

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1149의 Sucrose phosphorylase의 분리와 특성 연구

¹이진하 · ²박준성 · ²박현정 · ²조재영 · ³최정식 · †^{1,3,4}김도만
¹전남대학교 공업기술연구소, ²물질·생물화학공학과, ³동신대학교 산업용 가속기 이용 생물 연구센터,
⁴전남대학교 생명과학기술학부, 촉매연구소
(접수 : 2004. 8. 22., 게재승인 : 2004. 10. 12.)

Purification and Characterization Sucrose phosphorylase in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149

Jin-Ha Lee¹, Jun-Seong Park², Hyen-Joung Park², Jae-Young Cho², Jeong-Sik Choi³, and Doman Kim^{1,3,4,†}

¹The Engineering Research Institute, ²Department of Materials and Biochemical Engineering,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea,

³Biology Research Center for Industrial Accelerator, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Korea,

⁴School of Biological Sciences and Technology and Research Institute for Catalysis,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 8. 22., Accepted : 2004. 10. 12.)

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1149 produces various glucosyltransferases for the synthesis of dextran, levan and glucose-1-phosphate using sucrose as a substrate. A sucrose phosphorylase (1149SPase) was purified from *L. mesenteroides* NRRL B-1149 culture by using hollow fiber filtration (30 kDa cut off), Toyopearl DEAE 650 M column chromatography and following two times of DEAE-Sepharose column chromatographies. The specific activity of the purified 1149SPase was 25.7 (U/mg) with 16% yield. The 1149SPase showed a molecular size of 56 kDa on denatured 10% SDS-PAGE. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was MEIQNKAM. The optimum pH and temperature of this enzyme were 6.2~6.5 and 37°C, respectively. It had an apparent K_m of 6.0 mM and K_{cat} of 1.62/s for sucrose. 1149SPase crystal was formed by hanging drop diffusion technique using 20 mM calcium chloride dihydrate, 100 mM sodium acetate trihydrate pH 4.6 and 30% 2-methyl-2,4-pentanediol as vaporizing and reservation solution. The 1149SPase catalyzes transferring of glucose from isomaltose or sucrose to salicin and salicyl alcohol by disproportionation reaction or acceptor reaction and synthesized two acceptor products, respectively.

Key Words : *Leuconostoc mesenteroides*, sucrose phosphorylase, purification, crystal, acceptor reaction, disproportionation

서론

Sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7) (SPase)는 glycosyl hydrolases(1)의 family 13에 속하는 효소로, sucrose를 기질로 하여 효소 반응기에 phosphate를 첨가하면 glucose를 phosphate에 전이하여 fructose와 glucose-1-phosphate (G-1-P)를 합성한다

(2). SPase는 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291에서 처음 발견된 후 *Pseudomonas saccharophila*(3, 4), *L. mesenteroides* spp.(5, 6)와 *Streptococcus mutans*(7) 같은 박테리아에서 보고되었다. 최근에는 *L. mesenteroides* spp.(8, 9), *S. mutans*(10) 그리고 *Agrobacterium vitis*(11)에서 SPase 유전자가 분리되고 특성 연구가 진행되었다.

*L. mesenteroides*에서 SPase는 constitutive(12)하게 생산되며, G-1-P의 glucose기를 다양한 당과 당알코올(13, 14), 페놀과 알코올 성분(15-19)의 자유 OH기에 전이하여 여러 구조의 수용체 반응 산물을 합성한다(20). SPase는 또한 효소를 이용한 sucrose 분석(21), ¹⁴C-label된 sucrose의 합성(22, 23) 그리고 무기 인산의 특이적 양 측정(24) 등 생물공학 분야에도 다양하게

† Corresponding Author : School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1844

E-mail : dmkim@chonnam.ac.kr

이용되고 있다.

Dextran을 합성하는 *Leuconostoc* 속의 균들은 *alternan*, *dextran* 또는 *levan* 등 polymer를 생산한다(25). *L. mesenteroides* NRRL B-1149에서 생산된 효소는 glucose가 $\alpha(1\rightarrow3)$ 으로 연결된 불용성 glucan을 합성하는 것으로 알려졌다(26). 하지만, 최근 본 연구실에서는 *L. mesenteroides* NRRL B-1149가 $\alpha(1\rightarrow6)$ 으로 연결된 glucan을 합성하는 glucosyltransferase와 *levan*을 합성하는 fructosyltransferase를 동시에 생산하며, 또한 sucrose phosphorylase를 생산함을 확인하였다. 본 연구에서는 *L. mesenteroides* NRRL B-1149의 sucrose phosphorylase를 정제하고 physico-biochemical 특성을 확인하였으며, 이들의 새로운 수용체 반응 산물 합성에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

재료

수용체로 사용한 탄수화물과 항생제는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였고, 다른 시약은 GR 등급의 것을 정제 없이 사용하였다.

균주와 배양조건

L. mesenteroides NRRL B-1149균은 20 l jar fermentor를 이용하여 총 18 l의 2% (w/v) sucrose를 포함한 LM배지 (1 l의 증류수당 4 g yeast extract, 2 g peptone, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.015 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g NaCl, 2 g K_2HPO_4 , 0.01g $MnSO_4 \cdot H_2O$)를 이용하여 28°C에서 48시간 배양하였다. 배양액은 원심 분리 (8,000 × g, 20 분)하여 상등액을 회수한 후 0.1% Tween 80과 0.02% NaN_3 를 첨가하고 hollow fiber filtration (30 kDa cut off, Millipore, USA)방법을 이용하여 농축 후 총 3,882 U의 SPase 활성의 단백질을 얻었다.

효소 정제

Hollow fiber를 이용하여 농축한 효소액 (672 mg)을 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)로 평형화시킨 후 DEAE-Toyopearl 650M column (2.5 cm × 35 cm)에 흡착시켜 NaCl 농도를 0-0.5 M까지 단계적으로 증가시키면서 60 ml/hr의 유속으로 용출시켰다. SPase 활성을 보이는 각 분획을 모아 총 315 mg의 1149SPase를 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 투석한 후, 같은 buffer로 평형화시킨 DEAE-Sephrose (2.5 cm × 35 cm) column에 흡착시키고, column 부피 3배에 해당하는 같은 완충용액으로 결합되지 않는 단백질을 세척한 후 흡착된 단백질은 같은 buffer에 NaCl 용액을 이용하여 0-1 M까지 단계적으로 농도를 증가시키면서 45 ml/hr의 유속으로 용출시켰다. 다시 SPase 활성을 지닌 분획들을 모았으며 97 mg의 단백질을 같은 DEAE-Sephrose (2.5 cm × 35 cm) column을 이용하여 2차 정제 하였다.

효소 활성과 단백질양 측정

Sucrose phosphorylase의 활성은 기질로 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 준비한 200 mM sucrose를 사

용하였으며 28°C에서 일정시간 반응하고 TLC plate (Silica gel 60 aluminium sheet, Merck사, Germany)에 1 μ l씩 반응액을 점적하여 유리되는 fructose양을 분석하였다. 반응산물을 100°C에서 5 분간 끓여 반응을 정지 시키고, 반응액 1 μ l를 취하여 TLC plate에 점적한 후 acetonitrile:water (v/v, 85 : 15)를 이용하여 두 번 전개하였다. 전개된 TLC plate는 0.3% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine과 5% 황산을 함유한 시약을 이용하여 발색하였다(27). 효소 1 Unit은 1 분당 효소 1 ml당 sucrose로부터 유리되는 fructose의 μ mol 수로 표현한다.

단백질량은 Bradford 방법(28)에 따라 반응 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화하였으며, bovine serum albumin (A-7517, Sigma Chemical Co., USA)을 표준물질로 사용하였다.

SDS-PAGE

Laemmli(29)의 방법에 따라 10% polyacrylamide gel을 사용하여 단백질을 전기 영동하였으며 Coomassie Brilliant Blue R-250을 사용하여 단백질을 염색하였다.

1149SPase 활성에 미치는 pH 영향

최적 pH와 pH 안정성을 결정하기 위하여 20 mM의 citric acid- Na_2HPO_4 buffer (pH 5-7), Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 buffer (pH 7-8) 그리고 glycine-NaOH buffer (pH 8-10)를 사용하였다. 최적 pH는 200 mM sucrose를 각 pH의 buffer에 녹인 1149SPase (2 U/ml)와 37°C에서 20분간 반응시킨 후 활성을 측정하였다. pH에 대한 효소 안정성은 1149SPase (2 U/ml)를 각 pH의 buffer와 혼합하여 12 시간 동안 4°C에 보관한 후, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 200 mM sucrose와 37°C에서 20분간 반응하고 남아 있는 효소 활성을 측정하였다. 각 buffer pH가 효소 반응 기질의 pH에 주는 영향은 없었다.

1149SPase 활성에 미치는 온도 영향

최적 활성 온도를 확인하기 위하여 1149SPase (2 U/ml)를 여러 온도 (4, 16, 28, 37, 42, 50, 55°C)에서 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 200 mM sucrose와 1시간 반응시켜 유리되어 나오는 fructose 양을 측정하여 효소 활성을 구하였으며, 온도 안정성은 여러 온도 (4, 16, 28, 37, 42, 50, 55°C)에서 1149SPase (2 U/ml)를 10 시간 동안 방치시킨 후 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 200 mM sucrose와 37°C에서 20분간 반응하여 잔존하는 효소의 활성을 확인하였다.

효소 반응 상수 결정

효소 반응 상수 K_m 과 K_{cat} 은 5 mM에서 250 mM의 범위에서 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 sucrose를 이용하여 28°C에서 반응하고, Lineweaver Burk plots(30)를 그려 결정한다.

N-terminal 아미노산 서열 분석

정제된 효소를 SDS-PAGE 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, Hercules, USA)(31)에 transfer하고 56 kDa의 밴드를 잘라 Edman degradation 분석법에 따라

Applied Biosystems model 476A Protein/Peptide Sequencer (Applied Biosystems Inc., CA)을 사용하여 결정하였다.

1149SPase 결정화

결정화 선별 시약 (Hamston Research, USA)과 정제한 1149SPase (10 mg/ml)를 이용하여 실온에서 결정을 형성 하였으며 결정을 얻을 수 있는 조건은 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Crystal reagent formulation

No.	Salt	Buffer	Precipitant
1	20 mM Calcium Chloride dihydrate	100 mM Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	30% (v/v), 2-Methyl-2,4-pentanediol
2	None	100 mM HEPES-Na pH 7.5	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
3	200 mM Calcium Chloride dihydrate	100 mM Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20% (v/v), Iso-propanol

Disproportionation 반응과 수용체 반응

1149SPase (2 U/ml)를 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.4)에 녹인 100 mM isomaltose와 sucrose에 각각 50 mM salicin과 50 mM salicyl alcohol을 섞어 주고 28°C에서 48 시간 동안 반응시켰고 그 산물을 TLC를 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

***L. mesenteroides* NRRL B-1149 SPase 분리정제**

Hollow fiber를 이용하여 농축한 효소액 (672 mg)을 DEAE-Toyopearl 650M column과 두 번의 DEAE-Sepharose column chromatography 방법을 이용하여 25.7 U/mg의 정제된 1149SPase를 얻었으며(Table 2), SDS-PAGE (10%)에서의 분자량은 56 kDa로 확인되었다(Fig. 1). 이는 보고된 *L. mesenteroides* ATCC 12291 (55 kDa)(5)과 *S. mutans* (55.7 kDa)(10), 그리고 *Agrobacterium vitis* (53.9 kDa)(11)와 비슷한 분자량이었다.

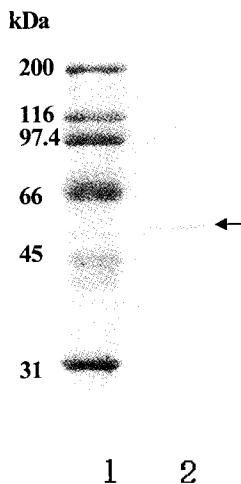


Figure 1. SDS-PAGE and molecular weight determination of the purified 1149SPase. Lane 1: Molecular mass standard marker {myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa)}, lane 2: Purified 1149SPase.

Table 2. Summary of 1149SPase Purification

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	4480	1600	2.8	1.0	100
Hallow fiber (30 K cut off)	3882	672	5.8	2.1	86.6
DEAE-Toyopearl 650 M	2052	315	6.5	2.3	45.8
DEAE-Sepharose (1st)	1018	97	10.5	3.8	22.7
DEAE-Sepharose (2nd)	719	28	25.7	9.2	16.1

효소 특성

1149SPase는 37°C에서 최적의 효소 활성을 보였으며, 40°C까지 안정성을 보였다(Table 3). 또한, 최적 pH는 6.2~6.5 범위였고, pH 5 이하에서는 효소활성이 급격히 감소하였다(Table 3). Sucrose를 기질로 한 1149SPase의 K_m 과 K_{cat} 값은 각각 6.0 mM과 1.62/s로 계산되었다(Fig. 2). 이는 보고된 *L. mesenteroides*의 재조합 DNA (Kikkoman, Japan)로부터 얻어진 효소의 K_m 값인 39 mM보다 작은 값이었다(8).

Table 3. Biochemical properties of 1149SPase

Optimum pH	6.2-6.5
pH Stability	5-8*
Optimum Temperature	37°C
Thermo-Stability	up to 40°C*
Molecular Weight	56 kDa

*The activity of 1149SPase was kept above 75%.

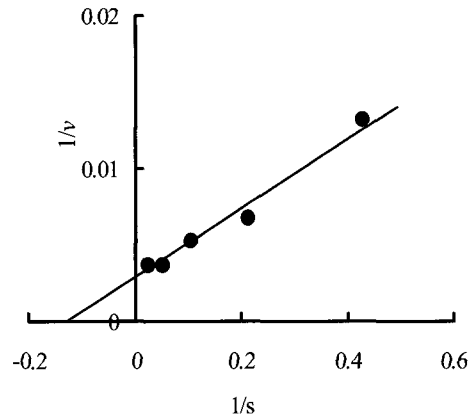


Figure 2. Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of sucrose. The unit of 1/s and 1/v are mM and $\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol}$, respectively.

N-terminal 아미노산 서열 분석

1149SPase의 N-terminal 아미노산은 MEIQNKAM으로 분석되었다. 이 서열을 이용하여 data base BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)로 분석한 결과 등록된 SPase 중 *L. mesenteroides* (Genbank BAA14344)(8)와 100% 상동성을 보였으며, *Listeria monocytogenes* str. 4b F2365 SPase 아미노산과는 75%의 상동성을 보였다. 하지만, 1149SPase 유전자를 얻기 위해 발표된 *L. mesenteroides*의 SPase 유전자 서열의

ORF (open reading frame)의 primer로는 PCR산물을 얻을 수 없어(결과 보이지 않음) 1149SPase 유전자는 기존에 보고된 SPase와 다른 염기서열을 가지고 있는 것으로 생각된다. 현재 1149SPase 유전자를 얻기 위한 연구를 수행 중이다.

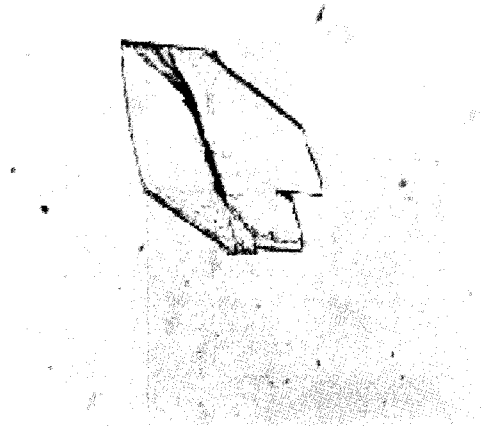


Figure 3. 1149SPase crystals formation. Condition for crystallization: Mixture with crystal screen reagent No. 1 (20 mM calcium chloride dihydrate, 100 mM sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% 2-methyl-2,4-pentanediol) and purified 1149SPase (10 mg/mL).

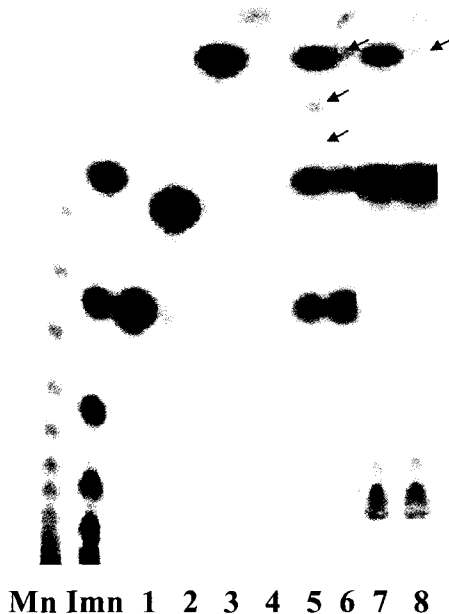


Figure 4. Thin layer chromatogram of 1149SPase acceptor reaction with various acceptors. Mn and Imn are malto- and isomaltotolosaccharide. Lane 1: 100 mM isomaltose, lane 2: 100 mM sucrose, lane 3: 50 mM salicin, lane 4: 50 mM salicyl alcohol, lane 5: reaction product of 1149SPase, 100 mM isomaltose and salicin, lane 6: reaction product of 1149SPase, 100 mM sucrose and salicin, lane 7: reaction product of 1149SPase, 100 mM sucrose and salicyl alcohol, lane 8: reaction product of 1149SPase, 100 mM sucrose and salicyl alcohol. Arrow indicates the acceptor reaction products.

1149SPase 결정화

1149SPase 효소 (10 mg/mL)는 20 mM calcium chloride dihydrate, 100 mM sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30%

2-methyl-2,4-pentanediol의 혼합 용액을 저장액과 건조액으로 사용하여 hanging drop diffusion방법으로 결정을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 하지만, 1149SPase 결정구조 분석에 더 적합한 모양의 결정을 만들기 위한 실험을 결정화 형성 조건을 바꾸어 주면서 진행하고 있다.

Disproportionation 반응과 수용체 반응 산물

순수 정제한 1149SPase를 이용하여 disproportionation 반응과 수용체 반응을 수행하였다(Fig. 4). 1149SPase는 salicin과 salicin alcohol의 경우 isomaltose를 이용한 disproportionation 반응으로부터 각각 두 개와 한 개의 반응산물을 합성하였고(Fig. 4, lane 5-6), sucrose를 이용한 수용체 반응으로 한 개의 salicin alcohol의 수용체 반응 산물을 합성하였다(Fig. 4, lane 8). 이러한 1149SPase의 sucrose에 있는 glucosyl 기를 phenol과 alcohol 등의 -OH 기에 전이하여 수용체 산물을 합성하는 특성은 단당, 이당, 삼당과 같은 여러 당들과 당 알코올을 그리고 폐놀 화합물 등을 수용체로 하는 경우 장내 유용한 미생물의 수를 증가시킬 수 있는 prebiotics 기능성 식품 첨가제 및 화장품 소재 등의 개발 및 생산에 활용 가능성이 있겠다.

요 약

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1149로부터 sucrose를 기질로 하여 효소 반응기에 phosphate를 첨가하면 fructose와 G-1-P를 합성하는 sucrose phosphorylase를 정제하였다. 배양액을 hollow fiber filtration (30 kDa cut off)을 이용하여 농축하고 Toyopearl DEAE 650 M column과 두 번의 DEAE-Sephacel column chromatography를 통해 16% yield를 갖는 정제된 1149SPase 25.7 (U/mg)을 얻었다. 정제한 1149SPase는 분자량이 56 kDa (10%, poly acrylamide gel)이었고, 37°C와 pH 6.2~6.5에서 효소 최적 활성을 보였다. 또한, sucrose를 기질로 한 K_m 과 K_{cat} 값은 각각 6.0 mM과 1.62/s로 계산되었고, N-terminal 아미노산 서열은 MEIQNKAM이었다. 1149SPase의 결정은 20 mM calcium chloride dihydrate, 100 mM sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% 2-methyl-2,4-pentanediol의 혼합 용액을 저장액과 건조액으로 사용한 hanging drop diffusion방법으로 얻을 수 있었다. Salicin과 salicin alcohol을 isomaltose를 이용한 disproportionation 반응과 sucrose를 이용한 수용체 반응으로 당전이 시킨 화합물을 합성하였다. 이러한 1149SPase의 disproportionation반응과 수용체 반응 특성은 여러 신소재 개발에 활용 가능하겠다.

감 사

본 연구는 RRC (동신대학교 산업융가속기 이용 생물 연구 센터, R12-2003-005-01004-0(2004)) 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Doudoroff, M. (1943), Studies on the phosphorylsis of sucrose, *J. Biol. Chem.* **151**, 351-361.
- Silverstein, R., J. Voet, D. Reed, and R. H. Abeles (1967), Purification and

- mechanism of action of sucrose phosphorylase, *J. Biol. Chem.* **242**, 1338-1346.
3. Koga, T., K. Nakamura, Y. Shirokane, K. Mizusawa, S. Kitao, and M. Kikuchi (1991), Purification and some properties of sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1805-1810.
 4. Kawasaki, H., N. Nakamura, M. Ohmori, K. Amari, and T. Sakai (1996a), Screening for bacteria producing sucrose phosphorylase and characterization of the enzymes, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 319-321.
 5. Russel, R. R. B., H. Mukasa, A. Shimamura, and J. J. Ferretti (1988), *Streptococcus mutans* gtfA gene specifies sucrose phosphorylase, *Infect. Immun.* **56**, 2763-2765.
 6. Kitao, S. and E. Nakano (1992), Cloning of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* and its overexpression using a 'sleeper' bacteriophage vector, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 179-184.
 7. Kawasaki, H., N. Nakamura, M. Ohmori, and T. Sakai (1996b), Cloning and expression in *Escherichia coli* of sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* No. 165, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 322-324.
 8. Ferretti, J. J., T. T. Huang, and R. R. B. Russell (1988), Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (gtfA) from *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Infect. Immun.* **56**, 1585-1588.
 9. Fournier, P., P. de Ruffray, and L. Otten (1994), Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 2.3-kb DNA fragment, *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **7**, 164-172.
 10. Weimberg, R. and M. Doudoroff (1953), Studies with three bacterial sucrose phosphorylases, *J. Bacteriol.* **68**, 381-388.
 11. Kitao, S. and H. Sekine (1994a), α -D-Glucosyl transfer to phenolic compounds by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of α -arbutin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 38-42.
 12. Kitao, S. and H. Sekine (1992), Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 2011-2014.
 13. Kitao, S., S. Yoshida, T. Horiuchi, H. Sekine, and I. Kusakabe (1994), Formation of kojibiose and nigerose by sucrose phosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 790-791.
 14. Kitao, S., T. Ariga, T. Matsudo, and H. Sekine (1993), The syntheses of catechin-glucosides by transglucosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 2010-2015.
 15. Kitao S., T. Matsudo, M. Saitoh, T. Horiuchi, and H. Sekine (1995), Enzymatic syntheses of two stable (-)-epigallocatechin gallate-glucosides by sucrose by sucrose phosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 2167-2169.
 16. Kitao, S., T. Matsudo, T. Sasaki, T. Koga, and M. Kawamura (2000), Enzymatic synthesis of stable, odorless, and powdered furanone glucosides by sucrose phosphorylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 134-141.
 17. Kitao, S. and H. Sekine (1994b), Syntheses of two kojic acid glucosides with sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 419-420.
 18. Doudoroff, M., W. Z. Hassid, H. A. Barker (1947b), Studies with bacterial sucrose phosphorylase II. Enzymatic synthesis of a new reducing and of a new non-reducing disaccharide, *J. Biol. Chem.* **168**, 733-746.
 19. Birnberg, P. R. and M. L. Brenner (1984), A one-step enzymatic assay for sucrose with sucrose phosphorylase, *Anal. Biochem.* **142**, 556-561.
 20. Kogure, M., H. Mori, H. Arikawa, C. Kojima, and H. Yamamoto (1997), Determination of sucrose using phosphorylase in a flowinjection system, *Anal. Chim. Acta.* **337**, 107-111.
 21. Maestre, E., I. Katakis, and E. Domnguez (2001), Amperometric flowinjection determination of sucrose with a mediated tri-enzyme electrode based on sucrose phosphorylase and electrocatalytic oxidation of NADH, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 61-86.
 22. Tedokon, M., K. Suzuki, Y. Kayamori, S. Fujita, and Y. Katayama (1992), Enzymatic assay of inorganic phosphate with use of sucrose phosphorylase and phosphoglucomutase, *Clin. Chem.* **38**, 512-515.
 23. Cote, G. L., and J. A. Ahlgren (1995), Microbial polysaccharides, *In Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 4th ed., vol. 16. p. 578-611. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
 24. Allene, J., W. C. Haynes, C. A. Wilham, J. C. Rankin, E. H. Melvin, M. J. Austin, J. E. Cluskey, B. E. Fisher, H. M. Tsuchiya, and C. E. Rist (1954), Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria^{1b}, *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5041-5052.
 25. Tanirseven, A. and J. F. Robt (1993), Interperation of dextranase inhibition at high sucrose concentration, *Carbohydr. Res.* **245**, 97-104.
 26. 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**, 248-254.
 27. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of Structural Proteins During the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-685.
 28. Lineweaver, H., and D. Burk (1934), The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666.
 29. Otter, T. S., M. King, and G. B. Whiteman (1987), A two-step procedure for efficient electrotransfer of both high-molecular weight (>400,000) and low-molecular weight (<20,000) proteins, *Anal. Biochem.* **162**, 370-377.