国家糖工程技术研究中心, 山东 济南 250100

² 阜阳师范学院生命科学学院, 安徽 阜阳 236037

摘要: Levan 果聚糖是一类分子中含有大量 β -(2,6) 果糖苷键主链和少量 β -(2,1) 果糖苷键支链的聚糖。部分微生物来源的 Levan 果聚糖具有抗肿瘤、抗糖尿病、免疫增强、降血脂等重要的生物活性, 在医药和功能食品方面具有巨大的应用潜能。由于微生物发酵液提取法产量相对较低, 而化学法合成过程繁琐, Levan 果聚糖的酶法合成备受关注。Levan 蔗糖酶 (Levansucrase, EC 2.4.1.10) 属于糖苷酶家族 GH68, 是一类 β -螺旋桨家族蛋白, 其催化糖类合成遵循 non-Leloir 糖基转移酶机制, 以蔗糖为底物转果糖基合成 Levan 果聚糖。部分微生物 Levan 蔗糖酶的分子结构及基因的表达调控已经得到阐明, Levan 果聚糖的酶法合成得到广泛研究。本文综述了 Levan 蔗糖酶的催化机制、酶分子结构、酶基因表达调控以及酶在合成 Levan 果聚糖中的应用, 以促进微生物 Levan 蔗糖酶及 Levan 果聚糖的研究和应用。

关键词: Levan 蔗糖酶, Levan 果聚糖, 酶法合成

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 06-0601-07

Levan 果聚糖是一类来源于植物或微生物的多糖, 分子中含有大量 β -(2,6) 果糖苷键组成的聚糖主链及少量 β -(2,1) 果糖苷键组成的支链, 不同于主要由 β -(2,1) 果糖苷键组成的菊粉 (inulin) 类果聚糖。一般地, 植物产生的 Levan 果聚糖的果糖基聚合度 $DP < 100$, 而微生物产生的 Levan 果聚糖的果糖基聚合度 $DP > 100$ ^[1]。研究发现, 微生物产生的 Levan 果聚糖具有抗肿瘤^[2]、抗糖尿病^[3-4]、降血脂^[5]、免疫增强^[6]等功能。另外, Levan 果聚糖可用于纳米材料及肽类或蛋白质大分子纳米药物载体的制备^[7-8]。多种微生物能够产生 Levan 果聚糖, 如芽孢杆菌 (*Bacillus*)^[6,9-10]、乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)^[11]、明串珠菌 (*Leuconostoc*)^[12-14]、拉恩氏菌 (*Rahnella*)^[15]、假单胞菌 (*Pseudomonas*)^[16]、发酵单胞菌 (*Zymomonas*)^[17] 和深海细菌

(*Geobacillus stearothermophilus*)^[18] 等。

Levan 果聚糖的获得可以通过微生物发酵液提取、酶法合成及化学法合成三种方法实现。微生物发酵液生产 Levan 果聚糖的产量较低, 一般在 14 - 36 g/L, 同时发酵液中存在的其他多聚物给 Levan 果聚糖的分离纯化带来了一定的困难。我们实验室从土壤中筛选获得的一株地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 8-37-0-1, 在优化了产生 Levan 果聚糖的培养基组成及培养条件之后, Levan 果聚糖产量可达到 41.7 g/L^[10]。化学法合成 Levan 果聚糖的过程比较繁琐, 仅报道了 β -糖苷键连接的果寡三糖的合成^[19]。酶法合成 Levan 果聚糖, 是利用 Levan 蔗糖酶以蔗糖为底物在一定条件下进行的反应, 步骤简单且产量高, 具有工业化前景^[20]。本文综述了 Levan 蔗糖酶的催化机制、酶分子结构、酶基因表达

基金项目: 国家“973 项目”(2012CB822102); 国家“863 计划”(2012AA021504); 国家自然科学基金 (31070064)

* 通信作者。Tel: +86-531-88365128; Fax: +86-531-88363002; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

作者简介: 陆娟 (1979 -), 女, 安徽明光人, 实验师, 硕士, 从事微生物技术研究。E-mail: lujuan918@sohu.com

收稿日期: 2013-08-23; **修回日期:** 2013-10-16

调控以及酶在合成 Levan 果聚糖中的应用。

1 Levan 蔗糖酶催化机制

Levan 蔗糖酶 (levansucrase, β -2, 6-fructan: D-glucose-1-fructosyltransferase, EC 2.4.1.10) 是一类果糖基转移酶 (fructosyltransferases), 属于糖苷酶家族 GH68, 目前发现的 217 种 Levan 蔗糖酶全部来源于原核生物, 其中 7 种来源于古菌, 210 种来源于细菌 (<http://www.cazy.org/GH68.html>)。Levan 蔗糖酶具有水解和转果糖基双重活性, 蔗糖可以作为唯一底物同时作为果糖基供体和果糖基受体, 酶催化反应遵循 non-Leloir 糖基转移酶机制^[21]: 首先酶的亲核基团羧基进攻蔗糖的异头碳形成共价的果糖-酶中间体, 酸/碱催化基团充当广义酸提供一个质子给糖的离去基团, 然后在去糖基化的过程中, 酶的酸/碱催化基团充当广义碱从果糖基受体移去一个质子, 果糖-酶中间体被水解, 当受体为水时发生水解反应, 受体为葡萄糖时发生蔗糖的交换反应, 受体为蔗糖时进行蔗果三糖、蔗果四糖等低聚糖合成反应, 当受体为 Levan 果聚糖时则发生多糖聚合反应。某些 Levan 蔗糖酶的水解活性和转糖基活性受蔗糖浓度的影响, 如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 Levan 蔗糖酶在低蔗糖浓度 ($< 0.25 \text{ mol/L}$) 时, 进行水解反应, 将蔗糖水解为果糖和葡萄糖, 在高蔗糖浓度时 ($> 0.25 \text{ mol/L}$), 则进行 Levan 果聚糖的合成反应^[1]。某些 Levan 蔗糖酶的转糖基受体选择性也受蔗糖浓度的影响, 如运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的 Levan 蔗糖酶, 0.25 mol/L 的蔗糖浓度最利于酶的 Levan 果聚糖合成反应, 随着蔗糖浓度的增加 (0.27 、 0.41 、 0.61 和 0.82 mol/L), 该酶合成 Levan 果聚糖的反应逐步受到抑制, 转糖基反应趋向于低聚果糖的生成, 合成低聚果糖的果糖基所占比例分别为 18%、26%、37% 和 51%^[22]。水生拉恩氏菌 (*Rahnella aquatilis*) 的 Levan 蔗糖酶可将 100 g/L 蔗糖转化为 27 g/L 的 Levan 果聚糖和 11 g/L 的寡糖, 而将 600 g/L 蔗糖转化为 5.5 g/L 的 Levan 果聚糖和 240 g/L 的寡糖^[23]。

2 细菌 Levan 蔗糖酶

2.1 细菌 Levan 蔗糖酶分子结构

细菌 Levan 蔗糖酶分子结构中通常包括 N 末端信号肽、催化中心区和 C 末端区 3 个部分, 酶分子具有 3 个高度保守的氨基酸残基共同组成了催化糖基转移活性的关键“催化三分子”: 亲核基团、酸/碱催化基团和过渡态稳定基团。枯草芽孢杆菌 Levan 蔗糖酶的晶体结构在 2003 年首次报道之后^[24], 一株革兰氏阴性菌重氮营养葡萄糖醋酸杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4) 的 Levan 蔗

糖酶晶体结构在 2005 年又得到了报道^[25], 最近一株革兰氏阳性细菌巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) Levan 蔗糖酶的 5 个突变体酶 (Y247A, Y247W, N252A, D257A, K373A) 晶体结构^[26] 和一株革兰氏阴性菌解淀粉欧文氏菌 (*Erwinia amylovora*) Ea273 的 Levan 蔗糖酶晶体结构得到了解析^[27]。目前蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中收录了枯草芽孢杆菌、重氮营养葡萄糖醋酸杆菌以及巨大芽孢杆菌的晶体结构数据。三种不同微生物来源的 Levan 蔗糖酶分子结构特征非常相似 (图 1-A), 它们均属于 β -螺旋桨家族蛋白质 (beta-propeller protein), 其催化结构域是由 5 个片状的 β 折片围绕形成的一个口袋状中空结构, 中央富含负电荷, 活性位点位于口袋状中空结构的底部 (图 1-B)。比较显著的区别体现在革兰氏阴性细菌重氮营养葡萄糖醋酸杆菌的 Levan 蔗糖酶比两种革兰氏阳性细菌枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌的 Levan 蔗糖酶少了一些 α 螺旋, 而多了一些无规则环 (Loop)。

在枯草芽孢杆菌 Levan 蔗糖酶中 D86、E342 和 D247 分别是酶的亲核基团、酸/碱催化基团和过渡态稳定基团。R360 位于与酶中空部位邻近的溶剂暴露位点, 是与酶聚合活性有关的一个非常重要的残基^[24]。进一步研究发现, R360 和活性中心周围的氨基酸 E340、N242 形成一个交互作用网, 在 Levan 果聚糖的合成中为果糖基受体底物提供了短暂的停靠位点; R360 也可能是 Levan 聚合中旋转异构状态交替中一个关键的氨基酸残基^[9]。R360 在革兰氏阳性菌来源的 Levan 蔗糖酶中是保守的, 而在革兰氏阴性菌来源的 Levan 蔗糖酶中被 His 替代, 如运动发酵单胞菌中的 H296 及重氮营养葡萄糖醋酸杆菌中的 H419。定点突变研究表明, 运动发酵单胞菌的 H296 可能是识别底物并与其结合的一个位点^[29]。枯草芽孢杆菌 Levan 蔗糖酶的 9 个非“催化三分子”氨基酸位点被推测可能与转糖基底物特异性、产物分子大小及酶的其他生化性质有关, 定点突变获得的一个突变酶 S164A 在酶的稳定性和动力学性质上发生了改变, 获得的 2 个突变酶 Y429N 和 R433A 不产生 Levan 果聚糖而产生大量的果寡糖; 进一步研究证明了 S164 是一个重要的保持活性亲核位点位置的氨基酸位点, Y429 是一个在催化结构域底物结合口袋中协调蔗糖位置的重要位点^[30]。

虽然 Levan 蔗糖酶的催化活性不需要金属辅因子, 但枯草芽孢杆菌的 Levan 蔗糖酶有 Ca^{2+} 低亲和的结合位点, 其中 D339 是一个关键的 Ca^{2+} 结合调节氨基酸, 该氨基酸位点在革兰氏阳性菌来源的 Levan 蔗糖酶中高度保守, 而在革兰氏阴性菌来源的 Levan 蔗糖酶不存在^[29]。在革兰氏阴性菌中, 存在着一个行使同样功能的二硫键, 在重氮营养葡萄糖

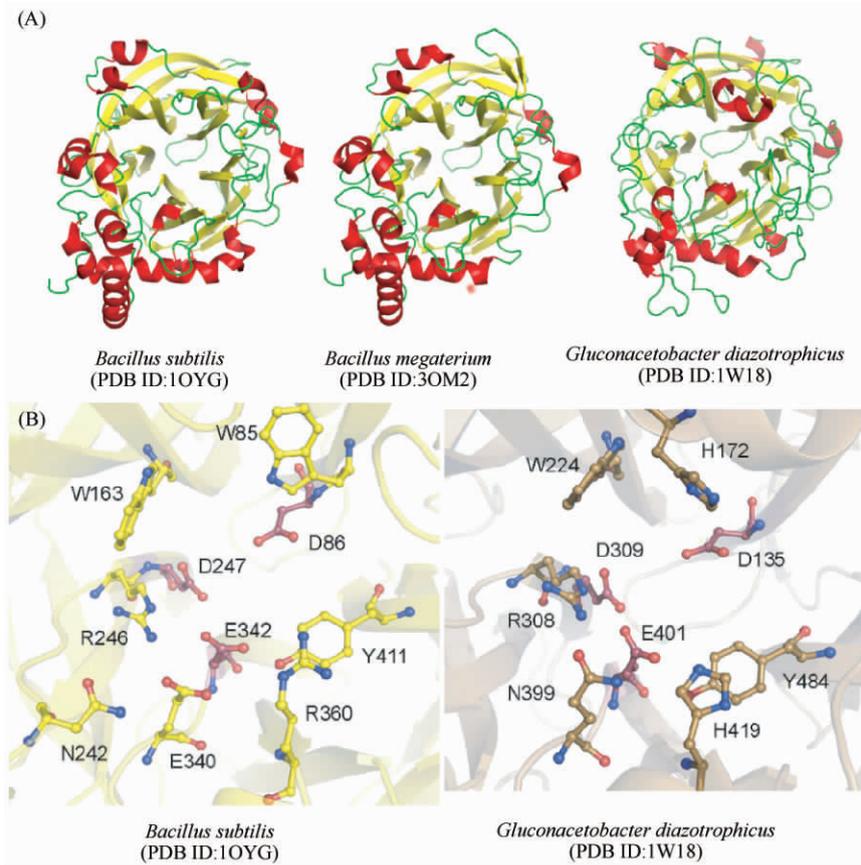


图 1. Levan 蔗糖酶分子结构及活性位点^[28]

Figure 1. Molecular structure and the active site of levansucrases. A: Stereo view of the structures created by PyMOL (software) with PDB data (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). B: The active site of levansucrases from *Bacillus subtilis* (catalytic residues: D86, D247 and E342) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* (catalytic residues: D135, D309 and E401)^[28].

醋杆菌的 Levan 蔗糖酶晶体结构中,观察到 2 个半胱氨酸残基 (C339-C395) 以二硫键形式形成一个 Ca^{2+} 结合位点,这种结构在维持酶的折叠稳定状态中起着非常重要的作用^[25]。

2.2 微生物 Levan 蔗糖酶基因表达调控

微生物产生的 Levan 蔗糖酶分子量大多数在 45 - 90 kDa 之间,少数在 100 kDa 以上^[13-14]。微生物 Levan 蔗糖酶基因的表达调控在枯草芽孢杆菌中得到比较深入的研究,目前发现了该菌中存在着两种二元调控系统来调控 Levan 蔗糖酶的表达。SacX-SacY 和 DegS-DegU 是枯草芽孢杆菌中调控 Levan 蔗糖酶基因 (*sacB*) 表达的两种二元调控系统,SacX、DegS 是信号分子蔗糖的感受器蛋白,SacY、DegU 是反应调节器蛋白。SacY 是 *sacB* 的一个正调节子,通过抗终止作用与 *sacB* mRNA 5' 端的终止子相互作用。在环境中没有蔗糖存在时,SacX 蛋白在细胞中的磷酸糖转移酶运输系统 PTS 作用下磷酸化,SacX-SacY 形成复合体,SacY 蛋白不能进行抗终止作用,此时 Levan 蔗糖酶 *sacB* 基因不表达。在环境中存在蔗糖时,蔗糖在细胞中的磷酸

糖转移酶运输系统 PTS 作用下磷酸化,阻止了 SacX 蛋白的磷酸化,SacX 与 SacY 不能形成复合体,SacY 可进行抗终止作用,此时 Levan 蔗糖酶 *sacB* 基因表达^[31]。DegS-DegU 二元系统可通过转录因子 ComK 相关的 *comK*-依赖途径 (*comK*-dependent pathway) 及独立的 *comK*-非依赖途径 (*comK*-independent pathway) 双重控制 *sacB* 的表达,盐压是可以激活该二元系统的一个环境信号。在 *comK*-非依赖途径中,DegU 是 *sacB* 的一个正调节子,DegS 蛋白在 ATP 存在时自动磷酸化,然后将磷酸基团转移给 DegU 蛋白,磷酸化的 DegU 蛋白可以激活 *sacB* 的转录;在 *comK*-依赖途径中,去磷酸化的 DegU 可以激活 *comK* 的转录,而转录因子 ComK 激活 *sacB* 的转录^[32]。

3 Levan 蔗糖酶催化的 Levan 果聚糖合成

酶法合成 Levan 果聚糖,是将微生物发酵液粗酶 (含有或除去微生物菌体细胞) 或提取的 Levan 蔗糖酶 (或其固定化酶) 加入到含有蔗糖底物的缓冲

液中,在一定的条件下进行反应。也可在反应水溶液中添加乙醇、乙腈或2-甲基-2-丙醇等有机溶剂进行反应。

pH和温度都显著影响着Levan蔗糖酶的活性。一般地,微生物来源的Levan蔗糖酶最适反应pH在4.0-7.0之间,多种微生物如枯草芽孢杆菌^[33]、肠膜状明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)^[12-13]的Levan蔗糖酶最适pH值是6.0。旧金山乳杆菌(*Lactobacillus sanfranciscensis*)的Levan蔗糖酶最适pH值为5.4,当pH值在4.4-6.2范围时酶活在50%以上,当pH值大于7.0时该酶的活性则被完全抑制^[11]。不同微生物源Levan蔗糖酶的反应温度差别较大,旧金山乳杆菌和肠膜状明串珠菌的重组Levan蔗糖酶合成Levan果聚糖的最适温度在30-35℃之间^[11-13],0℃却是来源于运动发酵单胞菌ZM1的重组Levan蔗糖酶合成Levan果聚糖的最适温度^[34],而来源于罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)和芽孢杆菌TH4-2的Levan蔗糖酶的最适温度比较高,分别是50℃和60℃^[33,35]。来源于同一株菌的Levan蔗糖酶的最适反应温度也不完全相同,来源于解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的胞内、胞外Levan蔗糖酶的最优转果糖基活性的温度分别是25-30℃和40℃^[36]。

在水相缓冲液中反应时,酶法合成Levan果聚糖的产量一般是底物浓度的25%-50%(表1)。芽孢杆菌Levan蔗糖酶粗酶在蔗糖浓度为40%的反应体系中40℃、24h合成了约200g/L的Levan果聚糖^[20];地衣芽孢杆菌RN-01的Levan蔗糖酶LsRN在没有NaCl存在时30℃和50℃都可以合成

Levan多糖纳米颗粒,Levan果聚糖产量分别是68.9g/L和71g/L,但30℃主要合成的是低分子量Levan果聚糖(11kDa),50℃主要合成的是高分子量Levan果聚糖(612kDa)^[37]。运动发酵单胞菌的Levan蔗糖酶-几丁质结合域融合酶蛋白固定于几丁质上,在200g/L的蔗糖反应体系中,可以合成83g/L的Levan果聚糖,比未固定化酶合成Levan果聚糖的产量(50g/L)提高了66%,并且该固定化酶连续反应7批次可以获得Levan果聚糖的总量为480g/L的^[17]。不同来源的Levan蔗糖酶合成Levan果聚糖和果寡糖产物的比例不同。肠膜状明串珠菌可将150mmol/L的蔗糖转化为18%的Levan果聚糖、17%的蔗果三糖1-kestose、11%的蔗果四糖nystose和7%的蔗果五糖1,1,1-kestopentaose^[12];而运动发酵单胞菌可将60%-70%浓度的蔗糖转化为Levan果聚糖和蔗果三糖1-kestose、蔗果三糖6-kestose、新蔗果三糖neokestose、蔗果四糖nystose等寡糖,其中Levan果聚糖和果寡糖的含量分别为5%-10%和24%-32%^[38]。

在酶法合成Levan果聚糖体系中添加有机溶剂,并不能提高Levan果聚糖的产量,某些有机溶剂的添加反而会降低Levan果聚糖的产量。水生拉恩氏菌Levan蔗糖重组酶粗酶在含有乙腈、丙酮、二甲基亚砜、甲醇、乙醇的有机溶剂体系(20%,V/V)中,虽然反应活性不受影响,但Levan果聚糖的产量并没有显著提高;而在含有乙二醇和丙二醇的有机溶剂体系中,Levan果聚糖的产量分别降低至水溶液体系的35%和28.4%^[32](表1)。

表1. Levan果聚糖的酶法合成条件和产量

Table 1. Reaction condition and yield of enzymatic synthesis of levan

strain	enzyme	sucrose / %	pH	T / °C	reaction medium	levan / (g/L)
<i>Bacillus licheniformis</i> RN-01 ^[37]	LsRN	20	6.0	30	sodium citrate buffer	68.9
				50	sodium citrate buffer	71
<i>Bacillus</i> sp. ^[20]	levansucrase	40	6.5	40	acetate buffer	200
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM1 (ATCC 10988) ^[34]	levansucrase	20	5	0	acetate buffer	50
<i>Zymomonas mobilis</i> ZM1 (ATCC 10988) ^[17]	Zm-Lev	20	5.0	15	sodium acetate buffer	83
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC33071 ^[32]	levansucrase	10	6.0	30	acetate buffer	27
				17	acetate-acetonitrile (8/2, V/V)	20
					acetate-acetone (8/2, V/V)	21
					acetate-DMSO (8/2, V/V)	16
					acetate-methanol (8/2, V/V)	29
					acetate-ethanol (8/2, V/V)	25
	acetate-ethylene glycol (8/2, V/V)	9.1				
	acetate-propylene glycol (8/2, V/V)	7.4				

4 展望

微生物来源的 Levan 果聚糖具有抗肿瘤、抗糖尿病、免疫增强、降血脂等多种重要的生物学功能,而且可用于制备纳米材料,在生物医药和功能食品等方面具有巨大的应用潜能,体现出巨大的潜在市场价值。目前 Levan 果聚糖的工业化生产还未实现。至今,由微生物发酵液提取法生产 Levan 果聚糖的产量较低,且纯品获得较困难,因此利用 Levan 蔗糖酶体外催化合成 Levan 果聚糖有望成为 Levan 果聚糖的工业化生产途径之一。在酶法合成 Levan 果聚糖的研究中,调控反应的 pH 值、温度、底物浓度、酶的用量等均可提高 Levan 果聚糖的产量,目前已经实现了酶法合成 Levan 果聚糖的产量达到 200 g/L^[20]。酶法合成 Levan 果聚糖的工业化实施必须解决 3 个问题:(1) 酶的大量获得。需要深入开展微生物 Levan 蔗糖酶及其基因表达调控研究,在此基础上优化产酶条件,提高产酶量。同时,也需要进一步开展 Levan 蔗糖酶的高效表达和快速纯化研究,实现酶的大量获得。(2) 酶的重复利用。酶的固定化及其催化工艺的研究和建立,可大大降低酶的使用量和生产成本。(3) 产物的快速回收。筛选各种有机溶剂和工艺,使得酶催化和产物回收同步进行,不仅缩短了产物回收过程,还可能降低了产物对酶的抑制,提高反应体系中的产物含量。这些问题的解决,必将促进 Levan 果聚糖酶法合成的大规模工业化生产,Levan 果聚糖的应用价值也将会得到更大程度的开发和体现。

参考文献

- [1] Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre VM, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M, Chávez-Moctezuma MP, Valdez-Alarcón JJ. Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(6): 1763-1778.
- [2] Dahech I, Belghith KS, Belghith H, Meidoub H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51(3): 329-335.
- [3] Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H, Meidoub H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(4): 742-746.
- [4] Dahech I, Belghith KS, Hamden K, Feki A, Belghith H, Meidoub H. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011, 49(5): 942-947.
- [5] Dahech I, Hamden K, Zohra A, Feki A, Meidoub H, Belghith H. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(4): 1070-1074.
- [6] Liu CH, Lu J, Lu LL, Liu YH, Wang FS, Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 2010, 101(14): 5528-5533.
- [7] Sezer AD, Kazak H, Öner ET, Akbuğa J. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 84(1): 358-363.
- [8] Sima F, Mutlu EC, Eroglu MS, Sima LE, Serban N, Ristoscu C, Petrescu SM, Oner ET, Mihailescu IN. Levan nanostructured thin films by MAPLE assembling. *Biomacromolecules*, 2011, 12(6): 2251-2256.
- [9] Meng GY, Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Structural Biology*, 2008, 8: 16-27.
- [10] Lu J, Xiao M, Lu L. Optimization of fermentation Conditions for production of levan by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Chinese Journal of Food Science*, 2011, 32(7): 183-187. (in Chinese)
- 陆娟,肖敏,卢丽丽. 地衣芽孢杆菌产 Levan 果聚糖发酵条件的优化. *食品科学*, 2011, 32(7): 183-187.
- [11] Tiekling M, Ehrmann MA, Vogel RF, Gänzle MG. Molecular and functional characterization of a levansucrase from sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 66(6): 655-663.
- [12] Kang HK, Seo MY, Seo ES, Kim D, Chung SY, Kimura A, Day DF, Robyt JF. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1727(1): 5-15.
- [13] Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-

- Munguía A, Olvera-Carranza C. Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 2006, 376 (1) :59-67.
- [14] Olvera C, Centeno-Leija S, López-Munguía A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 92 (1) :11-20.
- [15] Seo JW, Song KB, Jang KH, Kim CH, Jung BH, Rhee SK. Molecular cloning of a gene encoding the thermoactive levansucrase from *Rahnella aquatilis* and its growth phase-dependent expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnol*, 2000, 81 (1) :63-72.
- [16] Jathore NR, Bule MV, Tilay AV, Annapure US. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21 (4) :1045-1053.
- [17] Chiang CJ, Wang JY, Chen PT, Chao YP. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82 (3) :445-451.
- [18] Inthanavong L, Tian F, Khodadadi M, Karboune S. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnology Progress*, 2013, doi: 10.1002/btpr.1788. [Epub ahead of print]
- [19] Oscarson S, Sehgelmeble FW. Chemical syntheses of inulin and levan structures. *Journal of Organic Chemistry*, 2002, 67 (24) :8457-8462.
- [20] Belghith KS, Dahech I, Belghith H, Mejdoub H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Micromolecules*, 2012, 50 (2) :451-458.
- [21] Carel AGMW, Maurice CRF, Gerben MV. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 2008, 26 (5) : 436-456.
- [22] Crittenden RG, Doelle HW. Identification and characterisation of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41 (3) :302-308.
- [23] Kim MG, Seo JW, Song Ki-Bang, Kim CH, Chung BH, Rhee SK. Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Biotechnology Letters*, 1998, 20 (4) :333-336.
- [24] Meng G, Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structure Biology*, 2003, 10 (11) :935-941.
- [25] Martínez-Fleites C, Ortiz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernández L, Davies GJ. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*, 2005, 390 (Pt 1) :19-27.
- [26] Strube CP, Homann A, Gamer M, Jahn D, Seibel J, Heinz DW. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (20) :17593-17600.
- [27] Caputi L, Cianci M, Benini S. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of EaLsc, a levansucrase from *Erwinia amylovora*. *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*. 2013, 69 (Pt 5) :570-573.
- [28] Lammens W, Roy KL, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60 (3) :727-740.
- [29] Li SY, Chen M, Li G, Yan YL, Yu HY, Zhan YH, Peng ZX, Wang J, Lin M. Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochimica Polonica*, 2008, 55 (1) :201-206.
- [30] Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudino-Pinera E, Olvera C, López-Munguía A. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering Design and Selection*, 2008, 21 (10) :589-595.
- [31] Crutz AM, Steinmetz M, Aymerich S, Richter R, Le Coq D. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172 (2) :1043-1050.
- [32] Kunst F, Rapoport G. Salt stress is an environmental signal affecting degradative enzyme synthesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177 (9) :2403-2407.
- [33] Ben Ammar Y, Matsubara T, Ito K, Iizuka M, Limpaseni T, Pongsawasdi P, Minamiura N. Characterization of thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 2002, 99 (2) :

111-119.

- [34] Belghith H, Song KB, Kim CH, Rhee SK. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnology Letters*, 1996, 18 (4) :467-472.
- [35] Ozimek LK, Euverink GJW, Van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Letters*, 2005, 579 (5) :1124-1128.
- [36] Tian F, Inthanavong L, Karboune S. Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for

the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Bioscience Biotechnology Biochemical*, 2011, 75 (10) : 1929-1938.

- [37] Nakapong S, Pichyangkura R, Ito K, Iizuka M, Pongsawasdi P. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54:30-36.
- [38] Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova L, Danilevics A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 2002, 38 (5) :701-706.

Application of levansucrase in levan synthesis—A review

Juan Lu^{1,2}, Lili Lu¹, Min Xiao^{1*}

¹State Key Laboratory of Microbial Technology & National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, Shandong Province, China

²School of Life Sciences, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037, Anhui Province, China

Abstract: Levan is a fructan mainly linked by β -(2,6)-glycosidic bonds with some β -(2,1)-linked branch chains. Some microbial levan exhibit biological activities such as antitumor, antidiabetic and immunostimulating activities, hypolipidemic effect, and function as prebiotics, which has a wide and potential application in the pharmaceutical and food industry. Because of low extraction yields from microbial fermentation and a very complex process for chemical synthesis of levan, enzymatic synthesis of levan has attracted tremendous interest. Levansucrase (EC 2.4.1.10), a beta-propeller protein belonging to the glycoside hydrolase family 68 (GH68) with reaction mechanism of non-Leloir glycosyltransferase, catalyzes the synthesis of levan by transferring the fructosyl group of non-activated sucrose into the fructan chain. The molecular structure and regulation of gene expression of some microbial levansucrases have been elucidated. Meanwhile, the enzymatic synthesis of levan by levansucrase is widely studied. In this review, catalytic mechanism of levansucrase, molecular structure and regulation of gene expression of some microbial levansucrases, and the application of levansucrases in enzymatic synthesis of levan were summarized.

Keywords: levansucrase, levan, enzymatic synthesis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development of China (2012CB822102), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA021504) and by the National Natural Science Foundation of China (31070064)

* Corresponding author. Tel: +86-531-88365128; E-mail: minxiao@sdu.edu.cn

Received: 23 August 2013 / Revised: 16 October 2013