

Zymomonas mobilis ZM10이 생산하는 균체의 Levansucrase의 정제 및 특성

송기방 · 서정우 · 주현규¹ · 이상기*

생명공학연구소 미생물대사공학RU, ¹선문대학교 식량자원학과

Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). Song, Ki-Bang, Jeong-Woo Seo, Hyun-Kyu Joo¹, and Sang-Ki Rhee*. *Microbial Metabolic Engineering Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O.Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Food Resources, Sun Moon University, Asan 336-840, Korea*—An extracellular levansucrase, which catalyzes the the formation of levan from sucrose, from the culture broth of *Zymomonas mobilis* ZM1 was purified by conventional column purification methods. The final purification yield was 18.3 fold of the crude enzyme from *Z. mobilis*, with 16.5 % of the enzyme recovered in the preparation step. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 91,000 by Superose 12 gel filtration, and 45,000 by SDS-PAGE, indicating that levansucrase is a dimer. The optimum pH for the enzyme activity was around pH 4.0 for sucrose hydrolysis, and was around pH 5.0 for levan formation. The enzyme was inhibited by some metal ions, such as Hg²⁺ and Cu²⁺, and 50% of inhibition was observed with 5mM EDTA. The enzyme activity was enhanced by the presence of detergent Triton X-100, but inhibited by SDS completely. The enzyme catalyzes the liberation of reducing sugars, oligosaccharides and the formation of fructose polymer(levan). The enzyme also catalyzes the transfructosylation reaction of fructose moiety from sucrose to various sugar acceptor molecules, including sugar alcohols.

Key words: *Zymomonas mobilis*, levansucrase, levan

Levansucrase(sucrase: 2,6-β-D-fructan 6-β-D-fructosyltransferase; EC 2.4.1.10)는 과당전이반응을 촉매하여 자당으로부터 levan을 생성한다. Levan은 과당이 β-2,6 구조로 결합된 수용성 과당 중합체로 미생물(*Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Pseudomonas syringae*, *Eruinia amylovora* 등)이나 식물체(마늘, 목초 등)에서 발견된다[8]. 자연에 존재하는 levan은 수용성으로 주로 식물체에서 발견되는 불용성 fructan인 이눌린(β-2,1구조)과는 화학적, 생물학적 특성이 상이하다[8]. Levan은 자연계에 존재하는 미이용 다당류로 식품 신소재로서 장내 세균 개선제, 식품 농화제, 고과당 및 올리고당 원료, 식이섬유 등으로 이용될 수 있으며 의약품 신소재로서 혈장 대용제, 항 종양제, 면역 증강제로 이용될 수 있음이 보고되었다[2, 8, 12]. 그러나 기존의 미생물 발효법을 이용한 생산공정은 생산 수율이나 경제성 면에서 여러 가지 제한이 있어 산업적인 생산에는 이르지 못하고 있다. 또한 levansucrase는 levan합성 뿐만 아니라 특유의 과당 전이반응으로 여러 화합물을 fructosyl기 수용체로 인식하여 여러가지 sugar-derivative를 합성하는 것으로 알려져 있다[2, 14].

*Zymomonas*는 열대성 박테리아로서 높은 에탄올 생성능으로 인하여 효모를 대체할 에탄올 발효균주로 각광을 받아 왔으며[20, 24, 26], 탄소원으로 세가지의 기질(포도당, 과당, 자당)만 이용할 수 있다. 자당을 탄소원으로 이용할 때 여러가지 부산물(levan, 솔비톨, 글루콘산 등)이 생성되는 것으로 밝혀지고 이들 부산물들의 산업적 효용도가 증대함에 따라 *Z. mobilis*가 새로운 산업균주로서 재조명되고 있다[10]. *Z. mobilis*의 당흡수 기작은 permease의존성인 것으로 밝혀져[19] 자당으로부터 산업적 유용성이 있는 부산물들의 생성초기반응에 관여하는 *Z. mobilis*의 자당 가수분해효소의 구성, 특성 및 발현 기작에 관한 연구가 최근 많이 이루어져 왔다. *Z. mobilis*는 균체내 sucrase(β-D-fructofuranosidase; EC 3.2.1.26), 균체의 sucrase(β-D-fructofuranosidase)와 levansucrase가 존재하는 것으로 보고되고 있으며 이중 균체밖으로 levansucrase와 sucrase를 분비하여 자당을 가수분해 후 단당류의 형태로 당을 흡수, 이용한다[7, 15, 22, 23, 27]. 이때 levansucrase는 기질인 자당에 대하여 자당가수분해 반응 뿐만 아니라 과당전이반응도 촉매하여 결과적으로 levan이나 fructo-oligosaccharide들을 배지내에 축적한다.

*Z. mobilis*의 균체내외 자당 가수분해효소에 관한 분자 생물학적 연구는 많이 이루어져 있지만 개개의 효소학적

*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4450, Fax. 82-42-860-4592
E-mail: rheesk@kribb4680.kribb.re.kr

인 연구는 미진한 편이다. Lyness와 Doelle[13]은 *Z. mobilis* NCIB11199 균주로부터, Yanase 등[27]은 *Z. mobilis* Z6C 균주로부터 균체의 levansucrase를 분리하고 부분적인 효소의 특성을 보고한 바 있다. 최근 levansucrase의 효소학적 특성을 이용한 유용 다당류 및 당류를 생산하고자 하는 연구가 미생물 유래 levansucrase를 중심으로 이루어지고 있다[2, 3, 14, 17, 25]. 본 연구팀은 *Z. mobilis*의 levansucrase 유전자를 클로닝하여 재조합 미생물 및 효소를 이용하는 효율적인 새로운 levan 생산 공정을 개발하여 보고한 바 있으며[1, 21], 또한 levan을 생물 신소재로 사용하기 위한 연구의 일환으로 고가의 dextran을 대체한 이상계 수용액 추출계(Polyethylene glycol/levan)를 보고한 바 있다[4]. 본 연구에서는 *Z. mobilis*의 균체의 levansucrase를 정제하고 당가수분해 반응과 당전이반응을 촉매하는 효소의 특성을 조사하였으며 또한 이 효소의 당전이반응을 이용한 유용 당류의 합성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

사용한 *Z. mobilis* 균주는 *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988)이었으며 배양은 YPG 배지(yeast extract 1%, glucose 2%, KH_2PO_4 0.1%)를 기초배지로 사용하였고[20], 필요시에는 YPG배지에서 glucose를 뺀 YP배지에 탄소원으로 5% 자당을 첨가하여 사용하였다.

Z. mobilis 균체외 자당 가수분해효소의 정제

효소액의 조제 균체의 levansucrase를 정제하기 위하여 *Z. mobilis* 균을 20 l Jar를 이용하여 30°C에서 정지 배양하였다. 종균은 20시간마다 자당을 함유한 배지에서 계대 배양하였으며 접종량은 5%였다. 24시간 배양후 균체를 모은 다음 20 mM 인산 완충용액(pH 6.8)으로 현탁하고 30°C에서 15분간 서서히 진탕하여 균체를 세척한 후 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Ammonium sulfate분획 조효소액에 ammonium sulfate를 0-80%까지 포화시켜 침전된 단백질을 원심분리(8,000 g, 20 min)하여 20 mM 인산 완충용액(pH 6.8)에 녹인 후 동일한 완충용액에 투석하였다.

음이온 교환 크로마토그래피 투석시킨 ammonium sulfate 침전액을 미리 평형시켜 놓은 DEAE-650(S) (Merck, 0.025-0.050 mm) column(2.5×30 cm)에 시료를 주입한 후 20 mM의 동일한 완충용액으로 세척하고 NaCl용액(0-0.5 M)으로 직선농도구배를 형성시켜 분당 0.5 ml의 유속으로 용출하면서 시험관 당 5 ml씩 분획하였다.

흡착 크로마토그래피 2 mM 인산 완충용액으로 평형

시킨 hydroxyapatite column(2.2×15 cm)에 2 mM 인산 완충용액으로 평형화시킨 시료용액을 주입하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 인산 완충용액(0-0.5 M)으로 직선농도구배를 형성시켜 분당 0.25 ml의 유속으로 용출하면서 시험관 당 2.5 ml씩 분획하였다. 효소활성을 보이는 분획을 취합하여 투석하였다.

Fast performance liquid chromatography(FPLC) 농축된 효소액을 0.1M NaCl을 함유한 20 mM 인산 완충용액으로 평형화시킨 Superose 12 column에 주입하고 동일한 완충용액으로 용출,분획하였다. 이때 용출속도는 0.3 ml/min이었으며 시험관 당 0.3 ml씩 분획시켰다.

Levansucrase의 특성연구

효소활성에 미치는 pH의 영향 Levansucrase활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 sodium acetate 완충용액, 인산 완충용액과 glycine-NaOH 완충용액을 이용하여 pH 3.4에서 pH 8까지 각각의 pH에서 정제 효소의 자당 가수분해능과 levan 형성능을 조사하였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향 Levansucrase활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 0-60°C까지 각각의 온도에서 정제 효소의 자당 가수분해능과 levan 형성능을 조사하였다.

염 및 유기시약의 영향 정제된 levansucrase에 대한 여러 화합물과 금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 금속이온 용액 및 유기시약을 효소액과 등량혼합하여 20°C에서 60분간 방치한 후 20 mM sodium acetate 완충용액에서 잔존 효소활성도를 조사하였다.

분자량 결정 정제된 자당가수분해 효소의 분자량 및 단일성을 조사하기 위하여 젤여과 크로마토그래피와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 조사하였다. 젤여과 크로마토그래피는 Superose 12(FPLC)을 사용하였으며 표준단백질로는 HPLC standard(Boehringer Mannheim)를 사용하였다. Native-와 SDS-PAGE[11]는 10% resolving gel에 Hoeffler Mini-gel Kit를 사용하여 전기영동하였다. 분리된 단백질의 분자량은 protein standard size marker (BRL)와 비교하여 계산하였다.

Zymogram staining

Native gel을 이용한 sucrase 효소활성 검출은 O'Mullan의 방법[15]을 이용하였다. 전기영동이 끝난 젤을 100 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)으로 실온에서 2번 세척한 후 5% 자당이 함유된 동일한 완충용액에 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 생성된 환원당의 검출은 0.1% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)를 함유한 1N NaOH용액에서 10분간 반응시켜 활성염색을 하였다. Levansucrase의 효소활성은 5% 자

당이 함유된 동일한 완충용액에 넣어 37°C에서 3시간 반응시켜 검출하였다.

Levansucrase의 효소활성 측정

Levansucrase의 효소활성 측정은 조효소액 10 µl에 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.0)에 용해시킨 1% 자당용액 990 µl를 넣어 37°C에서 30분간 효소반응시킨 후 반응액중 생성된 환원당의 양을 GOD-PAP kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 정량하였다. 효소활성은 1분간에 1 µmol의 포도당을 생성하는 효소활성을 1 unit(U)로 정의하였다. Levan 형성활성은 조효소액 10 µl에 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)에 용해시킨 1% 자당용액 990 µl를 넣어 각각의 온도에서 2시간 효소반응시킨 후 반응액중 생성된 levan의 양을 HPLC를 이용하여 정량하였다.

분석방법

단백질의 정량은 ovalbumin을 표준시료로 하여 시판 중인 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad, USA)로 정량하였다. 시료 100 µl에 Coomassie Blue용액 5 ml을 가하여 섞어준 후 10분간 실온에 방치하고 595 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교하여 정량하였다. 시료에 함유된 levan이나 당의 검출은 HPLC(Beckman Gold system, USA)를 사용하였으며 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 시료로 사용하였다. 당의 검출은 RI 검출기를 사용하였다. Levan의 정량은 Shodex ionpack KS-802 column(Showa Denko Co., Japan)을 사용하였으며 [21], 당전이체의 분석은 Asahipak NH2P-50 column(Shodex, Japan)을 사용하였으며 acetonitrile:water (75:25)용매를 이용하여 유속 1 ml/min, 30°C 조건하에서 분석하였다. 당수용체로 전이된 유리 fructosyl기의 전환율은 전체 자당중에서 당수용체로 전이된 fructosyl기를 계산하여 백분율로 계산하였다.

결과 및 고찰

***Z. mobilis*의 균체외 자당가수분해 효소**

Z. mobilis ZM1이 균체외 분비성 자당가수분해 효소를 생산하는지 여부를 조사하기 위하여 10% 자당배지에서 생육시킨 후 배양상등액의 자당가수분해 효소활성을 조사한 결과 배양액중의 자당가수분해 효소활성은 대수증식기 중기에 가장 높았으며 대수증식기 말기에 감소되는 것으로 나타났다. 자당가수분해 효소활성을 나타내는 효소의 유형을 규명하기 위하여 배양액을 100배 농축한 후 전기영동하고 활성염색을 하여 본 결과 균체외 자당가수분해 효소는 2종 존재하며 2종의 자당가수분해 효소중 levansucrase의 존재를 확인하기 위하여 전기영동된 젤

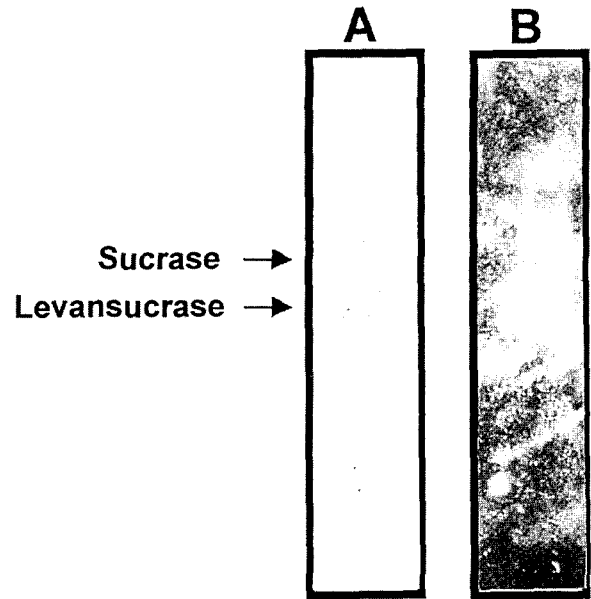


Fig. 1. Zymogram staining of the extracellular saccharolytic enzymes of *Z. mobilis* ZM1 following electrophoretic separation.

을 5% 자당용액에서 4시간 반응시킨 결과 levan 형성이 하나의 효소에서만 검출되어 각각 sucrase와 levansucrase인 것으로 동정되었다(Fig. 1). *Z. mobilis* ZM1의 균체의 자당가수분해 효소들은 포도당이나 과당을 탄소원으로 하였을 경우에는 배양액 중에서 효소활성이 검출되지 않았으며 자당에서 배양한 경우에만 균체의 효소활성이 검출되어 *Z. mobilis* ZM1의 가수분해 효소의 생성은 자당에 의해서 유도되는 것으로 추정되었다. *Z. mobilis*의 균체내외의 자당가수분해 효소의 활성비를 조사한 결과 전체 자당가수분해 효소활성중 약 83%가 균체외에서 검출되었다.

*Z. mobilis*균의 균체외 levansucrase와 sucrase의 존재 여부나 효소활성 특성에 관하여 많은 논란이 있어 왔다 [5, 13, 15, 16, 26]. 본 연구에서는 *Z. mobilis* ZM1의 levansucrase는 자당의 존재에 의하여 생산되는 유도효소이며 균체외에 대부분이 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 실험결과의 상이성은 대상균주가 서로 다르고 활성측정 방법의 부정확성 또는 *Z. mobilis*의 유전학적 불안정성에 기인하는 것으로 사료된다.

***Z. mobilis*로부터 균체외 levansucrase의 정제**

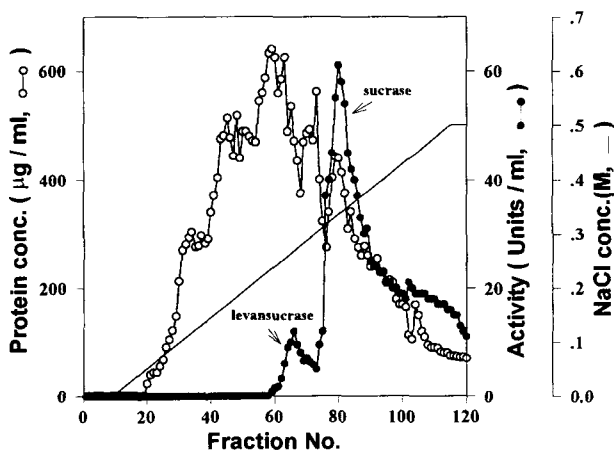
*Z. mobilis*의 levansucrase를 정제하기 위하여 대수증식기의 배양액을 원심분리하고 그 상등액에 80% ammonium sulfate를 첨가하여 단백질을 침전시켜 효소정제를 시도하였으나 배양액에 존재하는 점질성 물질때문에 초기 단계에서 효소의 농축이 불가능하였고 배양액중에 존재하는 효소의 양도 매우 적었다. 따라서 levan과

Table 1. Summary of levansucrase purification steps from *Z. mobilis*

Step	Volume (ml)	U total	Protein (mg/ml)	Spec. Act. (U/mg)	Yield (%)	Purifi. fold
Cell washed	1,300	- ^a	0.35	-	-	-
1st (NH ₄) ₂ SO ₄	115	-	1.28	-	-	-
Ion-exchange	38	4.35	0.57	0.21	100	1.00
Hydroxyapatite	20	2.58	0.41	0.31	65	1.52
2nd (NH ₄) ₂ SO ₄	2	0.96	0.46	1.04	21	5.07
Superose 12	1.5	0.72	0.13	3.75	16.5	18.3

같은 다당류를 생산하는 미생물의 경우 생성된 다당류가 정지기에는 균체표면에 흡착(protective layer)되는 특성[5, 26]을 이용하여 효소정제를 시도하였다. *Z. mobilis*를 10% 자당이 함유된 배지에 24시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 균체를 20 mM 인산 완충용액에 현탁하고 20분간 진탕하여 세척한 후 상등액에 대하여 자당가수분해 효소의 활성을 조사한 바 배양액을 농축한 조효소액에 비하여 약 4배의 효소활성을 가진 조효소액을 얻을 수 있었다. *Z. mobilis* 균체를 완충용액으로 세척한 후 원심분리한 결과 균체의 탁도(색깔)가 낮아지는 경향이 있었으며 균집된 pellet 상층부위에 levan 또는 세포막 부착 물질로 보이는 점질성의 물질층이 상당량 존재하는 것이 관찰되었다. 대수증식기의 균체를 세척한 경우에는 효소의 활성이 낮은점으로 미루어 세척액에 용출된 효소는 levan에 흡착되어 있었거나 또는 세포벽에 부착된 균체의 levansucrase 또는 sucrose가 유리된 것에 기인하리라고 사료된다.

Table 1은 각 단계별 정제도를 정리한 것으로 levansucrase와 sucrose의 분리가 가능하였던 Toyopearl-DEAE 음이온 교환 크로마토그래피(Fig. 2)에서 얻어진

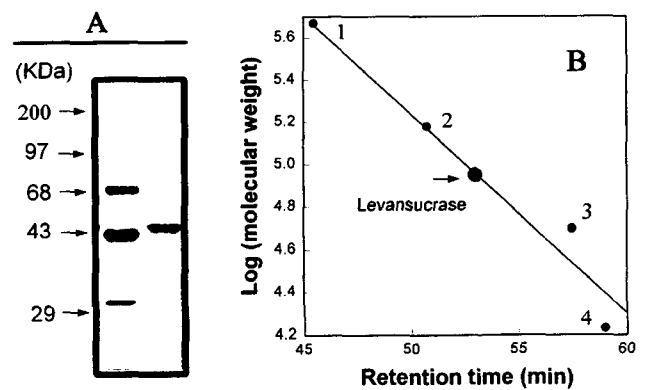
**Fig. 2. DEAE-anion exchange chromatogram of the extracellular saccharolytic enzymes of *Z. mobilis* ZM1.**

Cell washed solution from *Z. mobilis* ZM1 was put on the column (2.5×30 cm) preequilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 6.8), and eluted with NaCl gradient(0-0.5M).

levansucrase 활성을 기준으로 하였을 경우 최종적으로 약 18.3배의 정제도를 보였고 회수율은 약 16.5%였다. 정제된 활성분획을 10% SDS-PAGE를 행하고 0.05% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 결과 levansucrase가 단일 단백질 band로 검출되었으며(Fig. 3, A) 정제된 단백질에서는 자당가수분해 활성과 levan형성능이 관찰되었다.

Levansucrase의 분자량

분자량 측정을 위하여 최종적으로 정제된 효소액을 농축한 후 Superose 12 column에서 젤여과 크로마토그래피하였다. 이때 완충용액은 0.1M NaCl을 함유한 20 mM 인산 완충용액을 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min이었고 tube 당 0.5 ml을 분획하였다. Void volume는 blue dextran으로 측정하였으며, 표준단백질로는 HPLC용 표준품(Boehringer Mannheim)을 사용하여 용출시간을 구한 후 levansucrase의 분자량을 계산하였다. Fig. 3, B에서와 같이 levansucrase의 분자량은 젤여과 크로마토그래피에서 약 91,000으로, SDS-PAGE에서는 45,000으로 추

**Fig. 3. Homogeneity on SDS-PAGE (A) and molecular weight determination of purified levansucrase by gel filtration chromatography (B).**

The protein standards for SDS-PAGE were; myosin (200,000), phosphorylase b(97,400), bovine serum albumin (68,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (29,000), β -lactoglobulin (29,000), lysozyme (14,300). The protein standards for gel filtration were; β -galactosidase (465,000), IgG (sheep)(150,000), fab fragment from gG (sheep)(50,000), myoglobin from skeletal muscles (horse)(17,000).

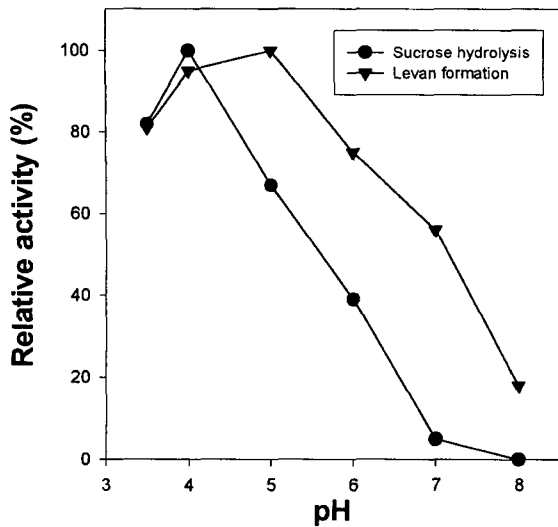


Fig. 4. Effect of pH on sucrose hydrolysis and levan formation activity of purified levansucrase.

The sucrose hydrolysis and levan formation assay was done by the methods described in Materials and Methods.

정되어 *Z. mobilis*의 levansucrase는 동일한 분자량을 갖는 subunit이 두개 결합한 dimer로 추정되었다.

Levansucrase의 특성조사

효소활성에 미치는 pH의 영향 정제된 levansucrase의 최적반응 pH를 알아보기 위하여 37°C에서 pH 3.4-8까지의 범위에서 효소 활성도를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 자당 가수분해 활성은 pH 4 부근에서 최고의 활성을 보였고, levan 형성은 pH 5 부근에서 최고의 활성을

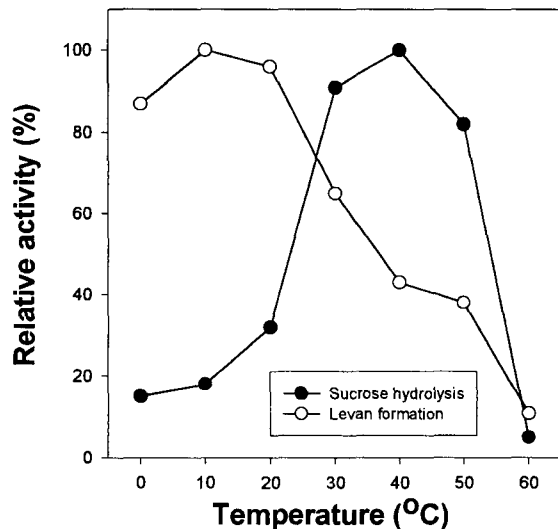


Fig. 5. Effect of temperature on sucrose hydrolysis and levan formation activity of purified levansucrase.

The sucrose hydrolysis and levan formation assay was done by the methods described in Materials and Methods.

보였으며, pH 8 이상의 조건에서는 효소활성이 없었다. 최적 levan 형성 pH가 6.0인 *Bacillus*[6], *Rahnella*[14] 또는 *Pseudomonas*[9]유래 levansucrase에 비하여 산성 조건에서 강한 효소활성을 보였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향 정제된 levansucrase의 최적반응 온도를 알아보기 위하여 0-60°C까지의 범위에서 효소 활성도를 측정하였다(Fig. 5). Levansucrase의 최대의 활성을 나타내는 온도는 자당 가수분해활성능의 경우 40°C였으며 levan형성활성능의 경우는 10°C가 최적 온도였다. 그러나 levan형성 반응 종결시의 *Z. mobilis* levansucrase의 levan형성 최적 온도가 0°C로 관찰되었다[21]. 이러한 원인으로는 levansucrase 자체에 의한 가수분해반응이나 효소의 열 안정성에 기인하는 것으로 추정된다[17]. 현재까지 보고된 levansucrase의 최적 levan형성 온도는 미생물 유래에 따라 다양하여 *B. subtilis* 유래[6]는 >10°C, *Pseudomonas* 유래[9]는 18°C, *Rahnella*유래[14]는 40°C로 보고되고 있으며 이러한 levansucrase의 levan형성특성은 열역학적인 측면에서 흥미로운 연구대상이라 할 수 있다.

여러가지 화합물 및 금속이온에 의한 영향 *Z. mobilis*의 levansucrase에 대한 여러 금속이온 및 유기시약의 영향을 알아보기 위해 농도별로 levansucrase와 혼합한 뒤 30°C에서 60분간 방치하고 효소의 활성을 측정하였다. Table 2에서와 같이 착염시약인 EDTA에 의하여 저

Table 2. Effects of various compounds on levansucrase activity^a

Compound	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
EDTA	1	85
	5	54
SDS	1	3
	5	2
Triton X-100	1	135
	5	144
Urea	1	95
	5	94
CuCl ₂	1	73
CaCl ₂	1	140
FeCl ₂	1	91
HgCl ₂	1	0
MgCl ₂	1	85
MnCl ₂	1	96
NiCl ₂	1	80
ZnCl ₂	1	121

^aAll of the metals and chemicals were tested at a final concentration of 10⁻³ M with the exception of EDTA, SDS, Triton X-100 and urea. The enzyme solutions were preincubated with each metal ions or chemicals at 30°C for 1 hour before measurement of activities.

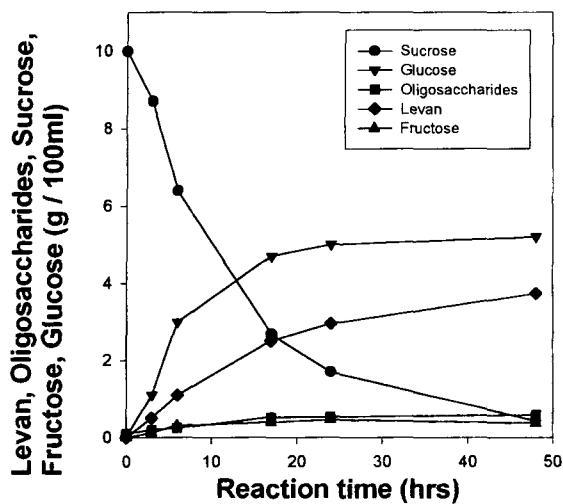


Fig. 6. Time course of substrate utilization and products formation of purified levansucrase.

Twenty mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 10% sucrose and the enzyme (1 unit/10 ml) were incubated at 0°C for 48 hrs. The analysis of sugars was conducted by HPLC, as described in Materials and Methods.

농도에서는 심한 저해현상을 보이지 않았으나 5 mM에서는 약 50% 정도의 활성이 저해되었다. 금속이온의 효과에서는 CaCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 , NiCl_2 에 의해 효소활성이 증가되었고 CuCl_2 와 FeCl_3 에 의해서는 약간의 활성저해가 관찰되었다. 그러나 HgCl_2 에 의해서는 효소활성이 완전히 없어졌다. Nonionic detergent인 Triton X-100을 효소반응액중에 첨가하였을 경우에는 1 mM과 5 mM 농도에서 각각 35%와 44%의 효소활성이 촉진되었다. 또한 ionic detergent인 SDS에 의해서는 심한 저해현상을 보여 1 mM의 농도에서도 효소활성을 완전히 잃었다. Petit-Glatron 등[18]은 *Bacillus*의 levansucrase를 정제한 후 특성을 조사하여 효소가 aggregate 되기 쉬운 성질이 있는 것을 관찰하고 CMC(critical micellar concentration)값 이상의 Triton X-100을 첨가하면 활성이 증가한다고 보고한 바 있다. 이러한 특성은 levansucrase가 lipid vesicle에 쌓여 있거나, polysaccharide 또는 lipopolysaccharide 등과 결합하고 있을 가능성을 시사하거나, 또는 단지 단백질 복합체를 형성하였기 때문인 것으로 사료된다.

Levan 형성 100 ml의 10% 자당용액(50 mM sodium acetate 완충용액, pH 5.0)에 효소액을 최종농도가 1 U/ml이 되도록 첨가하고 10°C에서 반응시키면서 반응액중 생성된 levan 및 유리된 당의 분석을 행하였다. Fig. 6에서와 같이 반응 48시간후 기질인 자당은 고갈되었으며 3.7 g/100 ml의 levan, 5 g/100 ml의 포도당, 0.8 g/100 ml의 oligosaccharides, 0.4 g/100 ml 과당이 생성되었다. 유리된 과당의 levan으로의 전환율은 74%로 나타났으며 기존에 보고된 levansucrase[14]에 비하여 높은 전

Table 3. Substrate specificity and acceptor reaction of levansucrase from *Z. mobilis*

Sugar	Hydrolysis ^a	Acceptor Sugar reaction ^b	Sugar	Hydrolysis ^a	Acceptor reaction ^b
Ribose	-	+	Lactose	-	+++
Fucose	-	-	Maltose	-	++
Lyxose	-	-	Trehalose	-	-
Xylose	++	+	Melibiose	-	+
Fructose	-	-	Melizitose	-	-
Sorbose	-	-	Kestose	+	+
Mannose	+	+	Raffinose	+	+++
Galactose	+++	-	Maltotriose	-	-
Glucose	++	+	Nystose	+	+
Lactulose	-	-	Starchyose	+	-
Sucrose	+	+++	Xylitol	-	+
Palatinose	-	+	Sorbitol	-	+
Cellobiose	-	+++	Mannitol	-	-

a, Twenty mM sodium acetate buffer (pH 4.0) containing 10% each sugars were incubated with the enzyme (1 unit/ml) at 30°C for 12 hrs.

b, Twenty mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 20% (W/V) sucrose and 20% (W/V) acceptor sugars were incubated with the enzyme (1 unit/ml) at 30°C for 24 hrs. The transfer products were analyzed by HPLC, as described in Materials and Methods. Transfer ratio is expressed as: more than 40%, +++; 10% to 40%, ++; less than 10%, +; not detected, -.

환율을 보였다.

기질 및 당전이 특이성 정제된 levansucrase의 기질 특이성에 관하여 조사하였다. 조사한 당류중 과당이 β -1,2 결합된 자당, raffinose, starchyose, kestose, nystose에서는 가수분해 활성이 관찰되었으며 lactulose(β -1,4 결합)와 palatinose(β -1,6 결합)에 대한 가수분해활성은 검출되지 않았다(Table 3). 효소반응생성물인 levan에 대한 가수분해활성은 관찰되었으나 inulin은 분해하지 못하였다.

Levansucrase는 자당의 fructosyl기를 여러 당수용체에 전이할 수 있으며 이러한 과당 전이 반응에 의하여 산업적으로 유용한 여러 가지 sugar-derivative들을 생산하고자 하는 연구들이 진행되고 있다. *Z. mobilis* levansucrase의 과당 전이반응에 관하여 조사한 결과(Table 3) 조사한 당류중 galactose, 자당, cellobiose, lactose와 raffinose에 대하여 효과적이었으며 또한 sugar alcohol인 솔비톨이나 자일리톨을 fructosyl기 수용체로 인식하여 지금까지 보고된 *Bacillus*[17]나 *Rahnella*[14] 등 다른 미생물 유래의 levansucrase에 비하여 많은 수용체에 대한 당전이활성을 가진 것으로 나타나 유용 다당류나 당전이산물의 제조가 가능할 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Belghith, H., K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee.

1996. Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnol. Lett.* **18**: 467–472.
2. Biton, J., J. M. Michel, D. Le Beller, V. Pelenc, F. Paul, P. Monsan, and G. Gellf. 1995. Enzymatic synthesis of low-carolie sugar substitutes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **750**: 321–324.
 3. Cheatham, P. S. J., A. J. Hacking, and M. Vlitos. 1989. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 212–219.
 4. Chung, B. H., W. K. Kim, K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee. 1997. Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning. *Biotechnol. Techniques* **11**: 327–329.
 5. Doelle, H. W. and P. F. Greenfield. 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 411–416.
 6. Elisashvili, V. I. 1984. Levan synthesis by *Bacillus* sp. *Appl. Biochem. Microbiol.* **20**: 82–87.
 7. Gunasekaran, P., T. Karunakaran, and J. Baratti. 1990. Cloning and sequencing of the *sacA* gene: Characterization of a sucrose from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **172**: 6727–6735.
 8. Han, Y. W. and M. A. Clarke. 1990. Microbial fructan, production and characterization, Chapter 18. *Agricultural and Synthetic Polymers*, American Chemical Society, New York.
 9. Hettwer, U, M. Gross, and K. Rudolph. 1995. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* **177**: 2834–2839.
 10. Johns, M. R., P. F. Greenfield, and H. W. Doelle. 1991. Byproducts from *Zymomonas mobilis*, pp. 97–121. In A. Fiechter(ed.) *Advances in Biochem. Eng. Biotech.*, Vol. **44**, Springer-Verlag, Berlin.
 11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680–685.
 12. Leibovich, J. and Y. Stark. 1985. Increase of permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cell. Mol. Biol.* **31**: 337–341.
 13. Lyness, E. W. and H. W. Doelle. 1983. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 345–350.
 14. Ohtsuka, K., S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematsu, and T. Uchida. 1992. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1373–1377.
 15. O'Mullan, P., M. Szakucs-Dobozi, and D. E. Eveleigh. 1991. Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnol. Lett.* **13**: 137–142.
 16. Park, Y. K., M. P. L. Mortatti, and H. H. Sato. 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Appl. Eur. Microbiol.* **44**: 515–518.
 17. Perez Oseguera M. A., L. Guereca, and A. Lopez-Munguia. 1996. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 465–471.
 18. Petit-Glatron, M. F., R. Chambert, and M. Steinmetz. 1980. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Characterization of a form isolated from phenol-treated cells and activated by Triton X-100. *Eur. J. Biochem.* **103**: 189–193.
 19. Romano, A. H. 1986. Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **4**: 207–213.
 20. Skotnicki, M. L., K. J. Lee, K. J. Tribe, and P. L. Rogers. 1982. Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for ethanol production, pp. 271–290. In A. Hollaender(ed.), *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Plenum Press.
 21. Song, K. B., H. Belghith, and S. K. Rhee. 1996. Production of levan, a fructose polymer, using an overexpressed recombinant levansucrases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **799**: 601–607.
 22. Song, K. B., H. K. Joo, and S. K. Rhee. 1993. Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC 10988). *Biochim. Biophys. Acta.* **1173**: 320–324.
 23. Song, K. B., S. K. Lee, H. K. Joo, and S. K. Rhee. 1994. Nucleotide and derived amino acid sequences of an extracellular sucrose gene (*invB*) of *Zymomonas mobilis* ZM1(ATCC 10988). *Biochim. Biophys. Acta.* **1219**: 163–166.
 24. Swings, J. and J. De Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 1–46.
 25. Tanaka, T., T. Karigane, S. Fujii, T. Chinzaka, and S. Nakamura. 1985. Intermolecular fructosyl and levanbiosyl transfers by levan fructotransferase of *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* **97**: 1679–1688.
 26. Viikari, L. 1988. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **7**: 237–261.
 27. Yanase, H., M. Iwata, R. Nakahigashi, K. Kita, N. Kato, and K. Tonomura. 1992. Purification, crystallization, and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1335–1337.

(Received March 12, 1998)