



## ***Zymomonas mobilis* LEVANSUKRAZ ENZİMİNİN LEVAN ÜRETİMİNDE KULLANILMASI**

**Güler Sözgen<sup>1</sup>, Gökçenaz Özdoğan<sup>2</sup>, Burcu Kaplan Türköz<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş / *Received*: 09.08.2018; Kabul / *Accepted*: 22.11.2018; Online baskı / *Published online*: 07.12.2018

Sözgen, G., Özdoğan, G., Kaplan Türköz, B. (2018). *Zymomonas mobilis* levansukraz enziminin levan üretiminde kullanılması. *GIDA* (2018) 43 (6): 1061-1074 doi: 10.15237/gida.GD18087

*Sözgen, G., Özdoğan, G., Kaplan Türköz, B. (2018). Use of Zymomonas mobilis levansucrase in levan production. GIDA (2018) 43 (6): 1061-1074 doi: 10.15237/gida.GD18087*

### **ÖZ**

Levan gıda, kozmetik ve ilaç sanayi gibi birbirinden farklı endüstrilerde kullanım alanına sahip bir fruktoz polimeridir. Levansukrazlar sakkarozu substrat olarak kullanarak fruktoz polimerleri oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. Bakteriler tarafından hücre dışına salgılanan levansukrazlar bakterinin yüksek sakkaroz konsantrasyonunda levan ve/veya fruktoooligosakkarit polimerlerini sentezlemesini sağlar. Bu çalışmada *Zymomonas mobilis* NRRL B-14023 kullanılarak levansukraz enziminin üretilmesi ve levan polimeri üretme koşulları incelenmiştir. Yapılan çalışmada *Z. mobilis* levansukrazı üretilmiş ve ham enzimin levan aktivitesi gösterilmiştir. Levansukraz, *Z. mobilis* B-14023 hücreleri tarafından 36 saat boyunca 30.3 °C'de 159 g/L sakkaroz, pH 4.91 ortamında statik kültürde üretilmiştir. Levansukrazın levan üretimi için optimum inkübasyon süresi ve sıcaklığı 24 saat ve 25 °C olarak bulunduğundan sonra aktiviteye etki eden faktörler araştırılmıştır. Artan NaCl konsantrasyonunda levan üretiminde azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca 10 mM EDTA ve MgCl<sub>2</sub> varlığında enzimin levan üretim aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak *Z. mobilis* NRRL B-14023 levansukrazı ile ortalama 62.42 g/L levan üretilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Zymomonas mobilis*, Levansukraz, Levan

### **USE of *Zymomonas mobilis* LEVANSUCRASE IN LEVAN PRODUCTION**

#### **ABSTRACT**

Levan has a wide range of uses in different industries such as food, cosmetics and pharmaceutical. Levansucrases are enzymes, which catalyze the formation of fructose polymers using sucrose as substrate. Levansucrases are produced and secreted by bacteria and enable them to synthesize levan/fructooligosaccharides in medium containing high sucrose concentrations. In this study, *Zymomonas mobilis* levansucrase was produced and its levan activity was investigated. Levansucrase was produced by *Z. mobilis* NRRL B-14023 cells in static culture in medium with 159 g/L sucrose, pH 4.91 at 30.3 °C for 36 h. The optimum incubation time, temperature of crude enzyme for levan production were found as 24 h and 25 °C. The levan production of levansucrase decreased with increasing NaCl concentrations. Furthermore the presence of 10 mM EDTA and MgCl<sub>2</sub> showed an inhibitory effect on levan production. As a result, on average 62.42 g/L levan was produced using *Z. mobilis* NRRL B-1423 levansucrase.

**Keywords:** *Zymomonas mobilis*, Levansucrase, Levan

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ burcu.kaplan.turkoz@ege.edu.tr

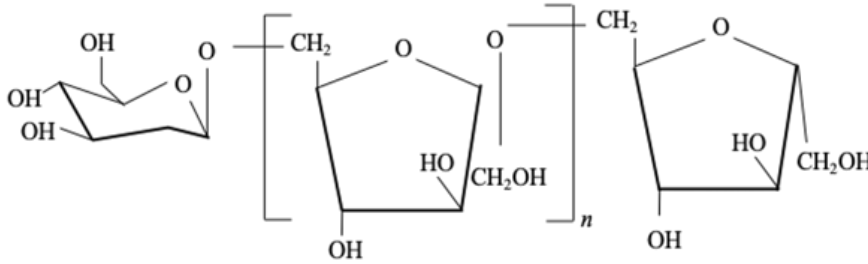
☎ (+90) 232 311 3011

☎ (+90) 232 311 4831

## GİRİŞ

Fruktanlar sakkarozdan türetilen fruktoz polimerleridir (Ritsema ve Smeekens, 2003). Fruktanlar gıda endüstrisinde oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. İnülin tipi fruktanlar tatlandırıcı, yağ ikamesi, tekstür düzeltici, stabilizatör ve jelleştirici olarak, ekmekçilikte, pastacılıkta, bebek mamalarında, dondurma ve tatlılarda kullanılmaktadır (Roberfroid, 2000). Levan tipi fruktanlar ise hem suda hem yağda

çözünebilir olmaları, yüksek molekül ağırlığı ve düşük viskoziteye sahip olmaları, oda sıcaklığında su içinde şişmemeleri gibi bir çok özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde jelleştirici ajan, emülgatör, stabilizatör ve kıvam arttırıcı olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Arvidson vd., 2006; Srikanth vd., 2015a). Levan, ana zincire D- fruktofuranosil halkalarının  $\beta$ -(2,6) bağları ile bağlanmasından oluşan doğal bir fruktoz polimeridir (Bekers vd., 2005) (Şekil 1).



Şekil 1: Levan polimerinin kimyasal yapısı.

Figure 1: Chemical structure of levan polymer.

Levan polimerinin ticari üretiminin ABD'de 1930'lu yıllarda başladığı bildirilmiştir (Srikanth vd., 2014). Levan, gıda, kozmetik, ilaç gibi birbirinden farklı endüstrilerde kullanım alanı bulmuştur (Ergene ve Avcı, 2016). Levan kimyasal özellikleri sayesinde diğer moleküllerle kovalent bağ yapabilir ve fonksiyonel polimerlerin oluşumuna olanak sağlar. Örneğin levan fosfatın bu özelliği ile yağ ikamesi olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Roberts ve Garegg, 1998). Levanın yağ ikamesi olarak kullanılmasında yüksek molekül ağırlığı ile tat reseptörleri tarafından algılanamayacak kadar büyük olması ve uçuculuk özelliğinin algılanabilir seviye için çok düşük olması da avantaj sağlamaktadır (Xiao vd., 2014). Ekmek ile ilgili yapılan bir çalışmada levanın mikrojel oluşturmasının raf ömrünün uzamasına etkili olduğu bulunmuştur. Buğday ekmeğine en az %1 oranında levan eklendiğinde kontrole kıyasla %18-26 oranında daha yumuşak ekmek elde edildiği gösterilmiştir (Jakob vd., 2012). Levanın biyobozunur ambalaj malzemesi olarak da kullanılabilceği bildirilmektedir. Levanın yapısında uzun esnek parçalar bulunmadığı için levan polimerinden yapılan filmler kullanım için çok kırılmandır ancak kil veya diğer plastikleştiricilerle birlikte kullanılmasıyla bu

soruna çözüm bulunmuştur (Vijayendra ve Shamala, 2014). Bütün bu özelliklerinin yanında levan ayrıca prebiyotik özellik de göstermektedir (Ki-Hyo vd., 2003). Anti-irritan, antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri de olduğu için levan tıbbi açıdan da değerli bir polimerdir (Öner vd., 2016).

Levan üretimi mikrobiyal fermantasyon ile yapılabilmektedir. *Zymomonas mobilis* fermantasyonu sonrası elde edilen üst fazlarda doğrudan levan bulunduğu gösterilmiştir (Silbir vd., 2014). Silbir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Z. mobilis* ile levan üretimi koşulları optimize edilmiştir ve 299.1 g/L başlangıç substrat (sakkaroz) konsantrasyonu, 42.3 saat inkübasyon süresi ve pH 6.0 başlangıç değerinde maksimum levan konsantrasyonu olan 40.2 g/L'ye ulaşıldığı belirtilmiştir. *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi kullanılarak yapılan bir çalışmada 200 g/L sakkaroz konsantrasyonu, 37 °C'de pH 7.0 değerinde 21 saat inkübasyon süresi sonunda 49.4 g/L levan elde edildiği bildirilmiştir (Shih vd., 2005). İmmobilize *B. subtilis* (Natto) Takahashi kullanılarak da 72 saat inkübasyon süresinde 70.6 g/L levan üretimi gerçekleştirildiği

bildirilmiştir (Shih vd., 2010). *Bacillus licheniformis* NS032 kullanılan bir çalışmada 96 saat inkübasyon sonunda 47.8 g/L levan elde edildiği (Kekez vd., 2015), *Acetobacter xylinum* NCIM 2526 kullanılarak da 60 saat sonunda 13.25 g/L levan elde edildiği (Srikanth vd., 2015b) bildirilmiştir.

Mikroorganizmaların sakkaroz fermantasyonu sırasında levan üretimlerini sağlayan hücre dışına salgıladıkları levansukraz enzimleridir.

Levansukrazlar, sakkarozu parçalayan ve açığa çıkan fruktozları şeker polimerlerine dönüştüren enzimlerdir. Bakteriler tarafından hücre dışına salgılanan levansukrazlar bakterinin yüksek sakkaroz konsantrasyonunda FOS ve levan polimerlerini sentezlemesini sağlar. Levansukrazlar mikrobiyal kökenlerine ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak uzun levan polimerleri ya da FOS üretirler (Öner vd., 2016). Levansukraz enzimi çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilir ve bunlardan *B. subtilis* (Chambert vd., 1974), *Acetobacter diazotrophicus* (Hernandez vd., 1995), *Erwinia amylovora* (Caputi vd., 2013), *Pseudomonas syringae* pathovar (Hettwer vd., 1995) ve *Z. mobilis* (Erdal vd., 2017; Santos-Moriano vd., 2015) levansukrazları karakterize edilmiştir. Enzim aktivitesi için önemli değişkenler sakkaroz konsantrasyonu, pH ve sıcaklıktır. *Z. mobilis* levansukrazının reaksiyon koşullarına bağlı olarak hem FOS hem de levan ürettiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada 4-40 °C arasındaki reaksiyonlar incelenmiş ve 4 °C'de en yüksek levan verimi elde edildiği, sıcaklık yükseldikçe FOS üretiminin arttığı bildirilmiştir (Santos-Moriano vd., 2015). Başka bir çalışmada *Z. mobilis* levansukrazın pH 5.4 tamponda ve 45 °C'de FOS aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Erdal vd., 2017). *B. subtilis* levansukrazı pH 6'da ve 22 °C'de levan üretirken (Chambert vd., 1974), *E. amylovora* levansukrazı pH 6.5 tamponda ve 37 °C sıcaklıkta FOS üretmektedir (Caputi vd., 2013). Doğrudan saflaştırılmış levansukraz enzimlerinin kullanılmasıyla levan üretimi ile ilgili literatürde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin *B. subtilis*'ten levansukraz üretimi ve enzimatik levan sentezi incelenmiştir. Artan protein konsantrasyonlarında levan üretiminin arttığı ve 1000 µg/mL enzim kullanılarak %84 verimle

levan üretilebileceği bildirilmiştir (Abdel-Fattah vd., 2005). Enzimatik levan üretimi; düşük yan ürün oluşması, üretimin kontrollü olması ve istenilen sürede gerçekleşmesi nedeniyle avantajlıdır. Bu çalışmada *Z. mobilis* levansukraz enziminin eldesi ve ham enzim ile levan üretim koşulları araştırılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

di-nitro salisilik asit (DNS) ve diğer bütün analitik saflıktaki kimyasallar Sigma-Aldrich ya da Merck'ten temin edilmiştir.

### Mikroorganizma ve Üreme Koşulları

Bu çalışmada kullanılan *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücresi Agricultural Research Service Culture Collection (Peoria, USA)'dan temin edilmiştir. Mikroorganizma, taze stok besiyeri ortamında (glukoz; 20 g/L, bacto peptone; 10 g/L, maya özütü; 10 g/L) 28 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrası %50 gliserol ile karıştırılarak -86 °C'de dondurularak saklanmıştır.

### *Z. mobilis* Levansukraz Fermantasyonu

Taze stok besiyeri ortamında geliştirilen *Z. mobilis*, %5(v/v) oranında aşı kültür ortamına (sakkaroz; 50 g/L, maya özütü; 7 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2.5 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1.6 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1 g/L, pH 5.0) ekilmiş ve 28 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında aşı kültürden %5(v/v) oranında üretim ortamına (sakkaroz; 159 g/L, maya özütü; 2.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1 g/L, pH 4.91) inokülasyon yapılmıştır. Fermantasyon, içerisinde 200 mL üretim ortamı bulunan 1 L erlenlerde statik kültür olarak 30.3 °C'de yapılmıştır. Fermantasyon süresince farklı zamanlarda örnek alınarak hücre yoğunluğu, protein miktarı ve levansukraz aktivitesi ölçülmüştür.

### Hücre Yoğunluğu

Fermantasyon ortamındaki hücrelerin yoğunluğu Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda belirlenmiştir.

### Ham Enzim Eldesi

Hücre dışına salgılanan enzimin eldesi, hücre dışı proteinlerin hücrelerden ayrılması yoluyla gerçekleşmiştir. Fermantasyon sonrasında hücrelerin uzaklaştırılması için iki farklı yöntem denenmiştir. Santrifugasyon yönteminde fermantasyon sonrasında alınan üretim ortamları 4 °C'de 6500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve temiz üst faz ham enzim olarak ayrılmıştır. Filtrasyon yönteminde ise fermantasyon sonrası üst faz 0.22 µm selüloz asetat filtreden geçirilmiş ve temiz alt faz ham enzim olarak ayrılmıştır.

### Enzim Aktivite Tayini

Levansukraz aktivitesi, açığa çıkan indirgen şeker (glukoz ve fruktoz) ya da glukoz miktarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. İndirgen şeker miktarı Miller'ın DNS yöntemine göre belirlenmiştir (Miller, 1959). 250 µL seyreltilmiş enzim örneği 0.5 M sakkaroz içeren 750 µL tampon A (22 mM sitrat-fosfat, pH 5.4) ile karıştırılmış ve 35 °C su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 3 mL DNS (3,5-di-nitro salisilik asit) çözeltisi eklendikten hemen sonra, örnek 100 °C su banyosunda 5 dakika boyunca kaynamaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin 540 nm'deki absorbans değerleri GENESYS 10S UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Örnekteki indirgen şeker miktarı glukoz standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Bir birim levansukraz aktivitesi, dakikada 1 µmol indirgen şekeri açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

### Elektroforez

Protein saflığı ve moleküler kütlesi SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile belirlenmiştir (Laemmli, 1970). Hücrelerden ayrılan ham enzim liyofilize edilmiş ve elde edilen toz, tampon A'da çözülmüştür. Ultrafiltrasyon üniteleri (Amicon 500, NMWCO 10 kDa) kullanılarak santrifugasyon ile 30 kat konsantre edilmiş, %12 akrilamid jelde yürütülmüş ve Coomassie Brilliant Blue G-250 ile boyanmıştır (Lawrence ve Besir, 2009).

### Zimogram

Jel üzerinde enzim aktivitesi zimogram (P. O'Mullan vd., 1991) ile belirlenmiştir. 100 µg protein içeren 40 µL örnekler denatüre edici

olmayan %10'luk poliakrilamid jelde yürütülmüş %5 sakkaroz içeren tampon A ile gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

### Protein Tayini

Protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). 200 µL Bradford boya çözeltisi üzerine 4 µL örnek ilave edilerek Thermo Scientific Multiscan Go sistemde 96 kuyulu plakalarda 595 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. BSA ile oluşturulan standart eğri denklem kullanılarak protein miktarı hesaplanmıştır.

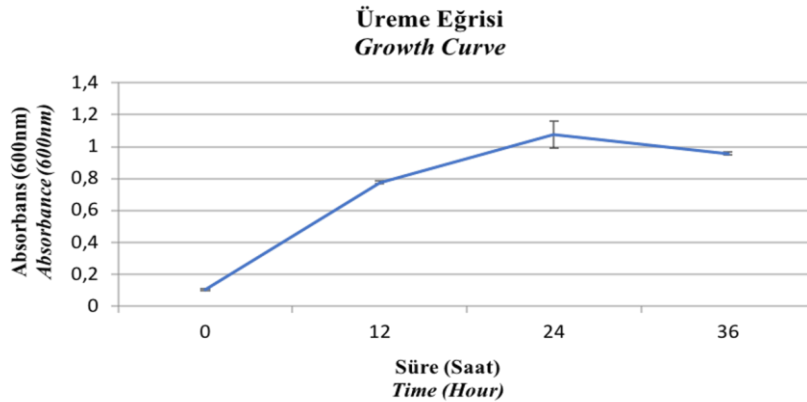
### Levan Üretimi ve Miktar Tayini

Levan üretimi için 30 birim enzim 0.2 M sakkaroz içeren tampon A (22 mM sitrat-fosfat, pH 5.4) ile karıştırılmıştır. Levan üretimi iki farklı sıcaklıkta (15 °C ve 25 °C) su banyosunda, toplam 15 mL hacimde gerçekleştirilmiş ve farklı zaman aralıklarında örnek alınmıştır. Reaksiyon sonucu oluşan levan miktarı iki farklı yöntem ile hesaplanmıştır. Doğrudan levan miktarı belirlenmesi için reaksiyonların 400 nm'deki bulanıklık değişimi takip edilmiştir (Vigants, vd., 2001). Ticari levan ile oluşturulan standart eğriler kullanılarak levan miktarı g/L cinsinden hesaplanmıştır. Oluşan levan miktarının indirgen şeker cinsinden belirlenmesi için ise levan çöktürülmüş ve elde edilen levan çökeltisi 0.1 M HCl asit ile 100 °C su banyosunda 1 saat boyunca hidroliz edilmiştir (Viikari, 1984). Açığa çıkan indirgen şeker DNS yöntemi ile fruktoz standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Levansukrazın levan üretimine iyonik yük etkisinin belirlenmesi için farklı NaCl konsantrasyonları içeren tamponlarda reaksiyonlar yapılmıştır. Ayrıca EDTA ve 10 mM MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O iyonları varlığında da reaksiyonlar yapılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### *Z. mobilis* B-14023 Üreme Eğrisi

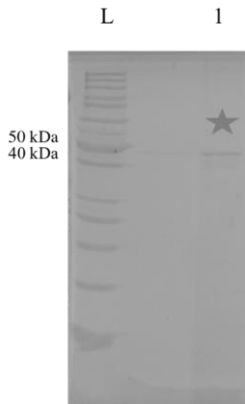
Fermantasyon ortamından 0., 12., 24. ve 36. saatlerde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda absorbans okunmuş ve en yüksek değer 36. saatte görülmüştür (Şekil 2). Bu sonuç Silbir ve ark. (2014) ile paralellik göstermektedir, mikroorganizma sayısının en yüksek olduğu saat 36.saat olarak belirtilmiştir.



Şekil 2: *Z. mobilis* üreme eğrisi  
Figure 2: *Z. mobilis* growth curve

### *Z. mobilis* Levansukraz Üretimine Sürenin Etkisi

Fermantasyon sırasında farklı saatlerde alınan örneklerden santrifüj yoluyla üst fazlar elde edilmiştir. Elde edilen üst fazlar elektroforez ile incelenmiş ve tek belirgin protein bandı olduğu görülmüştür (Şekil 3). Ayrıca daha önce yapılan çalışma ile bu protein bandı sekanslanmış ve levansukraz olduğu doğrulanmıştır (Erdal vd., 2017). Levansukraz enzimi hücre dışı bir enzim olduğundan ve üst fazlarda levansukrazdan başka belirgin bir protein bandı görülmediğinden elde edilen üst faz ile enzim aktivite tayini yapılmıştır.



Şekil 3: *Z. mobilis* fermantasyon sonrası üst fazın %12 SDS-poliakrilamid jelde incelenmesi L: Protein ladder, 1: örnek. Levansukraz bandı yıldız ile işaretlenmiştir.

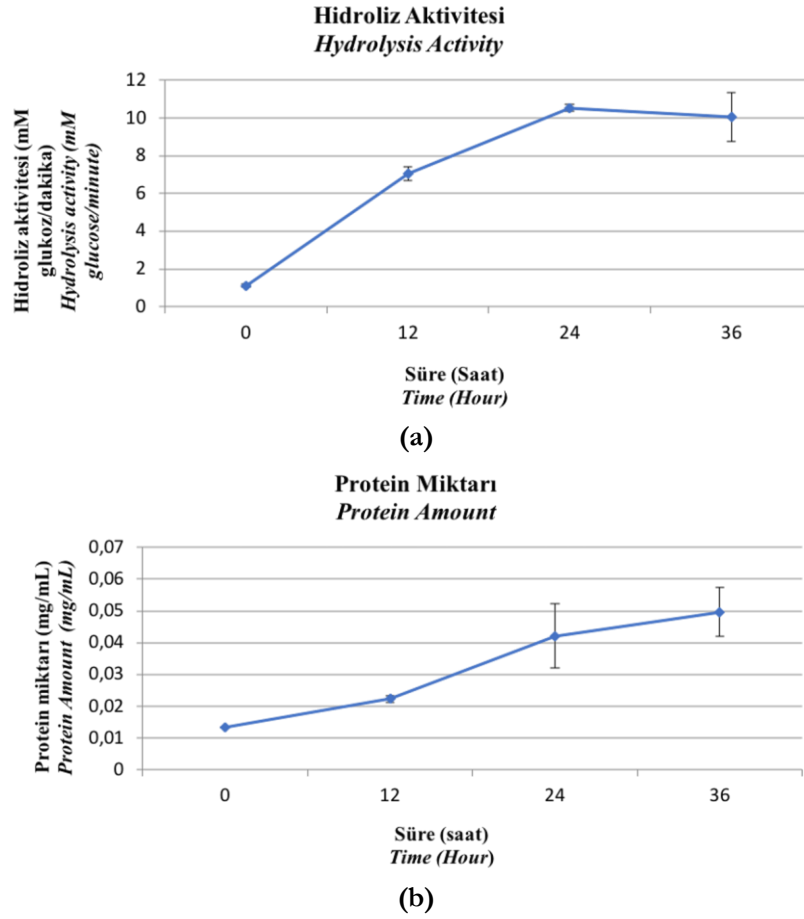
Figure 3: Analysis of cell free supernatant of *Z. mobilis* on 12% SDS-polyacrylamide gel L: protein ladder, 1: sample. Levansucrase band is marked with a star.

Levansukraz enziminin hidroliz aktivitesinin belirlenmesi için indirgen şeker yöntemi kullanılmıştır ve enzimin en yüksek hidroliz aktivitesi değerinin 36. saatte bulunduğu görülmüştür (Şekil 4a). Hücrelerden ayrılmış üst fazdan toplam protein tayini yapılarak, protein miktarında artış incelenmiştir. Fermantasyon süresince artan protein miktarı levansukraz miktarındaki artıştan kaynaklanmaktadır. Hidroliz aktivitesi sonuçlarıyla aynı şekilde en yüksek protein miktarı 36. saatte görülmüştür (Şekil 4b).

36 saat fermantasyon sonunda üst faz protein miktarı  $0.049 \pm 0.007$  mg/mL ve hidroliz aktivitesi  $10.07 \pm 1.3$  mM glukoz/dakika olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında inkübasyon süresi 36 saat olarak belirlenmiştir.

### Levansukraz ile Levan Üretimi

Ham enzim eldesi hücre dışı proteinlerin hücrelerden ayrılması yoluyla gerçekleşmiştir. Hücre dışı proteinlerin hücrelerden ayrılması santrifugasyon ve filtrasyon ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen ham enzim levan üretim denemelerinde kullanılmıştır. Reaksiyonlar sonucunda görülen beyaz bulanıklığın levan olduğu bildirilmiştir (Vigants vd., 2001; Viikari, 1984). Yapılan ön denemede 25 °C'de 30 birim levansukraz ile 0.2 M sakkaroz varlığında reaksiyon gerçekleştirilmiş ve 24 saat sonunda levan oluştuğu görülmüştür (Şekil 5a). Levan üretimi ayrıca zimogram ile de gösterilmiş ve jelde belirgin beyaz bir bant oluştuğu görülmüştür (Şekil 5b).



Şekil 4: *Z. mobilis* fermantasyon üst fazının (a) hidroliz aktivitesi ve (b) protein miktarı  
Figure 4: Hydrolysis activity (a) and protein amount (b) of *Z. mobilis* fermentation supernatant

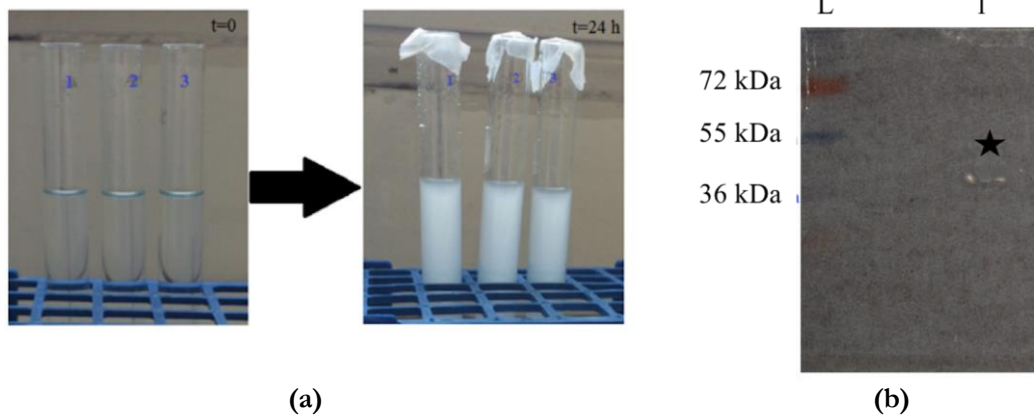
### Levan Üretimine Etki Eden Faktörler

#### Reaksiyon Süresi ve Sıcaklık

Levansukraz ile levan üretimi için optimum zaman ve sıcaklık koşullarını belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucunda artan süre ile levan üretiminin arttığı gözlenmiştir (Şekil 6a). Bu çalışmada en fazla 24 saat reaksiyon yapılmış ve en yüksek levan miktarı 24. saatte elde edilmiştir. Reaksiyon için iki farklı sıcaklık denenmiş ve *Z. mobilis* levansukrazının 25 °C'de daha yüksek miktarda levan ürettiği görülmüştür (Şekil 6b).

Literatürde yapılan bir çalışmada *Z. mobilis* CT2 levansukrazının optimum reaksiyon koşulunun 0.5 M sakkaroz ve 50 mM asetat pH 5.0 tamponda

25 °C'de olduğu gösterilmiştir (Senthilkumar ve Gunasekaran, 2005). Bir başka çalışmada *Z. mobilis* UQM 2716 levansukrazın 0.16 M sakkaroz 0.02 M sitrat fosfat pH 5.4 tamponda levan aktivitesi için optimum sıcaklık 25 °C olarak belirlenmiş ve 35 °C'de aktivitenin görülmediği bildirilmiştir (Crittenden ve Doelle, 1994). Diğer bir çalışmada da *E. coli*'de üretilmiş rekombinant *Z. mobilis* ZMI levansukrazının levan üretimi için optimum sıcaklığın 0 °C olduğu bildirilmiştir (Belghith, 1996). Hettwer ve ark., (1995) yaptıkları çalışmada *P. syringae* levansukrazının en yüksek levan aktivitesini 18 °C'de gösterdiğini bildirmiştir. *Bacillus sp.* TH4-2 levansukrazının levan aktivitesi için en uygun sıcaklığın 50 °C olduğu bildirilmiştir (Ammar vd., 2002).



Şekil 5: (a) t=0 ve t=24 saat anında levansukraz reaksiyon tüpleri (b) Zimogram analizi. L: Protein Ladder 1: örnek. Levansukraz bandı yıldız ile işaretlenmiştir.

Figure 5: Levansucrose production in reaction tubes at t=0 and t=24 hours (a) and zymography (b) L: protein ladder, 1: sample. Levansucrase band is marked with a star.

#### Enzimin Elde Edilme Yöntemi

Levan reaksiyonları hem santrifugasyon hem de filtrasyon ile elde edilen ham enzim ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen levansukrazın 400 nm'deki absorbans değerleri çok yakın bulunmuş (filtrasyon: 1,76; santrifugasyon: 1,66) daha kolay ve hızlı bir yöntem olduğu için çalışmalarda santrifugasyon yöntemi kullanılmıştır (Şekil 6c).

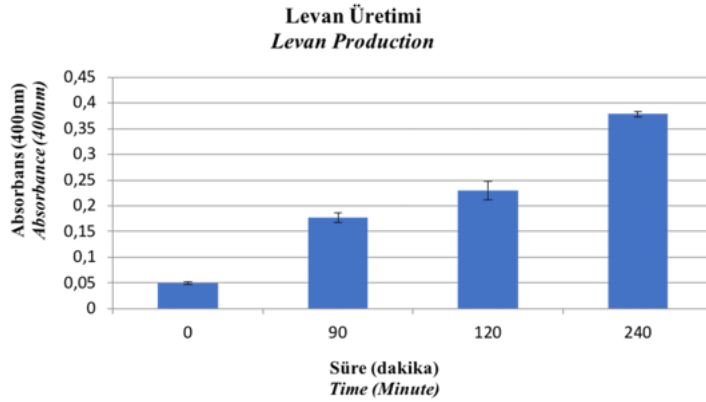
#### İyonik Yük, EDTA ve Metal İyonlar

*Z. mobilis* levansukrazından levansukraz üretimi için optimum inkübasyon süresi ve sıcaklık belirlendikten sonra levansukraz üretimini etkileyebilecek parametrelerden iyonik yük ve metal iyonları incelenmiştir. Reaksiyonlara farklı konsantrasyonlarda NaCl, EDTA ve farklı metal iyonları (MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) eklenerek reaksiyonlar 30 birim levansukraz enzimi ile 25 °C'de 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar üç tekrar halinde

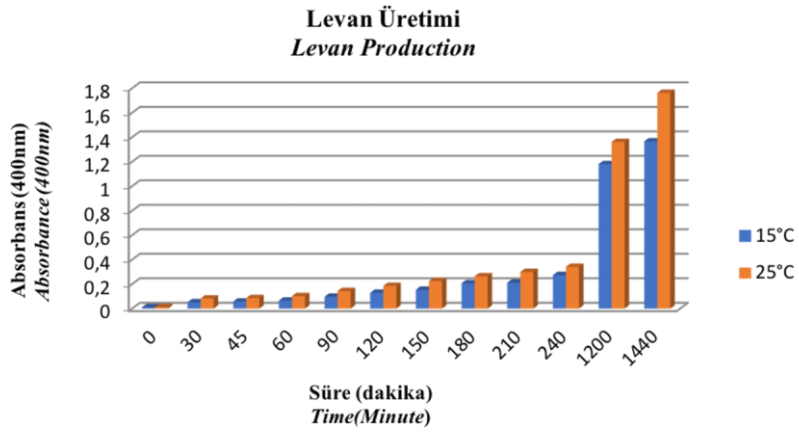
gerçekleştirilmiş ve levansukraz miktarı 400 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

#### İyonik Yük

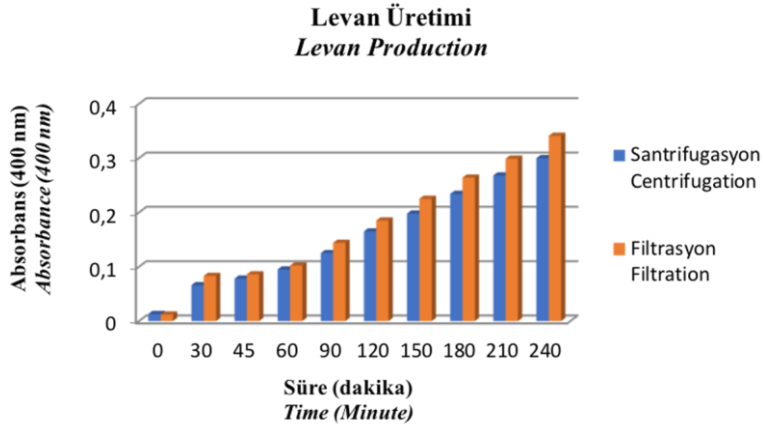
Sonuçlar artan NaCl konsantrasyonunun levansukraz üretimini olumsuz etkilediğini göstermiştir (Şekil 7). 500 mM NaCl varlığında levansukraz bulanıklık değerinde %18.5'lük bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile farklılık göstermektedir. Vigants ve ark., (1998) yaptığı çalışmada *Z. mobilis* 113 S levansukrazı kullanılmış ve 0.4 M NaCl varlığında levansukraz üretiminin kontrole kıyasla 1.2 kat arttığı bildirilmiştir. Trujillo Toledo ve ark., (2004) *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 levansukrazı kullanarak yaptıkları çalışmada ise 0.1 M sakkaroz varlığında 30 °C'de levansukraz üretiminin artan (0-1.2 M) NaCl konsantrasyonu ile arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçların farklılığı kullanılan farklı mikroorganizma türlerine ve diğer reaksiyon parametrelerine bağlı olarak açıklanabilir.



(a)



(b)

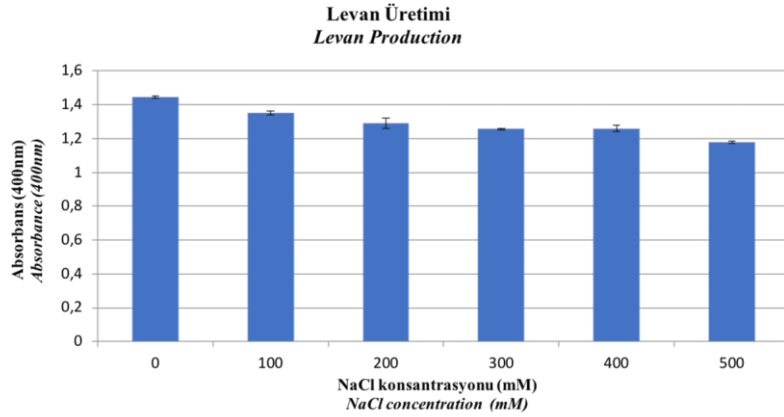


(c)

Şekil 6: (a) Farklı reaksiyon zamanlarında ve (b) farklı sıcaklıklarda levan üretimi (c) Filtrasyon ve santrifugasyon ile elde edilen ham levansukrazın 25 °C'de levan üretimi.

Figure 6: Levan production at different reaction time (a) and temperature (b). Levan production of levansucrase obtained by filtration and centrifugation at 25 °C (c).





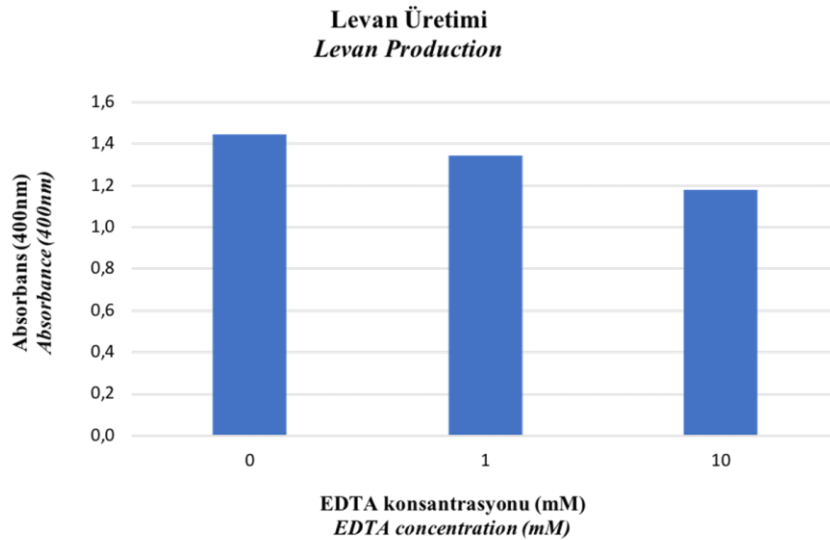
Şekil 7: Farklı NaCl konsantrasyonlarında 25 °C'de gerçekleştirilen levansukroz reaksiyonlarının 24 saat sonundaki 400 nm absorban değerleri.

Figure 7: 400 nm absorbance values of levansucrose reactions with different NaCl concentrations. Reactions were done at 25 °C for 24 hours.

#### Metal Şelat (EDTA)

*Z. mobilis* levansukrazının levansukroz aktivitesi 1 mM EDTA varlığında %7 ve 10 mM EDTA varlığında %18.5 azalmıştır (Şekil 8). Menéndez ve ark., (2002) *G. diazotrophicus* SRT 4 levansukrazını rekombinant olarak *E. coli*'de üretmiş ve 1 mM EDTA varlığının levansukroz aktivitesi üzerine etkisini

incelemiş ve levansukroz üretiminin yaklaşık %5 oranında azaldığını göstermiştir. Immobilize levansukroz-hidroksiapetit kompleksi ile yapılan bir çalışmada, 1 mM EDTA aktivitede %2'lik bir azalmaya neden olmuştur (Jang, vd., 2000). Bu fark immobilize enzimin artan stabilitesi ile açıklanabilir.



Şekil 8: Farklı EDTA konsantrasyonlarında 25 °C'de gerçekleştirilen levansukroz reaksiyonlarının 24 saat sonundaki 400 nm absorban değerleri.

Figure 8: 400 nm absorbance values of levansucrose reactions in the presence of EDTA. Reactions were done at 25 °C for 24 hours.

*Metal İyon*

10 mM EDTA varlığı *Z. mobilis* levansukrazının levan aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 8). Bu sonuç *Z. mobilis* levansukrazının levan üretimi için metal iyonlarına gereksinimi olabileceğini göstermektedir. Bu sebeple farklı metal iyonları varlığında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1: Farklı metal iyonlarının 10 mM konsantrasyonda levan üretimine etkileri.

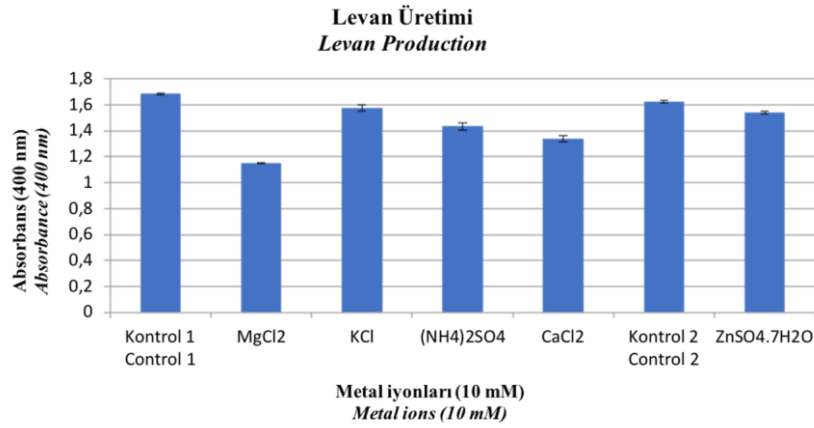
Table 1: Effect of different metal ions (10 mM) on levan production.

Reaksiyon Reactions	Levan Üretimi (%) Levan Production (%)
Kontrol (Control)	100
MgCl <sub>2</sub>	68.2
KCl	93.52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	85.05
CaCl <sub>2</sub>	79.44
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	94.77

10 mM MgCl<sub>2</sub>, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> ve ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O iyonları varlığında levan üretiminde bir miktar azalma gözlenmiştir, MgCl<sub>2</sub> varlığındaki aktivite (%68.2) diğerlerine göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 9 ve Çizelge 1).

EDTA ile elde edilen sonuçlar (Şekil 8) ile birlikte değerlendirildiğinde, levan üretimine olumlu etki eden bir metal iyonun olduğu düşünülmüş ancak denenen iyonlar arasında tespit edilememiştir.

*B. methylotrophicus* SK 21.002 levansukrazı ile yapılan bir çalışmada Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> metal iyonlarının levan üretimi üzerine anlamlı bir etkiye sahip olmadığı, bununla birlikte Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> iyonlarının levan oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Mg<sup>2+</sup> metal iyonunun ise kontrole göre aktiviteyi %15 arttırdığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2014). Çalışmada *Z. mobilis*'ten farklı bir mikroorganizma kullanıldığı için elde edilen farklı sonuçların mikroorganizma farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 9: Farklı metal iyonları varlığında 25 °C'de gerçekleştirilen levansukraz reaksiyonlarının 24 saat sonundaki 400 nm absorbans değerleri.

Figure 9: 400 nm absorbance values of levansukraz reactions in the presence of different metal ions. Reactions were done at 25 °C for 24 hours.

*Z. mobilis* levansukraz ile yapılan bir çalışmada, farklı iyonlar içeren çözeltilerin bulunduğu reaksiyonlar 37 °C'de 60 dakika inkübe edilerek hidroliz aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 1 mM konsantrasyonda K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının kontrole göre aktiviteyi %5 ve %2 arttırdığı, ancak metal iyonlarının konsantrasyonunun artması ile

aktivitenin azaldığı bildirilmiştir. Ca<sup>2+</sup> iyonu varlığında sırasıyla 1 mM, 5 mM ve 10 mM çözeltilerde %25, %33 ve %36 artış gözlenmiştir. Zn<sup>2+</sup> iyonu ile yapılan deneyde ise artan konsantrasyonda, aktivitede %3, %8 ve %10 azalış gözlenmiştir (Shaheen vd., 2017). Literatürde *Z. mobilis* levansukrazının metal iyon

varlığında levan üretim aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmaya rastlanmamıştır. Levan üretiminin ve hidroliz aktivitesinin farklı mekanizmaları olduğu yapısı çözülen *E. amylovora* levansukrazında gösterilmiştir (Wuerges vd., 2015). Ayrıca *Z. mobilis* levansukrazı ile yapılan yapı modellemesi çalışmasında da hidroliz aktivitesi ve levan üretiminde enzimin farklı bölgelerinin aktif rol oynadığı gösterilmiştir (Bakar ve Kaplan-Türköz, 2017). Metal iyonların hidroliz ve levan aktivitesi üzerine farklı etki göstermesinin sebebinin, reaksiyon mekanizmalarındaki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

### Levan Verimi

Levan miktarının belirlenmesi için iki farklı yöntemle hesaplama yapılmıştır.

Oluşan levanın fruktoz içeriğinin belirlenmesine dayanan yöntemle göre levan çöktürülmüş, asit hidrolizi ile parçalanmış ve indirgen şeker tayin yöntemiyle levan miktarı 69.159 mg fruktoz/mL olarak hesaplanmıştır. Levan miktarı için kullanılan diğer yöntemde ise levan miktarı 400 nm'deki absorpsiyon değeri ve oluşturulan levan standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu yöntemle 24 saat reaksiyon sonunda  $62.42 \pm 0.28$  g/L levan oluştuğu hesaplanmıştır, bu değer literatür ile karşılaştırıldığında yüksektir. Literatürde rekombinant *Z. mobilis* levansukrazları ile çalışmalar yapılmıştır. Chiang vd., (2009) 10 mL %20 0.5 M sakkaroz 100 mM sodyum asetat pH 5.0 tamponda reaksiyon hazırlanmış ve 15 °C'de 9 saat inkübasyon sonrası 53 g/L levan elde edildiği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada 50 mM asetat pH 5.0 tamponda %20 sakkaroz kullanılmış ve 0 °C'de 70 saat inkübasyon sonrası 50 g/L levan elde edilmiştir (Belghith, 1996).

### SONUÇ

Bu çalışmada *Z. mobilis* kullanılarak levansukraz enzimin eldesi ve elde edilen enzim ile levan üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Levan gıda ve diğer birçok farklı endüstride prebiyotik, yağ ikamesi, antioksidan ve biyofilm oluşturma gibi özellikleri sayesinde kullanım alanına sahiptir. Levanın bu geniş endüstriyel uygulamalarına rağmen büyük ölçekte üretimleri için yeni yöntemler aranmaktadır. Levanın ekonomik

olarak üretilmesi için yeni stratejiler gerekmektedir.

Bu çalışmada levan üretimi için ham levansukraz enzimi kullanılmış ve levan üretimi için optimum süre ve sıcaklık 25 °C'de 24 saat olarak bulunmuştur. Bu üretim süresi ve sıcaklıkta ortalama  $62.42 \pm 0.28$  g/L levan üretimi gerçekleştirilmiştir.

Levan üretimi gerçekleştirildikten sonra üretime etki eden faktörler incelenmiştir ve 10 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub> varlığında ve artan NaCl konsantrasyonlarında üretilen levan miktarında azalma olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmayla *Z. mobilis* NRRL B-14023 hücrelerinden üretilen levansukraz enziminin levan üretiminde kullanılabileceği ilk kez gösterilmiş olduğundan literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca ham enzim ile maliyetli saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan ve oda sıcaklığında verimli levan üretimi yapılabileceği gösterilmiştir. Bütün bunlar büyük ölçek üretimin uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Üretimin endüstriye uygulanması ve üretilen levanın özelliklerinin incelenmesi önerilmektedir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma "*Zymomonas mobilis* levansukraz enziminin üretilmesi, saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel kullanımı" başlıklı TÜBİTAK-TOVAG (proje no: 214O174) proje kapsamında desteklenmiştir.

### KAYNAKÇA

- Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A. R., Esawy, M. A. T. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr Microbiol*, 51(6), 402-407, doi:10.1007/s00284-005-0111-1.
- Arvidson, S. A., Rinehart, B. T., Gadala-Maria, F. (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. *Carbohydr Polym*, 65(2), 144-149, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.12.039.

- AU - Lawrence, A.-M., AU - Besir, H. (2009). Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. *JöVE*, (30), e1350, doi:10.3791/1350.
- Bakar, B., Kaplan-Türköz, B. (2017). Structural Modelling and Structure-Function Analysis of *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *SDÜ Fen Bil Enst Der*, 21(1), 279, doi: 10.19113/sdufbed.81065.
- Bekers, M., Upite, D., Kaminska, E., Laukevics, J., Grube, M., Vigants, A., Linde, R. (2005). Stability of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem*, 40(5), 1535-1539, doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.052.
- Belghith, H. (1996). Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnol Lett*, 18(4), 467-472, doi: 10.1007/BF00143472.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J Biotechnol* 99(2), 111-119, doi: 10.1016/S0168-1656(02)00160-8.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Caputi, L., Nepogodiev, S. A., Malnoy, M., Rejzek, M., Field, R. A., Benini, S. (2013). Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*, a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides. *J Agric Food Chem*, 61(50), 12265-12273, doi: 10.1021/jf4023178.
- Chambert, R., Gonzy-Treboul, G., Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 41, 285-300, doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x.
- Chiang, C. J., Wang, J. Y., Chen, P. T., Chao, Y. P. (2009). Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Appl Microbiol Biotechnol*, 82(3), 445-451, doi: 10.1007/s00253-008-1772-z.
- Crittenden, R. G., Doelle, H. W. (1994). Identification and Characterization of the Extracellular Sucrases of *Zymomonas mobilis* Uqm-2716 (Atcc-39676). *Appl Microbiol Biotechnol*, 41(3), 302-308, doi: 10.1007/BF00221223.
- Erdal, Ö., Kaplan-Türköz, B., Taştan, Ö., Gökşungur, Y. (2017). Levansucrase production by *Zymomonas mobilis*: Optimization of process parameters and fructooligosaccharide production. *J Food Biochem*, 41(3), 1-9, doi: 10.1111/jfbc.12361.
- Ergene, E., Avcı, A. (2016). Mikrobiyel ekzopolisakkaritler. *SAÜ Fen Bil Der*, 20(2), 193-202.
- Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J*, 309(1), 113-118, doi: 10.1042/bj3090113.
- Hettwer, U., Gross, M., Rudolph, K. (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol*, 177(10), 2834-2839, doi: 10.1128/jb.177.10.2834-2839.1995.
- Jakob, F., Meißner, D., Vogel, R. F. (2012). Comparison of novel GH 68 levansucrases of levan-overproducing *Gluconobacter* species. *Acetic Acid Bacteria*, 1(1), 2, doi: 10.4081/aab.2012.e2.
- Jang, K., Song, K., Kim, J., Kim, H., Chung, B., Rhee, K. (2000). Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. *Bioprocess Eng* 23: 89, doi: 10.1007/s004499900153.
- Kekez, B. D., Gojic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., Beskoski, V. P., Vrvic, M. M. (2015). High Levan Production by *Bacillus licheniformis* NS032 Using Ammonium Chloride as the Sole Nitrogen Source. *Appl Biochem Biotechnol*, 175(6), 3068-3083, doi: 10.1007/s12010-015-1475-8.
- Ki-hyo, J., Kang, S. A., Cho, Y., Kim, Y., Lee, Y.-J., Hong, K., Choue, R. W. (2003). Prebiotic

- Properties of Levan in Rats. *J. Microbiol. Biotechnol*, 13(3), 348-353.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680, doi: 10.1038/227680a0.
- Menéndez, C., Hernández, L., Selman, G., Mendoza, M. F., Hevia, P., Sotolongo, M., Arrieta, J. G. (2002). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-levanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr Microbiol*, 45(1), 5-12, doi: 10.1007/s00284-001-0044-2.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31(3), 426-428, doi: 10.1021/ac60147a030.
- Öner, E. T., Hernández, L., Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol Adv*, 34(5), 827-844, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.002.
- P. O'Mullan, M. S.-D. and D. E. E. (1991). Identification of Saccharolytic Enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4, 13(2), 137-142.
- Ritsema, T., Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol*, 6(3), 223-230, doi: 10.1016/S1369-5266(03)00034-7.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1682S-7S; discussion 1688S-90S, doi: 10.1093/ajcn/71.6.1682S.
- Roberts, E.J., Garegg, P. J. (1998). Levan derivatives, their preparation, composition and applications including medical and food applications. *World patent appl*, WO9803184.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., Plou, F. J. (2015). Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *J Mol Catal B Enzym*, 119, 18-25, doi: 10.1016/j.molcatb.2015.05.011.
- Senthilkumar, V., Gunasekaran, P. (2005). Influence of fermentation conditions on levan production by *Zymomonas mobilis* CT2. *Indian J Biotechnol*, 4(4), 491-496.
- Shaheen, S., Aman, A., Siddiqui, N. N. (2017). Influence of Metal ions, Surfactants and Organic Solvents on the Catalytic Performance of Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 13,41-46.
- Shih, I. L., Chen, L. D., Wang, T. C., Wu, J. Y., Liaw, K. S. (2010). Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chemistry*, 12(7), 1242-1247, doi: 10.1039/b924765c.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., Hsieh, C. Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J Agric Food Chem*, 53(21), 8211-8215, doi: 10.1021/jf058084o.
- Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Y. (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr Polym*, 99, 454-461, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.031.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B. (2015a). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym*, 120, 102-114, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.003.
- Srikanth, R., Siddartha, G., Sundhar Reddy, C. H. S. S., Harish, B. S., Janaki Ramaiah, M., Uppuluri, K. B. (2015b). Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym*, 123, 8-16, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.079.
- Srikanth, S., Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumar, C., Jaganathan, M. K., Tamilarasan, K. (2014). Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 7-12, doi: 10.1016/j.bcab.2013.11.011.
- Trujillo Toledo, L. E., Gómez Riera, R., Banguela Castillo, A., Soto Romero, M., Arrieta Sosa, J. G.,

- Hernández García, L. (2004). Catalytic properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electron J Biotechnol*, 7(2), 0-0, doi: 10.2225/vol7-issue2-fulltext-4.
- Vigants, A., Hicke, H.-G., Marx, S. P. (2001). A Simple and Efficient Method for the Purification of Membrane-Bound Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Curr Microbiol*, 42(6), 415-418, doi: 10.1007/s002840010239.
- Vigants, A., Kruce, R., Bekers, M., Zikmanis, P. (1998). Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. *Biotechnol Lett*, 20(11), 1017-1019, doi: 10.1023/A:1005454921301.
- Viiikari, L. (1984). Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 19: 252, doi: 10.1007/BF00251846.
- Vijayendra, S. V. N., Shamala, T. R. (2014). Film forming microbial biopolymers for commercial applications-A review. *Crit Rev Biotechnol*, 34(4), 338-357, doi: 10.3109/07388551.2013.798254.
- Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R., Benini, S. (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *J Struct Biol*, 191(3), 290-298, doi: 10.1016/j.jsb.2015.07.010.
- Xiao, M., Feng, F., Lu, L. (2014). Preparation method of levan-contained yogurt. *Chinese patent* CN103190478B.
- Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M., Jiang, B. (2014). Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Carbohydr Polym* 101(1), 975-981, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.045.