GOVP1200609893

최 종
연구보고서

# 유당으로부터 기능성 감미료 타가토스의 효소적 생산

# Enzymatic Production of Tagatose, Functional Sweetener from Lactose

세 종 대 학 교

농 림 부

자료출처 : 유당으로부터 기능성 감미료 타가토스의 효소적 생산 / 농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유당으로부터 기능성 감미료 타가토스의 효소적 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 15 일


주관연구기관명 : 세종대학교
총괄연구책임자 : 오 덕 근
연 구 원 : 김 혜 정
연 구 원 : 김 택 범
연 구 원 : 김 미 원
연 구 원 : 정 은 숙
연 구 원 : 이 용 주
연 구 원 : 김 진 하
연 구 원 : 김 영 수
연 구 원 : 염 수 진
위탁연구책임자 : 엄 수 종
연 구 원 : 박 시 호
연 구 원 : 한 혜 숙
연 구 원 : 박 명 순
연 구 원 : 이 유 진

# 요 약 문

Ⅰ. 제 목

유당으로부터 기능성 감미료 타가토스의 효소적 생산에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 감미료 타가토스의 관한 연구는 화학적인 방법으로는 생산되고 있으나 생물학적인 방법으로는 거의 연구되어 있지 않아 본 연구를 통하여 생물학적인 방법으로 타가토스를 생산하는 것이다. 연구의 필요성은 타가토스의 경우 효소법으로 생산되므로 유전공학기술, 효소의 유전자 진화 기술 등의 첨단기술과 효소 고정화, 생물반응기 등의 사업화 기술의 확보에 있고 효소법은 환경친화적으로 타가토스를 생산하므로 기술을 확보할 필요가 있다. 또한, 생활이 향상됨에 따라 저칼로리 당을 요구하는 상황에서 설탕과 매우 유사한 특성을 지니고 zero 칼로리인 타가토스의 개발이 시급하고 타가토스는 저칼로리, 비충치성, 설사 비유발성의 특징을 가짐으로써 비만, 당뇨병, 설탕과잉 섭취 등에서 기인되는 질병의 예방에 필요하므로 타가토스 생산 기술을 개발해야한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

유전자 선별을 통한 타가토스 생산 고온 효소 선별하며 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량을 수행한다. 타가토스 생산을 위한 효소 및 균체 반응 조건 최적화하고 타가토스 생산을 위한 고정화 방법 개발하고 고정화 균체 및 효소에 의한 타가토스를 생산하고 타가토스 생산을 위한 생물반응기 작동을 수행한다. 유당 분해 전환 효소 반응 최적화를 한 후 유당으로부터 시작하여 타가토스 생산한다. 유당분해, 타가토스 생산 및 정제의 scale-up 실험하여 타가토스 시제품 생산하고 경제성을 분석한다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

(1) 연구개발 결과

- **유당 분해 전환 효소 반응 최적화:** *Kluveromyces lactis* β-galactosidase를 cloning하였고 발현시켜 생성된 효소의 최적온도는 40℃이었고, 최적 pH는 7.0 이었고 $Mn^{+2}$가 가장 좋은 활성을 보여 주었다. 10%와 30% lactose 용액이 300분에 분해되었다. 타가토스 생산이 고온이므로 초고온균 *Thermotoga martima*의 β-galactosidase를 cloning하였고 발현시켜 생성된 효소의 특성을 살펴보았다. 최적온도는 80℃, pH는 6.5, 무기염은 $Mg^{+2}$가 최적이었다. 10%와 30% lactose 용액이 300분에 분해되었다. *K. lactis*의 β-galactosidase, *T. martima* 의 β-galactosidase, lactozym 효소 (Novo사의 판매되는 β-galactosidase)의 유당분해 능력을 같은 단백질 농도에서 Lactozym이 유당 분해 능력이 가장 높았다.
- **타가토스 생산을 위한 균주선별 및 효소 유전자 클로닝:** 고온 환경의 토양으로부터 분리된 미생물을 대상으로 70℃에서 L-arabinose isomerase 활성을 지닌균을 16S rRNA 염기서열 분석 및 생물학적, 생화학적 특성을 조사하여 분류 동정을 나타내어 본 연구결과의 분리균을 *Geobacillus thermodenitrificans*로 동정하고 명명하였다. *G. stearothermophilus* 유래의 L-arabinose isomerase 유전자를 기반으로 하여 효소 유전자를 클로닝하였다.
- **효소 돌연변이에 의한 효소 활성 증가:** *G. stearothermophilus*의 L-arabinose isomerase를 site-directed mutagenesis에 의하여 408번과 475번이 각각 alanine과 lysine으로 변화된 mutant가 tagatose에 대한 성생능력이 ELISA reader 측정시 약 6배 증가하였고 2 rounds의 error prone PCR로부터 8배 증가한 mutant (pL153)를 얻었다. *G. thermodenitrificans*의 L-arabinose isomerase를 site-directed mutagenesis한 결과 single mutant에서는 활성이 475번의 아미노산이 Asn이 Lys로 변화되었을 때 가장 높게 나타났고 double mutant에서는 활성이 450번의 아미노산이 Cys이 Ser로 변화되었고 475번의 아미노산이 Asn이 Lys로 변화되었을 때 가장 높게 나타났다. 이 3 가지 효소로 타가토스를 생산 한 결과 65℃에서 wild-type은 46.0%, single mutant는

55.8%, double mutant는 58.2%의 conversion을 나타내었다.

- **돌연변이 효소들의 정제 및 특성 조사:** *G. stearothermophilus* wild-type (pL151)와 돌연변이 효소(pL153)들의 타가토스 생산 능력을 측정하고 특성을 조사하기 위하여 정제한 후 속도상수들과 온도, pH, 무기염 특성, 기질특이성, 저해제 특성을 살펴보았다. 그 결과 mutant가 wild 보다 생산속도가 빨랐으며 560분에서의 전환율도 mutant가 52%로 wild의 45%보다 7% 정도 더 높았다.

  *G. thermodenitrificans*의 wild-type, single mutant 및 double mutant를 정제하여 $K_m$, $V_{max}$, $k_{cat}$, $k_{cat}/K_m$를 살펴 결과 double mutant가 $k_{cat}/K_m$값이 가장 컸고 그 다음은 single mutant이었고 wild가 가장 작았다.

- **균주 효소의 정제 및 특성 조사:** 새로 선별한 *G. thermodenitrificans* L-arabinose isomerase의 특성을 살펴보기 위하여 순수 정제한 후, 속도상수들과 온도, pH, 무기염 특성, 기질특이성, 저해제 특성을 살펴보았다. 그 결과 Mn을 첨가한 경우는 Mn을 첨가하지 않은 경우 보다 현저하게 속도가 빨랐으며 500시간에서 전환수율도 Mn을 첨가한 경우가 52%로 Mn을 첨가하지 않은 경우의 36%보다 16% 정도 더 높았다.

- **고정화 균체에 의한 타가토스의 생산:** 경제성과 산업화의 용이성을 위하여 고정화를 이용한 생물전환을 하였다. *G. stearothermophiluss*의 L-arabinose isomerase (gali 152)를 사용하여 유리효소, 고정화 효소, 유리 균체, 고정화 균체의 효율성을 비교하고 온도, pH, 온도 안정성, pH 안정성, 금속염 특성을 살펴보았다. 생물반응기에서 유속별, galactose 농도별, 균체량 별 타가토스의 생산을 살펴보았다. 60℃에서 고정화 균체를 생물반응기에서 $Mn^{2+}$을 첨가한 경우 20일까지 안정하였으며 300 g/L의 갈락토스에서 59 g/L 타가토스가 2.9 g/L-h로 생산되었다.

- **고정화 효소에 의한 타가토스의 생산:** *G. stearothermophiluss*의 galactose isomerase (gali 152)를 사용하여 자유 효소와 고정화 효소의 온도, pH, 온도 안정성, pH 안정성을 살펴보았고 100 g/L galactose에서 자유 galactose isomerase는 37.4 g/L, 고정화 galactose isomerase는 58.4 g/L의 타가토스가 생성되었다. 생물반응기의 담체크기, L/D, 유속, 기질농도, 효소활성 별 실험을 통하여 최적조건을 결정하였고 결정된 조건에서 안정성을 보기 위하여 타가토

스를 40일간 생산하였다. 그 결과 300 g/L galactose로부터 첫 15일 까지는 145 g/L가 50 g/L-h 이상의 생산성으로 생산되었고 24일에는 활성이 반으로 감소하였다. *G. thermodenitrificans* 유래인 double point mutant (Cys450→Ser, Asn475→Lys)가 가장 활성이 좋아 최적효소로 선정하고 타가토스 생산에 사용하였다. 이 효소를 고정화 하였고, 고정화 효소의 최적온도는 70℃이었고 pH는 8.5이었다. 특히, 고정화 효소는 65℃에서도 매우 안정하여 7일 후에도 활성이 최대값의 98.5%로 매우 높게 나타났다. L-Arabinose isomerase mutant의 고정화 효소를 사용하여 packed-bed 반응기에서 300 g/L galactose로부터 30일 까지는 160 g/L이상 및 32 g/L-h 이상의 생산성으로 생산되었다. 30일 이후에는 활성이 약간씩 감소하였지만 40일 후에 활성은 최대치의 80%를 나타내어 40일 정도 타가토스 생산에 사용하는 것은 문제가 없었다.

- **타가토스의 정제:** *G. thermodenitrificans* 유래인 double point mutant의 galactose isomerase가 있는 재조합 *E. coli*를 배양한 후 High-pressure homogenizer로 세포를 파쇄하고, amonium sulfate 침전시키고 열처리하여 부분 정제된 효소를 alginate에 고정화시킨 후 생물반응기(XK-16)로 타가토스를 생산하였다. 효소반응액을 Dowex 50W-X2($H^+$)와 Dowex($CO_3^{-2}$)의 column을 통과시켜 이온 성분을 제거하였고 이온이 제거된 용액을 진공 농축하여 점액성 물질을 얻었고 이것을 99.9%의 에탄올을 첨가하여 흰색의 결정 25.6 gram을 얻었고 HPLC와 IR로 타가토스임을 확인하였다. 생산된 타가토스를 활성탄을 처리한 후 여과하여 색소를 제거한 후 이온교환수지가 장착된 MPLC를 이용하여 타가토스를 분리하여 활성탄 처리를 한 후 여과한 후 농축하고 동결건조하여 정제된 타가토스를 제조하였다. 이때, 80g의 반응액으로부터 70 g의 타가토스를 얻어 정제수율이 87.5%이었다

(2) 연구활용계획

- 향후 사업화 연구시 본 연구 결과를 기반으로 하여 사업화를 달성한다. 본 과제의 성공적인 수행으로 tagatose 생산을 위하여, lactose 가수분해 공정, galactose 이성화공정, 각종 당류의 효율적인 크로마토그래피 분리, 핵심효소인 β-galactosidase와 L-arabinose isomerase의 활성 증진 및 고정화기술 확립, 타가토스의 결정화 등 핵심기술을 완성하는 동시에, 공정 단위별로 소규모

pilot scale 장치의 건설 및 기존 시설을 이용하여 생산 공정 개발, scale-up 연구를 수행하여 실제 타가토스의 생산 공정 시스템을 구축한다. 과제 수행 결과를 기반으로 lactose로부터 tagatose의 시험생산을 위한 demonstration unit를 완성하고 시제품을 출시하며 건강 기능성 소재로 시장을 창출한다.

- 시장의 1차 target은 타가토스의 저 칼로리와 기능성을 강조하여 여성 다이어트 식품용, 당뇨병환자식 등 건강 기능성 식품소재로서 판매를 개척하며 점진적으로 화장품, 재약용 등 비식품용으로 시장을 확대한다.
- 또한 세계시장 진출을 위하여 시기에 따라 외국기업에 개발기술의 licensing out도 추진한다.

# SUMMARY
# (영문요약문)


1. **Lactose hydrolysis:** *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase gene was expressed in *Escherichia coli* as a soluble His-tagged recombinant enzyme under the optimized culture conditions. The expressed protein was multimeric with a subunit molecular mass of 118 kDa. The dimeric form of the β-galactosidase was the major fraction but had a lower activity than those of multimeric forms. The purified enzyme required $Mn^{2+}$ for activity. The activity was optimal at 40℃ and the optimum pH value was 7.0.

   A putative β-galactosidase gene of *Thermotoga maritima* was expressed in *E. coli* as a carboxyl terminal His-tagged recombinant enzyme. The gene encoded a 1,100 amino-acid protein with a calculated molecular weight of 129,501. The expressed enzyme was purified by heat treatment, His-tag affinity chromatography, and gel filtration. The optimum temperature for β-galactosidase activity was 80℃ and the optimum pH value was 6.5. In thermostability experiments, the enzyme followed first-order kinetics of thermal inactivation and its half-life times at 80 and 90℃ were 16 h and 16 min, respectively. $Mn^{2+}$ was the most effective divalent cation for β-galactosidase activity.

   Among *K. lactis* β-galactosidase, *T. martima* β-galactosidase, lactozym (β-galactosidase purchased from Novo Co.), Lactozym had the highest activity for lactose hydrolysis at the same concentration of protein. Therefore, we used lactozym in lactose hydrolysis.

2. **Strain isolation and DNA cloning for D-tagatose production:** A strain, producing bacterial thermostable L-arabinose isomerase, was isolated from Korean soil samples obtained from compost under high temperature

circumstances. This strain was identified as *Geobacillus thermodenitrificans* based on the 16S rRNA analysis, and biological and biochemical characteristics. The *araA* gene, encoding L-arabinose isomerase (AI), from *G. thermodenitrificans* was cloned basis on the L-arabinose isomerase gene of *G. stearothermophilus* and expressed in *E. coli*.

**3. Increase in D-tagatose production by site-directed mutagenesis:** L-Arabinose isomerase from *G. stearothermophilus* has been genetically evolved to increase the reaction rate toward D-galactose. The single point mutations influencing the activity were investigated based on the sequence of the previously evolved enzymes. Among the seven point mutations found in the evolved enzymes, mutations at $Val^{408}$ and $Asn^{475}$ were determined as the high influencing mutation points for D-galactose isomerization activity. Random mutation was introduced into the sites $Val^{408}$ and $Asn^{475}$ (X408V and X475N) and candidates were screened based on the non-optimal pH condition. Among the random mutations at the site 408 and 475, mutations of Q408V and R408Vwere selected. The optimal pH of the both mutations Q408V and R408V were shifted to pH 7.5. At the shifted optimal pH 7.5, the D-galactose isomerization activity of Q408V and R408V were 60% and 30% higher than that of wild type at pH 8.5.

Among single-site mutations of l-arabinose isomerase derived from *G. thermodenitrificans*, the W164G and N475K mutants showed the lowest and highest activity,respectively, for D-tagatose production. Site-directed mutagenesis at these sites showed that the aromatic ring at site 164 and the size of site 475 were important for D-tagatose production. Among double-site mutations, the C450S-N475K mutant exhibited the highest d-tagatose production. After 300 min at 65C, the d-tagatose yield from d-galactose was 46% for the wild-type, 55% for the N475K mutant, and 58% for the C450S-N475K mutant.

4. **Characterization of wild and mutant L-arabinoseisomerase:** A mutated gene was obtained by an error-prone polymerase chain reaction using the l-arabinose isomerase gene from *G. stearothermophilus* as a template and the gene was expressed in *E. coli*. The expressed mutated L-arabinose isomerase exhibited the change of three amino acids (Met322→Val, Ser393 →Thr, and Val408→Ala), compared to the wild-type enzyme and was then purified to homogeneity. The mutated enzyme had a maximum galactose isomerisation activity at pH 8.0, 65℃, and 1.0 mM $Co^{2+}$, while the wild-type enzyme had a maximum activity at pH 8.0, 60℃, and 1.0 mM $Mn^{2+}$. The mutated L-arabinose isomerase exhibited increases in D-galactose isomerisation activity, optimum temperature, catalytic efficiency (*k*cat/*Km*) for D-galactose, and the production rate of D-tagatose from D-galactose.

The *araA* gene, encoding L-arabinose isomerase (AI), from *G. thermodenitrificans* was cloned and expressed in *E. coli*. Recombinant AI was isolated with a final purity of about 97% and a final specific activity of 2.10 U/mg. The molecular mass of the purified AI was estimated to be about 230 kDa to be a tetramer composed of identical subunits. The AI exhibited maximum activity at 70℃ and pH 8.5 in the presence of $Mn^{2+}$. The enzyme was stable at temperatures below 60℃ and within the pH range 7.5-8.0. D-Galactose and L-arabinose as substrate were isomerized with high activities. Ribitol was the strongest competitive inhibitor of AI with a *K*i of 5.5 mM. The apparent *K*m and *V*max for L-arabinose were 142 mM and 86 U/mg, respectively, whereas those for D-galactose were 408 mM and 6.9 U/mg, respectively. The catalytic efficiency (*k*cat/*Km*) was 48 $mM^{-1}$ $min^{-1}$ for L-arabinose and 0.5 $mM^{-1}$ $min^{-1}$ for D-galactose. $Mn^{2+}$ was a competitive activator and increased the thermal stability of the AI. The d-tagatose yield produced by AI from D-galactose was 46% without the addition of $Mn^{2+}$ and 48% with $Mn^{2+}$ after 300 min at 65℃

5. **Tagatose prodcution by immobilized cells:** Using immobilized recombinant *E. coli* cells containing *G. stearothermophilus* larabinose isomerase mutant (Gali 152), we found that the galactose isomerization reaction was maximal at 70℃ and pH 7.0. Manganese ion enhanced galactose isomerization to tagatose. The immobilized cells were most stable at 60℃ and pH 7.0. The cell and substrate concentrations and dilution rate were optimal at 34 g/L, 300 g/L, and 0.05 $h^{-1}$, respectively. Under the optimum conditions, the immobilized cell reactor with Mn2+ produced an average of 59 g/L tagatose with a productivity of 2.9 g/L-h and a conversion yield of 19.5% for the first 20 days. The operational stability of immobilized cells with Mn2+ was demonstrated, and their half-life for tagatose production was 34 days. Tagatose production was compared for free and immobilized enzymes and free and immobilized cells using the same mass of cells. Immobilized cells produced the highest tagatose concentration, indicating that cell immobilization was more efficient for tagatose production than enzyme immobilization.

6. **Tagatose prodcution by immobilized enzymes:** To develop a feasible enzymatic process for D-tagatose production, a L-arabinose isomerase, Gali152, was immobilized in alginate, and the galactose isomerization reaction conditions were optimized. The pH and temperature for the maximal galactose isomerization reaction were pH 8.0 and 65℃ in the immobilized enzyme system, and pH 7.5 and 60℃ in the free enzyme system. The presence of manganese ion enhanced galactose isomerization to tagatose in both the free and immobilized enzyme systems. At pH 8.0 and 60℃, the immobilized enzyme produced 58 g/L of tagatose from 100 g/L galactose in 90 h by batch reaction, whereas the free enzyme produced 37 g/L tagatose due to its lower stability. A packed-bed bioreactor produced 230 g/L tagatose from 500 g/L galactose in continuous

recycling mode, with a productivity of 9.6 g/L-h and a conversion yield of 46%. D-Tagatose was continuously produced using thermostable L-arabinose isomerase immobilized in alginate with D-galactose solution in a packed-bed bioreactor. Bead size, L/D (length/diameter) of the reactor, dilution rate, total loaded enzyme amount, and substrate concentration were found to be optimal at 0.8 mm, 520/7 mm, 0.375 $h^{-1}$, 5.65 units, and 300 g/L, respectively. Under these conditions, the bioreactor produced about 145 g/L tagatose with an average productivity of 54 g tagatose/L-h and an average conversion yield of 48 %. Operational stability of the immobilized enzyme was demonstrated, with a tagatose production half-life of 24 days.

A double point mutant (Cys450→Ser, Asn475→Lys) from *G. thermodenitrificans* was selected as an enzyme producing D-tagatose due to its highest activity among the obtained enzymes. The pH and temperature for the maximal galactose isomerization reaction were pH 8.5 and 70℃ in the immobilized enzyme system. Using the immobilized enzyme, the packed-bed bioreactor produced about 160 g/L tagatose from 300 g/L galactose with an average productivity of 32 g tagatose /L-h and an average conversion yield of 48 %. The immobilized enzyme was stable for 30 days.

7. **Purification of D-tagatose**: After a reaction mixture of D-tagatose was treated by activated carbon to remove color, D-tagatose was separated by using MPLC with an ion exchange chromatography (Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410). The collected D-tagatose was treated by activated carbon, filtrated, concentrated, and freeze dried. From the reaction mixture of 80 g D-tagatose, 70 g of purified D-tagatose was obtained with a purification yield of 87.5%.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction of research project ····· 14
Section 1. Introduction of research project ····· 14
Section 2. Objective of research project ····· 17
Section 3. Necessity of research project ····· 19
Section 4. Scope of research project ····· 20

Chapter 2. Current status of research ····· 25
Section 1. Current status of domestic research ····· 25
Section 2. Current status of foreign research ····· 26
Section 3. Current status of research results ····· 29

Chapter 3. Contents and results of research ····· 33
Section 1. Experimental methods ····· 33
Section 2. Contents and results of research ····· 43

Chapter 4. Achievement and contribution of research ····· 147
Section 1. Achievement of research ····· 147
Section 2. Contribution of research ····· 148

Chapter 5. Application plan of research results ····· 149
Section 1. Application to other research ····· 149
Section 2. Industrialization plan of research results ····· 149

Chapter 6. Overseas science and technology information ····· 150

Chapter 7. References ····· 151

# 목 차


제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 14
제 1 절 연구개발과제의 개요 ····· 14
제 2 절 연구개발과제의 목적 ····· 17
제 3 절 연구개발과제의 필요성 ····· 19
제 4 절 연구개발과제의 범위 ····· 20

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 25
제 1 절 국내 기술개발 현황 ····· 25
제 2 절 국외 기술개발 현황 ····· 26
제 3 절 연구결과가 차지하는 위치 ····· 29

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 33
제 1 절 이론적, 실험적 접근방법 ····· 33
제 2 절 연구내용 및 결과 ····· 43

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 147
제 1 절 연구개발목표의 달성도 ····· 147
제 2 절 관련분야에의 기여도 ····· 148

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 149
제 1 절 타연구에의 응용 ····· 149
제 2 절 기업화 추진방안 ····· 149

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 150

제 7 장 참고문헌 ····· 151

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구 개발의 개요

### 1. 새로운 감미료의 필요성

설탕, 포도당, 과당 등은 식품 중에서 자연 성분으로 널리 분표되어 있을 뿐만 아니라 각종 가공식품 제조에 광범위하게 사용되고 있는 감미료이다. 그러나 설탕으로 대표되는 전통적인 당질 감미료는 칼로리 과잉, 충치, 비만 및 당뇨병 유발 등 건강에 부정적인 측면이 부각되면서 세계적으로 설탕을 대체할 수 있는 기능성 감미료가 주목받고 있다. 예로서 최근 '자일리톨'에 대한 소비자의 반응을 보더라도 건강에 도움이 되는 대체감미료 제품구입에 선뜻 높은 비용을 지불할 만큼 우리나라 소비자들의 생활수준과 건강기능성에 대한 인식이 높아졌다.

설탕대신 사용되는 대체 감미료에는 설탕보다 단맛이 훨씬 강한 아스파탐 등의 '고감미 감미료'와 단맛은 설탕보다 낮으나 단맛 이외의 생리적 기능을 가지고 있는 당알콜, 올리고당 등의 '당질 감미료'로 크게 구분할 수 있다. 이와 같이 여러 설탕 대체 감미료가 개발, 판매되고 있으나 실제 어떤 대체 감미료를 사용하더라도 설탕과 같은 효과를 얻기 어렵기 때문에 설탕을 대체한다는 것은 쉬운 일이 아니다. 소비자들은 설탕과 같은 단맛과 특성을 가지면서 칼로리가 낮고 건강에 좋은 이상적인 감미료를 원하고 있다. 타가토스가 바로 소비자들의 이와 같은 욕구를 충족시킬 수 있는 가장 이상적인 기능성 감미료이다.

### 2. 타가토스의 개요

타가토스는 설탕과 거의 구별할 수 없는 천연의 단맛(설탕의 92%)을 가지고 있으며, 물리적 성질도 설탕과 비슷하다. 그러나 섭취한 타가토스는 소장에서 잘 흡수되지 않아 혈당치에 영향을 주지 않으며 칼로리는 설탕의 약 30%인 저칼로리 감미료이다. 또한 타가토스는 장내 미생물에 의해 발효되어 유익한 유산균의 장내 증식을 촉진시키는 prebiotic 효과를 가지고 있다. 타가토스는 당알코올류(솔비톨, 자일리톨, 말티톨, 이소말트, 락티톨 등)와는 달리 다량 섭취 시에도 설

사유발(laxative effect) 현상을 나타내지 않는 설탕대체 감미료로 많은 관심을 받고 있으며, 비만, 당뇨병 등 성인병의 치료와 개선을 위한 질병 예방에 기여할 것으로 기대되고 있고 식품 시장에서 시장 잠재성이 매우 큰 물질로 평가받고 있다.

따라서, 타가토스는 단순한 저칼로리 감미료가 아니라 여성용 다이어트 식품, 다이어트 캔디, 다이어트 음료, 당뇨병 환자식, 기능성 과자류, 무설탕 껌, 장내 유익균의 증식을 촉진하는 정장용 symbiotic 제품 등의 기능성 식품 원료로 사용이 기대된다. 또한 타가토스는 물리적 성질이 설탕과 거의 비슷하므로 아스파탐 등의 고감미료와 혼합하여 식탁용 저칼로리 감미료로 사용될 수 있으며 항노화 기능도 안정되고 있다. 이상과 같은 기능성 이외에 타가토스는 당의정, 감기시럽, 치약, 구강세정제 등에 저칼로리 bulking agent, 화장품의 첨가제, 광학활성 화합물의 합성을 위한 중간원료 등 다양한 용도로 사용될 수 있어 세계 시장은 약 70조원에 달할 것으로 추정된다.

타가토스를 생산하는 효소를 galactose isomerase (학문명: L-arabinose isomerase, EC: 5.3.1.4, araA)는 Fig. 1에 나타난 것과 같이 in vivo에서 L-arabinose 를 L-ribulose로 전환시키는 효소이나 in vitro에서 구조적으로 유사한 기질인 D-galactose를 D-tagatose로 전환한다. 따라서 고활성의 내열성 L-arabinose isomerase를 이용할 경우 고부가가치 기능성 감미료인 타가토스를 효소 이성화법으로 경제적으로 생산할 수 있다.

타가토스는 2003년부터 Arla Foods 사에 의하여 D-galatose로부터 $Ca(OH)_2$를 촉매로한 화학적 이성화법으로 생산되어 'Gaio tagatose'란 상품명으로 시장을 개척하고 있다. 그러나 화학이성화법은 수율 면에서 우수하나 회수, 정제가 어렵고 공정이 복잡하며 환경오염이 상대적으로 심할 뿐 아니라 소비자들은 화학공정보다는 안심하고 먹을 수 있는 안전한 생물공정에 의해 생산된 기능성 식품소재를 요구하므로, 전 공정을 청정 효소전환 공정으로 대체한 새로운 타가토스 생산 기술을 개발할 필요가 있다.

이런 연구 환경을 바탕으로 국내에서 현재 연구되지 않고 있는 저칼로리 설탕대체 당인 타가토스를 생물전환반응에 의해 락토스로부터 가수분해로 갈락토오스를 얻고 이로부터 타가토스를 생산하고자 내열성 갈락토오스 이성화효소를

자연계로부터 얻어 산업화를 위한 대량생산 시스템의 개발과 고유 유전자 확보를 위한 다양한 클로닝 기술 및 분자진화방법에 대한 최적화 연구를 수행하고 이 효소 또는 세포를 고정화하고 고정화 효소 또는 세포가 함유된 생물반응기를 개발하고 최적화하여 생물반응기에서 타가토스를 연속적으로 생산하고 생산된 타가토스를 정제하여 시제품을 얻고자 한다.

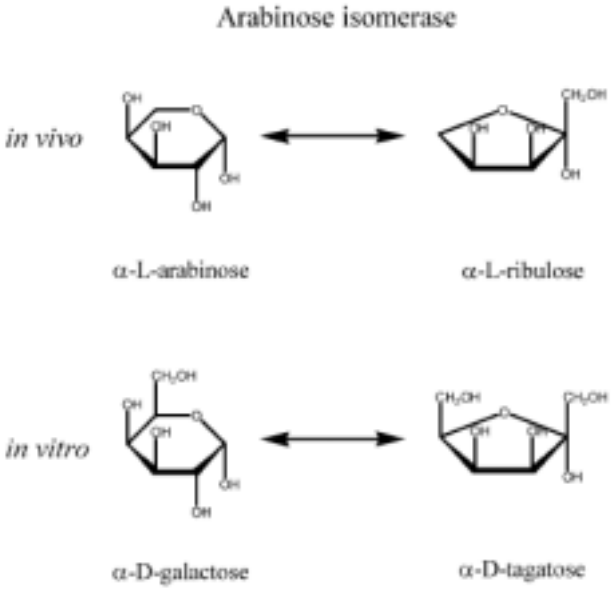



Fig. 1. In vivo and in vitro reaction catalyzed by arabinose isomerase.

## 제 2 절 연구개발의 목적

Galactose isomerase(학문명: L-arabinose isomerase, EC: 5.3.1.4, araA)는 갈락토오스를 타가토스로 전환시키는 생물촉매로 반응 산물인 타가토스는 저칼로리 설탕 대체감미료로 다양한 이용성이 기대되고 있다. 타가토스는 체내 흡수시 대사가 되지 않아 zero-caloric sweetener로 주목되고 있으며, 경제수준의 향상에 따른 성인병의 예방을 위한 감미료로 관심이 크게 증가하고 있을 뿐 아니라 다양한 식품 개발을 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

타가토스는 FDA에서 GRAS (Generally Recognized As Safe)로 인정되었으며, MD, Spherix, Arla 등의 유명회사들이 크게 관심을 가지는 품목으로 성장하였다. 특히 덴마크의 MD사 (현재는 스위스의 Ara Food로 합병됨)는 대량생산을 위한 연구개발을 서둘러 진행하여 왔으며 가까운 시일에 대량생산을 위한 시스템 구축을 완료할 것으로 예상되고 있다. 현재까지의 타가토스 생산을 위한 방법 중 최근에는 친환경적이면서 부산물 없이 대량으로 생산이 가능한 생물촉매에 의한 전환반응이 크게 인기를 끌고 있어 이 분야에 대한 연구도 크게 높아지고 있는 실정이다. 효소를 생물촉매로 이용한 타가토스의 생산에 대한 연구는 아직 많이 진행되어 있지 않지만, 국내·외의 현실을 감안 할 때 조만간 이에 대한 연구결과도 많을 것으로 기대되고 있다.

이를 위해 다양한 생물촉매와 관련 유전자의 확보는 다변화 되고 국제화 되어가는 시장경제성의 확보를 위해 필수적으로 요구되는 선결과제로 인식되는 상황이다. 특히 타가토스의 생물전환에 요구되는 새로운 유전자의 발굴과 분자진화 기술의 확립은 관련기술의 축적뿐만 아니라 국내·외의 타가토스에 대한 인식의 고취와 국민건강 증진을 위해서도 시급히 요구되는 상황이다.

기술적인 측면에서는 유전자 조작기술, 재조합 미생물 배양기술, 효소의 유전자 진화기술, 효소 생산기술, 효소의 분리정제기술, 생물반응기의 개발기술, 생물공정의 최적화 개발, scale-up 기술 등의 관련 산업의 기술수준의 진보와 더불어 생물공학 핵심기술의 발전으로 국제 경쟁력을 확보할 수 있다. 특히 본 과제의 책임자들은 다양한 생물촉매와 공정 최적화에 대한 다양한 기술적 능력을 갖추고 있어 연구수행에 따른 국내의 관련 기반기술의 축적에 크게 기여할 것으로

예상된다. 특히 타가토스에 대한 국내의 미생물 자원과 효소이용기술을 한단계 상승 시키는 역할과 제품개발에 따른 파급효과가 큰 점을 고려할 때 관련제품의 수입대체 효과와 수출효과도 크게 기여할 것으로 예상된다.

경제와 산업적 측면에서는 세계적으로 연간 5,000억 이상의 매출이 예상되고 있다. 국내 시장에서는 50-60억 정도의 음료와 유제품 시장이 형성될 것으로 기대되며 매년 50억원의 수입대체 효과가 기대된다. 특히 매년 40% 증가하고 있는 국내 감미료 시장과 관련 제품의 개발을 위한 음료, 제과, 제빵, 제약업 등에 광범위하게 적용될 수 있어 설탕과잉 섭취 등에서 기인되는 국민의 건강증진을 크게 개선시킬 것으로 예상된다.

효소시장에 있어서 타가토스 생물촉매 유전자의 확보와 관련기술의 축적은 국내 효소시장의 확보와 더불어 매년 10%씩 증가하는 효소시장에서의 안정적 상품의 공급뿐만 아니라 효소공학기술의 확보에 따른 수입대체 효과와 더불어 세계시장으로의 수출도 기대된다.

이는 고수율의 타가토스를 생산하기 위한 신규 내열성 galactose isomerase 생물촉매의 확보뿐만 아니라 인적, 산업재산권의 확보를 통한 유전자의 발굴, 개량, 수출에도 크게 기여할 것으로 예상된다.

## 제 3 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

가. 유망 기능성 신감미료의 생산기술: 자일리톨이나 에리스리톨 같은 당알코올 생산은 발효법으로 생산하여 비교적 Mid-Tech으로 생산되나 신 기능성 당 타가토스의 경우 효소법에 의한 생물전환법으로 생산되므로 유전공학기술, 효소의 유전자 진화 기술, site-directed mutagenesis 등 의 첨단기술과 효소 고정화, 생물반응기, 사업화 기술을 확보할 필요가 있다.

나. 선행 연구결과의 완결: 주관 책임자는 이미 (주)보락과 함께 세계 최초 미생물 발효법으로 자일리톨을 생산하는 방법을 개발하여 산업화를 한 경험이 있고, 선행 연구 결과로 고온균 *Geobacillus stearothermophilus*의 galactose isomerase 유전자를 *E. coli*에 cloning하여 생산하고 있다. 갈락토스로부터 60℃에서 전환수율 50%, 48시간에 고정화 효소를 이용한 생물 반응기로 100 g/L 타가토스 생산한 결과가 있다.

다. 화학합성법을 대체하는 청정기술 개발 필요: 생명공학 기술을 이용하여 환경친화적인 생물전환법으로 타가토스를 생산하는 기술을 확보하면 glucose isomerase를 이용하여 glucose로부터 fructose를 생산하는 방법도 화학합성법을 대체한 사례를 보아현재 고온 고압하에 생산하는 생산 초기에 있는 화학합성법을 대체할 필요가 있다.

### 2. 경제·산업적 측면

가. 새로운 대체감미료가 개발 필요: 일본과 국내시장의 경우 설탕 및 관련 올리고당 시장은 정체 내지는 감소인데 비하여 설탕대체 신감미료 시장은 40%씩 성장하고 있으나 대개가 당알코올류 중심이어서 새로운 대체감미료가 요구되고 있음. 이 중 많은 부분을 수입에 의존하고 있어 이 분야에 있어서는 뒤져 있는 상태이고 생활이 향상됨에 따라 저칼로리 당을 요구하고 아직까지 설탕을 대체할 당이 나타나지 않고 있는 상황에서 설탕과 매우 유사한 특성을 지

니고 zero 칼로리인 타가토스의 개발이 시급하다.

나. 새로운 대체감미료 시장 창출 필요: 미국 Biospherics사에서 개발한 특허권을 덴마크의 세계적인 유가공 회사인 MD사에서 250만$ 및 옵션계약을 통해 취득했으며, MD가 Arla사로 통합되어 현재 소규모로 생산하여 동남아에 연 500억 정도 판매되고 있다. Tagatose 2001년 4월 FDA에 승인을 얻었으며 미국시장을 목표로 Arla사가 1억불을 투자하여 화학공장을 설립하고 있으며 2003년에 완공 예정이므로 2003년 이후로는 시장이 급성장할 것으로 예상된다. 기존 당알코올류 시장의 경우 설사유발 한계량의 제한 때문에 사용량이 크게 확대되지 않고 있기 때문에 새로운 대체 감미료에 의한 새로운 시장 창출이 필요하다. 국내의 경우 신규 감미료 시장은 매년 40%씩 신장하고 있으며, 관련 제품의 개발 역시 활성화되고 있고, 음료, 빙과, 제과, 제빵, 제약 등 그 적용범위를 넓혀가고 있으며, 타가토스의 경우는 이러한 단점이 없기 때문에 관련 시장규모가 커질 것으로 예상된다.

### 3. 사회・문화적 측면

타가토스(tagatose)는 저칼로리, 비충치성, 설사유발 한계량의 단점 극복 등의 특징을 가짐으로써 비만, 당뇨병등 성인병을 가진 성인이나 어린이들이 안심하고 섭취할 수 있는 건강감미료이며, 설탕과잉 섭취 등에서 기인되는 여러가지 사회 구조적 질병의 예방에이 필요하므로 타가토스 생산 기술을 개발해야한다.

# 제 4 절 연구개발의 범위

## 1. 연차별 연구개발 목표와 내용

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|---|---|---|
| 1차 년도 (2002) | - 타가토스 생산을 위한 효소반응조건 최적화<br>- 타가토스 생산을 위한 고정화 방법 개발<br>- 유전자 선별을 통한 타가토스 생산 고온 효소 선별<br>- 타가토스 생산을 위한 생물반응기 작동 | - 타가토스 생산을 위한 효소반응조건 최적화<br>- L-arabinose isomerase를 여러 담체에 고정화하여 최적 담체 및 최적 반응조건 선정<br>- 내당성 및 반응속도가 빠른 고온효소 선별<br>- 생물반응기에서 갈락토스로부터 타가토스 연속 생산 |
| 2차 년도 (2003) | - 유당 분해 전환 효소 반응 최적화<br>- 고정화 균체에 의한 타가토스생산<br>- 갈락토스로부터 타가토스 생산후 정제<br>- 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량 | - β-galactosidase를 유당에 첨가하여 포도당과 갈락토스 생산의 최적 조건 선정<br>- 효소 대신 균체를 고정화하여 타가토스를 생산<br>- 갈락토스로부터 타가토스 생산후 정제<br>- 내당성 및 반응속도가 빠른 효소 개발: DNA point mutation |
| 3차 년도 (2004) | - 유당으로부터 타가토스 생산후 정제<br>- 유당으로부터 시작하여 타가토스 생산<br>- 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량<br>- 유당분해, 타가토스 생산 및 정제의 scale-up 실험<br>- 타가토스 시제품 생산<br>- 경제성 분석 | - 유당으로부터 포도당 존재시와 타가토스 정제<br>- 유당에서 타가토스의 전환공정 확립 및 최적화<br>- 내당성 및 반응속도가 빠른 효소 개발: DNA shuffling<br>- 유당에서 타가토스의 전환 전단계 scale-up<br>- 타가토스 시제품 생산<br>- 경제성 분석 |

## 2. 연구개발의 범위

가. 균주 선별 및 효소 클로닝

반응 온도에서는 기질인 갈락토오스가 70도씨 이하에서 비교적 안정된 구조를 유지하여 갈변화(browning) 없이 산물인 타가토스로 전환되며 80도씨 이상에서는 구조가 불안정하여 갈변화되어 타가토스를 정제하기 위해서는 복잡한 정제공정이 요구되는 단점을 근본적으로 차단하고자 하는 취지에서, 전환수율은 증가시키되 갈변화를 최소화하여 정제공정이 비교적 간단한 70도씨 정도에서 안정하게 반응을 수행할 수 있는 내열성 생물촉매를 토양으로부터 분리하고자 하였다.

신규 내열성 galactose isomerase 유전자는 PCR을 수행하여 클로닝 벡터에 삽입하여 유전자의 염기서열을 확인하였고, 재조합 단백질의 발현과 타가토스의 고수율 생물전환반응을 위한 시스템의 최적화는 고농도의 재조합 단백질 발현벡터에 삽입하여 IPTG 유도 없이 LB 액체배지에서 대량의 내열성 재조합 단백질 효소유전자를 발현 시키고자 하였다.

나. 타가토스 생산을 위한 고정화 방법 개발

타가토스 생산의 산업적인 공정을 개발하기 위하여 L-arabinose isomerase를 고정화를하여 안정성과 가격이 저렴한 방법을 조사하였다. 사용할 고정화 방법은 silica gel의 흡착법, sodium alginate에 의한 포괄법, agarose-CNBr에 의한 공유법, silica gel. CM-cellulose, sodium alginate 물질에 glutaraldehyde로 가교시킨 가교법이다.

다. 타가토스 생산을 위한 효소반응조건 최적화

타가토스의 생산성을 증가시키기 위하여 간이 정제한 효소를 사용하였고 이 효소를 이용하여 타가토스를 생산하기 위하여 온도, pH, 온도 안정성, pH 안정성, 무기염, 기질농도, 효소농도 등을 최적화하였다.

라. 고정화 효소 및 생물반응기에 의한 타가토스생산

타가토스의 생산성을 증가시키기 위하여 간이 정제한 효소를 고정화하였고 고정화 효소를 이용하여 타가토스를 생산하기 위하여 온도, pH, 온도 안정성, pH 안정성, 무기염 등을 최적화하였다. 고정화 효소가 충진된 생물반응기에서 타가토스의 생산성을 향상시키기 위하여 담체크기, L/D, 유속, 효소농도, 기질농도 등을 최적화하였고, 작동안정성을 알기 위하여 40일간 타가토스 생산을 시도하였다.

마. 고정화 균체 및 생물반응기에 의한 타가토스생산

효소고정화는 효소파쇄과정과 정제과정이 들어가 폐수발생 및 효소 정제시 활성 소실등 단점이 많이 존재한다. 경제성과 산업화의 용이성을 위하여 효소 고정화(enzyme-immobilization)를 지양하고 균체고정화(whole-cell immobilization)를 이용한 생물전환방법을 연구하였다. 고정화 균체를 이용하여 타가토스를 생산하기 위하여 온도, pH, 온도 안정성, pH 안정성, 무기염 등을 최적화하였다. 고정화 효소가 충진된 생물반응기에서 타가토스의 생산성을 향상시키기 위하여 유속, 효소농도, 기질농도 등을 최적화하였고, 작동안정성을 알기 위하여 40일간 타가토스 생산을 시도하였다.

바. 유당 분해 전환 효소 반응 최적화

*Kluveromyces lactis* β-galactosidase를 cloning하였고 발현시켜 생성된 효소의 온도, 온도안정성, pH, 무기염, 기질 농도, 효소농도를 최적화하였고 kinetic parameter를 구하였고 lactose의 분해를 시도하였다.

타가토스 생산이 고온이므로 초고온균 *Thermotoga martima*의 β-galactosidase를 cloning하였고 발현시켜 생성된 효소의 온도, 온도안정성, pH, 무기염, 기질 농도, 효소농도를 최적화하였고 kinetic parameter를 구하였고 lactose의 분해를 시도하였다. 또한 반응과정을 modelling하였다.

Novo사의 Lactozyme을 이용하여 제시된 조건에서 반응시켜 lactose의 분해를 시도하였다. 3가지 경우를 비교 검토하여 최적 β-galactosidase를 선정하였다.

사. 유당으로부터 타가토스 생산

유당에 β-galactosidase를 처리하여 유당 가수분해물을 얻고 유당 가수분해물로부터 직접 타가토스를 생산하였다. 이때 L-arabinose isomerase의 포도당에 대한 저해를 *G. thermodenitrificans* 효소와 *G. stearothermophilus* 효소에서 살펴보았고 이 중 저해가 적은 효소를 사용하여 유당 가수분해물 농도 별로 실험을 수행하였다.

아. 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량

새로 선별한 *Geobacillus thermodenitrificans* L-arabinose isomerase 특성을 살펴보기 위하여 순수 정제한 후, 속도상수들과 기질특이성, 저해제 특성을 살펴보았다. 타가토스 생산에 영향을 주는 효소의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 그 영향을 살펴보고 우수한 효소 선별 방법을 확립하였다. 돌연변이 효소들의 타가토스 생산 능력을 측정하고 특성을 조사하기 위하여 정제한 후 속도상수들과 기질특이성, 저해제 특성을 살펴보았다.

자. 유당분해, 타가토스 생산 및 정제의 scale-up 실험

생물반응기에서 다량의 타가토스를 생산하고 활성탄소와 수지를 이용하여 타가토스를 분리하고 농축한 후 동결 건조하여 시제품 생산을 생산하였다. 이온교환 수지를 통과시켜 이온 성분을 제거하고 이온이 제거된 용액을 진공 농축하여 점액성 물질을 얻었고 이것을 에탄올을 첨가하여 타카토스 흰색의 결정을 얻었다.

# 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 1 절 국내 기술개발 현황

○ 국내의 경우는 본 연구진이 최초로 타가토스를 연구를 수행하였고 고온균 *Geobacillus stearothermophilus*의 galactose isomerase 유전자를 *E. coli*에 cloning하여 생산 연구를 하고 있다.

○ 연세대 변유량 교수팀이 초고온균의 galactose isomerase를 생산하고 있으나 초고온균의 경우 조효소로 코발트를 사용하는데 코발트의 경우 식품에 들어갈 수 없는 물질이므로 산업화의 어려움 존재, 비슷한 경우로 glucose isomerase에서도 코발트로 인하여 초고온균을 못쓰고 고온균의 효소를 사용한다. 연세대 변유량 교수팀은 *Thermotoga neapolitana*로부터 기존에 보고 되지 않은 L-AI 유전자를 cloning하여 *E. coli*에서 대량 발현하였고, 이를 이용한 타가토스의 생산 기술을 개발하였으며 그 특허권을 CJ에 양도하였다(대한민국 특허번호 10-0443865-0000).

○ 유당을 이용하여 타가토스를 효소적으로 생산하는 것은 연구되고 있지 않다.

## 제 2 절 국외 기술개발 현황

○ 타가토스는 현재 상업적으로 생산은 되지 않고 있으나 덴마크의 MD사(현재 Arla사)가 영국의 Biospherics사 미국의 Searl, 그리고 일본의 Hayashibara등에서 관련 기술을 특허화하여 이미 보유하고 있으며 MD사의 경우 유청(whey)로 부터 얻은 lactose를 가수분해하여 galactose를 얻고 이를 기질로 하여 화학합성법으로 타가토스를 생산하고 있다. MD사는 화학적 방법으로 타가토스를 생산하고 있지만 fructose도 화학합성법이 아닌 glucose isomerase 방법으로 생산되는 것으로 추정하면 향후 galactose isomerase 방법으로 대체될 것으로 예상된다.

○ 미국의 Spheric사는 1994년 칼슘을 촉매로 하여 D-galactose를 D-tagatose로 전환하는 화학적 이성화법을 개발하였다 (Fig. 2). 즉 galactose를 20 ~ 25℃의 저온에서 금속수산화물인 tagatose · $Ca(OH)_2$ 복염을 형성시킨 후 복염을 여과하여 회수하고 $CO_2$를 취입하여 중화시킨다. 복염은 알칼리 조건에서는 안정하나 산성조건에서는 불안정하므로 pH 7 이하가 되면 타가토스가 유리되고 $CaCO_3$ 침전이 생긴다. 여과, 탈이온 과정을 거쳐 정제한 공업체인 Arla Foods사에서는 5백만 불의 로열티를 지불하고 미국 Biospheric사로부터 이와 같은 화학이성화법에 의한 타가토스 특허 기술을 이전 받았다. Biospheric사는 계속적인 기술지원대가와 타가토스의 판매액에 대한 running royalty로서 계약기간 동안 약 5억불 이상의 수익이 예상되는 것으로 보도되고 있다.

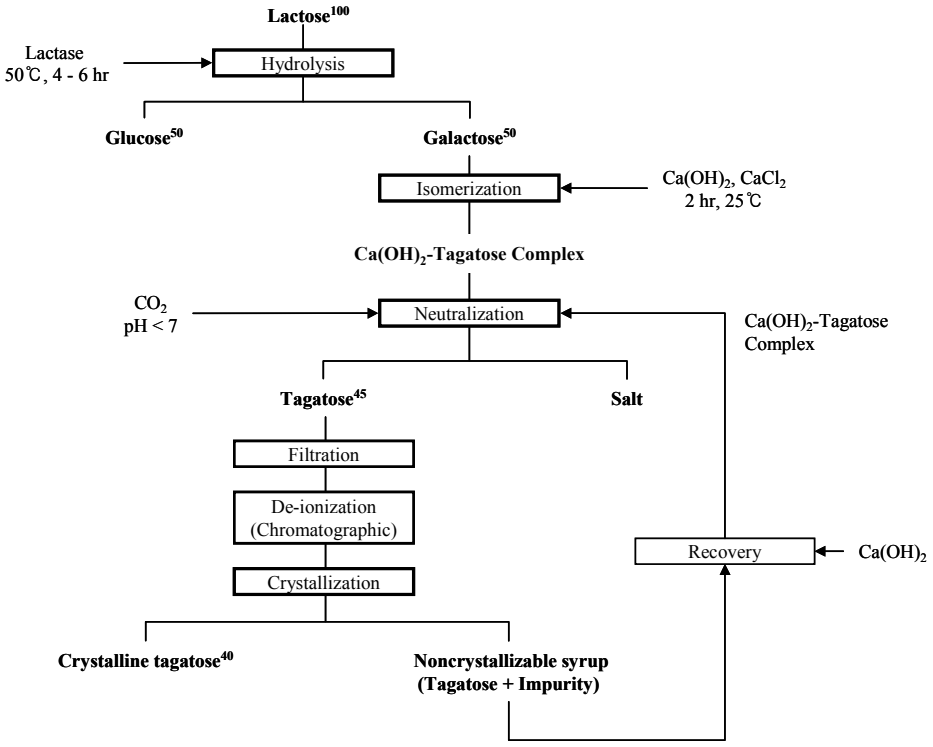



Fig. 2. Arla Foods Process for manufacturing of tagatose by chemical isomerization.

○ 독일의 Nordzucker는 Arla Foods와 joint venture를 설립하고 연간 생산 1250 M/T의 타가토스 생산 공장을 Hanover에 건설하여 2003년부터 Gaio tagatose란 상품명으로 생산하고 있다.

○ Kraft Foods사는 cheese whey로부터 효소법에 의한 tagatose 생산 공정을 보고하였다. Cheese whey를 UF, RO의 막분리에 의해 단백질과 염을 제거한 다음 고정화 β-galactosidase를 이용하여 lactose를 galactose와 glucose로 가수분해 시켰다. 이 가수분해액을 알코올 발효하여 glucose를 알코올로 전환시킨 후 알코올을 증발 제거하여 galactose 용액을 얻고 이를 고정화 L-arabinose isomerase(AI)를 이용하여 tagatose로 전환하였다. 미국의 Kraft사가 *Lactobacillus* 균에서 galactose isomerase를 생산하는 연구를 하고 있으나 재조합 균이 아닌 관계로 효소 역가가 매우 낮아 산업화에는 거리가 있다.

○ 덴마크의 Bioneer사는 2004년 혐기성 내열성 세균 *Thermoanaerobacter mathranii* 유래 L-AI를 *E. coli*에서 발현시키고, 이 재조합 효소를 고정화하여 65℃에서 galactose를 tagatose로 42% 전환시켰다고 보고하였다.

○ Tagatose는 2001년 미국 FDA로부터 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 인정받아 미국에서 식품첨가물로 사용하는데 문제가 없으며 2003년 8월 Arla Foods사에서는 우리나라에서도 tagatose가 승인된 것으로 발표하였다.

## 제 3 절 연구결과가 차지하는 위치

○ 본 과제에서 개발하고자 하는 기본공정은 유당을 β-galactosidase로 처리하여 glucose와 galactose로 가수분해 되고 가수분해 되지 않은 lactose는 효소 반응기로 재처리한다. Glucose와 galactose는 크로마토그래피에 의해 분리되고 galactose는 고정화 L-arabinose isomerase를 충진한 효소 반응기에서 타가토스로 이성화한다. 이성화 반응액은 크로마토그래피에 의해 분리하여 이성화되지 않은 galactose는 이성화 컬럼으로 순환하고 타가토스는 농축, 결정화시켜서 결정 타가토스 제품을 얻는다.

○ 우유로부터 1 lb의 cheese를 생산하는데 9 lb의 cheese whey (milk whey)가 폐수로서 발생되므로 유가공 공장에서는 폐수처리와 유용물질의 회수라는 측면에서 whey로부터 유당을 회수한다. Cheese whey 중에는 약 5%의 유당이 함유되어 있으며, whey 고형분의 70 ~ 80%가 유당이다. 본 과제에서는 이와 같이 유가공 공장에서 부산물로 얻어지는 저렴한 유당을 출발 물질로 한다.

○ 유당은 glucose와 galactose가 β-1,4 glucoside 결합을 하고 있는 이당류(disaccharide)이다. Lactose는 β-galactosidase(lactase)에 의해 glucose와 galactose로 가수분해 되며, 유당의 효소 가수분해는 우유 중의 유당 또는 whey 중의 유당을 가수분해할 목적으로 많이 연구 되었다.

○ 유당의 가수분해를 위해서 유가공 업체에서는 아직 유리효소(free enzyme)가 많이 사용되고 있으나, β-galactosidase 고정화 방법, 여러 가지 형태의 고정화 효소 반응기에 대하여 많은 연구가 이루어졌다. 또한 lactose는 용해도가 낮고 가수분해 중 잡균의 생육을 방지하기 위하여 고온에서 처리할 필요가 있으므로 내열성 β-galactosidase에 대한 연구가 활발히 수행 되었으며, 특히 최근에는 호열미생물 및 초호열성 미생물 유래 내열성 β-galactosidase도 개발되고 있다. Novozyme사에서는 Lactozym이란 상품명으로 시판하고 있다.

○ 현재까지 유당의 가수분해는 유당 함량이 낮은 우유 중의 유당 가수분해를 목적으로 주로 개발되었다. 그러나 타가토스의 생산을 목적으로 한 유당의 효소 가수분해 공정에 대해서는 새로운 접근이 필요하다. 고농도 유당을 효율적으로 가수분해 시키기 위해서는 필수적으로 고활성의 안정성이 우수한 내열성

β-galactosidase를 선정하여야 한다. 또한 기계적 적성이 우수하고, 장기간 연속조업할 수 있는 β-galactosidase의 고정화 방법, 최적 고정화 반응기의 형태, 조업방법과 조건 등에 대한 연구가 수행되어야 한다.

- Bertelseu 등은 800 mM (28%) 유당을 고정화 β-galactosidase (*Lac* s)를 사용하여 24시간에 완전히 가수분해 하였다고 보고하였으나, 타가토스 생산 공정에서는 고농도 유당 용액의 가수분해, 가수분해 시간의 단축, 가수분해 산물인 galactose 또는 glucose에 의한 저해 등의 문제가 해결되어야 한다.
- Galactose와 glucose로 구성된 가수분해 액은 크로마토그래피에 의하여 galactose와 glucose로 분리된다. Galactose는 L-arabinose isomerase 고정화 컬럼을 통과하면서 galactose를 타가토스로 이성화한다. 전술한 바에 대해서는 많이 연구되었고 일부 상품이 판매되고 있는데 비하여 L-arabinose isomerase (L-AI)는 최근에야 연구되기 시작하여 산업적으로 이용이 가능한 내열성이 우수한 고활성 L-AI의 개발이 핵심이다.
- Glucose isomerase를 이용한 glucose의 fructose로의 이성화반응은 그 열역학적 특성에 의하여 고온 반응에서 높은 수율의 전환률을 얻을 수 있다. 이와 마찬가지로, L-arabinose isomerase를 이용한 galactose의 타가토스로의 이성화반응 기술의 산업적 실용화도 고온반응을 통하여 실현될 수 있다.
- 또한, 현재까지의 L-arabinose isomerase를 이용한 타가토스의 생산기술은 재조합 *E. coli*에서의 효소발현기술 및 이를 이용한 galactose에서 타가토스로의 일단계성 이성화공정 개발에만 머물러 있으며, 식품소재로서의 타가토스의 생산 및 제품화를 위하여 산업적으로 이용 가능한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 균주에서의 L-AI의 효과적인 발현 및 대량 생산이 필수적으로 개발되어야 하는 실정이다.
- Galactose의 타가토스로의 이성화 반응은 이성화율을 향상시키기 위해서 고온에서 반응시키는 것이 유리하므로 유당의 가수분해 반응과 galactose의 이성화 반응은 60 ~ 70℃ 범위에서 수행하는 것이 바람직하다. 그러나 최적반응온도는 선택하는 내열성 효소의 특성과 공정조건을 고려하여 검토되어야 할 것이다. 알카리 금속과 복염을 형성시키는 화학이성화법과는 달리 효소이성화 반응은 중성 내지는 약산성에서 반응하므로 당류의 분해산물을 현저히 감

소시킬 수 있으며, 그 결과 회수, 정제 비용을 절감할 수 있다.

○ 유당 가수분해액을 galactose와 glucose를 분리하는 공정을 기본 공정으로 채택하여 개발하고자 하나 개발기술의 경제성 검토의 결과에 따라 galactose와 glucose 혼합 가수 분해액을 그대로 타가토스 이성화 반응기에 공급하여 이성화시키는 공정도 고려할 수 있을 것이다.

○ 이성화 반응기에서 배출되는 이성화액에는 30 ~ 60%의 타가토스를 함유하고 있으므로 미전환 galactose와 tagatose를 크로마토그래피로 분리한 다음, 미전환 galactose는 이성화 반응기로 재순환하여야 한다. Galactose와 타가토스의 분리에 대해서는 거의 연구된 바 없고 분석 목적 또는 소규모로 recycle chromatography에 의한 분리가 연구되었을 뿐이므로 대량분리를 위한 크로마토그래피 수지 선정, 조업조건과 방법, scale-up 등이 연구되어야 한다.

○ 이상의 개발하고자 하는 기본 공정에 대한 기술개발을 완료한 다음 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 여러 가지 대체 공정에 응용이 가능할 것이다. 즉 고농도 lactose를 가수분해 시킬 경우 완전 가수분해 시키기는 어려울 것이므로 가수분해 되지 않은 lactose를 분리하여 재순환시키고 galactose와 glucose로 구성된 가수분해액을 그대로 L-AI 이성화 반응기에서 이성화시킨 후 이성화당액을 크로마토그래피에 의하여 tagatose, galactose, glucose의 3가지 분획으로 분리하여 타가토스는 결정화 공정, galactose는 재순환, glucose는 fructose syrup 제조공정으로 각각 공급한다.

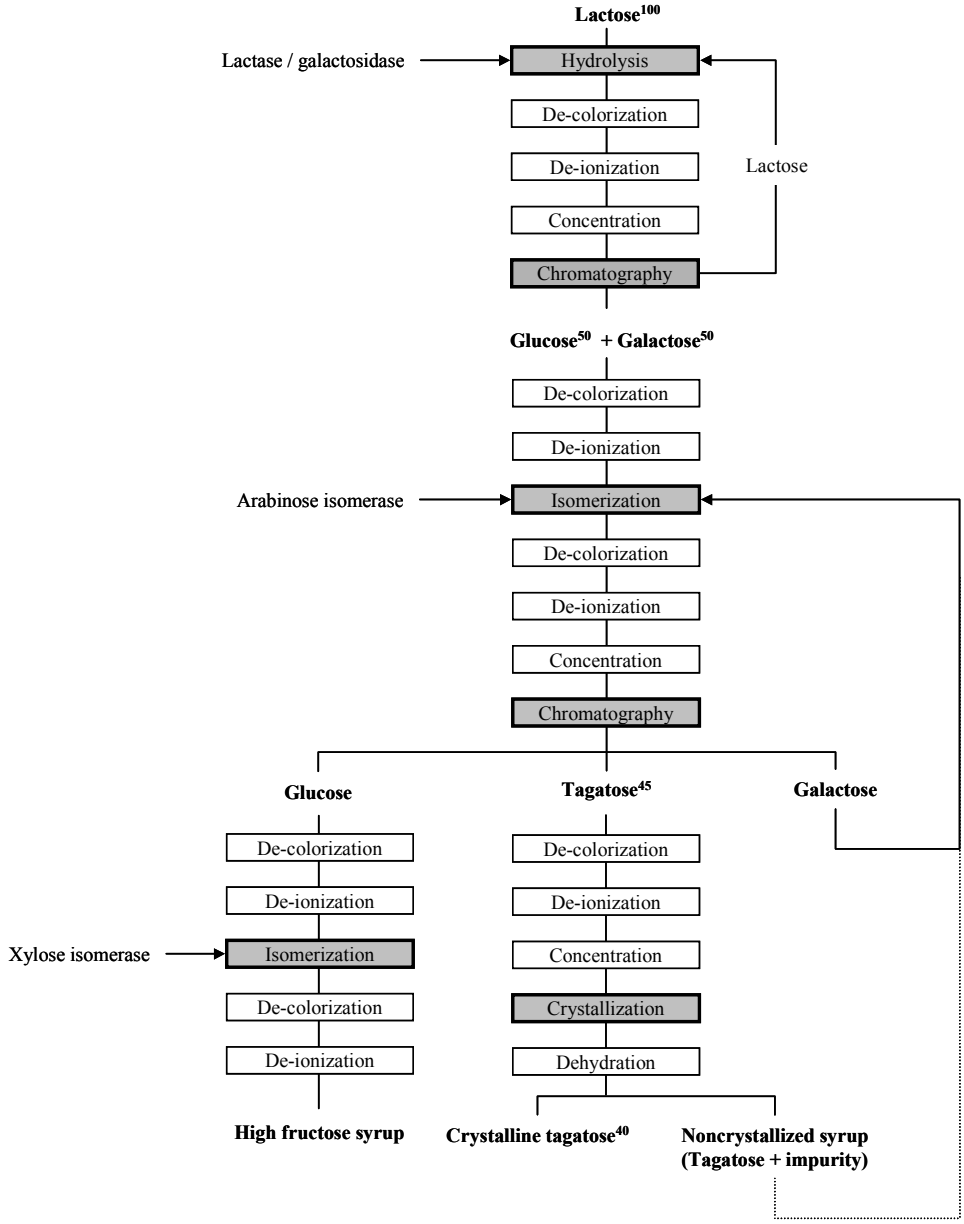



Fig. 3. Alternative process for manufacturing of tagatose from lactose by enzymatic conversion.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 이론적, 실험적 접근방법

### 1. 미생물, 플라스미드, 세포 및 효소 준비

*Geobacillus stearothermophilus*와 *Geobacillus thermodenitrificans*의 galactose isomerase 유전자를 포함하는 pLex plasmid(Invitogen, The Netherlands)로부터 유도된 vector인 pL151 (*Geobacillus stearothermophilus*의 wild), pL152(돌연변이), pL153, pL29(*Geobacillus thermodenitrificans*의 wild)를 지닌 재조합 미생물인 *Escherichia coli* (*E. coli* MC1061/pL151,152,153)를 효소원으로 사용하였다. 미생물은 7 L jar fermentor (Biotron Co., Bucheon, Korea)에 10 g/L glycerol, 30 g/L yeast extract, 10 g/L Bactotrypton, 0.1 g/L $Na_2HPO_4$, and 0.02 g/L $KH_2PO_4$로 구성된 5 L 배지에서 배양하였다.

효소는 균체 파쇄액으로 부터 ammonium sulfate 침전과 dialysis를 한후 부분 정제하여 사용하였다. Dialysis가된 효소액은 ultrafiltration membrane (50,000 MWCO, Sartorius, Gloucestershire, UK)를 사용하여 농축하여 사용하였다. L-arabinose isomerase 활성 1 unit는 1 μmole D-tagatose를 60°C, pH 8.0에서 1분당 생산하는 효소의 량으로 정의한다.

균체 준비는 배양된 세포를 원심분리(6,000 rpm, 10 min)를 4 °C에서 수행한 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 두 번 세척한후 같은 buffer에 녹여 세포 고정화에 사용하였다.

### 2.효소유전자의돌연변이

*Geobacillus stearothermophilus*와 *Geobacillus thermodenitrificans*의 galactose isomerase 유전자를 돌연변이 시켜 library를 구성하기 위하여 error-prone PCR은 PCR Radom Mutagenesis Kit (Clon Tech, USA)를 사용하여 수행하였다. 이때, 돌연변이율은 1,000 bp당 2.3 이였다. Site-directed mutagenesis는 pAlTER-1 vector를 이용하는 Altered Sites II in vitro Mutagenesis Sytem(Promega, USA)으로 수행하였다. 돌연변이된 1.5 kb PCR 산물을 제한효

소 KpnI와 EcoRI로 짜른후 pLex vector로 subcloning하여 *E. coli* MC1061에 형질전환 시켰다.

### 3. β-Galactosidase 효소 정제 및 특성 조사

유당 분해의 대표균인 *Kluyveromyces lactis* KCTC 7139의 β-galactosidase 와 고온균 *Thermotoga martima*의 β-galactosidase 유전자를 cloning 하였다. *E. coli* 유래 단백질을 제거하고 imidazol 농도를 조절하여 His-tag affinity chromatograph로 순수 정제하였다. 효소 특성 조사를 위해 반응액으로는 50 mM buffer 내에 150 mM lactose for 5 min or 2 mM *o*NPG 를 사용하였다.

최적온도를 결정하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 에서 *Kluyveromyces lactis*의 β-galactosidase 경우는 25로부터 55°C 변화시키고 *Thermotoga martima*의 β-galactosidase 경우는 50로부터 95°C 변화시키고 5분간 실험을 수행하였다.

pH를 4에서 10까지 변화시키면 60°C에서 다른 pH buffer를 사용하였다. 사용한 buffer는 다음과 같다. 50 mM maleate-NaOH (pH 4-6), 50 mM phosphate-NaOH (pH 6-7), 50 mM Tris-HCl (pH 7-9), and 50 mM borate-NaOH (pH 9-10).

여러 가지 금속염 효과는 1 mM 을 첨가하여 살펴보았다. 효소활성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer 용액에서 60°C로 하여 30분간 반응하였다.

### 4.L-Arabinose isomerase 효소정제및특성조사

효소정제는 His-tag이 붙지 않은 경우는 세포파쇄후 ammonium sulfate 침전을 통하여 단백질을 얻은 후, 60°C에서 30분간 열처리를 하여 *E. coli* 유래 단백질을 제거하고 FPLC를 사용하여 Hi-Trap, hydroxyapatite 및 Resource Q로 순수 정제하였다. His-tag이 붙은 경우는 세포파쇄후 ammonium sulfate 침전을 통하여 단백질을 얻은 후, 60°C에서 30분간 열처리를 하여 *E. coli* 유래 단백질을 제거하고 를 imidazol 농도를 조절하여 His-tag affinity chromatograph로 순수 정제하였다.

효소 특성 조사를 위해 반응액으로는 50 mM buffer 내에 10 g/L galactose를 사용하였다. 최적온도를 결정하기 위하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 에서 40 로부터 80°C변화시켜 30분간 실험을 수행하였다.

pH를 4에서 10까지 변화시키면 60°C에서 다른 pH buffer를 사용하였다. 사용한 buffer는 다음과 같다. 50 mM maleate-NaOH (pH 4-6), 50 mM phosphate-NaOH (pH 6-7), 50 mM Tris-HCl (pH 7-9), and 50 mM borate-NaOH (pH 9-10).

여러 가지 금속염 효과는 1 mM 을 첨가하여 살펴보았다. 효소활성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer 용액에서 60°C로 하여 30분간 반응하였다.

### 5. 효소 고정화 방법 개발 및 반응조건 최적화

Arabinose isomerase의 1 unit는 60℃, pH 8.0에서 1분 동안 1 ㎍을 생산하는 효소의 양을 정의한다.

최적 효소 고정화 방법을 찾기 위하여 고정화 실험은 초기 효소 활성을 46 U/ml로 조절하였다. 모든 종류의 고정화 효소는 플라스크에 50 ml 기질(10 g/l 갈락토스 50 mM Tris/HCl 완충용액 pH 8.0)과 함께 첨가하여 60℃로 24시간마다 반응시켜 타가토스 생산하는데 사용하였다. 고정화 효소는 24시간 마다 여과한 후 새로운 기질로 대체하였다. 기질은 5-6번 대체하였다.

가. silica에 흡착법: 10 ml arabinose isomerase를 10g의 실리카에 섞고 상온에서 2시간 혼합하였다.

나. sodium alginate에 포괄법: 10 ml arabinose isomerase를 2.5%(w/v)의 alginate에 섞고 과량의 0.2 M $CaCl_2$에 syringe pump를 이용해 drop으로 떨어뜨려 alginate 비드를 만들었다.

다. agarose-CNBr에 공유결합법: CNBr-agarose gel(CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow, Amersham-Pharmacia Biotech, Sweden)을 1mM HCl에 넣고 하루동안 swelling 시켰다. 이것을 1mM HCl 1 L로 세척하고 pH 8.3의 coupling buffer로 세척하였다. 이 gel을 10 ml arabinose isomerase과 섞고 4℃에서 12시간 동안 반응시켜 효소와 gel이 coupling되게 하였다. 이 gel을 serial buffers에 세척하였다.

라. microencapsulation: 10 ml arabinose isomerase를 silica gel, CMC, sodium alginate에 고정화한 후 1% glutaraldehyde를 50 mM Tris/HCl 완충용액 pH 7에서 1시간 동안 처리하였다.

## 6. L-Arabinose isomerase 효소반응 최적화

고정화 방법으로는 재조합 L-arabinose isomerase의 조효소액 10 mL을 5.0% sodium alginate와 혼합하여 0.2 M의 $CaCl_2$용액에 syringe pump와 진공 pump를 사용하여 고정화 비드를 제작하였고 비드의 크기는 2.0 mm이었다.

가. 최적 온도: 기질 0.5 ml (galactose 10 g/L)에 내열성 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 pH 8.0, 50 mM Tris-HCl 완충용액 내에서 조사하였다. 자유효소는 40℃에서 80℃까지, 고정화 효소는 50℃에서 80℃까지 30분간 반응시켰다.

나. 최적 pH: 기질 0.5 ml (galactose 10 g/L)에 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 65℃에서 pH를 자유효소는 4에서 10까지, 고정화 효소는 6에서 10까지 30분간 반응시켰다. 사용한 완충용액은 pH 4-6에서는 maleate-NaOH 완충용액, pH 6-7에서는 phosphate-NaOH 완충용액, pH 7-9에서는 Tris-HCl완충용액, pH 9-10에서는 borate-NaOH 완충용액을 사용하였다.

다. 무기염 영향: 기질 0.5 ml (galactose 10 g/L)에 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 pH 7.5, 50 mM Tris-HCl 완충용액에서 온도를 65℃에서 여러 가지 무기염 각각을 1 mM 첨가하여 30분간 반응시켰다.

라. 자유 효소와 고정화 효소의 pH 안정성: 기질 0.8 ml (galactose 10 g/L)에 L-arabinose isomerase 0.2 ml 첨가하여 60℃에서 여러 pH에서 여러 시간동안 반응시켰다.

마. 자유 효소와 고정화 효소의 온도 안정성: 기질 0.8 ml (galactose 10 g/L)에 내열성 L-arabinose isomerase 0.2 ml 첨가하여 pH 8에서 자유 효소와 고정화 효소의 온도를 50℃에서 80℃까지 여러 시간 동안 반응시켰다. 사용한 완충용액은 Tris-HCl 완충용액이었다.

바. L-Arabinose isomerase의 자유효소와 고정화 효소의 활성비교: 10 mg 단백질을 50 ml galactose(100 g/L, 60℃, pH 8 Tris-HCl 완충)용액에 넣고 자유

galactose isomerase, 고정화 galactose isomerase의 활성 비교하였다.

### 7. 균체반응 최적화

가. 세포고정화: 세포고정화를 위하여 10 mL 세포 용액을 10 mL sodium alginate (Yakuri Pure Chemicals Co., Kyoto, Japan)와 섞은 후 syringe pump (74900 Cole Parmer, IL, USA)를 사용하여 혼합액을 진공을 걸어주면서 과량의 0.2 M $CaCl_2$ 용액에 떨어뜨려 혼합하여 고정화 균체를 제조하였다. Alginate beads의 경도를 증가시키기 위해 다른 3배 부피의 0.2 M $CaCl_2$ 용액에 옮긴 후 4°C에서 느리게 밤새도록 혼합하였다. alginate beads를 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer로 4°C에서 30분간 혼합 후 두 번 세척하였다. 최종 alginate와 균체 농도는 적당히 조절하여 사용하였다.

나. Alginate 농도 최적화: Alginate 농도가 타가토스 생산에 미치는 영향은 최종 농도를 1.5에서 3.0 %로 변화시켜 조사하였다. 고정화 세포의 활성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10g/L galactose에서 20시간 동안 60°C에서 3.4% (w/v) 균체농도에서 측정하였다.

다. 고정화 균체농도 최적화: 고정화 균체에서 균체 농도가 타가토스 생산에 미치는 영향은 2.1 %, 2.8 %, 3.4 %, 4.1 %, 5.4%, 6.7%에서 수행하였다. 비교를 위하여 같은양의 균체로부터 효소를 얻어 실험을 수행하였다.

라. 온도 최적화: 고정화 세포와 유리 세포의 최적온도와 열안정성을 조사하기 위하여 50°C에서 80°C까지 변화시키며 여러 시간 별로 활성을 측정하였다.

마. pH 최적화: 고정화 세포와 유리 세포의 최적온도와 pH안정성을 조사하기 위하여 pH를 4에서 10까지 변화시키면서 여러 시간 별로 활성을 측정하였다. 60°C에서 다른 pH buffer를 사용하였다. 사용한 buffer는 다음과 같다. 50 mM maleate-NaOH (pH 4-6), 50 mM phosphate-NaOH (pH 6-7), 50 mM

Tris-HCl (pH 7-9), and 50 mM borate-NaOH (pH 9-10).

사. 무기염 최적화: 여러 가지 금속염 효과는 1 mM 을 첨가하여 살펴보았다. 고정화 세포와 유리 세포의 활성은 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer 용액에서 60°C로 하여 5시간 반응 조사하였다.

아. 비교실험: 자유 효소, 고정화 효소, 자유 세포, 고정화 세포를 같은 양의 배양 균체량으로부터 타가토스 생산을 수행하여 비교하였다.

## 8.생물반응기 작동

가. 고정화 효소: Galactose isomerase를 2.5% 또는 4% alginate에 포괄시킨 후 고정화시켰다. 고정화 효소의 alginate 비드를 packed-bed bioreactor에 충진하여 사용하였다. 사용한 생물반응기는 소형으로는 반응액을 15 ml로 하여 XK16 (Pharmacia Biotech, UK; 직경 16 mm, 높이 130 mm)을 사용하였다. 고정화 효소는 10%, 30% 용액은 각각 4 ml/h, 7.5 ml/h로 하여 연속적으로 첨가하였다. 50% 용액은 4 ml/h recycling 시켜 24시간 마다 반응액을 교환해 주었다. 고정화 효소가 충진된 생물반응기에서 타가토스의 생산성을 향상시키기 위하여 유속, 효소농도, 기질농도 등을 최적화하였고, 작동안정성을 알기 위하여 40일간 타가토스 생산을 시도하였다.

나. 고정화 균체: Alginate beads에 포괄된 균체를 생물반응기 (XK 16, Armersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 충진하여 타가토스 생산에 사용하였다. 반응기의 작동 부피는 20 mL이고 높이와 직경은 각각 200 mm와 16 mm이었다. Galactose는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 용액에 녹여 그 농도를 50, 100, 200, 300, 400 g/L로 하였고, 희석율 0.025, 0.05, 0.75, 0.10, 0.15 $h^{-1}$로 조절하여 peristaltic pump로 반응기에 주입하였다. 반응온도는 water circulator (Eyela NTT-1200, Tokyo, Japan)를 사용하여 60°C로 유지하였고 연속 생산을 위하여 여러 농도의 galactose 용액 700 mL을 연속적

으로 주입하고 밖의 reservoir에 연속적으로 배출하였다. 고정화 균체가 충진된 생물반응기에서 타가토스의 생산성을 향상시키기 위하여 유속, 효소농도, 기질농도 등을 최적화하였고, 작동안정성을 알기 위하여 40일간 타가토스 생산을 시도하였다.

## 9. Tagatose 정제

가. 효소반응액을 Dowex 50W-X2($H^+$)와 Dowex($CO_3^{-2}$)의 column을 통과시켜 이온 성분을 제거하였고 이온이 제거된 용액을 진공 농축하여 점액성 물질을 얻었고 이것을 99.9%의 에탄올을 첨가하여 흰색의 결정을 얻었다.

나. 이온교환수지가 장착된 MPLC(medium pressure liquid chromartography)를 이용하여 갈락토스와 타가토스를 분리하여 타가토스 부분만 분취하였다. 타가토스 용액을 활성탄 처리를 한 후 여과한 후 농축하고 동결건조하였다. 이때, 이온교환수지는 Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410를 20L 규모로 충진하여 YAMAGEN MPLC YFLC-700와 함께 사용하였고 유속은 100 mL/min이었다 (Fig. 4). D-tagatose 정제의 전체적인 과정은 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 4. MPLC with Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410 resin (20L)

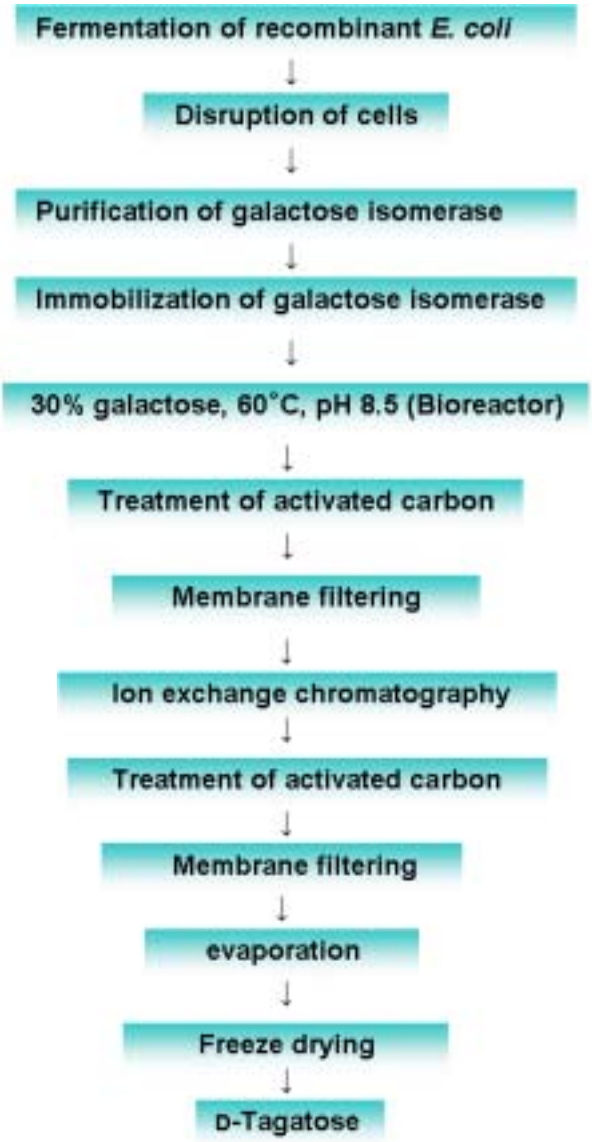



Fig. 5. Purification procedure of D-tagatose

## 9.스크리닝및분석

Agar plate ( 20 mg/ml LB 배지, 50 μg/ml ampicillin, 15 mg/ml agar)에서 자란 colonies를 50 μg/ml ampicillin와 50 μl LB배지가 포함된 96-well plates에 옮긴 후 37°C에서 한시간 동안 배양하여 galactose isomerase의 expression을 수행하였다. ELISA reader (Bio-rad, USA)를 사용하여 희석액의 OD(600 nm)를 측정하였다 (D1). 50 μl galactose 용액(10 g/L)을 96-well plate에 첨가한 후 60°C에서 6시간 동안 처리하여 세포 lysis와 타가토스 전환을 수행한후 희석액의 OD(560 nm)를 측정하였다 (D2). 타가토스를 측정하기 위하여 황산/cysteine/carbazole 용액을 첨가한 후 희석액의 OD(570 nm)를 측정하였다 (D3). 상대활성은 (D3-D2)/D1으로 측정하였다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford 법으로 측정하였다. 타가토스와 갈락토스 농도는 C18-amine column (KR100-10NH2, Kromasil, Bohus, Sweden)을 사용하여 RI detector (RID-10A, Shimadzu)가 장착된 HPLC (Shimadzu SCL-10A, Kyoto, Japan)로 측정하였다. 이 coulum은 35°C에서 80% acetonitrile를 2 mL/min 속도로 흘려주었다.

# 제 2 절 연구내용 및 결과

## 1. 유당 분해 전환 효소 반응 최적화

*Kluveromyces lactis*의 β-galactosidase 유전자와 *Thermotoga martima* 의 β-galactosidase 유전자를 각각 *E. coli*에 cloning하였다(Fig. 6, Fig, 7). 이 유전자를 발현시켜 L-arabinose isomerase를 생산하였고 생산된 효소를 His-tag Affinity column을 이용하여 imidazole 농도차로 *Kluveromyces lactis*와 *Thermotoga martima* β-galactosidase를 정제하였다.

정제된 *Kluveromyces lactis*와 *Thermotoga martima* β-galactosidase의 특성을 살펴보았다. 그 결과 재조합 *K. lactis* β-galactosidase의 최적온도는 *o*NPG는 37℃ lactose는 40℃이었고 (Fig. 8), 최적 pH는 모두 7.0이었고 (Fig. 9) $Mn^{+2}$가 가장 좋은 활성을 보여 주었다 (Fig. 10). *K*m와 *V*max값은 *o*NPG 경우는 1.53 mM, 562 mole/min-mg이고 lactose 경우는 19.8 mM, 569 mole/min-mg를 나타내었다(Fig. 11, Table 1). 100g/L lactose와 300 g/L lactose가 300분에 분해되었다(Fig. 12).

정제된 *Thermotoga martima* β-galactosidase의 특성을 살펴보았다. 최적온도는 lactose의 경우 80℃, *o*NPG의 경우 85℃ (Fig. 13), pH는 두 경우 모두 6.5 (Fig. 14), 무기염은 lactose의 경우 $Mg^{+2}$가 최적이었고 *o*NPG의 경우 $Mn^{+2}$이 최적이었다(Fig. 15). 내열성 실험에서는 효소활성은 1차반응을 보였고 85℃와 90℃에서의 반감기는 각각 94분과 30분을 보였다(Fig. 16). *K*m와 *V*max값은 *o*NPG 경우는 80℃에서 각각 0.33 mM, 79.6 mole/min-mg이고 lactose 경우는 10 mM 이하 저농도에서는 1.6, 66.3이었고 고농도에서는 27.8, 139를 나타내었다 (Fig. 17, Fig. 18, Table 2).

I-----*Klac* β-*gal*----I Leu-Glu-His6

***Nde*** **I** ***Xho*** **I**

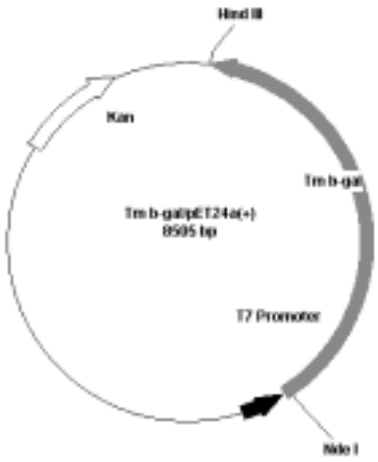
*Vent* DNA polymerase (NEB)

5′-primer with *Nde*I:AGAGTCTGCATATGTCTTGCCTTATTCCTGAG **AT**

(A**A**T [N ] A**T**T [I ]) 3′-primer with

*Xho*I:ACTAATCTCGAGTTCAAAAGCGAGATCAAACTCA

Fig. 6. Cloning of *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase gene




I-----*Tm* β-*gal*----I Lys-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Glu-His6

*Nde* I *Hind* III

*Vent* DNA polymerase (NEB)

5′-primer with *Nde*I:AGAGTCTCCATATGAAGAATATGCCCTACGAATG

3′-primer with

*Hind*III:ACTATGAAGCTTCCTCACGTAGATAGTTTTTCTCGT

Fig. 7. Cloning of *Thermotoga martima* β-galactosidase gene

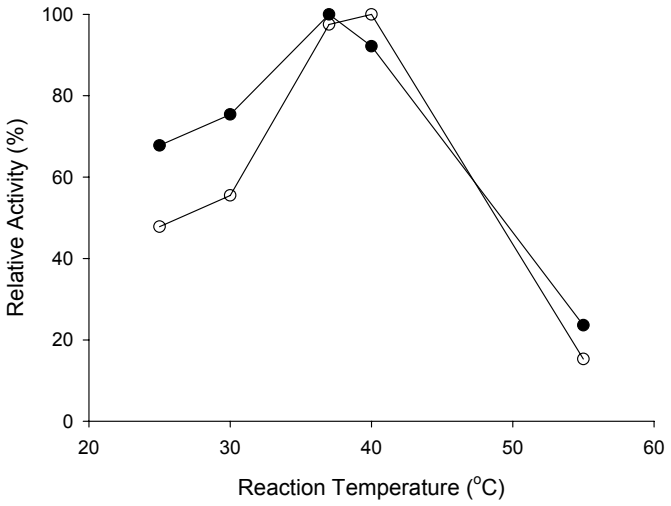



Fig. 8. Effect of temperature on *K. lactis* β-galactosidase activity for lactose (○) and *o*NPG (●).

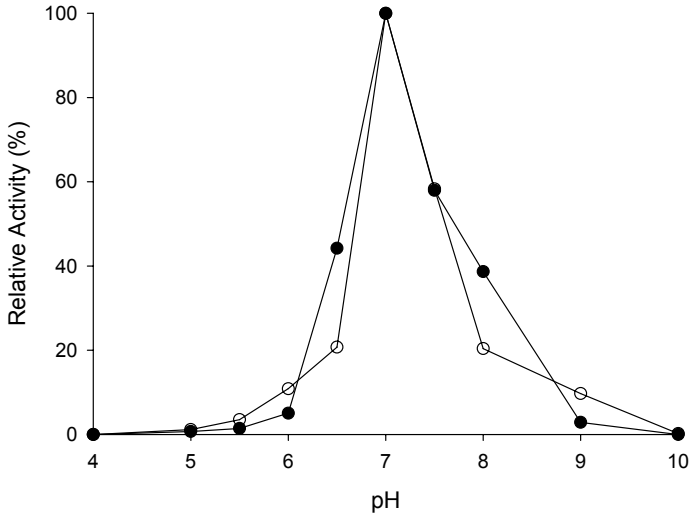



Fig. 9. Effect of pH on *K. lactis* β-galactosidase activity for lactose (○) and *o*NPG (●).

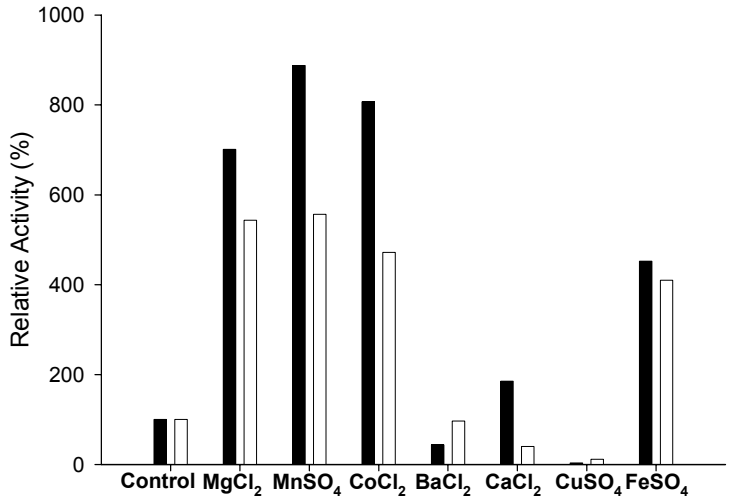



Fig. 10. Effect of divalent cations on *K. lactis* β-galactosidase activity for lactose (□) and *o*NPG (■).

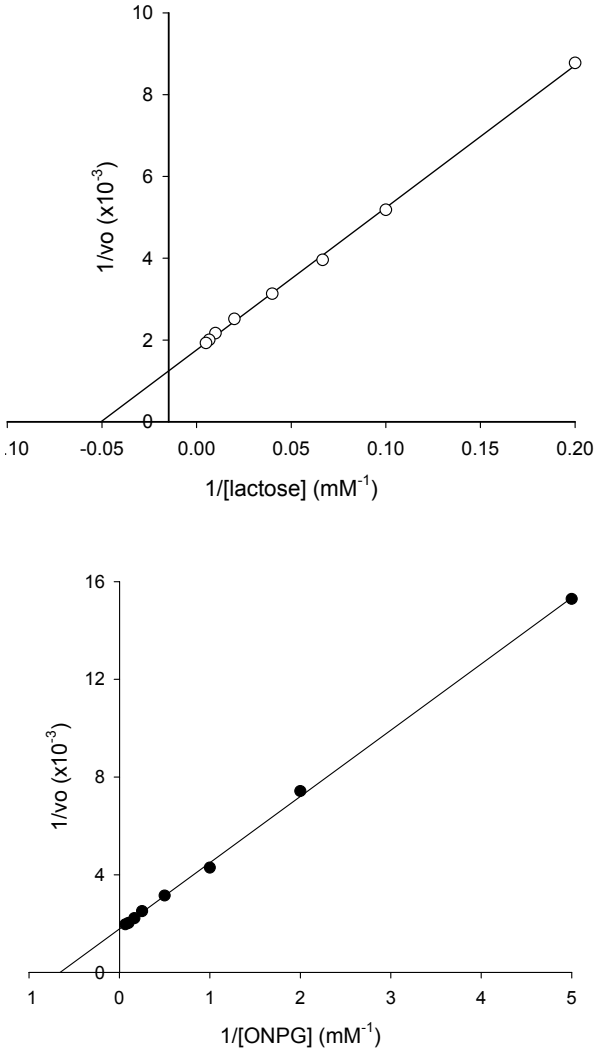



Fig. 11. Double-reciprocal plots on *K. lactis* β-galactosidase activity for lactose (○) and *o*NPG (●). The *K*m and *V*max values for *o*NPG were 1.53 mM and 562 mole/min-mg, and for lactose 19.8 mM and 569 mole/min-mg, respectively.

Table 1. Enzymatic properties of the recombinant *K. lactis* β-galactosidase purified using Ni-NTA agarose affinity chromatography comparing with a commercial preparation.

| Substrate | This work | | Commercial preparations[a] | |
|---|---|---|---|---|
| | *o*NPG | Lactose | *o*NPG | Lactose |
| Optimum temperature(℃) | 37 | 40 | 40[b] | — |
| Optimum pH | 7.0 | 7.0 | 6.6-7.0[b] | — |
| *K*m (mM) | 1.5 | 19.8 | 1.7[c] | 17.3[c] |
| *V*max (mol/min-mg) | 562 | 569 | 78[c] | 124[c] |

[a]Maxilact LX-5000 provided by Gist-Brocades (Seclin, Cedex, France),

[b]Zhou &Chen (2001),

[c]Cavaille & Combes (1995).

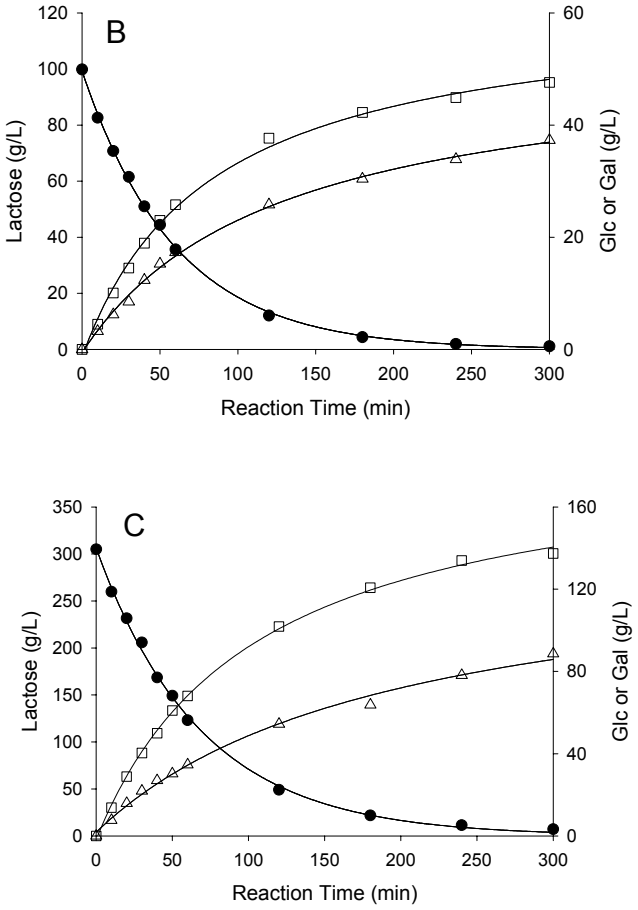



Fig. 12. Lactose conversion at 37℃ for 5 h with 10% (B), and 30% (w/v) lactose (C) by comparably increasing amount of the *K. lactis* β-galactosidaseas the increase of initial substrate concentration. lactose (●), glucose (□), and galactose (△), respectively.

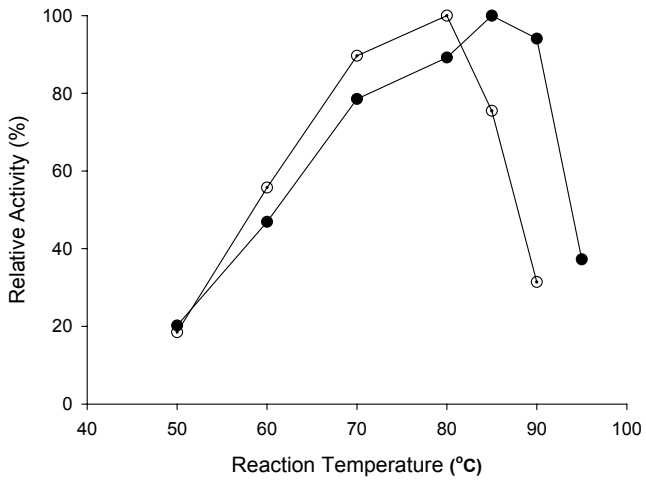



Fig. 13. Effect of temperature on *T. martima* β-galactosidase activity for lactose (○) and *o*NPG (●).

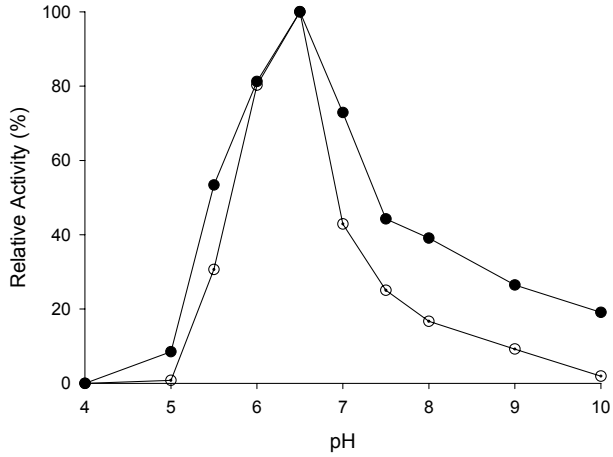



Fig. 14. Effect of pH on *T. martima* β-galactosidase activity for lactose (○) and *o*NPG (●).

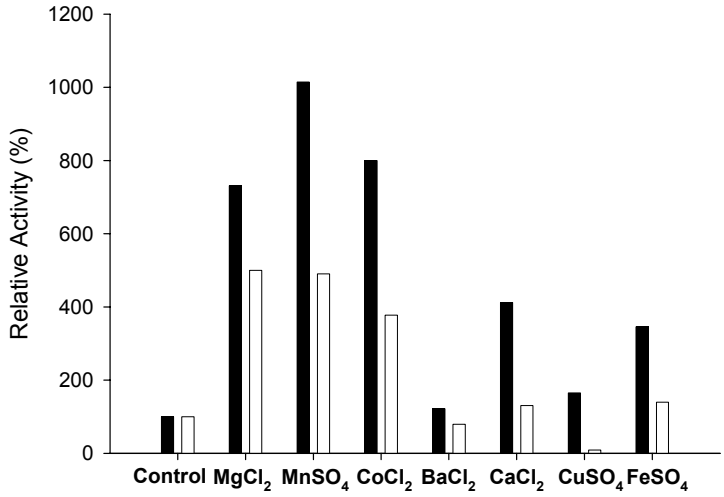



Fig. 15. Effect of divalent cations on *T. martima* β-galactosidase activity for lactose (□) and *o*NPG (■).

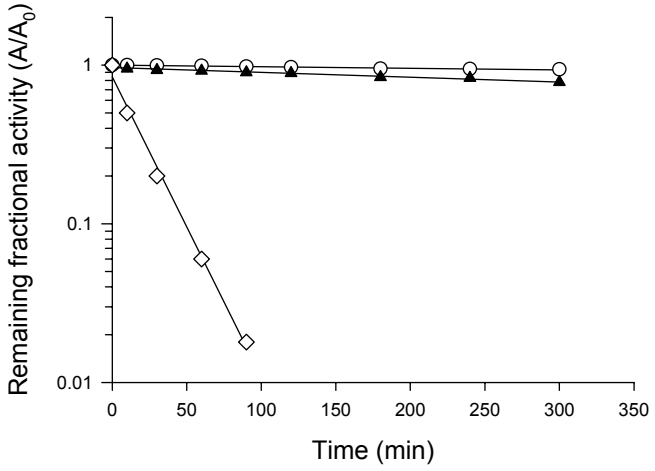



Fig. 16. Thermal inactivation of *T. martima* β-galactosidase at each temperature, where $A$ and $A_0$ are the remaining and the initial activities: 70 (○), 80 (▲), and 90°C (◇). The enzyme activity was assayed with 2 mM *o*NPG in buffer B at 60°C for 10 min.

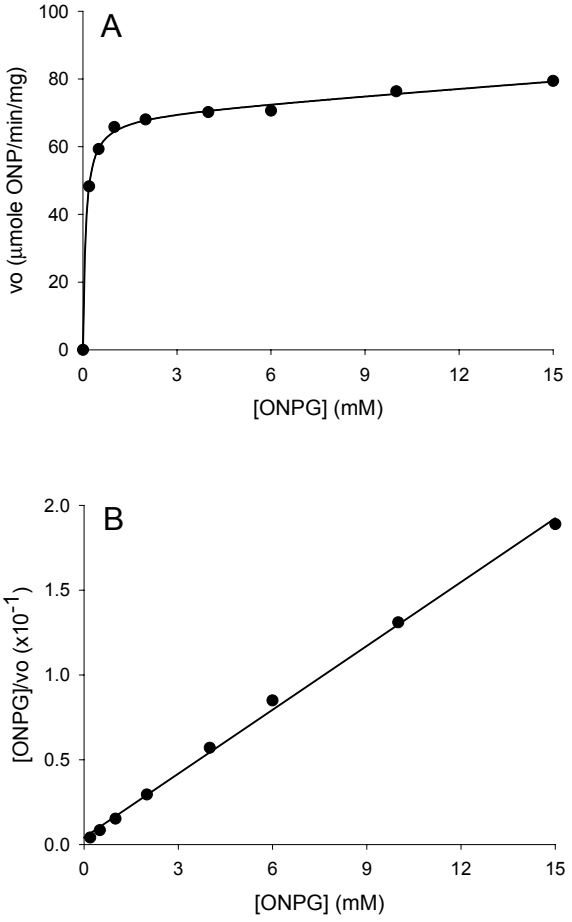



Fig. 17. Michaelis-Menten kinetic behavior reacted with *o*NPG at 80°C. (A) Michaelis-Menten (*S* vs. *V*) plot and (B) Hanes-Woolf plot (*S* vs. *S*/*V*). The $K_m$ and $V_{max}$ values for *o*NPG were 0.33 mM and 79.6 mole $min^{-1}$ $mg^{-1}$.

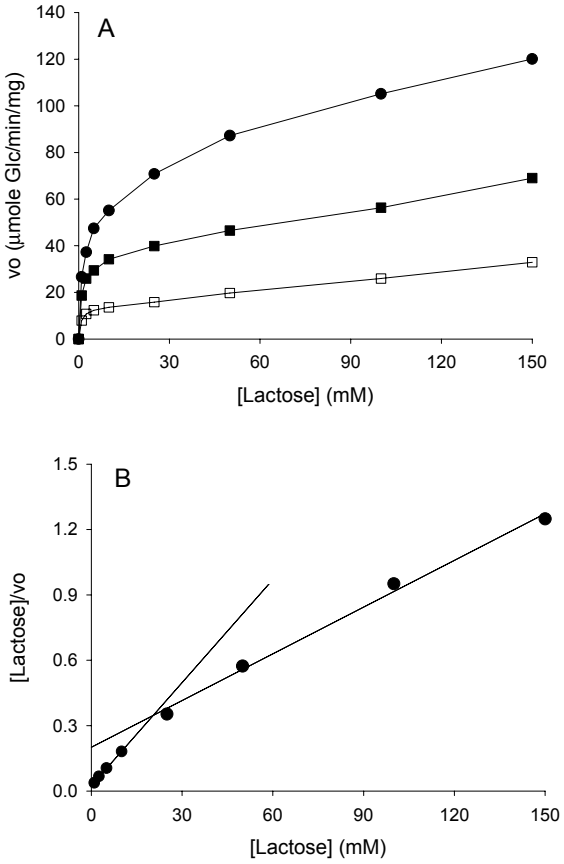



Fig. 18. Non-Michaelis-Menten kinetic behavior with substrate activation reacted with lactose at 80°C. (A) Michaelis-Menten ($S$ vs. $V$) plot at 40 (□), 60 (■), and 80°C (●) and (B) Hanes-Woolf plot ($S$ vs. $S/V$). The $K$m and $V$max values for lactose calculated at lower concentrations up to 10 mM, $K\mathrm{m}^{L}$ = 1.6 and $V\mathrm{max}^{L}$ = 63.3, and at higher concentrations the higher values, $K\mathrm{m}^{H}$ = 27.8 and $V\mathrm{max}^{H}$ = 139.

Table 2. Enzymatic properties of the recombinant *T. martima* β-galactosidase purified using Ni-NTA agarose affinity chromatography and gel filtration.

| | *o*NPG | Lactose |
|---|---|---|
| Optimum temperature (℃) | 85 | 80 |
| Optimum pH | 6.5 | 6.5 |
| *K*m (mM) | 0.33 | 1.60[a]<br>27.8[c] |
| *V*max (mol/min-mg) | 79.6 | 63.3[b]<br>139[d] |

The enzyme kinetic parameters for each substrate were calculated from Hanes-Woolf plots (*S* vs. *S*/*V*) of the Michaelis-Menten reaction equations. The *K*m and *V*max values for lactose are calculated at lower concentrations up to 10 mM ($^{a}K\mathrm{m}^{LH}$ and $^{b}V\mathrm{max}^{L}$) and at higher concentrations ($^{c}K\mathrm{m}^{H}$ and $^{d}V\mathrm{max}^{H}$).

## 2. 유당 분해 전환 효소의 선정

*Kluveromyces lactis*의 β-galactosidase, *Thermotoga martima* 의 β-galactosidase, lactozym 효소 (Novo사의 판매되는 β-galactosidase)의 유당분해 능력을 같은 단백질 농도에서 유당 300 g/L와 100 g/L에서 비교하였다 (Fig. 19). 그 결과 Lactozym이 유당 분해 능력이 가장 높았으며, 그 다음이 *Kluveromyces lactis*의 β-galactosidase 이었고 *Thermotoga martima* 의 β-galactosidase가 가장 낮았다.

Lactozym를 사용하여 유당분해조건을 농도별로 수행하였다. 400 g/L 유당에서는 1200 U를 사용하여 반응 4시간에 분해가 완료 되었고, 300 g/L 유당에서는 900 U를 사용하여 반응 4시간에 분해가 96% 되었고, 100 g/L 유당에서는 900 U를 사용하여 반응 1시간에 분해가 99% 되었다 (Fig. 20, Fig 21, Fig. 22). 확립된 유당분해 조건을 이용하여 유당가수 분해물로부터 galactose를 얻고 얻어진 galactose로 부터 타가토스를 생산할 예정이다.

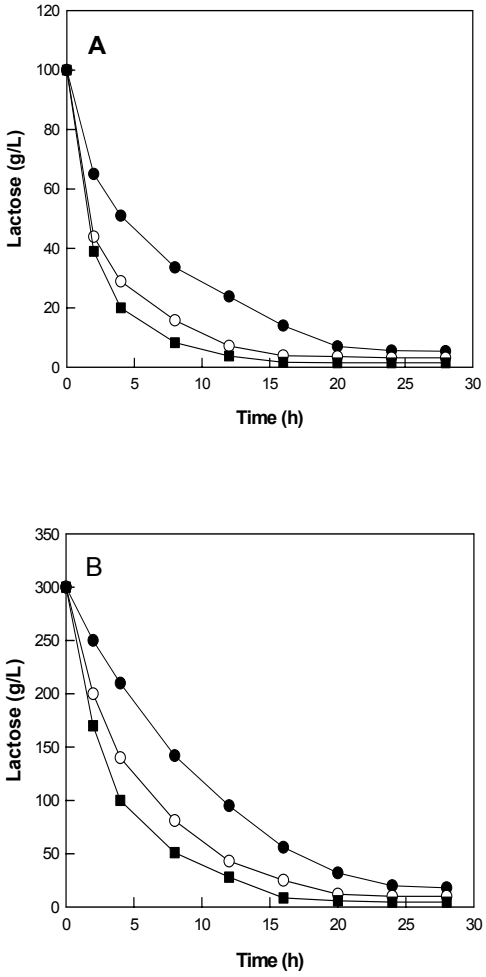



Fig. 19. Lactose hydrolysis by β-galactosidase of *Thermotoga martima* (●), β-galactosidase of *Kluveromyces lactis* (○), and lactozym (■) with 100 g/L lactose (A) and 300 g/L lactose (B).

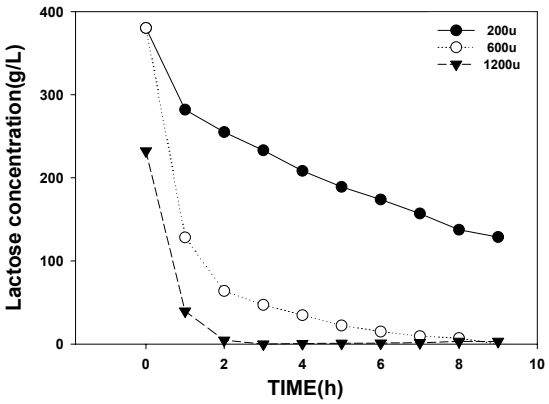



Fig. 20. Effect of enzyme unit on lactose hydrolysis by lactozym with 400 g/L lactose.

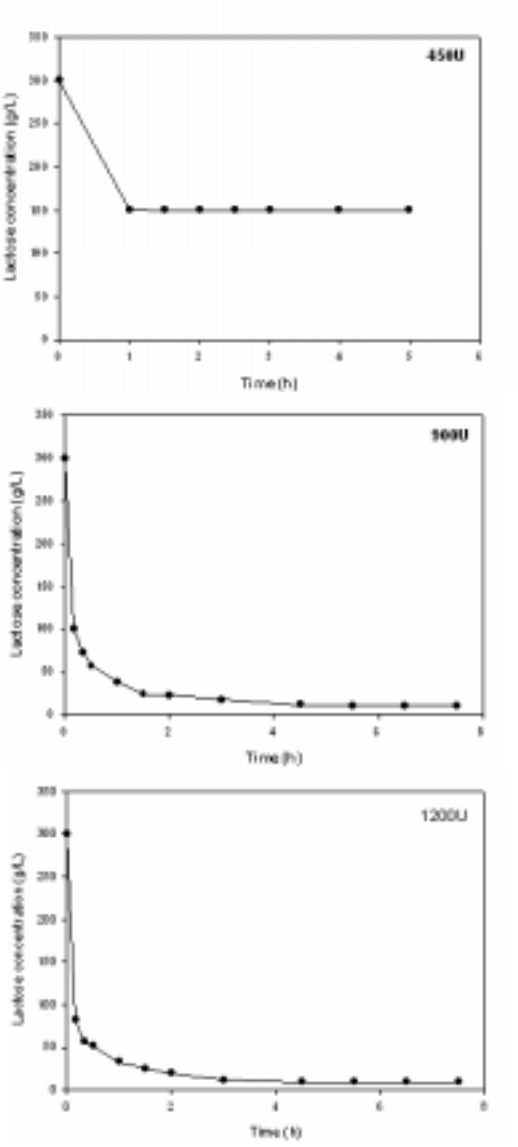



Fig. 21. Effect of enzyme unit on lactose hydrolysis by lactozym with 300 g/L lactose.

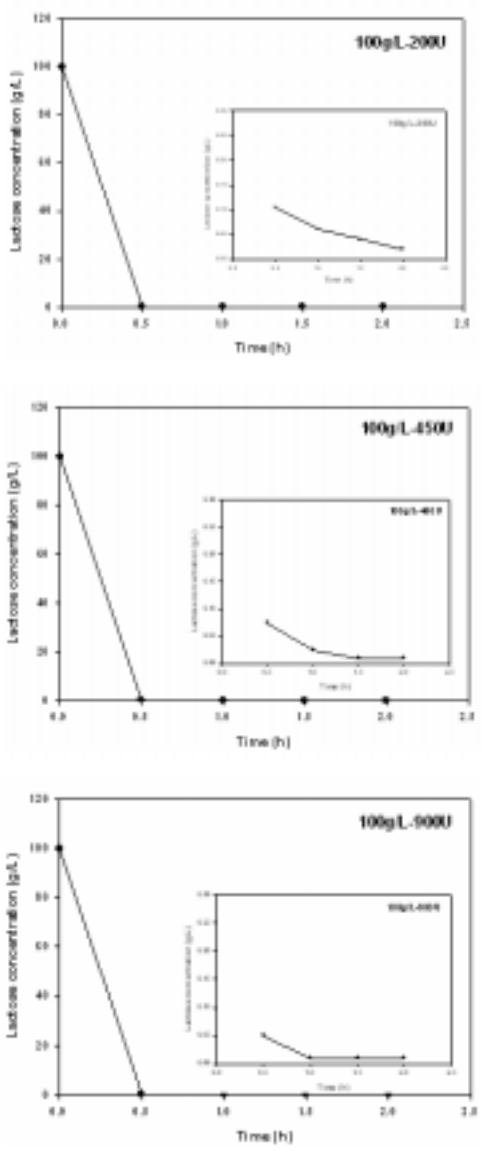



Fig. 22. Effect of enzyme unit on lactose hydrolysis by lactozym with 100 g/L lactose.

## 3. 균주선별 및 효소 유전자 클로닝

가. 균주선별

고온 환경의 토양으로부터 분리된 미생물을 대상으로 신규한 내열성 galactose isomerase 유전자를 확보하기 위하여 고온미생물 CBG-A1의 세포추출물을 이용하여 cystein-carbazole-황산 발색법을 이용하여 갈락토오스로부터 타가토소의 생산효소활성을 측정하였다. 실험결과 60도씨에서 성장 가능한 48종의 고온 미생물과 70도씨에서 성장 가능한 15종의 고온 미생물로 부터 내열성 galactose isomerase활성을 확인할 수 있었다. 이들 중 효소활성이 비교적 높게 확인된 70도씨 성장균인 CBG-A1(#29) 균주가 60도와 70도씨에서 효소활성이 가장 높게 측정되었다 (Fig. 23).

타가토스 생물전환을 위한 신규 내열성 galactose isomerase 유전자를 발굴하기 위해 고온 환경의 토양으로부터 채취한 토양현탁액을 분리배지에 도말하여 70도씨 이상에서 성장 가능한 미생물을 분리하였다. 분리배지로는 3%의 한천을 포함하는 LB 배지를 이용하여 70도씨에서 하룻동안 배양하여 형성된 균집락을 순수 분리배양 하였고 LB 액체배지에서 배양한 후 원심분리하여 얻은 균체를 Tris-HCl (pH 8.0) 완충액에 현탁한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 균체를 파쇄한 후 원심분리 상청액을 효소활성 측정을 위한 조효소액으로 이용하였다.

효소활성의 측정은 55도씨에서 갈락토오스를 기질로 하여 분당 1㎛M의 타가토스를 생성시키는 단백질의 량을 1 unit로 하였으며, 타가토스 표준물질을 기준으로 하였다. 단백질농도 결정은 BCA Bio-Rad 단백질 정량 kit를 이용하여 측정하였고 표준 단백질로는 Bovine serum albumin을 기준으로 하여 정량하였다. 분리균은 16S rRNA 염기서열 분석 및 생물학적, 생화학적 특성을 조사하여 분류 동정하였다. 동정결과 분리균은 *Geobacillus thermodenitrificans*와 98%의 상동성 (Fig. 24)을 나타내어 본 연구결과의 분리균을 *Geobacillus thermodenitrificans*로 동정하고 *Geobacillus thermodenitrificans* CBG-A1로 명명하였다.

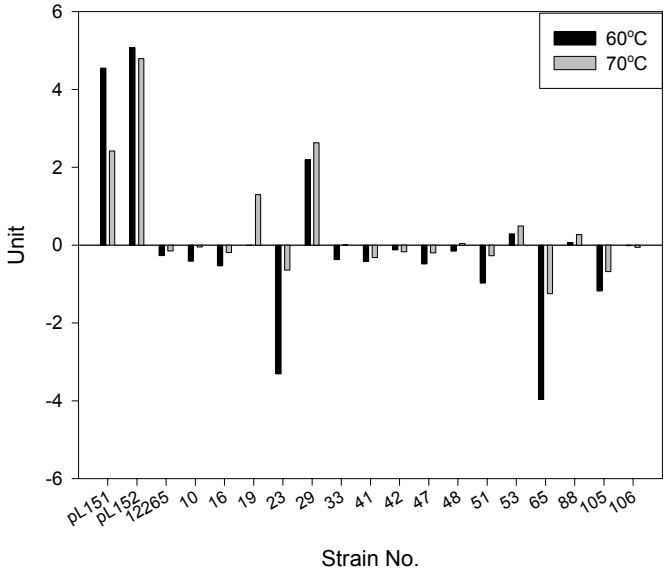



Fig. 23. 토양으로부터 분리된 고온미생물의 갈락토오스 이성화효소 활성측정

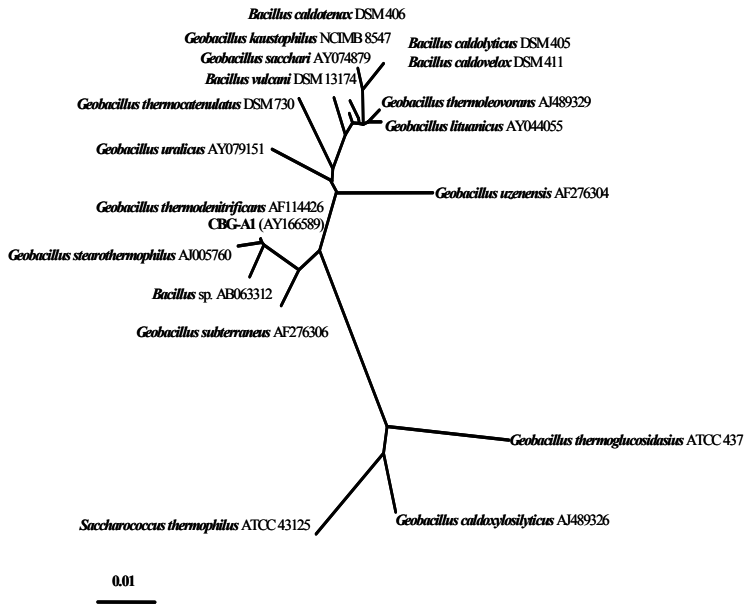



Fig. 24. 분리균 CBG-A1의 16S rRNA 염기서열을 이용한 분류계통 분석

분리균의 형태학적 생리적 특성을 *G. streathermophilus*및 와 *G. thermodenitrificans*비교한 결과 Table 3에 나타내었다. 또한 이 균주를 65℃에서 5 liter 발효조에세 14시간 배양한 결과를 Fig. 25에 나타내었다. 균체는 600nm에서 OD 1.25까지 성장하였고 galactose isomerase 활성이 0.28 U/mg까지 나타내었다.

나. 효소 유전자의 클로닝

*Geobacillus thermodenitrificans* CBG-A1으로부터 신규 내열성 galactose isomerase 유전자를 클로닝하기 위하여 genomic DNA를 분리하였으며, 분리된 DNA를 주형으로 하여 genomic DNA를 분리한 후 gene-specific primer (araA-*BamH* I 5′-cgcgggatccatgatgctgtcattacgtcctt-3′, araA-*Hind*Ⅲ 5′-cgcgaagcttttaccgcccccgccaaaacac-3′)를 이용하여 유전자 특이적 primer를 이용한 PCR을 수행하였다. 증폭된 1.5 kb의 목적 유전자의 PCR product는 정제하여 이후의 클로닝 작업에 이용하였다. 얻어진 효소유전자는 T4 DNA ligase를 이용하여 클로닝 벡터인 pGEM T-easy에 삽입하였으며 대장균 DH5α에 transformation 한 후 lacZ gene의 α-complementation을 이용하여 선택적으로 삽입유전자 클론을 분리하였다. 분리 배지로는 ampicillin, X-gal, IPTG가 첨가된 LB 한천 평판배지를 이용하였으며 유전자가 삽입된 white colony 만을 선택적으로 분리하였다. 분리된 균집락은 ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서 배양한 후 plasmid를 분리하여 제한효소로 삽입유전자를 확인하였으며, 순수 정제된 plasmid는 제한효소를 이용하여 삽입유전자를 확인한 후 유전자 서열을 분석하였다. 확인된 1.5 kb의 염기서열은 NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 유전자 상동성을 조사한 결과 *Geobacillus stearothermophilus* 유래의 galactose isomerase 유전자와 85%의 염기 상동성과 98%의 아미노산 상동성을 보이는 것으로 확인되었다 (Fig. 26). CBG-A1으로부터 확보된 내열성 galactose isomerase는 유전자를 과발현 하기 위하여 발현 벡터인 pLex와 pHCE19T(II)에 삽입(Fig. 27)하여 IPTG 유도없이 T7 promotor 조절

하에서 유전자를 발현 하였고 SDS-PAGE gel를 이용하여 발현정도를 검증하였다. 또한 벡터의 발현 특이성을 조사한 결과에서는 pET 벡터에서 발현율이 가장 높은 것으로 SDS-PAGE에 의해 확인되었으나 inclusion body 형태로 발현되었고 세포내 soluble protein으로의 발현유도를 시도하였으나 비효소활성이 아주 낮게 확인되었고, pHCE19T(II) 벡터에서는 효소활성이 높게 확인되었으나 발현율에서는 pET 벡터보다 낮게 발현되는 것으로 확인되었다.

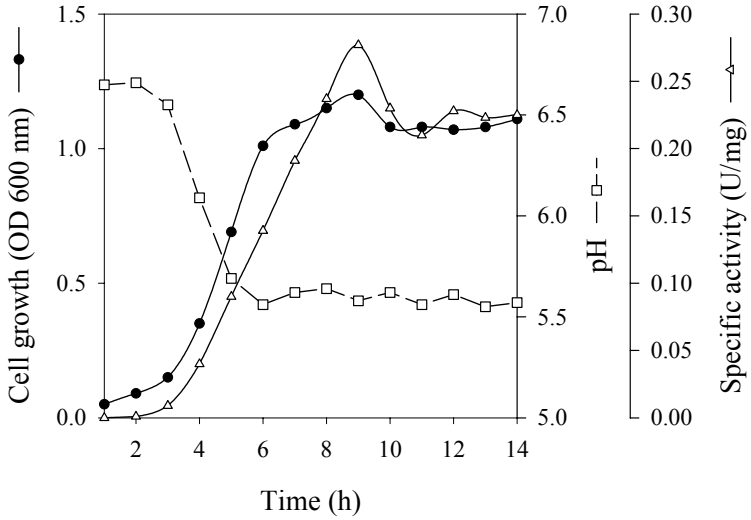



Fig. 25. Time course of thermostable L-arabinose isomerase (araA) from *G.. thermodenitrificans* CBG-A1 in MY medium.

Table 3. Identification of the isolated strain CBG-A1

| Characteristics | CBG-A1 | *G. stearothermophilus** | *G. thermodenitrificans** |
|---|---|---|---|
| Shape | Rod | Rod | Rod |
| Size (width × length, μm) | 0.6-1.2 ×1.6-3.5 | 0.6-1.0 × 2-3.5 | 0.5-1.0 × 1.5-2.5 |
| Motility | − | + | − |
| Gram stain | + | + | + |
| Spore | +(central) | + | + |
| Catalase test | + | + | + |
| Production of acid from: | + | + | + |
| Glycerol | + | + | + |
| Arabinose | + | D | + |
| Ribose | + | ND | + |
| Xylose | + | D | + |
| Cellobiose | + | − | + |
| Lactose | W | − | + |
| Starch | W | + | + |
| Glucose | + | + | + |
| Galactose | − | − | + |
| Anaerobic growth | − | − | − |
| Temperature range (°C) | 45 75 | 40 65 | 45 70 |

+, Positive reaction; −, negative reaction; D, 11-89% of strains are positive; ND, not determined w, weak

*, Citation from Bergy's manual.

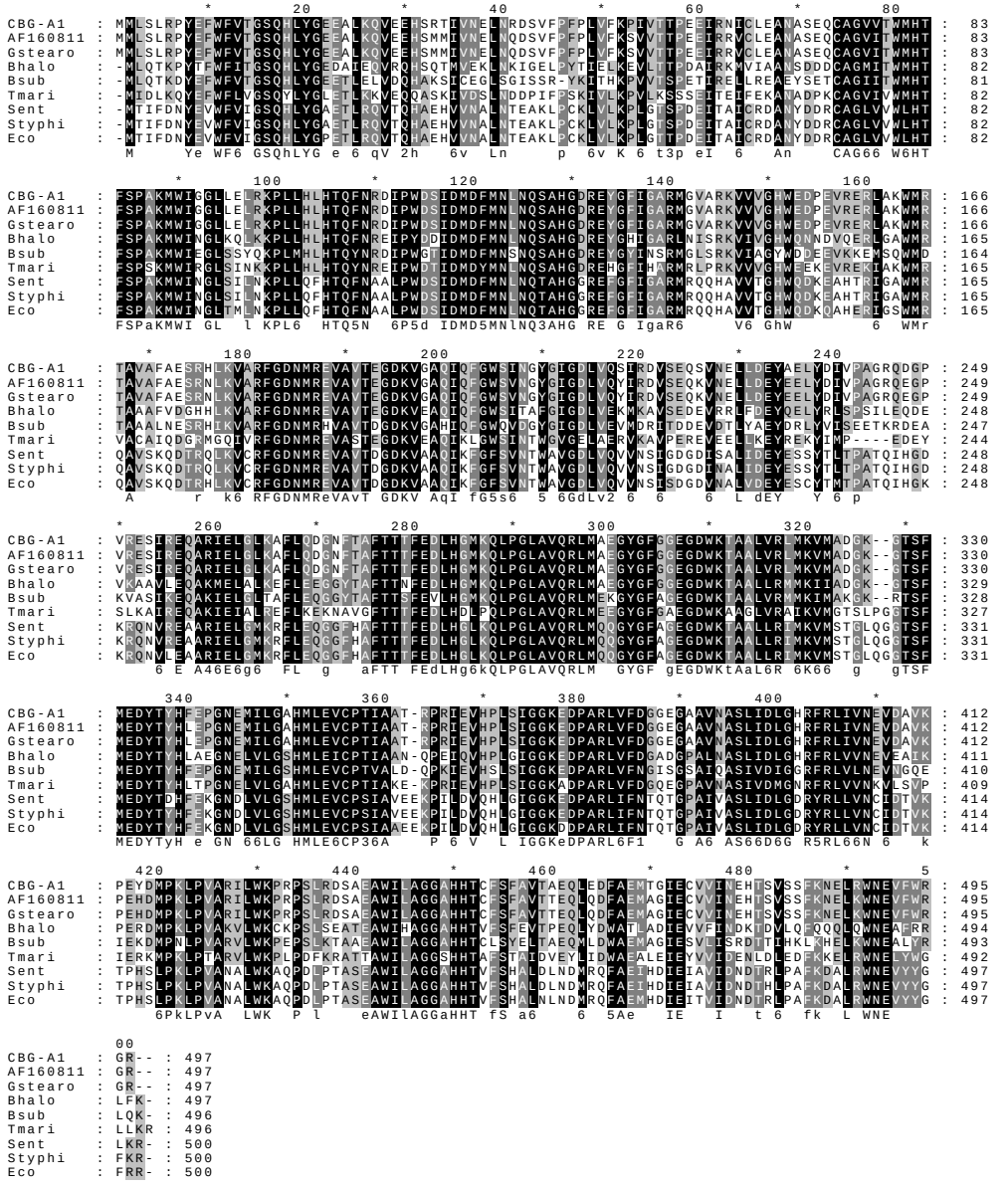


Fig. 26. 내열성 갈락토오스 이성화 효소의 아미노산 염기서열 분석

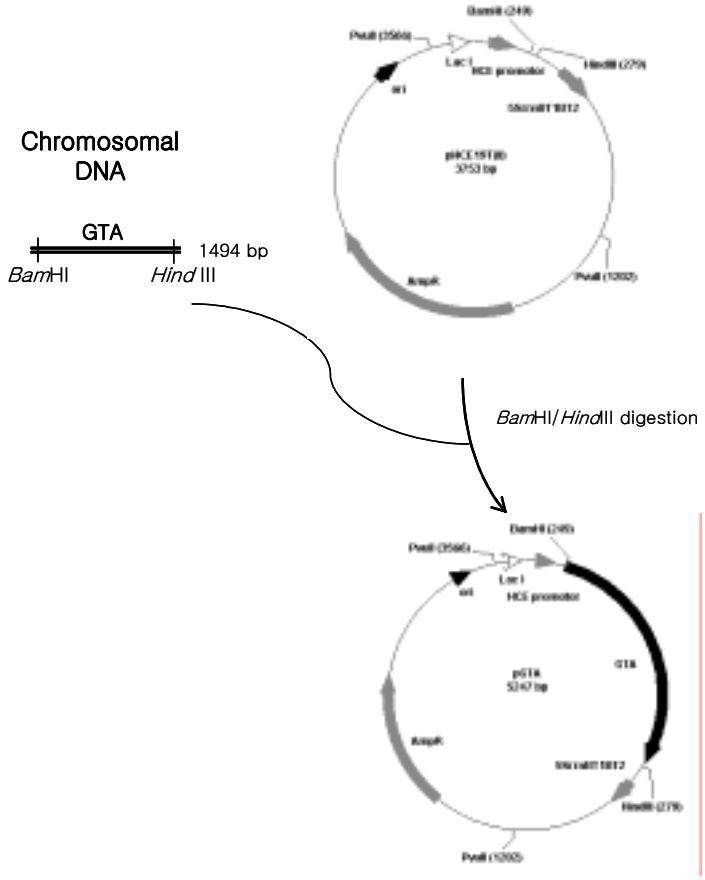



Fig. 27. CBG-A1으로부터 갈락토오스 이성화 효소의 클로닝

## 4. 효소 돌연변이에 의한 효소 활성 증가

### 가. *Geobacillus stearothermophilus* L-arabinose isomerase

효소활성의 비교는 *G. stearothermophilus* 유래의 갈락토오스 이성화 효소 유전자를 가지는 pL151과 돌연변이 유전자를 가지는 pL152 효소유전자를 비교하였다. *Geobacillus stearothermophilus* 유래의 재조합 내열성 L-arabinose isomerase 아미노산 서열을 분석한 결과 Fig. 28과 같다. 밑줄 친 부분은 첫 error-prone PCR을 수행한 결과 pL152가 발현된 변화된 아미노산 위치이다.

2번의 error-prone PCR을 한 결과 이중 393번 아미노산은 중복되어 7개의 아미노산이 변화되었다 (Table 4). 변화된 위치의 아미노산만 특정하게 변경시키기 위하여 primer들을 제작하여 사용하였다 (Table 5).

7개의 변화된 아미노산을 각각 wild에서 한 개씩 변화시켜 Table 6에 나타내었다. 408번 아미노산을 변화시켰을때 활성이 가장 많이 증가하였고 2배 이상 증가한 아미노산 변화 위치는 475, 322, 428번 이었다. 타가토스 생산 활성에 영향을 크게 미치는 아미노산인 408, 475, 322, 428번의 4개의 아미노산 site를 2개씩 조합하여 두 개의 아미노산이 변화되었을때 타가토스 생산 활성을 측정하였다 (Table 7). 그 결과 408번과 475번 조합이 가장 타가토스 생산 활성에 영향을 주는 아미노산 위치임을 알았다.

그러므로 408번과 475번의 아미노산의 크기를 조절하기 위하여 크기별 여러 아미노산을 치환하여 타가토스 활성을 측정하였다. 408번의 경우 R group의 크기가 $CH_3$ 정도가 가장 적당하였고 이 보다 크기가 작거나 크면 타가토스 생성 활성이 떨어짐을 알 수 있어 408번이 alanine일때 활성이 최대임을 알았다 (Table 8, Fig. 29). 475번의 경우 R group의 크기가 탄소3개 질소 1개 정도가 가장 적당하였고 이 보다 크기가 작거나 크면 타가토스 생성 활성이 떨어짐을 알 수 있어 475번이 lysine일때 활성이 최대임을 알았다 (Table 8, Fig. 30).

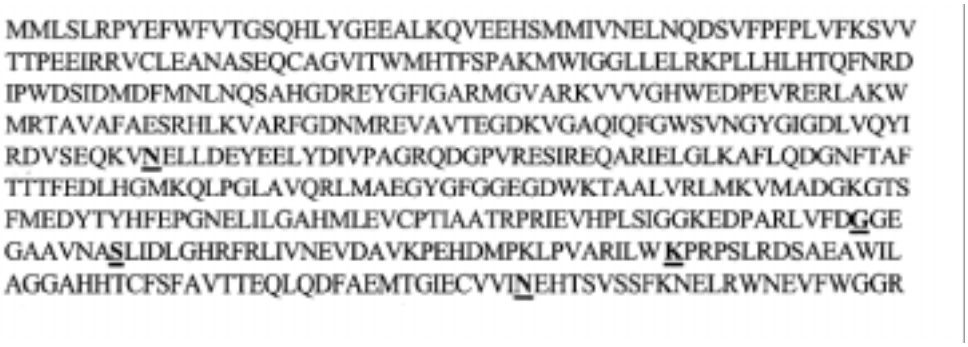



Fig. 28. The amino acid sequences of galactose isomerase

Table 4. 2번의 error-prone PCR 결과 변화된 아미노산.

| Round | Relative activity | Mutation sites |
|---|---|---|
| Wild(pL151) | 100 | |
| 1st(pL 152) | 573 | Asn228→Asp, Gly384→Asp, Ser393→Thr, Lys428→Asn, Asn475→Lys |
| 2nd(pL 153) | 866 | Met322→Val, Ser393→Thr, Val408→Ala |

Table 5. Oligonucleotides used in this study

| Oligonucleotides | Usage |
|---|---|
| GCCCTGAAGAAGGGCTTTATTTGA | For nascent N-terminal GSAI |
| TTAACCAATGATGCTGTCATTACGTCC | For nascent N-terminal GSAI with the restriction site removal |
| CCCTGTACGATTACTGCAGGTGC | For nascent C-terminal GSAI |
| CATCGAGCAACTCGTCCACTTTTTGTTCAG | Mutagenesis for D228N |
| CTTTGCCATCGGCCACCACTTTCATCAAC | Mutagenesis for V322M |
| CGCGCCTCGCCGTCGTCAAACACGAG | Mutagenesis for D384G |
| CTAAATCGATCAGCGTAGCATTGACCGCC | Mutagenesis for T393S |
| GTTTCACCGCATCGGCTTCATTGACAATGAG | Mutagenesis for A408V |
| GCGACGGGCGCGGGTTCCATAAAATGCG | Mutagenesis for N428K |
| CGGACGTATGTTCCTTGATCACGACGCAT | Mutagenesis for K475N |
| GACGGACGTATGTTCCTGGATCACGACGCATTC | Mutagenesis for Q475N |
| GACGGACGTATGTTCACGGATCACGACGCATTC | Mutagenesis for R475N |
| GGTTTCACCGCATCGCCTTCATTGACAATGAGAC | Mutagenesis for G408V |
| GGTTTCACCGCATCCTTTTCATTGACAATGAGAC | Mutagenesis for A408V |
| GACGGACGTATGTTCNNNGATCACGACGCATTC | Mutagenesis for X475N |
| GGTTTCACCGCATCNNNTTCATTGACAATGAGAC | Mutagenesis for X408V |

Underline indicates the mismatched base.

N indicates the any of 4 nucleotides.

X indicates the any of 20 amino acids.

Table 6. 단일 아미노산 변화시 타가토스 생산 활성

| Mutation site | For D-galactose | |
|---|---|---|
| | Relative activity | Source |
| Wild type | 100 | 151 |
| Asn228→Asp | 5 | 152 |
| Met322→Val | 318 | 152 |
| Gly384→Asp | 66 | 152 |
| Ser393→Thr | 134 | 152, 153 |
| Val408→Ala | 557 | 152 |
| Lys428→Asn | 296 | 153 |
| Asn475→Lys | 457 | 153 |

Table 7. 두 아미노산 조합 변화시 타가토스 생산 활성

| Mutation site | For D-galactose | |
|---|---|---|
| | Relative activity(%) | Source |
| Wild type | 100 | 151 |
| 408: Val→Ala, 475: Asn→Lys | 692 | 152, 153 |
| 322: Met→Val, 408: Val→Ala | 67 | 152, 153 |
| 408: Val→Ala, 428: Lys→Asn | 442 | 152, 153 |
| 322: Met→Val, 475: Asn→Lys | 607 | 152, 153 |
| 428: Lys→Asn, 475: Asn→Lys | 614 | 152 |

Table 8. 408번 아미노산의 R group 크기 변화시 타가토스 생산 활성

| Mutation site | For D-Galactose | |
|---|---|---|
| | Relative activity | Source |
| 408Gly | 432 | |
| 408Ala | 669 | |
| 408Val | 100 | 151 |
| 408Leu | 67 | |
| 408Ile | 65 | |

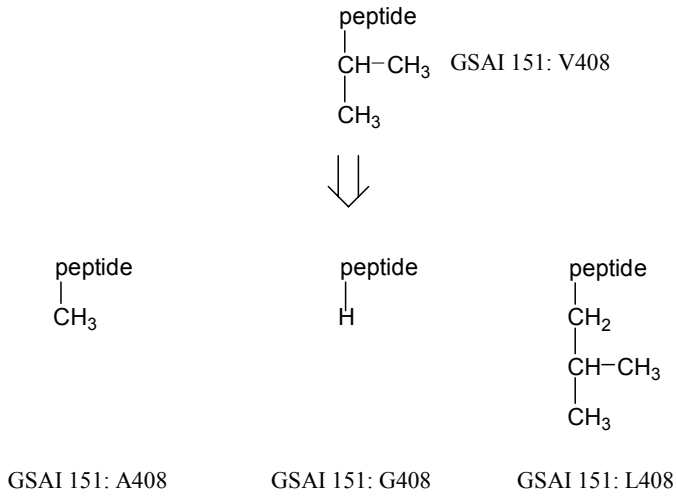



Fig. 29. Effect of R-group in 408th amino acid of galactose isomerase on tagatose producing activity.

Table 9. 475번 아미노산의 R group 크기 변화시 타가토스 생산 활성

| Mutation site | For D-Galactose | |
|---|---|---|
| | Relative activity | Source |
| 475Asn | 100 | 151 |
| 475Gln | 607 | |
| 475Lys | 672 | |
| 475Arg | 634 | |

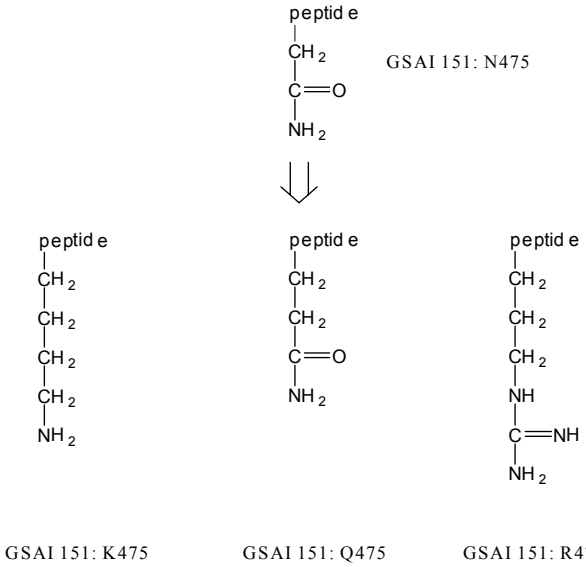



Fig. 30. Effect of R-group in 475th amino acid of galactose isomerase on tagatose producing activity.

408번과 475번이 임의의 아미노산으로 치환되는 실험을 수행하였다. pH 7.5에서 wild galactose isomerase보다 활성이 더 좋은 것을 선별하였다. 100 colony에서 활성이 높은 2가지의 mutant clony를 선별하였다. 408번 Val이 Gln 또는 Arg으로 변경된 mutant로 pH 별로 활성을 살펴보았다 (Fig. 31). Wild galactose isomerase의 pH 8.5에서의 활성보다 408번 Val이 Gln 또는 Arg으로 변경된 mutant의 경우 pH7.5에서 각각 60%와 30% 활성이 증가하였다.

408번과 475번이 각각 alanine과 lysine으로 변화된 mutant를 순수 정제하여 kinetic parameters를 구하였다 (Table 10). 기질친화도인 $K_m$은 wild와 mutant 큰 차이가 없었고, 효소의 촉매 효율인 $k_{cat}/K_m$와 효소의 최고 속도인 $V_{max}$는 mutant의 경우 D-Galactose에 대해서는 증가하였고 L-Arabinose에 대하여는 감소하였다. 이것은 mutant의 경우 tagatose에 대한 성생능력이 증가하였음을 의미한다.

나. *Geobacillus thermodenitrificans* galactose isomerase

특정위치의 아미노산을 변경시키기 위하여 primer들을 제작하여 사용하였다 (Table 11). 여러번의 error-prone PCR을 수행한 결과 활성에 크게 영향을 주는 *G. thermodenitrificans* galactose isomerase의 아미노산은 10개 정도로 164, 228, 320, 322, 384, 393, 408, 428, 450, 475번이 해당된다 (Table 12). 각각 아미노산을 single mutation을 시킨 후 D-galactose와 L-arabinose에 대한 활성과 Km 값을 살펴본 결과 Table 13와 같다. 이중에서 활성이 가장 낮게 나타난 164번과 가장 높게 나타난 475번을 site-directed mutagenesis를 수행하여 164번은 R-group의 ring 유무 별로 치환하였고 475번 R-group의 크기 별로 치환하였다 (Table 14). 그 결과 164번은 aromatic ring이 중요하였고 475번은 lysine 정도 크기의 아미노산이 적당하였다.

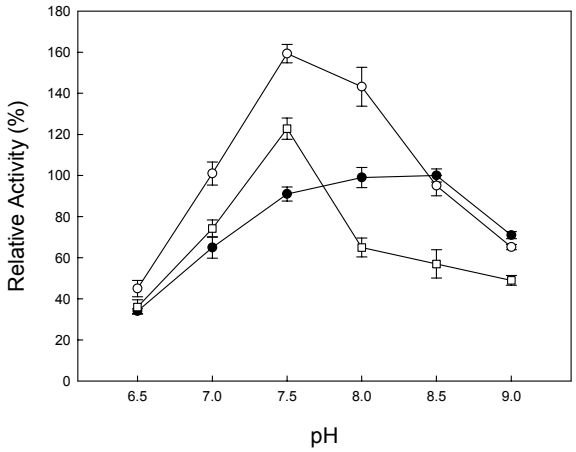



Fig. 31. Effect of single amnino acid mutation on the optimal pH of *Geobacillus stearothermophilus* galactose isomerase. Symbols represents: wild type (●), $Gln^{408}$ (○), $Arg^{408}$ (□).

Table 10. Kinetic parameters of galactose isomerase for galactose and arabinose.

| Kinetic Parameter | D-Galactose | | L-Arabinose | |
|---|---|---|---|---|
| | Wild | Mutant | Wild | Mutant |
| $K_m$(mM) | 210 | 222 | 30.3 | 28.4 |
| $V_{max}$ (U/mg) | 1.69 | 3.24 | 3.41 | 1.85 |
| $k_{cat}$ (sec) | 28.3 | 63.6 | 47.3 | 21.9 |
| $k_{cat}/K_m$ (sec/mM) | 0.13 | 0.29 | 1.56 | 0.77 |

Table 11. Oligonucleotides used in this study

| Oligonucleotides | Usage |
|---|---|
| TTGAATTCATGATGCTGTCATTA | For nascent N-terminal GTAI in pTrc |
| TTCTGCAGTTACCGCCCCCGCCA | For nascent C-terminal GTAI in pTrc |
| TTCATATGATGCTGTCATTACGTCC | For nascent N-terminal GTAI in pET24a |
| TTCTCGAGCCGCCCCCGCCAAAA | For nascent C-terminal GTAI in pET24a |
| TTCTCGAGATGATGCTGTCATTAC | For nascent N-terminal GTAI in pET15b |
| TTGGATCCTTACCACCCCC | For nascent C-terminal GTAI in pET15b |
| GGCTGGCGAAAGGGATGCGGACG | Mutagenesis for W164G - forward |
| CGTCCGCATCCCTTTCGCCAGCC | Mutagenesis for W164G - reverse |
| CGGCTGGCGAAATTCATGCGGACGGCCGT | Mutagenesis for W164F - forward |
| ACGGCCGTCCGCATGAATTTCGCCAGCCG | Mutagenesis for W164F - reverse |
| AGCGGCTGGCGAAACATATGCGGACGGCCGT | Mutagenesis for W164H - forward |
| ACGGCCGTCCGCATATGTTTCGCCAGCCGCT | Mutagenesis for W164H - reverse |
| GAACAAAGCGTCGACGAACTGCTTG | Mutagenesis for N228D - forward |
| CAAGCAGTTCGTCGACGCTTTGTTC | Mutagenesis for N228D - reverse |
| TCGGTTGATGAGAGTCATGGCGG | Mutagenesis for K320R - forward |
| CCGCCATGACTCTCATCAACCGA | Mutagenesis for K320R - reverse |
| GTTGATGAAAGTCGTGGCGGATGGC | Mutagenesis for M322V - forward |
| GCCATCCGCCACGACTTTCATCAAC | Mutagenesis for M322V - reverse |
| CGTGTTTGACGACGGTGAGGGCG | Mutagenesis for G384D - forward |
| CGCCCTCACCGTCGTCAAACACG | Mutagenesis for G384D - reverse |

Underline indicates the mismatched base

Table 12. Amino acid site to affect on the activity of galactose isomerase

| Oligonucleotides | Usage |
|---|---|
| CGGTCAATGCTACGCTGATTGAC | Mutagenesis for S393T - forward |
| GTCAATCAGCGTAGCATTGACCG | Mutagenesis for S393T - reverse |
| ATTGTCAATGAAGCGGATGCGGTGAAAC | Mutagenesis for V408A - forward |
| GTTTCACCGCATCCGCTTCATTGACAAT | Mutagenesis for V408A - reverse |
| GTATTTTATGGAACCCGCGCCCGTC | Mutagenesis for K428N - forward |
| GACGGGCGCGGGTTCCATAAAATAC | Mutagenesis for K428N - reverse |
| CTCATCACACAAGCTTCTCGTTT | Mutagenesis for C450S - forward |
| AAACGAGAAGCTTGTGTGATGAG | Mutagenesis for C450S - reverse |
| GTCGTGATCAAAGAACATACTTCC | Mutagenesis for N475k - forward |
| GGAAGTATGTTCTTTGATCACGAC | Mutagenesis for N475k - reverse |
| ATGTGTCGTGATCGCTGAACATACTTC | Mutagenesis for N475A - forward |
| GAAGTATGTTCAGCGATCACGACACAT | Mutagenesis for N475A - reverse |
| AATGTGTCGTGATCCAAGAACATACTTCCGT | Mutagenesis for N475Q - forward |
| ACGGAAGTATGTTCTTGGATCACGACACATT | Mutagenesis for N475Q - reverse |
| ATGTGTCGTGATCCGTGAACATACTTCC | Mutagenesis for N475R - forward |
| GGAAGTATGTTCACGGATCACGACACAT | Mutagenesis for N475R - reverse |

Table 13. Isomerization activity of galactose isomerase and its mutants.

| Mutant | Relative activity(%) | | Km (mM) | |
|---|---|---|---|---|
| | D-galactose | L-arabinose | D-galactose | L-arabinose |
| GTAI | 100 | 100 | 144 | 97 |
| W164G | 2 | 16 | 1105 | 36 |
| N228D | 34 | 44 | 161 | 123 |
| K320R | 234 | 149 | 148 | 56 |
| M322V | 90 | 111 | 280 | 15 |
| G384D | 18 | 27 | 713 | 163 |
| S393T | 118 | 70 | 201 | 188 |
| V408A | 203 | 230 | 97 | 76 |
| K428N | 249 | 183 | 90 | 59 |
| C450S | 300 | 200 | 67 | 51 |
| N475K | 302 | 225 | 45 | 69 |

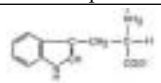
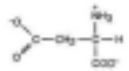
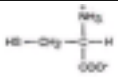
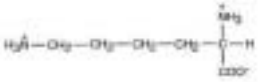
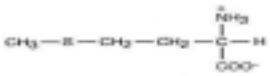
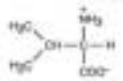
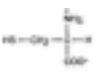
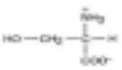
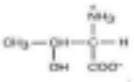
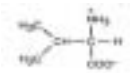
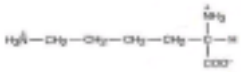
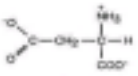
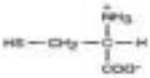
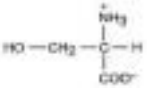
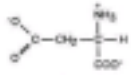
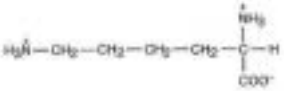
| | wild type | mutant |
|---|---|---|
| 164 | Trp | Gly |
| |  | |
| 228 | Asn | Asp |
| |  |  |
| 320 | Lys | Arg |
| |  | |
| 322 | Met | Val |
| |  |  |
| 384 | Gly | Asp |
| | |  |
| 393 | Ser | Thr |
| |  |  |
| 408 | Val | Ala |
| |  | |
| 428 | Lys | Asn |
| |  |  |
| 450 | Cys | Ser |
| |  |  |
| 475 | Asn | Lys |
| |  |  |

Table 14. Mutation effect of 164-site and 475-site on the isomerization activity.

| Mutant | R group | Relative activity (%) | Km (mM) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | D-galactose | L-arabinose |
| $Trp^{164}$ | Aromatic ring | 100 | 144 | 97 |
| $Phe^{164}$ | Aromatic ring | 122 | 101 | 54 |
| $His^{164}$ | Positively charged ring | 8 | 129 | 90 |
| $Gly^{164}$ | H | 2 | 1105 | 36 |
| $Asn^{475}$ | 2C 1N | 100 | 144 | 97 |
| $Gln^{475}$ | 3C 1N | 231 | 105 | 94 |
| $Lys^{475}$ | 4C 1N | 302 | 45 | 69 |
| $Arg^{475}$ | 4C 3N | 201 | 173 | 82 |

활성이 비교적 높은 320, 408, 428, 450번을 활성이 가장 높은 475번과 함께 double mutation을 수행하였다 (Table 15). 그 결과 두 번째로 활성이 높은 450번과 double mutation을 수행한 결과가 가장 활성이 높게 나타났다. Wild와 single mutation시킨 것 중 가장 높은 활성을 보인것과 double mutation시킨 것 중 가장 높은 활성을 보인것의 정제하여 kinetic parameters를 살펴보았다 (Table 16). 그 결과 double mutation시킨 것이 catalytic efficeincy가 wild에 비하여 2.8배 향상하였다. 이 3 가지 효소로 타가토스를 생산 한 결과 65℃에서 wild는 46.0%, single mutant는 55.8%, double mutant는 58.2%의 conversion을 나타내었다 (Fig. 32). $K_m$, $k_{cat}$ ,$V_{max}$, $k_{cat}/K_m$은 wild 보다 mutant에서 D-galactose와 L-arabinose에 대해서는 모두 증가하였다. 이것은 mutant의 경우 tagatose에 대한 성생능력이 증가하였음을 의미한다.

Table 15. Mutation effect of double sites on the isomerization activity.

| Mutant | Relative activity for D-galactose (%) | Km (mM) | |
|---|---|---|---|
| | | D-galactose | L-arabinose |
| GTAI | 100 | 144 | 97 |
| N475K | 302 | 45 | 69 |
| K320R, N475K | 297 | 103 | 58 |
| V408A, N475K | 272 | 257 | 66 |
| K428N, N475K | 316 | 149 | 168 |
| C450S, N475K | 407 | 75 | 71 |

Table 16. Kinetic parameters of galactose isomerase mutant for the galactose isomerization.

| | D-galactose | | | | L-arabinose | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mutant | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ (U/mg) | $k_{cat}$ ($min^{-1}$) | $k_{cat}/K_m$ ($min^{-1}$ $mM^{-1}$) | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ (U/mg) | $k_{cat}$ ($min^{-1}$) | $k_{cat}/K_m$ ($min^{-1}$ $mM^{-1}$) |
| GTAI | 408 | 6.9 | 204 | 0.50 | 142 | 86 | 6816 | 48 |
| N475K | 290 | 17.4 | 735 | 2.53 | 100 | 165 | 13083 | 131 |
| C450S, N475K | 339 | 24.2 | 1046 | 3.09 | 106 | 183 | 14434 | 136 |

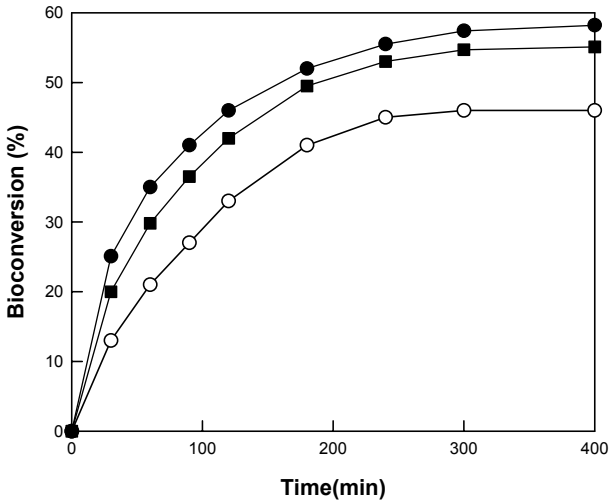



Fig. 32. Time courses of D-tagatose production from D-galactose by *G. thermodenitrificans* wild (○), single mutant (●), and double mutant (■) galactose isomerases.

## 5. 돌연변이 효소들의 정제 및 특성 조사

*Geobacillus stearothermophilus* 돌연변이 효소들pL151 (wild)와 2차 error-prone PCR에서 얻은 돌연변이 pL153을 순수정제 하였다 (Table 17). Crude 효소를 ammoniumammonium sulfate precipitation, heat treatment, Hi-trap Q ion exchange, Biogel hydroxyapatite, 및 Resource Q ion exchange column chromatography로 정제하였고 recombinant *E. coli*, 로부터 65배 농축하였고 최종 수율은 6.1% 이었고 최종 specific activity는 2.1 U/mg이었다. SDS-PAGE에 의해서 단백질 패턴을 분석한 결과 최종 정제효소인 Resource Q 수지의 산물은 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 나타났다.

온도에 따른 효소활성을 살펴본 결과 최적온도는 두 경우 모두 65℃이였으나, 70℃에서는 wild의 경우 활성이 급격히 떨어졌으나 돌연변이 효소의 경우 조금만 떨어졌다 (Fig. 33). 금속염 영향을 거의 받지 않는 buffer인 PIPES, EPPS buffer를 사용하여 pH가 galactose isomerase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 34). 최적 pH는 wild와 mutant 모두 pH8.0에서 최대로 나타났다.

여러 가지 금속염이 wild와 mutant의 galactose isomerase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 35). 활성이 비교적 많이 증가한 금속염은 wild와 mutant 모두에서 Mn, Mg, Co, Mo이였고 wild의 경우에는 최대활성을 나타낸 금속염은 Mn이였으나 mutnat의 경우에는 Co이였다. 일반적으로 galactose isomerase에서 고온균의 최적 금속염은 Mn이고 초고온균의 최적 금속염은 Co로 보고되고 있다. 그러므로 mutant의 경우 고온균에서 일부특성이 초고온균으로 변화하고 있는 것으로 생각된다.

Table 17. Purification of *G. stearothermophilus* l-arabinose isomerase.

| Step | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg) | Yield (%) | Purification (fold) |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude extract | 5,671 | 320 | 0.06 | 100 | 1.0 |
| Ammonium sulfate | 1,537 | 188 | 0.12 | 59 | 2.2 |
| Heat treatment | 889 | 160 | 0.18 | 50 | 3 |
| Hi-trap Q | 45.3 | 68 | 1.5 | 21 | 25 |
| Hydroxyapatite | 17.4 | 30 | 1.7 | 9.4 | 31 |
| Resource Q | 9.0 | 21 | 2.3 | 6.6 | 38 |

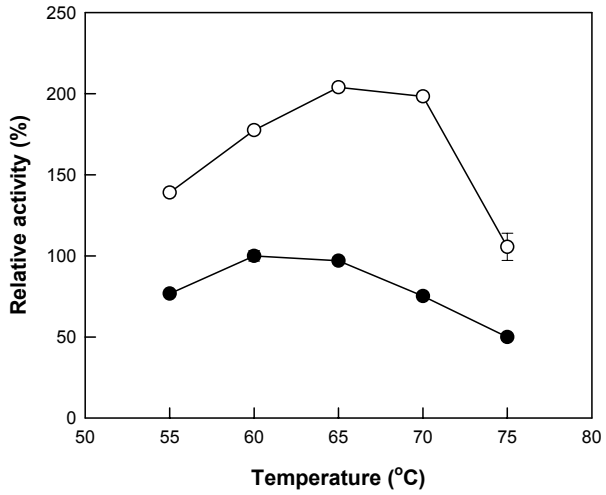



Fig. 33. Effect of temperature on galactose isomerase of wild and mutant

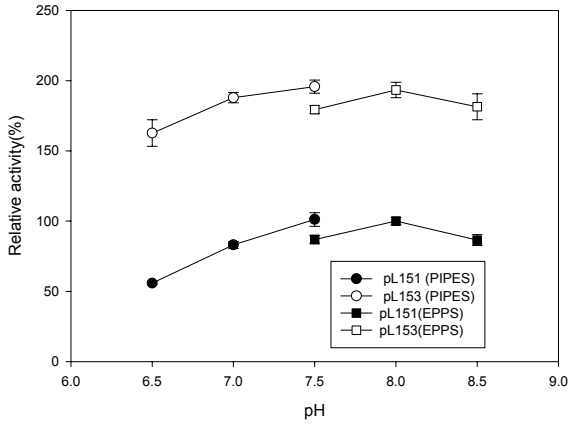



Fig. 34. Effect of pH on galactose isomerase of wild and mutant

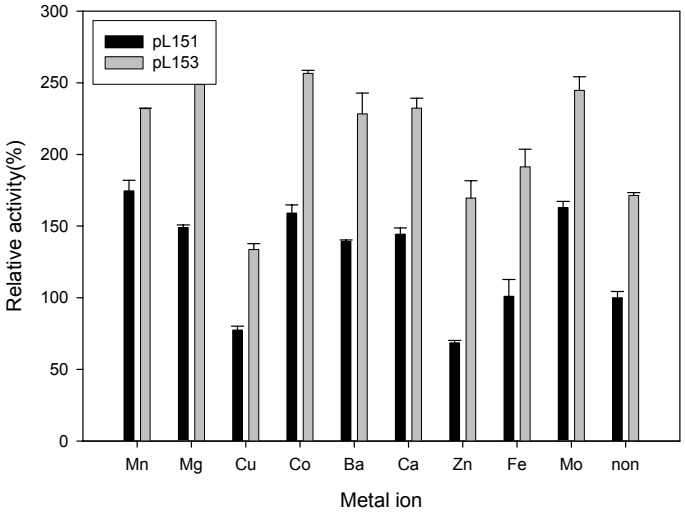



Fig. 35. Effect of metal ion on galactose isomerase of wild and mutant

기질특이성을 조사하기 위하여 5탄당과 6탄당을 중심으로 한 여러 가지 당류가 효소활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 36). Arabinose의 경우 wild와 mutant 모두에서 활성이 가장 높았으며 galactose, fucose, 순으로 활성을 보였다. 특이하게도 glucose와 xylose에 대한 활성도 존재하였다. 기질저해 현상을 조사하기 위하여 5탄당알콜과 6탄당알콜을 중심으로 한 여러 가지 당알콜류가 효소활성에 저해 영향을 살펴보았다 (Fig. 37). Ribitol과 arabinitol의 경우 wild와 mutant 모두에서 활성이 저해가 크게 나타났으며 xylitol, ducitol, erythritol의 경우 활성저해가 비교적 적게 일어났다.

타가토스의 생산을 살펴보기 위하여 0.5 mg/mL의 동일한 단백질의 양으로부터 wild와 mutant 효소를 사용하여 galactose로부터 타가토스를 생산하였다 (Fig. 38). 그 결과 mutant가 wild 보다 생산속도가 빨랐으며 600분에서의 전환율도 mutant가 45%로 wild의 28.5%보다 16.5% 정도 더 높았다.

Wild와 변화된 mutant를 순수 정제하여 kinetic parameters를 구하였다 (Table 19). $K_m$, $k_{cat}$ ,$V_{max}$, $k_{cat}/K_m$은 wild 보다 mutant 에서D-Galactose와 L-Arabinose에 대해서는 모두 증가하였다. 이것은 mutant의 경우 tagatose에 대한 성생능력이 증가하였음을 의미한다.

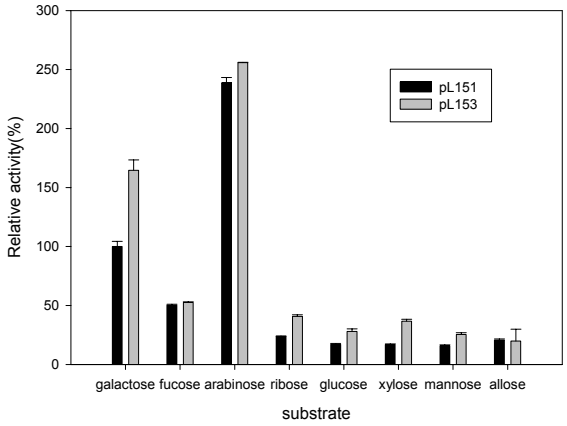



Fig. 36. Effect of substrate on galactose isomerase of wild and mutant

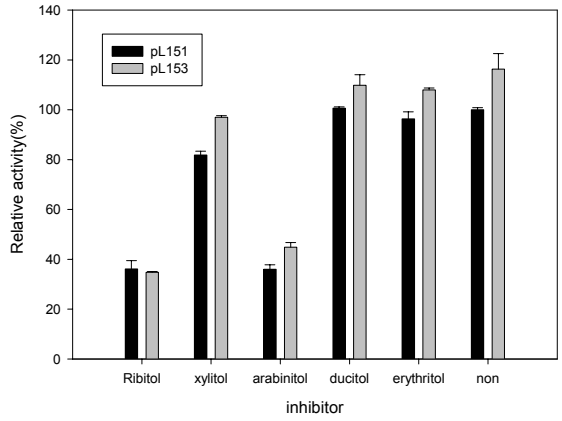



Fig. 37. Effect of inhibitor on galactose isomerase of wild and mutant

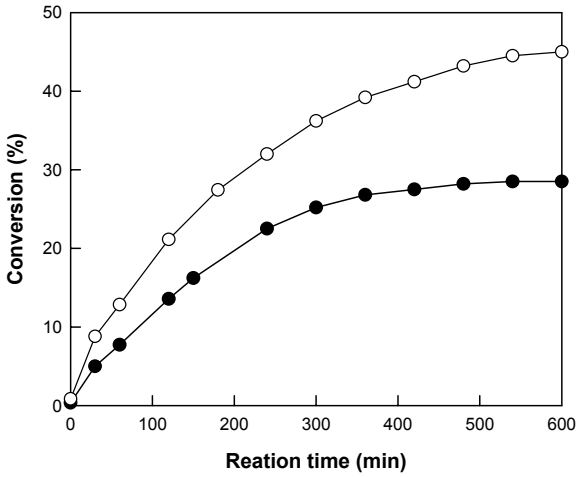



Fig. 38. Conversion from galactose to tagatose by galactose isomerase of wild and mutant

Table 18. Kinetic parameters of galactose isomerase for galactose and arabinose.

| Kinetic Parameter | D-Galactose | | L-Arabinose | |
|---|---|---|---|---|
| | Wild | Mutant | Wild | Mutant |
| $K_m$(mM) | 145 | 578 | 67 | 100 |
| $V_{max}$ (U/mg) | 7.8 | 37.6 | 96 | 134 |
| $k_{cat}$ (1/min) | 173 | 1211 | 4100 | 6475 |
| $k_{cat}/K_m$ (1/mM-min) | 1.2 | 2.1 | 61 | 65 |

## 6. 신균주 효소의 정제 및 특성 조사

### 가. L-Arabinose isomerase 유전자 cloning

*Geobacillus thermodenitrificans*으로부터 신규 내열성 L-arabinose isomerase 유전자를 클로닝하기 위하여 genomic DNA를 분리하였으며, 분리된 DNA를 주형으로 하여 유전자 특이적 primer를 이용한 PCR을 수행하였다. 증폭된 1.5 kb의 목적 유전자의 PCR product는 정제하여 이후의 클로닝 작업에 이용하였다. 얻어진 효소유전자는 T4 DNA ligase를 이용하여 클로닝 벡터인 pGEM T-easy에 삽입하였으며 대장균 DH5α에 transformation 한 후 lacZ gene의 α-complementation을 이용하여 선택적으로 삽입유전자 클론을 분리하였다. 분리 배지로는 ampicillin, X-gal, IPTG가 첨가된 LB 한천 평판 배지를 이용하였으며 유전자가 삽입된 white colony 만을 선택적으로 분리하였다. 분리된 균집락은 ampicillin이 첨가된 LB 액체배지에서 배양한 후 plasmid를 분리하여 제한효소로 삽입유전자를 확인하였으며, 순수 정제된 plasmid는 제한효소를 이용하여 삽입유전자를 확인한 후 유전자 서열을 분석하였다. CBG-A1으로부터 확보된 내열성 galactose isomerase는 유전자를 과발현 하기 위하여 발현 벡터인 pLex 와 pHCE19T(II)에 삽입하여 IPTG 유도 없이 T7 promotor 조절 하에서 유전자를 발현 하였고 SDS-PAGE gel를 이용하여 발현정도를 검증하였다. 또한 벡터의 발현 특이성을 조사한 결과에서는 pET 벡터에서 발현율이 가장 높은 것으로 SDS-PAGE에 의해 확인되었으나 inclusion body 형태로 발현되었고 세포내 soluble protein으로의 발현유도를 시도하였으나 비효소활성이 아주 낮게 확인되었고, pHCE19T(II) 벡터에서는 효소활성이 높게 확인되었으나 발현율에서는 pET 벡터보다 낮게 발현되는 것으로 확인되었다.

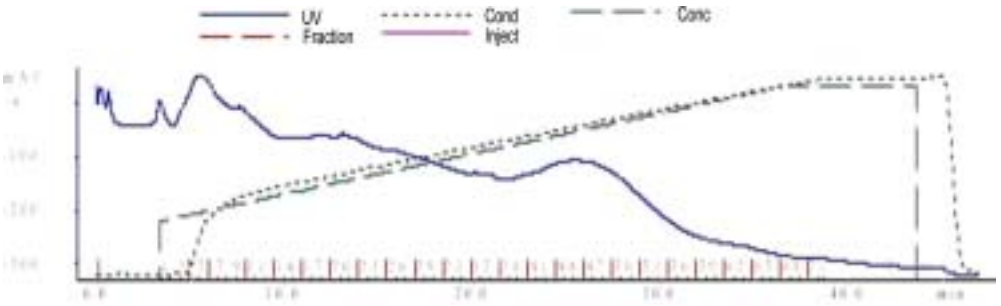
### 나. L-Arabinose isomerase 효소의 정제

*Geobacillus thermodenitrificans*의 galactose isomerase 유전자를 expression시킨후 순수정제를 시도하였다. 배양액을 원심분리하여 균체를 회

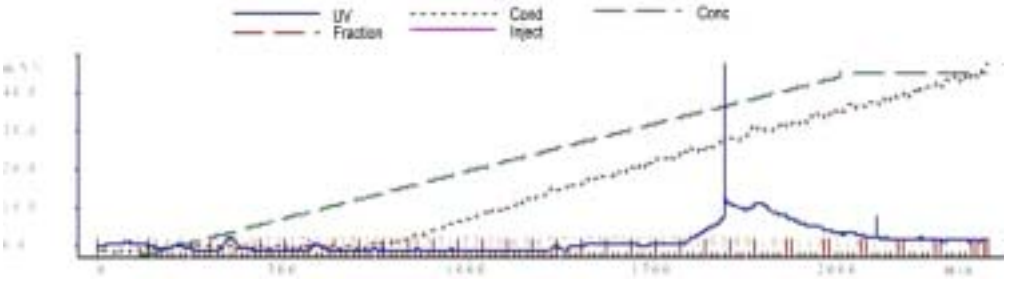
수한후 sonicator로 균체를 파쇄하였다. 균체파쇄액을 ammonium sulfate로 첨전시켜 단백질을 회수하고 60℃에서 30분간 가열처리하여 *E. coli* 유래 단백질 들을 제거하였다. 회수된 단백질을 FPLC를 사용하여 Hi-Trap, Hydoxyapatite, Resource Q를 사용하여 정제하였다. Hi-Trap (5ml)의 starting buffer는 50mM Tris-HCl pH8.0이었고 elution buffer는 50mM Tris-HCl pH8.0, 0.5M NaCl이었다. Hydroxyapatite의 starting buffer는 10mM phosphate buffer pH7.0이고 elution buffer는 50mM phosphate buffer pH7.0이었다. Resource Q의 starting buffer는 50mM Tris-HCl pH8.0이었고 elution buffer는50mM Tris-HCl pH8.0, 0.5M NaCl이었다. 각 단계별 chromatogram은 Fig. 39에 나타내었다. 모든 정제 단계별 효소활성, 효소양, 수율 및 정제 배수를 Table 19에 나타내었다. 순수 정제하여 얻어진 최종 효소는 초기 양의 6.1%로 이었고 효소 활성은 초기보다 38배 증가하였다. 정제 단계별 단백질의 정제 정도를 보기 위하여 SDS PAGE에서 보았다 (Fig. 40). 그 결과 열처리 단계까지는 많은 불순 단백질이 보였으나 Hi-trap 단계 이후로는 비교적 불순물이 적었다. Resource Q를 통과한 최종 효소용액에는 단일 단백질로 나타났다. 정제된 효소의 순수도를 측정하기 위하여 gel scanning을 한 결과 순도는 96.95%로 나타났다(Fig. 41). Native gel을 수행한 결과 tetramer임을 보여주었다 (Fig. 42).

정제를 용이하게 하기 위하여 his-tagged galactose isomerase를 pET vector를 사용하여 만들었다. His-tagged 효소의 경우는 간단하게 열처리와 affinity chromatography로 95배 증가된 활성을 얻었고 이때 수율도 31%로 비교적 높을 수율로 효소를 얻을 수 있었다 (Table 20). SDS PAGE에서도 최종 효소액이 단일 단백질로 보여주었다 (Fig. 43).

1. Hi-Trap 5ml : 40-60 fractions




2. Hydroxyapatite : 92-115 fractions




3. Resource Q : 59-65 fractions

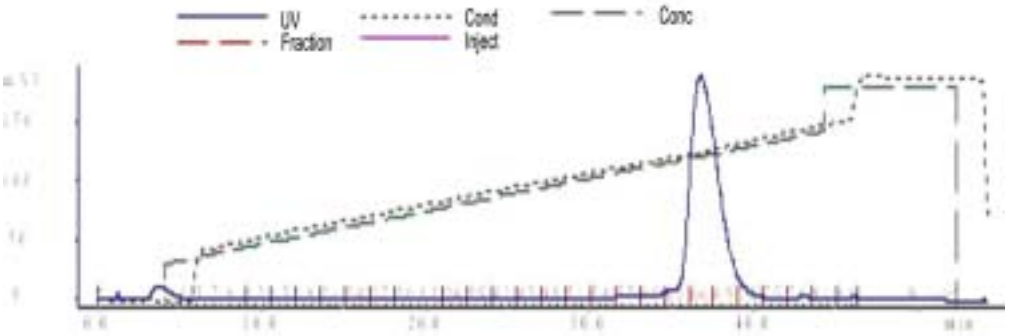



Fig. 39. Chromatogram of Hi-trap, Hydroxyapatite, Resource Q.

Table 19. Purification of galactose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans.*

| Step | Total protein (mg) | Total activity (U) | Sp Act. (U/mg) | Yield (%) | Purifica-tion (fold) |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude | 18903.34 | 1067.03 | 0.056 | 100 | 1.00 |
| ammonium sulfate | 5121.966 | 627.52 | 0.123 | 58.8 | 2.20 |
| Heat treatment | 3561.76 | 580.46 | 0.163 | 54.40 | 2.91 |
| Hi-trap | 226.935 | 226.69 | 0.999 | 21.24 | 17.84 |
| Hydroxy-apatite | 57.595 | 100.01 | 1.736 | 9.37 | 31.00 |
| Resource Q | 30.296 | 65.105 | 2.149 | 6.10 | 38.38 |

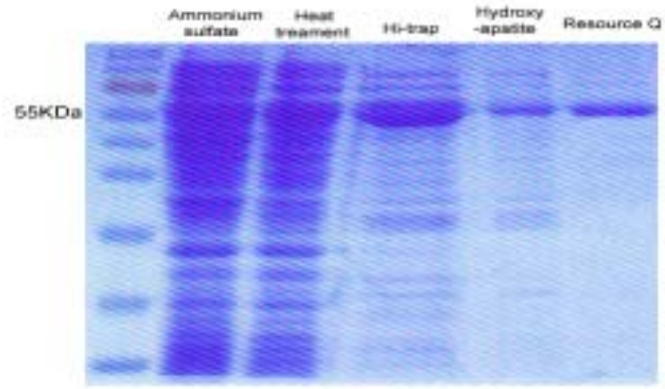
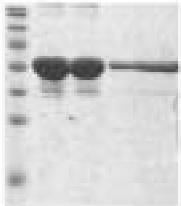



Fig. 40. SDS PAGE of galactose purification



| Index | Name | Volume INT*mm2 | Adj. Vol. INT*mm2 | % Adj. Vol. | Concentration | Area mm2 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | standard1 | 38581.33316 | -42732.5301 | N/A | 100.000000000000 | 566.46625 |
| 2 | Std2 | 15281.85469 | -41.9829031 | N/A | 0.000000000000 | 81.522400 |
| 3 | standard2 | 28106.34755 | -16578.4158 | N/A | 29.28445545062 | 221.06875 |
| 4 | impurity2 | 4590.787031 | -866.576038 | N/A | 1.442951247360 | 30.078125 |
| 5 | impurity3 | 2216.796875 | -254.784169 | N/A | 0.30791288840 | 17.718750 |
| 6 | bk | 480.0273438 | -413.2419501 | N/A | N/A | 3.2226563 |
| 7 | impurity1 | 1232.071094 | -136.676040 | N/A | 0.111813708773 | 8.3004375 |
| 8 | impurity5 | 7160.332031 | -1292.83915 | N/A | 1.962865185268 | 46.028313 |
| 9 | impurity4 | 3171.373658 | -228.284719 | N/A | 0.285146540334 | 11.618406 |

Fig. 41. Gel scaning for purity. The purity of galactose isomerase was 96.95%

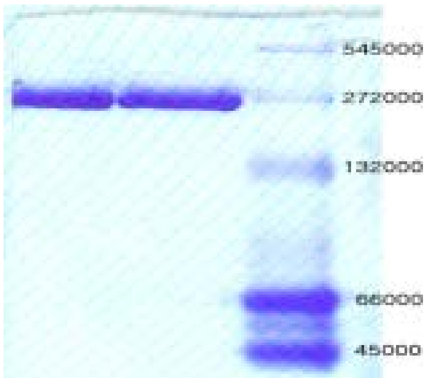



Fig. 42. Native gel of galactose isomerase. galactose isomerase was tetramer.

Table 20. Purification of his-tagged galactose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*.

| Step | Total protein (mg) | Total activity (U) | Sp.Act. (U/mg) | Yield (%) | Purifica-tion (fold) |
|---|---|---|---|---|---|
| Crude | 12602 | 778.93 | 0.062 | 100 | 1.00 |
| Heat treatment | 469.8 | 408 | 0.87 | 52.38 | 14.03 |
| His-tag | 41.61 | 245 | 5.9 | 31.45 | 95.16 |

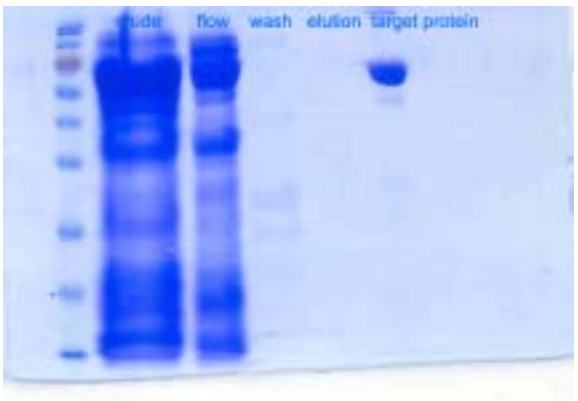



Fig. 43. SDS PAGE of his-tagged galactose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*.

다. L-Arabinose isomerase 효소의 특성조사

*Geobacillus thermodenitrificans*에서 얻은 L-arabinose isomerase을 순수정제한 후 효소특성을 비교하였다. 온도에 따른 효소활성을 살펴본 결과 최적온도는 70℃이였고 (Fig. 44), 열안정성을 살펴본 결과 65℃까지는 비교적 안정하였으나 그 이상의 온도에서는 온도가 증가할 수록 활성이 급격히 감소함을 보여 주었다 (Fig. 45). pH가 galactose isomerase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 46). 최적 pH는 pH8.5이었다. pH 안정성은 pH 7-9범위에서는 비교적 안정하였으나 그 이상과 이하의 pH에서는 안정성이 떨어졌고 특히 pH10에서는 3.5시간 후에는 활성이 없어졌다 (Fig. 47).

여러 가지 금속염이 L-arabinose isomerase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 48). 활성이 비교적 많이 증가한 금속염은 Mn, Mg, Co, Ca이였고 최대활성을 나타낸 금속염은 Mn이였다. 가장 활성 증가가 크게 나타는 Mn과 Co를 농도별 실험을 수행하였다. Mn의 경우에는 3.5 mM에서 활성이 최대이었고 Co의 경우에는 2.5 mM에서 활성이 최대이었다 (Fig. 49). 기질특이성을 조사하기 위하여 5탄당과 6탄당을 중심으로 한 여러 가지 당류가 효소활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 50). Arabinose의 에서 활성이 매우 높게 나타났으며 allose, xylose, ribulose,에서 약간의 활성을 보였다. glucose, fucose, gulose, mannose에서는 활성이 나타나지 않았다.

기질저해 현상을 조사하기 위하여 5탄당알콜과 6탄당알콜을 중심으로 한 여러 가지 당알콜류가 효소활성에 저해 영향을 살펴보았다 (Fig. 51). Xylitol, ducitol, erythritol의 경우 활성저해가 비교적 적게 일어났고 arabinitol의 경우 활성이 저해가 크게 나타났다. aldonitol의 경우 저해가 크게일어나 활성이 나타나지 않았다.

Mn을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 같은 단백질 mg/ml으로 타가토스 생성을 살펴본 결과 300분 후에 Mn을 첨가한 경우는 48%Mn을 첨가하지 않은 경우는 46% 전환되었다 (Fig. 52).

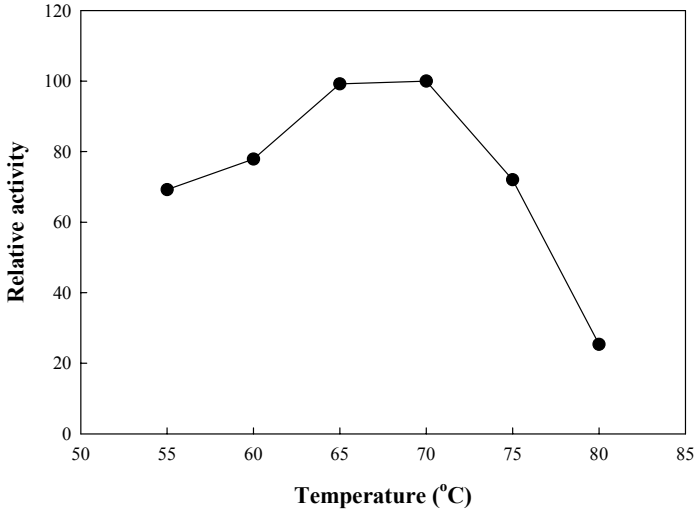



Fig. 44. Effect of temperature on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

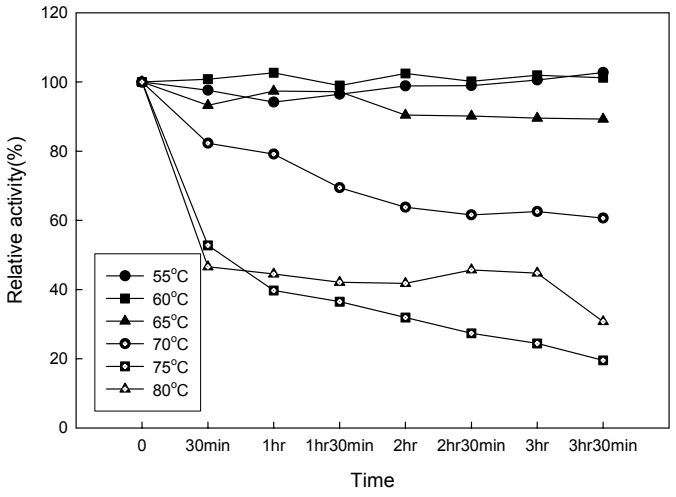



Fig. 45. Effect of temperature stability on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

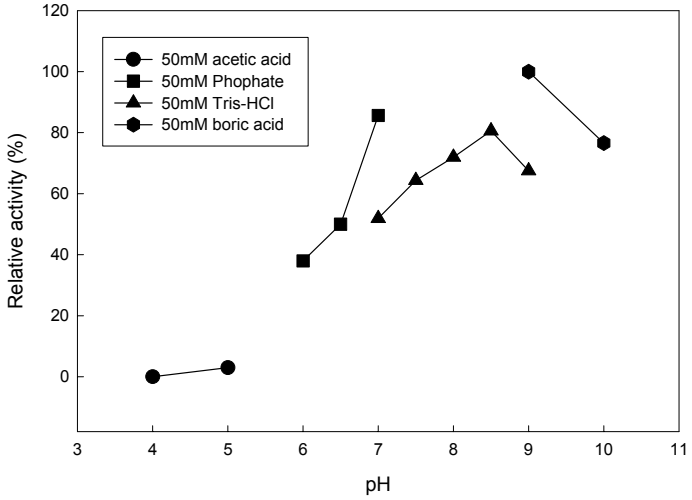



Fig. 46. Effect of pH on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

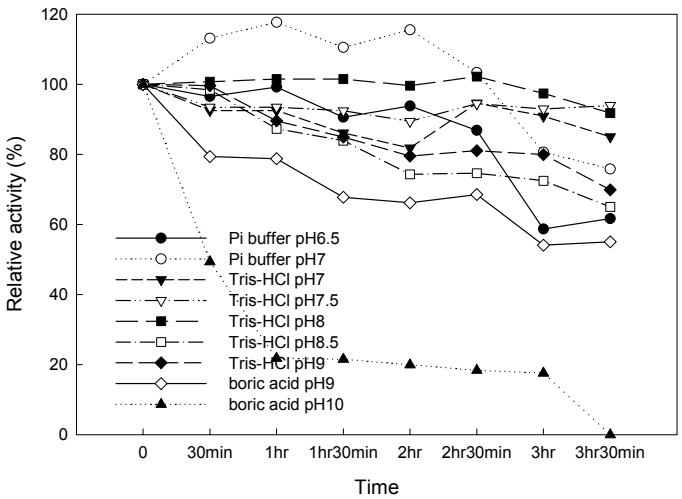



Fig. 47. Effect of pH stability on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

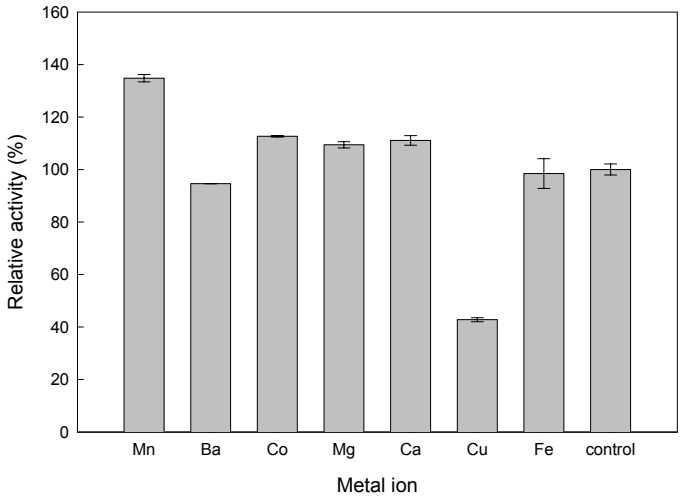



Fig. 48. Effect of metal ion on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

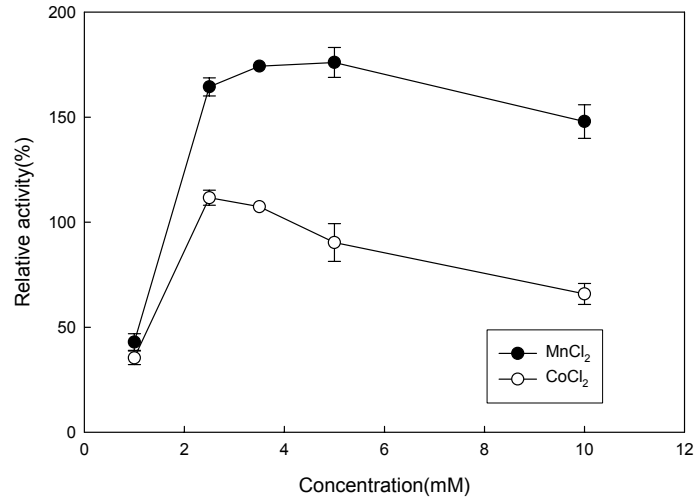



Fig. 49. Effect of the Mn and Co concentration on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

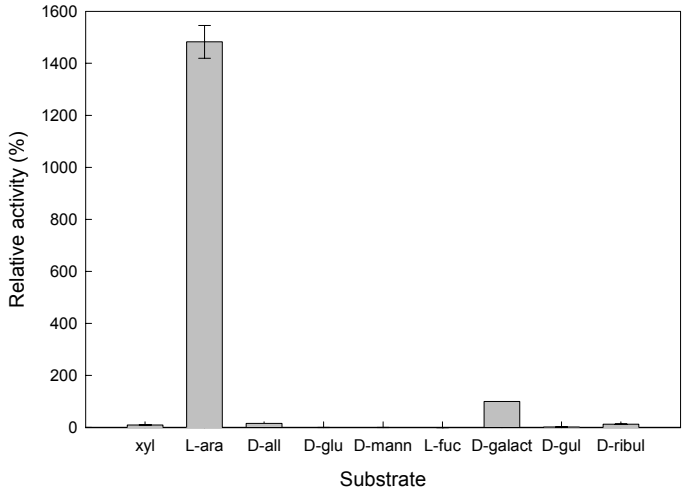



Fig. 50. Effect of substrate on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

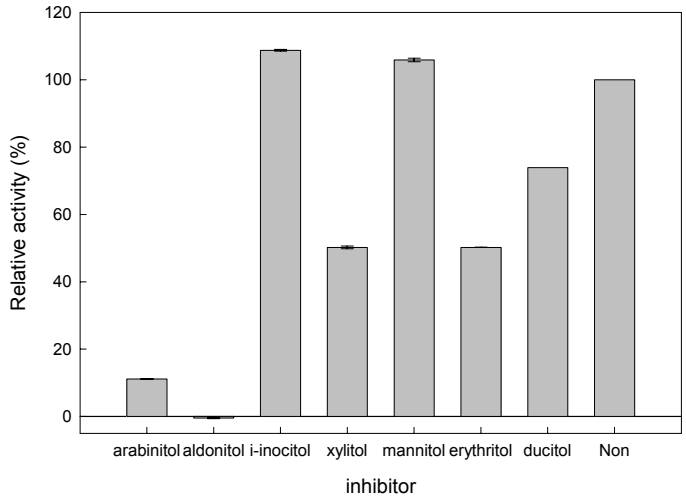



Fig. 51. Effect of inhibitor on L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

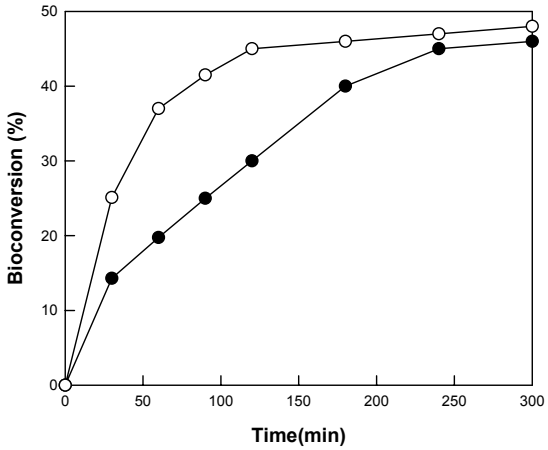



Fig. 52. Effect of temperature on Conversion from galactose to tagatose by L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans* with and without Mn.

## 7. 고정화 균체에 의한 타가토스의 생산

### 가. 유리효소, 고정화 효소, 고정화 균체의 비교

유리효소, 고정화 효소, 고정화 균체를 비교하기 위해서 같은 양의 미생물로부터 타가토스 생산을 수행하였다 (Fig. 53). 같은 양의 미생물을 고정화하여 고정화 균체로 사용하였고, 같은 양의 미생물을 파쇄한 후 ammonium sulfate에 침전한 후 투석하여 유리효소로 사용하였고, 같은 양의 미생물을 파쇄한 후 ammonium sulfate에 침전한 후 투석하고 고정화하여 고정화 효소로 사용하였다. 실험결과 고정화 균체가 타가토스 생산이 가장 많았고 그 다음은 고정화 효소, 그 다음은 유리 효소로 나타났다. 고정화균체는 고정화 효소에 비하여 specific production rate은 높으나 volumetric production rate은 떨어진다 (Table 21).

균체 농도에 따른 고정화 효소와 고정화 균체의 타가토스 생산을 살펴보았다 (Fig. 54). 고정화 균체의 경우에는 3.4%까지는 균체의 농도가 증가할수록 타가토스 생산이 증가하였으나 3.4% 이상에서는 균체의 농도가 증가할수록 타가토스 생산이 감소하였다. 이것은 고농도의 균체에서는 물질전달의 입체적인 방해가 있기 때문으로 생각된다. 이에 비하여 고정화 효소에서는 사용한 균체의 농도가 증가할수록 타가토스 생산이 증가하였다. 고정화 효소에서는 필요한 효소만 대부분으로 존재하므로 차지하는 부피가 작아 물질전달의 입체적인 방해가 적기 때문으로 생각된다.

### 나. 고정화 균체의 타가토스 생산 조건최적화

고정화 균체의 농도를 3.4%로 하여 60℃에서 alginate 농도를 1.5%에서 3.0%로 변화시켜 타가토스 생산을 살펴보았다 (Fig. 55). 고정화 균체에서 alginate 농도가 변화할 때 타가토스 생산양은 거의 일정하게 나타났다. 이것은 alginate 농도는 타가토스 생산과 무관하다는 것을 의미한다.

Table 21. Comparison of continuous tagatose production by immobilized enzyme and immobilized cells.

| | [a] Immobilized enzyme bioreactor | Immobilized cell bioreactor |
|---|---|---|
| Tagatose concentration of output (g/L) | 145.0 | 49.0 |
| Conversion yield (output tagatose / input galactose, %) | 48.3 | 16.3 |
| Total amount of cells used for the 20 mL-bioreactor (g) | 33.7 [b] | 0.68 |
| Volumetric productivity (g/L·h) | 54.0 | 2.45 |
| Specific productivity (tagatose g/cells g·h) | 0.032 | 0.072 |

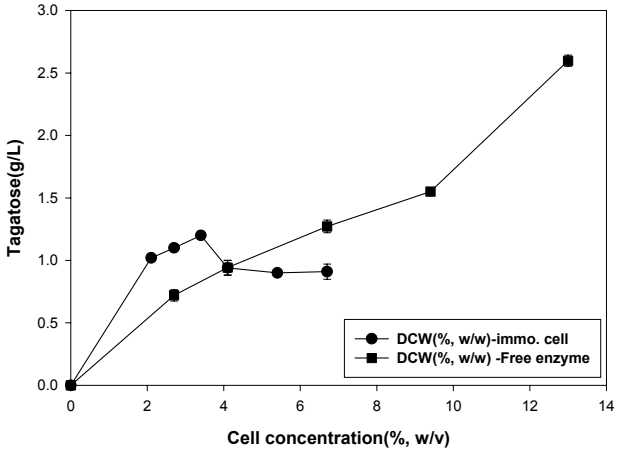



Fig. 53. Tagatose production by free enzyme, immobilized enzyme and immobilized cell with the same cell amount

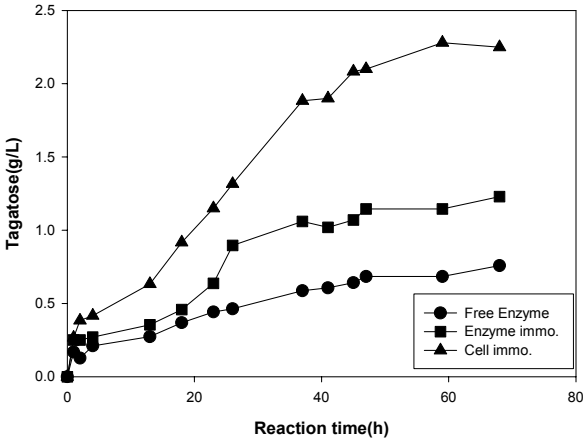



Fig. 54. Tagatose production by free enzyme and immobilized cell with increasing the cell concentration

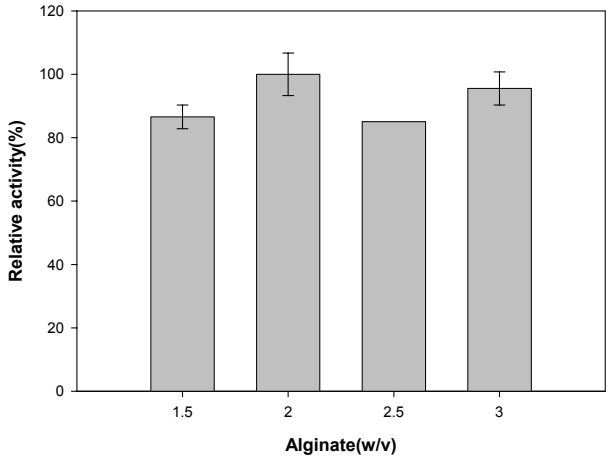



Fig. 55. Effect of alginate concentration of immobilized cell on tagatose production

균체 농도에 따른 고정화 균체의 타가토스 생산을 살펴보았다 (Fig. 56). 3.4%까지는 균체의 농도가 증가할수록 타가토스 생산이 증가하였으나 3.4% 이상에서는 균체의 농도가 증가할수록 타가토스 생산이 감소하였다. 이것은 고농도의 균체에서는 물질전달의 입체  고정화 균체와 유리균체에서 타가토스 생산을 위한 최적온도를 조사하는 실험을 수행하였다 (Fig. 57). 유리 균체의 경우 타가토스 생산을 위한 최적온도가 65℃임에 비하여 고정화 균체의 경우 타가토스 생산을 위한 최적온도가 70℃이었다. 고정화를 할 경우 alginate 부분이 균체를 열로부터 보호하는 역할을 하여 최적온도가 증가한 것으로 생각된다. 고정화 균체와 유리균체에서 타가토스 생산을 위한 온도안정성 실험을 수행하였다 (Fig. 58, Fig. 59). 유리균체에서는 60℃에서 3시간 정도 경과 하면 활성이 50%로 감소하는데 비하여 고정화 균체에서는 같은 온도에서 25시간 경과하여도 활성이 80% 정도가 유지된다. 그러므로 고정화 균체의 경우에는 유리 균체보다 훨씬 열안정성을 지니고 있다.

고정화 균체와 유리균체에서 타가토스 생산을 위한 최적pH를 조사하는 실험을 수행하였다 (Fig. 60). 유리 균체의 경우 타가토스 생산을 위한 최적 pH가 7.5임에 비하여 고정화 균체의 경우 타가토스 생산을 위한 최적 pH가 7.0이었다. 고정화 균체와 유리균체에서 타가토스 생산을 위한 pH안정성 실험을 수행하였다 (Table 22).  유리균체에서는 pH 8에서 67분 정도 경과 하면 활성이 50%로 감소하는데 비하여 고정화 균체에서는 같은 pH에서 8시간 경과하여도 활성이 50% 정도가 유지된다. 그러므로 고정화 균체의 경우에는 유리 균체보다 훨씬 pH 안정성을 지니고 있다.

여러 가지 금속염이 arabinose isomerase 활성에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 61).  고정화 균체에서 최대활성을 나타낸 금속염은 Mn이였지만 유리 균체에서는 Zn이었다.

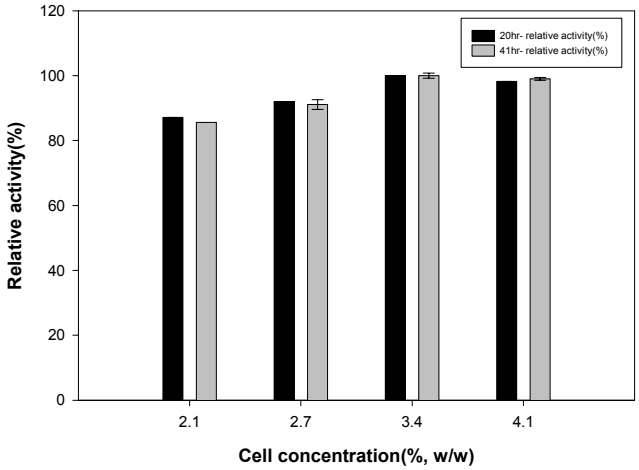



Fig. 56. Effect of cell concentration of immobilized cell on tagatose production

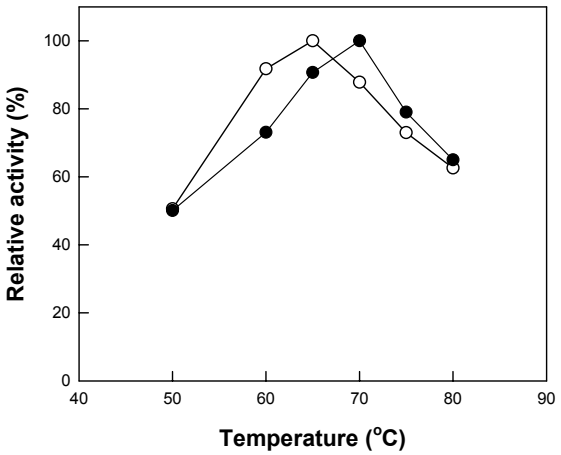



Fig. 57. Effect of temperature on tagatose production by free cells (○) and immobilized cells (●). The reactions were performed for 5 h in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 10 g/L galactose.

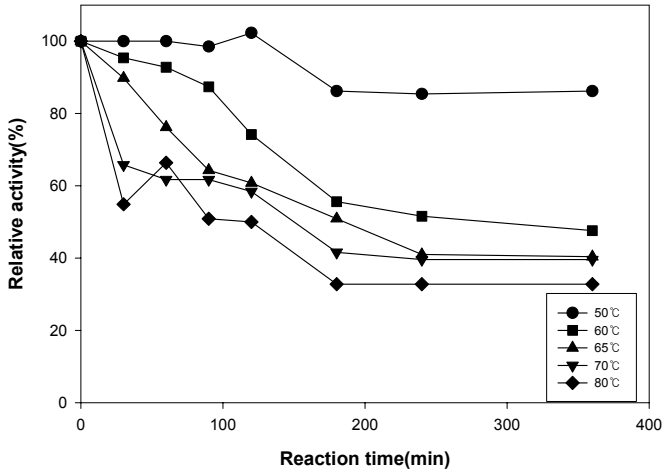



Fig. 58. Effect of temperature stability of free cell on tagatose production

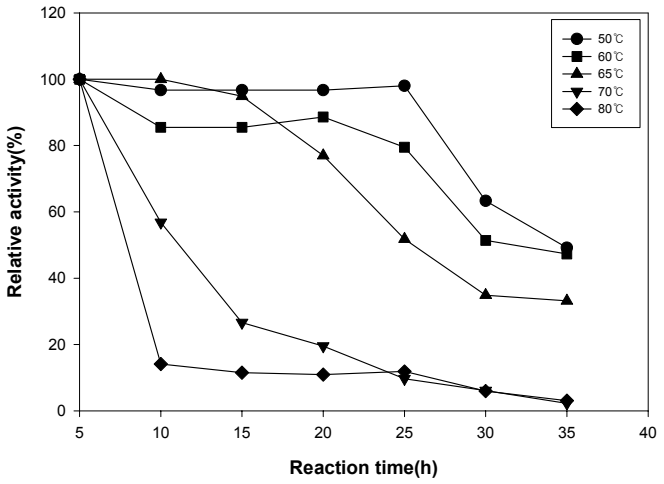



Fig. 59. Effect of temperature stability of immobilized cell on tagatose production

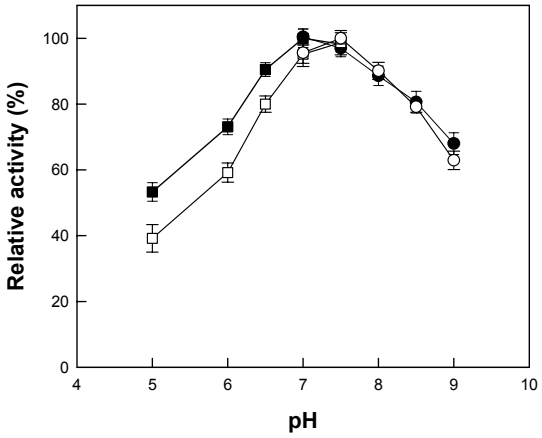



Fig. 60. Effect of pH on tagatose production by free cells (□) and immobilized cells (■) in 50 mM maleate-NaOH buffer (pH 5.0 - 7.0) and by free cells (○) and immobilized cells (●) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 - 9.0). The reactions were performed at 65C for 5 h in each buffer system containing 10 g/L galactose.

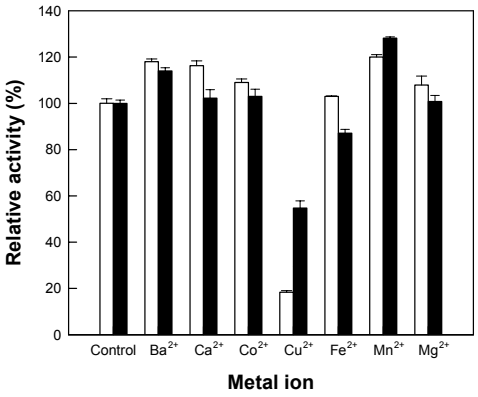



Fig. 61. Effect of metal ion on tagatose production by free cells (□) and immobilized cells (■). The reactions were performed at 65C for 5 h in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 g/L galactose.

Table 22. Effect of pH stability of immobilized cell on tagatose production

| pH | 50mM Maleic, Tris, NaOH buffer | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 5 | 6 | 7 | 7.5 |
| Free cell($t_{1/2}$, min) | 23.3 | 96.9 | 64.4 | 64.6 |
| Immo. Cell($t_{1/2}$, min) | 828.9 | 950.6 | 1318.0 | 1654.1 |
| pH | 50mM Tris-Hcl buffer | | | |
| | 7 | 7.5 | 8 | 8.5 |
| Free cell($t_{1/2}$, min) | 70.6 | 79.0 | 67.9 | 55.6 |
| Immo. Cell($t_{1/2}$, min) | 2005.5 | 1928.3 | 1296.0 | 1530.5 |

다. 생물반응기에서 고정화 균체를 사용한 타가토스 생산

Alginate beads에 포괄된 균체를 생물반응기 (XK 16, Armersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 충진하여 타가토스 생산에 사용하였다. 반응기의 작동 부피는 20 mL이고 높이와 직경은 각각 200 mm와 16 mm이었다. Galactose는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 용액에 녹여 그 농도를 50, 100, 200, 300, 400 g/L로 하였고, 희석율 0.05, 5 $h^{-1}$로 조절하여 peristaltic pump로 반응기에 주입하였다 (Fig. 62, Table 23). 반응온도는 water circulator (Eyela NTT-1200, Tokyo, Japan)를 사용하여 60°C로 유지하였고 연속 생산을 위하여 여러 농도의 galactose 용액 700 mL을 연속적으로 주입하고 밖의 reservoir에 연속적으로 배출하였다. Galactose 농도가 증가할수록 타가토스 생산성은 증가하였으나 전환수율은 감소하였다.

생물반응기에서 갈락토스 400 g/L에서 희석속도에 따른 타가토스의 생산량을 살펴보았다 (Fig. 63, Table 24). 희석율이 증가할수록 타가토스 생산성은 증가하였으나 전환수율은 감소하였다.

60℃에서 고정화 균체를 생물반응기에서 $Mn^{2+}$을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 40일 동안 활성을 살펴보았다 (Fig. 64). $Mn^{2+}$이 없는 경우 13일까지 안정하였고 48 g/L 타가토스가 2.4 g/L-h로 생산되었고 13일 후에는 활성이 급격히 감소하였다. 이에 비하여 $Mn^{2+}$을 첨가한 경우 20일까지 안정하였으며 59 g/L 타가토스가 2.9 g/L-h로 생산되었다.

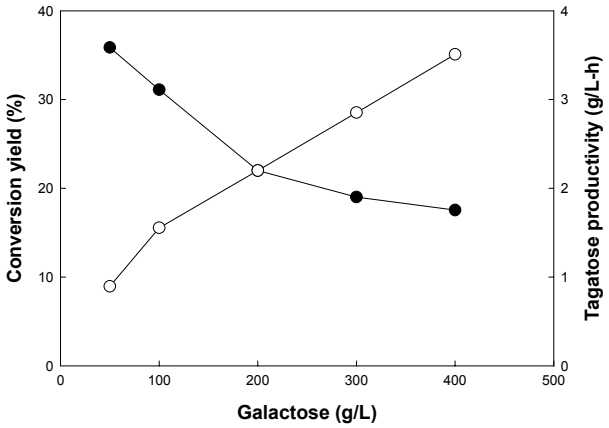



Fig. 62. Effect of galactose concentration on tagatose production in a packed-bed bioreactor

Conversion yield (○), tagatose productivity (●)

Table 23. Effect of substrate concentration on tagatose production in a packed-bed bioreactor.

| Sub.(g/L) | Taga(g/L) | conversion rate(%) | productivity ($g/L.h^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 50 | 17.93 | 35.86 | 0.896 |
| 100 | 31.10 | 31.1048 | 1.555 |
| 200 | 44.00 | 22 | 2.200 |
| 300 | 57.07 | 19.02 | 2.853 |
| 400 | 70.19 | 17.5464 | 3.509 |

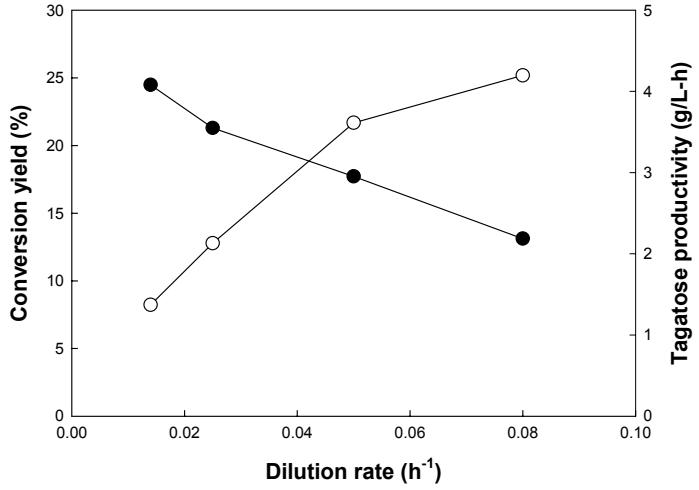



Fig. 63. Effect of dilution rate on tagatose production in a packed-bed bioreactor. Conversion yield (○), tagatose productivity (●)

Table 24. Effect of dilution rate on tagatose production in a packed-bed bioreactor.

| Dilution rate ($h^{-1}$) | Taga(g/L) | conversion rate(%) | productivity (g/L.h-1) |
|---|---|---|---|
| 0.014 | 97.92 | 24.48 | 1.37 |
| 0.025 | 85.19 | 21.30 | 2.13 |
| 0.05 | 70.86 | 17.72 | 3.61 |
| 0.08 | 52.47 | 13.12 | 4.20 |

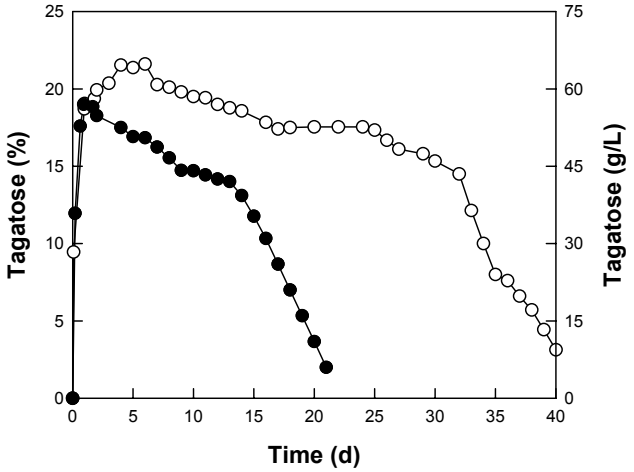



Fig. 64. Stability profiles of the immobilized cellsin a packed-bed bioreactor for tagatose production with (○) and without (●) added $Mn^{2+}$. A 300 g/L galactose solution in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) was fed into the bioreactor for 40 days.

## 8. 고정화 효소에 의한 타가토스의 생산

가. 최적 온도

기질 0.5 ml (galactose 10 g/L)에 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 pH 8.0, 50 mM Tris-HCl 완충용액에서 온도를 자유효소는 40℃에서 80℃까지, 고정화 효소는 50℃에서 80℃까지 30분간 반응시켰다 (Fig. 65). 그 결과 자유효소는 60℃에서, 고정화 효소는 65℃에서 최적 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 고정화 효소의 담체에 의한 열 차단 효과로 추측된다.

나. 최적 pH

기질로 galactose 10 g/L을 사용하고 기질 0.5 ml에 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 65℃에서 pH를 자유효소는 4에서 10까지, 고정화 효소는 6에서 10까지 30분간 반응시켰다 (Fig. 66). 사용한 완충용액은 pH 4-6에서는 maleate-NaOH 완충용액, pH 6-7에서는 phosphate-NaOH 완충용액, pH 7-9에서는 Tris-HCl완충용액, pH 9-10에서는 borate-NaOH 완충용액을 사용하였다. 그 결과 자유효소는 pH 7에서, 고정화 효소는 pH 9에서 최적 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 고정화 효소의 담체에 의한 효과로 추측된다.

다. 무기염 영향

기질로 galactose 10 g/L을 사용하고 기질 0.5 ml에 L-arabinose isomerase 0.5 ml 첨가하여 pH 7.5, 50 mM Tris-HCl 완충용액에서 온도를 65℃에서 여러 가지 무기염 각각을 1 mM 첨가하여 30분간 반응시켰다 (Fig. 67). 그 결과 자유효소는 60℃에서, 고정화 효소는 65℃에서 최적 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 고정화 효소의 담체에 의한 열 차단 효과로 추측된다.

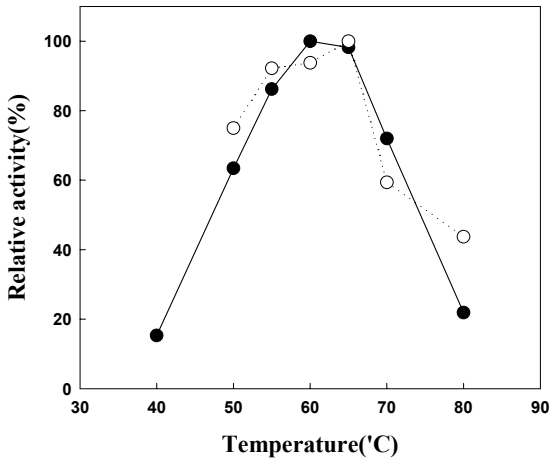



Fig. 65. Effect of temperature on free and immobilized L-arabinose isomerase. Free enzyme (●) and immobilized enzyme (○).

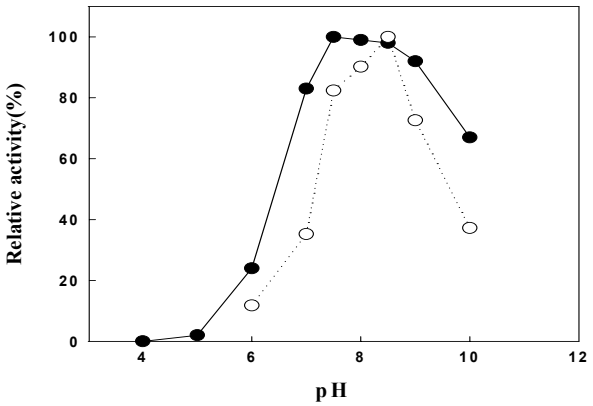



Fig. 66. Effect of pH on free and immobilized L-arabinose isomerase. Free enzyme (●) and immobilized enzyme (○).

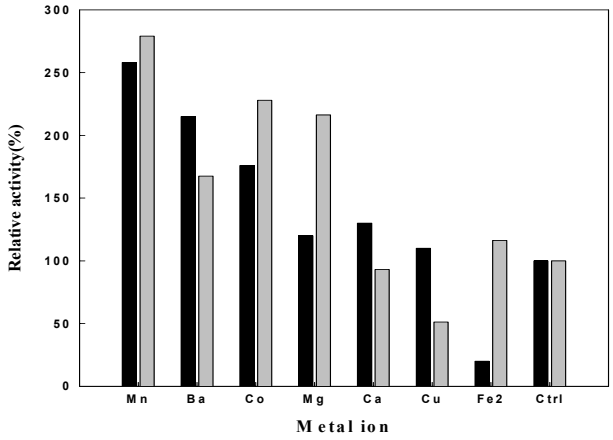



Fig. 67. Effect of metal various ions on the activity of free and immobilized enzyme. Free enzyme (■) and immobilized enzyme (□).

라. 자유 효소와 고정화 효소의 pH 안정성

기질로 galactose 10 g/L을 사용하고 기질 0.8 ml에 내열성 galactose isomerase 0.2 ml 첨가하여 60℃, pH 8로 하여 여러 무기염에서 반응시켰다 (Fig. 68). 그 결과 pH 8에서 최적 활성을 보여주었다. 고정화 효소가 자유효소보다 안정성이 좋안 반감기가 훨씬 길었지만 pH 9이상에서는 급격히 감소하였다 (Table 25).

마. 자유 효소와 고정화 효소의 온도 안정성

기질로 galactose 10 g/L를 사용하고 기질 0.8 ml에 내열성 galactose isomerase 0.2 ml 첨가하여 pH 8에서 자유 효소와 고정화 효소의 온도를 50℃에서 80℃까지 반응시켰다(Fig. 69). 사용한 완충용액은 Tris-HCl 완충용액이었다. 그 결과 자유효소는 50℃, 고정화 효소 60℃에서 가장 좋은 안정성을 보여주었다. 60℃에서고정화 효소의 반감기가 자유효소보다 50배 증가하였으며 60℃ 이상에서는 고정화 효소 열안정성이 급격히 감소하였다 (Table 26).

사. L-Arabinose isomerase의 자요효소와 고정화 효소의 활성비교

10 mg 단백질을 50 ml galactose(100 g/L, 60℃, pH 8 Tris-HCl 완충)용액에 넣고 자유 galactose isomerase와 고정화 galactose isomerase의 활성 비교하였다(Fig. 70). 자유 galactose isomerase는 37.4 g/L, 고정화 galactose isomerase는 58.4 g/L의 타가토스가 생성되었다. 자유 galactose isomerase의 타가토스로의 전환율이 고정화 galactose isomerase 보다 낮은 것은 고정화 효소의 안정성이 자유 효소의 안정성 보다 월등히 높기 때문이다.

Table 25. Half-lives of free and immobilized thermostable L-arabinose isomerases at various pHs

| pH | 6.0 | 7.0 | 8.0 | 9.0 |
|---|---|---|---|---|
| Free enzyme ($t_{1/2}$, h)[a] | 3.2 | 5.3 | 4.2 | 2.3 |
| Immobilized enzyme ($t_{1/2}$, h)[a] | 380 | 216 | 10.2 | 6.0 |

a Enzyme activity was assayed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 g/l galactose. Reactions were allowed to proceed at various pH and at 60 °C.

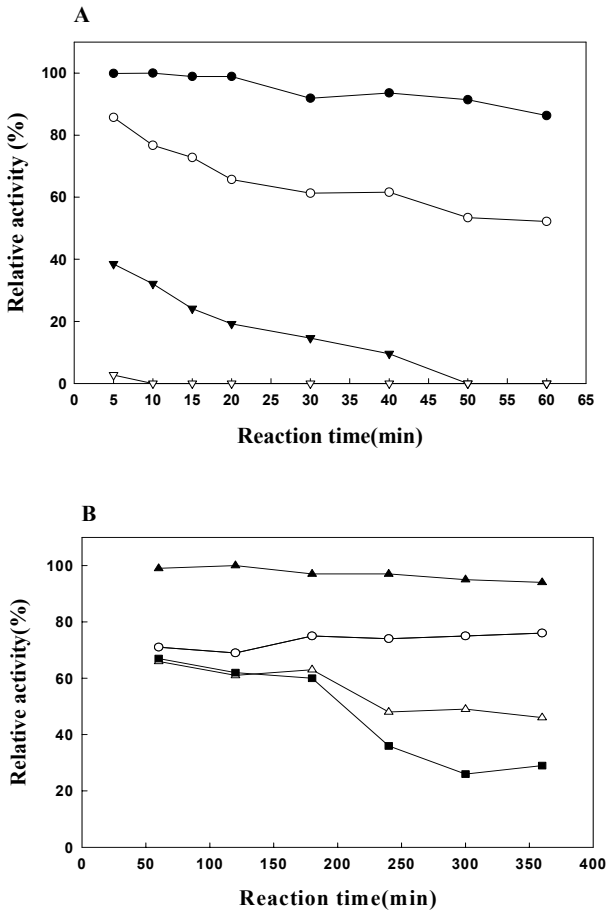



Fig. 68. pH stability of free(A) and immobilized enzyme(B).
pH 6(●), pH 7(○), pH 8(▲), pH 9(△), and pH 10(■).

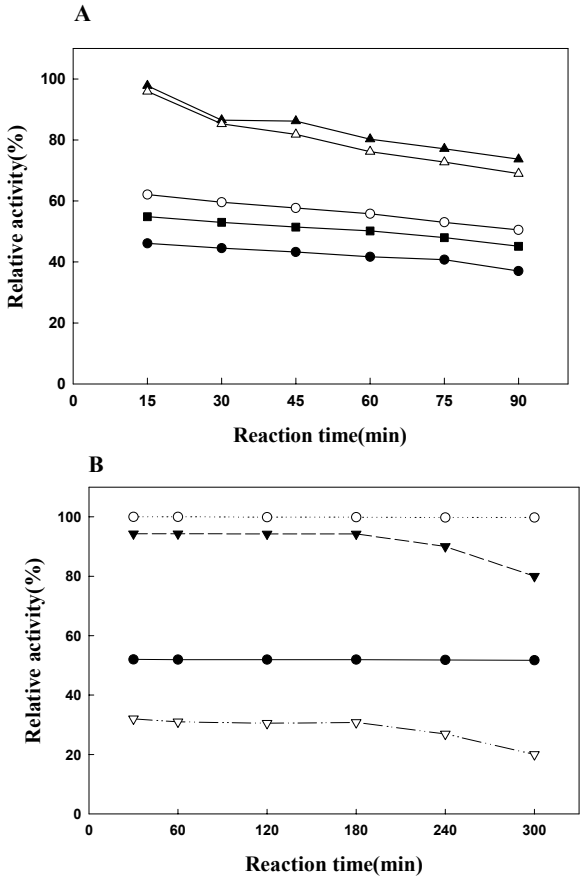



Fig. 69. Temperature stability of free(A) and immobilized enzyme(B). 50℃(●), 60℃(○), 70℃(▼), and 80℃(▽).

Table 26. Half-lives of free and immobilized thermostable L-arabinose isomerases at various temperatures

| Temperature (°C) | 50 | 60 | 65 | 70 | 80 |
|---|---|---|---|---|---|
| Free enzyme ($t_{1/2}$, h)[a] | 10.4 | 4.2 | 1.2 | 0.28 | 0.04 |
| Immobilized enzyme ($t_{1/2}$, h)[a] | 960 | 216 | 42.0 | 10.0 | 6.5 |

[a]Enzyme activity was assayed in a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 g/L galactose.

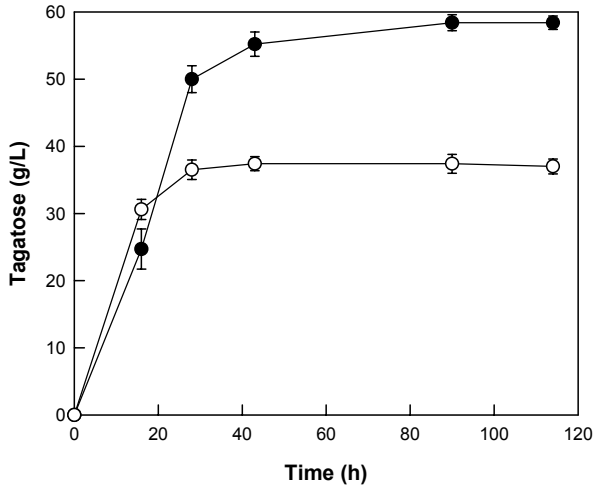



Fig. 70. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by free L-arabinose isomerase and immobilized L-arabinose isomerase. Free L-arabinose isomerase(○) and immobilized L-arabinose isomerase(●).

아. 생물반응기에서의 타가토스 생산

1) 고정화 담체 크기에 따른 D-tagatose 전환율의 영향

생물반응기(packed-bed reactor)에서 D-tagatose 생산수율에 대한 영향을 살펴보았다. 250U의 효소를 calcium alginate (2.5%)와 혼합하여 고정화하였다 (Fig. 71). 이때 담체 크기는 진공도와 syringe pump의 속도를 조절하여 0.8mm, 1.5mm, 2.0mm, 2.5mm, 3.5mm로 다양하게 만들었다. 100g/L D-galactose 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 60℃에서 6시간동안 반응시켰다. 이때 기질의 유속은 0.2 1/h이였다.

Fig. 72에서 나타난 것처럼 담체 크기가 가장 작은 0.8mm에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 담체 크기가 클수록 기질과 반응할 수 있는 면적이 커지기 때문에 담체크기가 작을수록 높은 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

2) L/D ratio (길이/직경 비율)에 따른 D-tagatose 전환율의 영향

D-Tagatose의 생산수율을 높이기 위해서 생물반응기에 대한 L/D ratio (길이/직경 비율) 실험하였다. 1.39U의 효소를 alginate (2.5%)와 혼합하여 고정화하였다. 이때 담체 크기는 0.8mm로 하였다. 각각의 column 사이즈는 520/7 mm, 300/10, 50/25, 200/16 mm이였고 총 부피는 모두 20mL로 동일하였다. 100g/L D-galactose를 함유하는 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 60℃에서 6시간동안 반응시켰다. 이때 기질의 유속은 0.2 1/h이었다. Fig. 73에서 나타난 것처럼 column의 직경이 작고, 높이가 높은 520/7 mm 에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 직경이 작고 높이가 높을수록 기질과 반응할 수 있는 시간이 길기 때문인 것으로 해석된다.

3) 유속에 따른 타가토스 전환율의 영향

생물반응기에서 유속에 따른 D-tagatose 전환율의 영향을 살펴보기 위하여 유속을 변화하였다(Fig. 74). 1.39U의 효소를 alginate (2.5%)와 혼합하여 고정화하였다. 이때 담체 크기는 0.8mm column은 520/7 mm로 하였다. 유속은 0.2 1/h에서 0.75 1/h로 다양하게 실험을 하였다. 100 g/L D-galactose를 함유하는 완충용액에서 60℃에서 6시간동안 반응시켰다. 그림 11에서 나타낸 것처럼 유속의 속도가 가장 낮은 0.2 1/h에서 높은 전환율을 나타냈다. 이것은 유속의 속도가 낮을수록 효소와 반응할 수 있는 시간이 길기 때문이다. 시간당 D-tagatose의 생산량을 측정해 본 결과, 유속이 빠를수록 증가하였다. 전환율과 생산속도를 고려하여 유속을 0.375 1/h로 결정하였다.

Fig. 71. Phtography of a packed-bed bioreactor

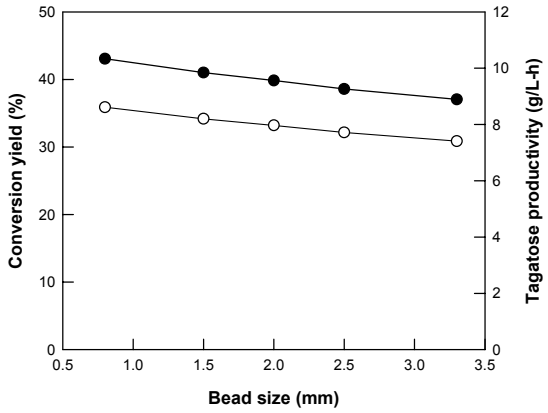



Fig. 72. Effect of alginate bead size of immobilized enzyme on conversion yield (●) and tagatose productivity (○) in a packed-bed reactor. The working volume of the reactor was 20 mL, and L/D was 200/16 mm, respectively.

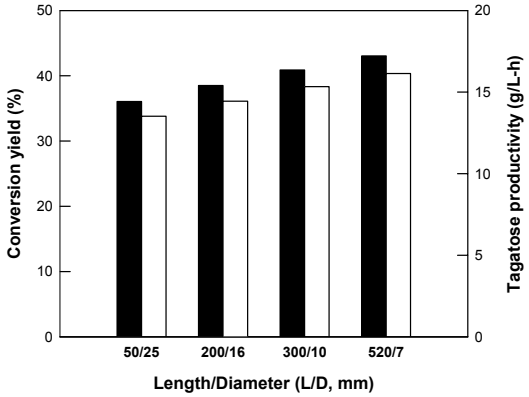



Fig. 73. Effect of change of length to diameter (L/D in mm) on conversion yield (■) and tagatose productivity (□) in a packed-bed reactor. The working volume of the reactor was 20 mL.

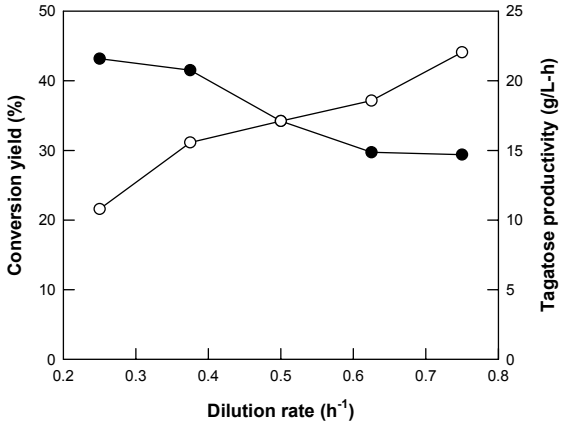



Fig. 74. Effect of dilution rate on conversion yield (●) and productivity (○) in a packed-bed reactor. The working volume of the reactor was 20 mL, and L/D was 520/7 mm, respectively.

4) 기질 농도에 따른 타가토스 전환율의 영향

D-Tagatose의 생산수율을 높이기 위해서 생물반응기에 대한 기질농도별 실험을 하였다. 250U의 효소를 calcium alginate (2.5%)와 혼합하여 고정화하였다 (Fig. 75).

이때 담체 크기는 0.8mm로 하였으며, column 사이즈는 520/7, 유속은 0.375 1/h로 실험을 하였다. 기질농도는 50 g/L, 100 g/L, 300 g/L, 500 g/L로 다양하게 실험하였다. 각 기질농도별로 100 g/L D-galactose를 함유하는 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 60℃에서 6시간동안 반응시켰다. Fig. 65에서 나타낸 것처럼 50 g/L에서는 30.4 g/L의 D-tagatose를 생 산하여 전환율 60.8%, 100 g/L에서 45 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 45%, 300 g/L에서는 67.5 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 22.5%, 500 g/L에서는 89 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 17.8%로 나타났다.

5) 효소 활성에 따른 타가토스 전환율의 영향

D-Tagatose의 생산수율을 높이기 위해서 생물반응기에 대한 효소활성별 실험을 하였다. 각각의 효소 농도는 1.39U, 2.78 U, 4.00U, 5.65U로 하였다. 이때 담체 크기는 0.8mm로 하였으며, column size는 520/7 mm, 유속은 0.375 1/h, 기질농도는 300 g/L로 실험하였다. 각 효소활성별로 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에서 60℃에서 72시간동안 반응시켰다.

Fig. 76에서 나타난 것처럼 1.39U에서는 67.5 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 22.5%, 2.78U에서 114.3 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 38.1%, 4.00U에서는 135.06 g/L의 D-tagatose 를 생산하여 전환율 45.0%, 5.65U에서 는 144 g/L의 D-tagatose를 생산하여 전환율 48.0%로 나타났다. 따라서 효소의 농도가 높을수록 D-tagatose로의 전환율 (%)이 올라가는 것을 알 수 있었다.

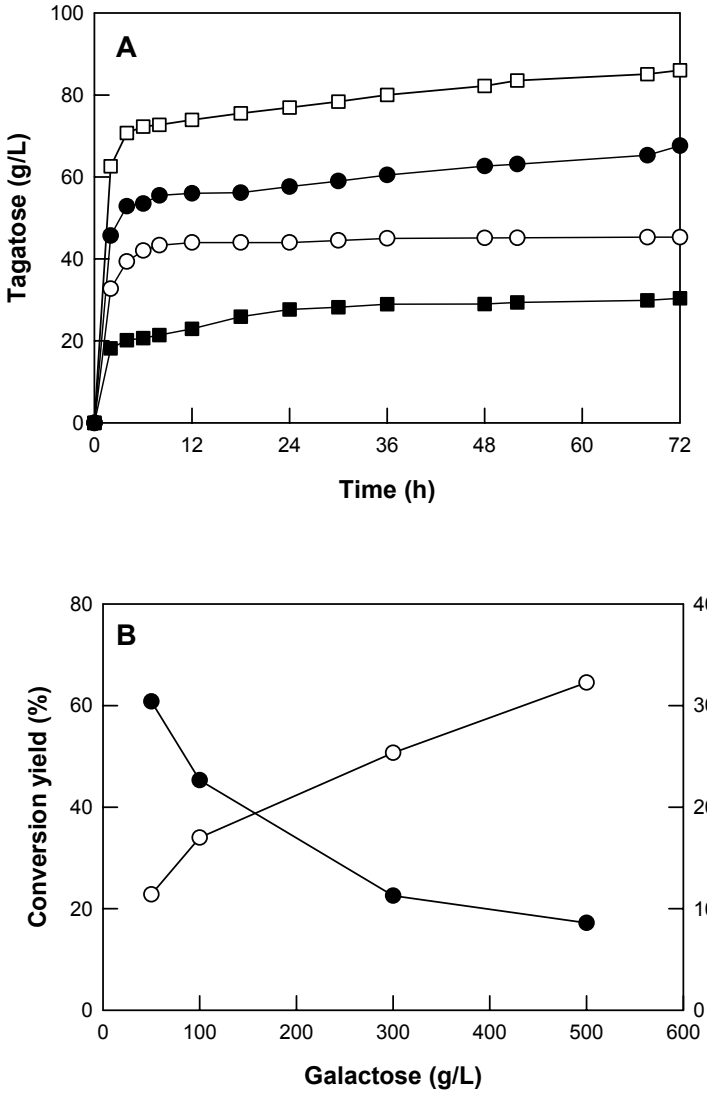



Fig. 75. Effect of substrate concentration on tagatose production in a packed-bed reactor. (A) Tagatose concentrations produced from different substrate concentrations; 50 (■), 100 (○), 300 (●), and 500 g/L galactose (□) solutions. (B) Conversion yield (●) and tagatose productivity (○) at the reaction time of 75 h.

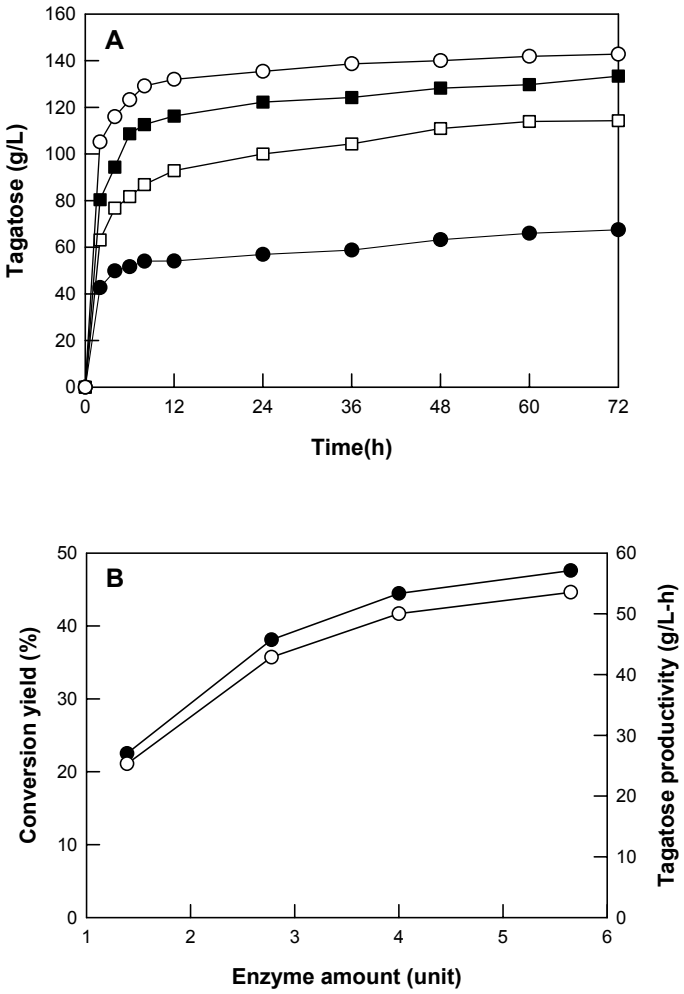



Fig. 76. Effect of total loaded enzyme amount on tagatose production in a packed-bed reactor. (A) Tagatose concentrations produced with different enzyme amount used; 1.39 (●), 2.78 (□), 4.00 (■), and 5.65 units (○). (B) Conversion yield (●) and tagatose productivity (○) at 75 h reaction time. The working volume of the reactor was 20 mL, and the L/D was 520/7 mm, respectively.

6) 생물반응기에서의 타가토스의 생산

1.96 U L-arabinose isomerase 사용하여 packed-bed 반응기에서 4 ml/h로 100 g/l galactose을 연속적으로 첨가시켜 50 g/L 타가토스가 생산되어 전환수율 50%, 평균 생산성 13.3 g/l-h로 7일간 생산되었다. 168시간 동안 20 ml 생물반응기에서 44.4 g의 타가토스가 생성되었다. 이것은 2,200 g 타가토스 / 생물반응기 liter에 해당된다 (Fig. 77).

500 g/L galactose를 3.91 U L-arabinose isomerase의 고정화 담체가 들어있는 생물반응기(XK-16)로 타가토스를 생산하였다(Fig. 78). 생산농도는 230 g/L로 전환수율 46%이었고 타가토스의 생산성은 9.58 g/L-h이었다. 생산성과 전환수율이 감소한 것은 고농도 galactose에서 기질저해 현상이 있기 때문이다.

안정성을 보기 위하여 5.65 U L-arabinose isomerase의 고정화 담체가 들어있는 생물반응기(XK-16)로 타가토스를 40일간 생산하였다(Fig. 79). L-Arabinose isomerase 사용하여 packed-bed 반응기에서 고정화 효소는 300 g/L galactose로부터 첫 15일 까지는 145 g/L가 50 g/L-h 이상의 생산성으로 생산되었고 24일에는 활성이 반으로 감소하였다.

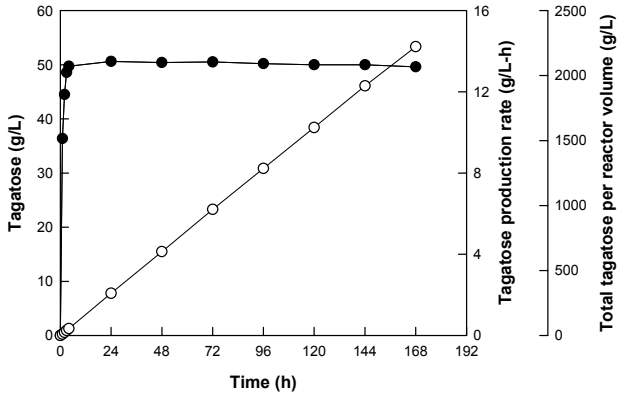



Fig. 77. Continuous production of tagatose from galactose by immobilized Gali152 in a packed-bed bioreactor. Tagatose production (●), tagatose production rate (●), and total tagatose per reactor volume (○). The galactose medium was a buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 100 g/L galactose. Enzyme activity of 1.96 international unit was immobilized.

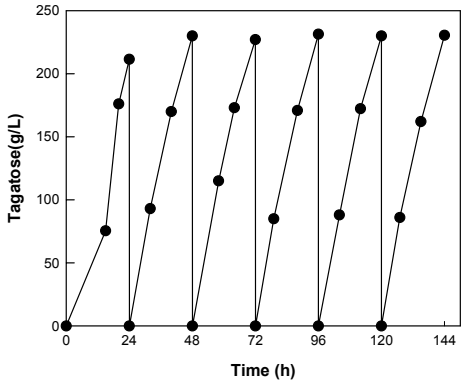



Fig. 78. Tagatose production of form galactose by the immobilized Gali152in a packed-bed bioreactor with continuous recycling mode. The galactose medium was a buffer 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 500 g/L galactose. Enzyme activity of 3.91 international unit was immobilized.

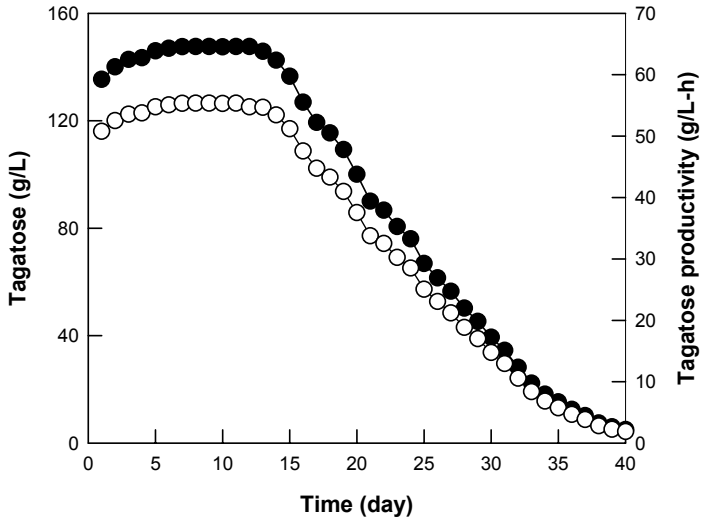



Fig. 79. Stability profile of immobilized enzyme in a packed-bed reactor for conversion yield (●) and tagatose productivity (○). The working volume of the reactor was 20 mL. The galactose solution of 300 g/L in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was fed into the reactor at the dilution rate of 0.375 $h^{-1}$ and the average bead size was approximately 0.8 mm. The reaction was performed at 60C for 40 days with the total enzyme activity of 5.65 units.

## 9. 타가토스 생산, 정제 및 시제품의 생산

### 가. 최적 효소의 고정화에 의한 타가토스 생산

그 동안 개발한 galactose isomerase는 *G. stearothermophilus* 유래의 wild-type인 gali 151, 돌연변이 효소인 gali 152 (Asn228→Asp, Gly384→Asp, Ser393→Thr, Lys428→Asn, Asn475→Lys), 돌연변이 효소인 gali 153 (Met322→Val, Ser393→Thr, Val408→Ala), *G. thermodenitrificans* 유래인 wild-type, single point mutant (Asn475→Lys), double point mutant (Cys450→Ser, Asn475→Lys)가 있다. 이중에서 *G. thermodenitrificans* 유래인 double point mutant (Cys450→Ser, Asn475→Lys)가 가장 활성이 좋아 최적효소로 선정하고 타가토스 생산에 사용하였다.

고정화 방법은 효소고정화와 세포 고정화가 있는데 고정화균체는 고정화 효소에 비하여 specific production rate는 높으나 volumetric production rate는 떨어진다. 그러므로 volumetric production rate가 높게 나타난 고정화 효소법을 사용하여 타가토스 생산에 사용하였다.

최적 효소의 자유 효소와 고정화 효소의 온도특성을 살펴보았다(Fig. 80). 자유 효소의 최적온도는 65℃이었고, 고정화 효소의 최적온도는 70℃이었다. 특히 고정화 효소는 75℃에서도 활성이 최대값의 97%로 비교적 높게 나타났다. 최적 효소의 자유 효소와 고정화 효소의 pH 특성은 거의 유사하게 나타났고 최적 pH는 8.5이었다 (Fig. 81).

효소를 고온에서 장기간 사용하려면 열안정성이 중요하다. 최적 효소의 자유 효소와 고정화 효소의 열안정성을 살펴본 결과 Fig. 82에 나타내었다. 자유 효소는 65℃에 비교적 안정하여 7시간 후에도 활성이 최대값의 92%로 비교적 높게 나타났다. 70℃ 이상에서는 열안정성 온도가 증가할수록 떨어져 80℃에서는 6시간 후에 활성이 최대값의 20%로 낮게 나타났다. 이에 비하여 고정화 효소에서는 열안정성이 크게 증가하였다. 고정화 효소는 65℃에서도 매우 안정하여 7일 후에도 활성이 최대값의 98.5%로 매우 높게 나타났다. 70℃ 이상에서도 자유효소보다 열안정성이 월등히 증가하였으나 열안정성 온

도가 증가할수록 떨어져 80℃에서는 4일 후에 활성이 최대값의 20%로 낮게 나타났다.

최적 효소의 10 mg 단백질을 50 ml galactose(100 g/L, 60℃, pH 8 Tris-HCl 완충)용액에 넣고 자유 galactose isomerase와 고정화 galactose isomerase의 활성 비교하였다(Fig. 83). 자유 galactose isomerase는 53 g/L, 고정화 galactose isomerase는 59 g/L의 타가토스가 생성되었다. 초기 전환 속도는 고정화 효소보다 자유 효소가 높았지만 최종적으로는 자유 galactose isomerase의 타가토스로의 전환율이 고정화 galactose isomerase 보다 낮았다. 이는 고정화 효소의 안정성이 자유 효소의 안정성 보다 높기 때문이다.

안정성을 보기 위하여 3.0 U galactose isomerase의 고정화 담체가 들어있는 생물반응기(XK-16)로 타가토스를 40일간 생산하였다(Fig. 84). Galactose isomerase 사용하여 packed-bed 반응기에서 고정화 효소는 300 g/L galactose로부터 30일 까지는 160 g/L이상 및 32 g/L-h 이상의 생산성으로 생산되었다. 30일 이후에는 활성이 약간씩 감소하였지만 40일 후에 활성은 최대치의 80%를 나타내어 40일 정도 타가토스 생산에 사용하는 것은 문제가 없다는 결과를 얻었다.

## 나. 정제 및 시제품 생산

400 g/L 유당 10 L에 Lactozym 1200 U를 사용하여 반응 6시간에 분해하여 206 g/L의 galactose를 얻었다. 이는 분해율 98%에 해당되는 것이다. 유당가수분해물 1L를 Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410를 1:2로 혼합된 이온교환수지(20L 규모)를 통과시켜 galactose를 분리하였다. 이때 당 분리는 YAMAGEN MPLC YFLC-700를 사용하여 유속은 50 mL/min이었고 1 batch에 206g의 반응액으로부터 192 g의 galactose를 얻어 정제수율이 93.2%이었다. 얻어진 galactose용액을 농축하여 300 g/L 또는 500 g/L galactose용액을 제조하였다. 필요할 때마다 유당가수분해물을 1L 단위 분리정제하여 galactose를 제조하였고 제조한 용액을 타가토스 생산에 사용하였다.

타가토스 생산 및 정제 연구는 반응액을 20 ml인 50% galactose 용액을 5.55 U의 arabinose isomerase가 고정화된 생물반응기(XK16)를 사용하였다. 생물반응기의 유량은 12.5 ml/h로 하여 연속적으로 첨가하여 7일간 작동시켜 140 mL의 타가토스 함유 용액을 얻었다. 생산농도는 240 g/L로 전환수율 48%이었고 타가토스의 생산성은 10 g/L-h이었다(Fig. 36). 타가토스 용액을 HPLC 분석한 결과 타가토스가 32 g이 존재하였다. Dowex 50W-X2($H^+$)와 Dowex($CO_3^{-2}$)의 column을 통과시켜 이온 성분을 제거하였다. 이온이 제거된 용액의 D-tagatose는 28.7 g이었다. 이온이 제거된 용액을 50℃에서 진공 농축하여 점액성 물질을 얻었고 이것을 99.9%의 에탄올을 첨가하여 25.6 g D-tagatose 흰색의 결정을 얻었다.

생물반응기에서 생산된 타가토스를 시제품을 만들기 위하여 정제를 수행하였다 (Fig. 85). *G. thermodenitrificans* 유래인 double point mutant의 L-arabinose isomerase가 있는 재조합 *E. coli*를 배양한 후 High-pressure homogenizer로 세포를 파쇄한 후 원심분리하였다. 상등액을 amonium sulfate 침전시킨 후 침전된 단백질을 회수하여 용해시킨 뒤 60℃에서 20분간 열처리하여 *E. coli*유래 단백질을 제거하였다. 부분 정제된 효소를 alginate에 고정화시킨후 생물반응기(XK-16)로 타가토스를 생산하였다. 생산된 타가토스를 활성탄을 처리한 후 여과하여 색소를 제거하였다.

이온교환수지가 장착된 MPLC(medium pressure liquid chromartography)를 이용하여 갈락토스와 타가토스를 분리하여 타가토스 부분만 분취하였다. 타가토스 용액을 활성탄 처리를 한 후 여과한 후 농축하고 동결건조하였다. 주요 과정인 활성탄 처리조건과 이온교환 수지 처리과정을 자세히 살펴보면 다음과 같다.

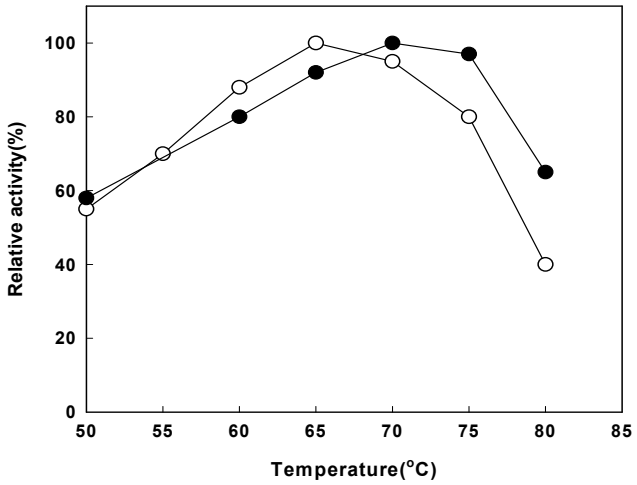



Fig. 80. Effect of temperature on free and immobilized thermostable galactose isomerase. Selected free enzyme (○) and immobilized enzyme (●).

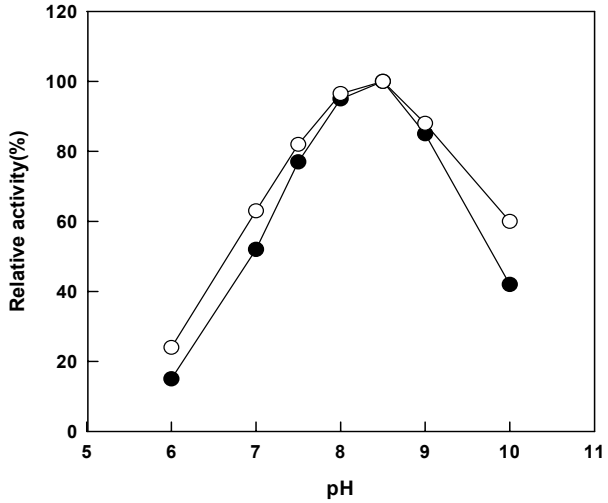



Fig. 81. Effect of temperature on free and immobilized thermostable galactose isomerase. Selected free enzyme (○) and immobilized enzyme (●).

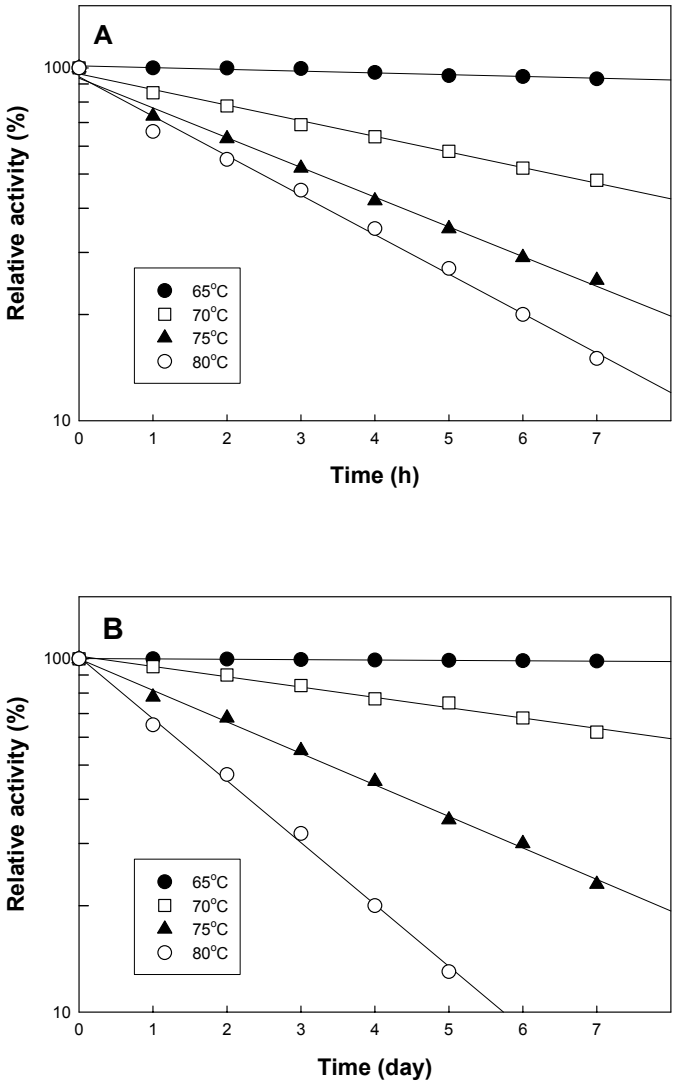



Fig. 82. Temperature stability of free(A) and immobilized enzyme(B).

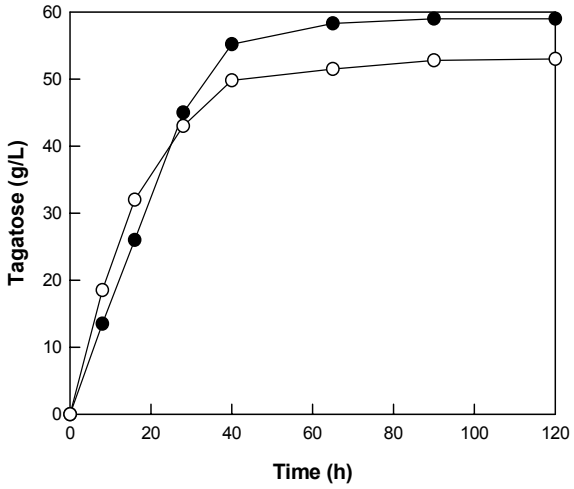



Fig. 83. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by selected free galactose isomerase(○) and immobilized galactose isomerase(●).

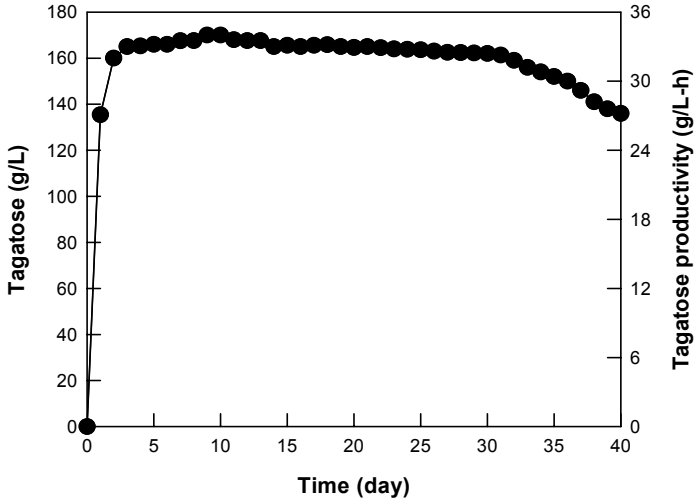



Fig. 84. Stability profile of immobilized enzyme in a packed-bed reactor for conversion yield and tagatose productivity. The galactose solution of 300 g/L in 50 mM EPPS buffer (pH 8.5) was fed into the reactor at the dilution rate of 0.2 $h^{-1}$.

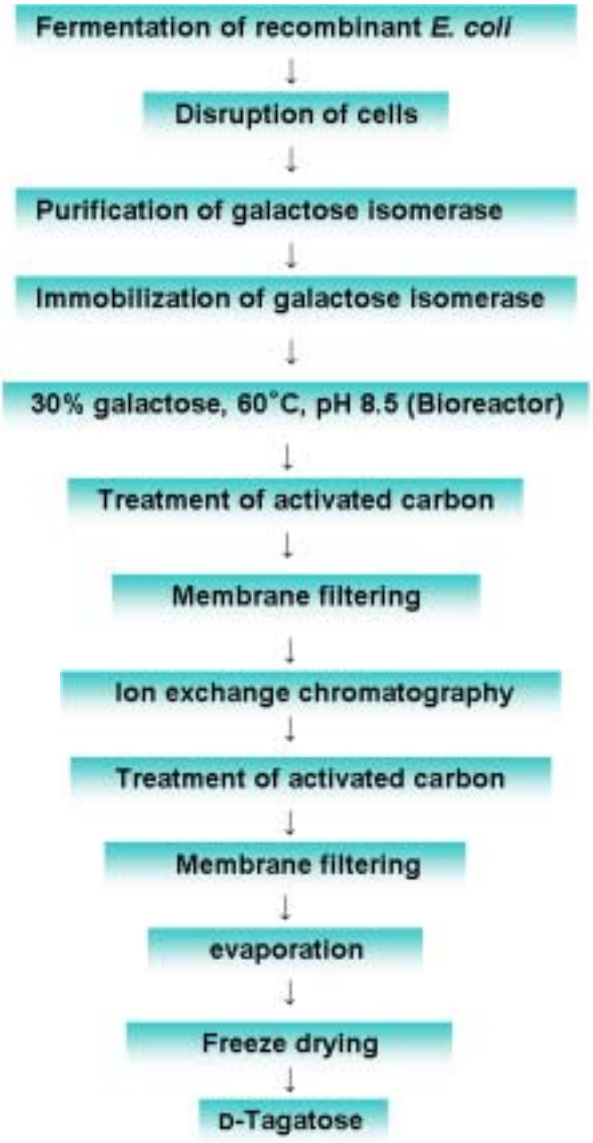



Fig. 85. Purification procedure of D-tagatose

생물반응기에서 생산된 타가도스의 의 색깔을 없애기 위해 활성탄을 처리하였다. 활성탄 처리 조건을 최적화하기 위해 pH(5, 6, 7, 8), 온도(50, 60, 70, 80℃), 활성탄 농도(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5%), 반응시간(20, 30, 40, 50)을 변화시켜 반응시킨후 여과하여 여과된 배양액을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 최적 조건을 pH 6, 70℃, 활성탄 농도 1.5%, 반응시간 30분으로 결정하였다 (Table 27).

이온교환수지는 Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410를 2:1로 혼합하여 20L 규모로 충진하여 YAMAGEN MPLC YFLC-700와 함께 사용하였고 유속은 100 mL/min이었고 1 batch에 80g의 반응액으로부터 70 g의 타가토스를 얻어 정제수율이 87.5%이었다 (Fig. 86, Fig. 87, Fig. 88).

Table 27-A Residual color of fermentation broth after activatived carbon treatment at 70℃, 1.5% activated carbon and various pHs for 30 min. Initial color was 100% (OD, 540nm =0.16).

| pH | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|
| Residual color | 0.42 | 0.32 | 1.20 | 2.80 |

Table 27-B Residual color of fermentation broth after activatived carbon treatment at pH 6, 1.5% activated carbon and various temperatures for 30 min. Initial color was assumed to be 100%.

| Temperature(℃) | 50 | 60 | 70 | 80 |
|---|---|---|---|---|
| Residual color | 1.23 | 0.68 | 0.32 | 0.30 |

Table 27-C. Residual color of fermentation broth after activatived carbon treatment at 70℃, pH 6, and various concentrations of activated carbon for 30 min. Initial color was assumed to be 100%.

| Activated carbon (%) | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
|---|---|---|---|---|
| Residual color | 5.32 | 1.45 | 0.32 | 0.28 |

Table 27-D. Residual color of fermentation broth after activatived carbon treatment at 70℃, pH 6, and 1.5% activated carbon for various times. Initial color was assumed to be 100%.

| Time (min) | 20 | 30 | 40 | 50 |
|---|---|---|---|---|
| Residual color | 4.32 | 0.32 | 0.30 | 0.28 |

Fig. 86. MPLC with Dowex 50 x 8, Amberlite IRA-410 resin (20L)

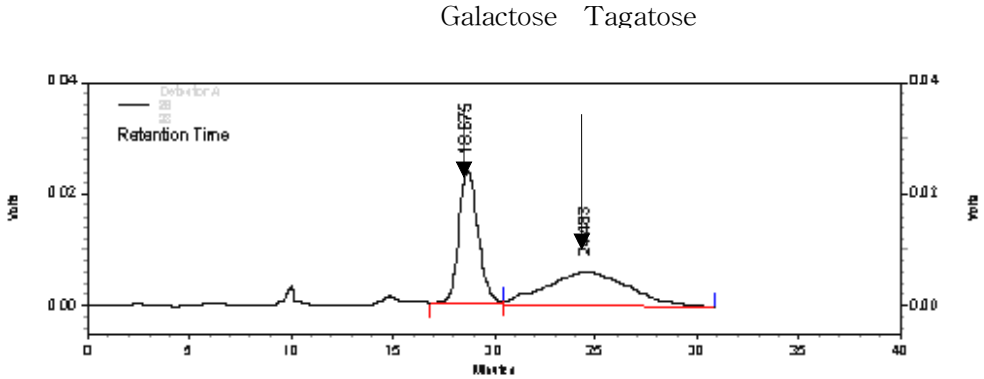



Fig. 87. MPLC profiles of galactose and tagatose

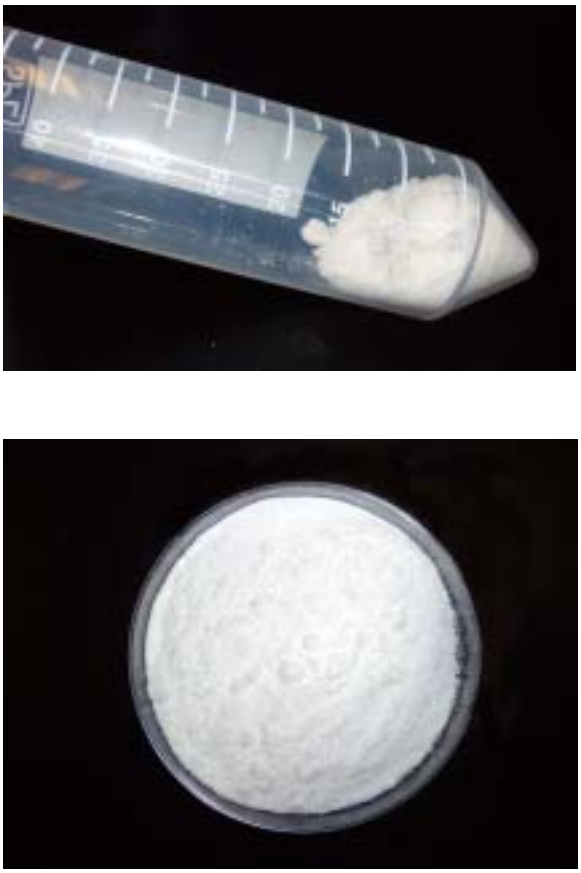


Fig. 88. Photography of purified D-tagatose

건조 결정이 D-tagatose임을 증명하기 위해 표준 D-tagatose(Sigma Co., USA)와 비교하였다(Fig. 89). 표준 D-tagatose의 녹는 온도와 동일하게 건조 결정의 녹는온도는 131℃를 나타내었다. 비선광도를 측정한 결과도 동일하게 5.8도를 나타내었다. 건조결정과 표준 D-tagatose를 HPLC로 각각을 분석한 결과 모두 동일 시간의 peak로 검출되었고 또한 함께 분석한 결과도 동일시간의 peak로 검출되어 건조결정이 D-tagatose임을 확인할 수 있었다. Infrared spectrum에서는 여러 가지 peak가 검출되었고 이중 3,000-3,500 $cm^{-1}$의 peak는 -OH peak이었고, 2,500-3,000 $cm^{-1}$의 peak는 -CH결합의 stretching peak이었고, 1,500-2,000 $cm^{-1}$의 peak는 C=O peak로 생각되나 D-tagatose가 furan ring을 형성하면서 peak가 작아진 것 같았다. 건조 결정의 Infra-Red spectrum, HPLC, 비선광도, 녹는점을 비교하여 건조결정이 D-tagatose임을 증명할 수 있었다.

## 10. 경제성 분석

타가토스 판가가 5,500 - 6,000 원이다. 국내에서 유당을 구입하면 유당가격이 500원인데 이때 원부재료비 2,250원이다. 정제에서 발생되는 galactose는 재사용이 가능하므로 2회 재사용하면 원부재료비가 1,556원이다. 유당을 국내가 아닌 곳에서 구입하면 유당가격이 300원이 가능한데 이때 원부재료비 1,590원이다. 정제에서 발생되는 galactose는 재사용이 가능하므로 2회 재사용하면 원부재료비가 973원이다. 유당을 유청에서 얻을 경우에 유청은 재활용이 가능하고 유당부분은 매우 저렴하게 얻을 수 있다. 경제성 분석 결과 유당가격이 사업 경쟁력이 가장 중요한 인자임을 알았다.

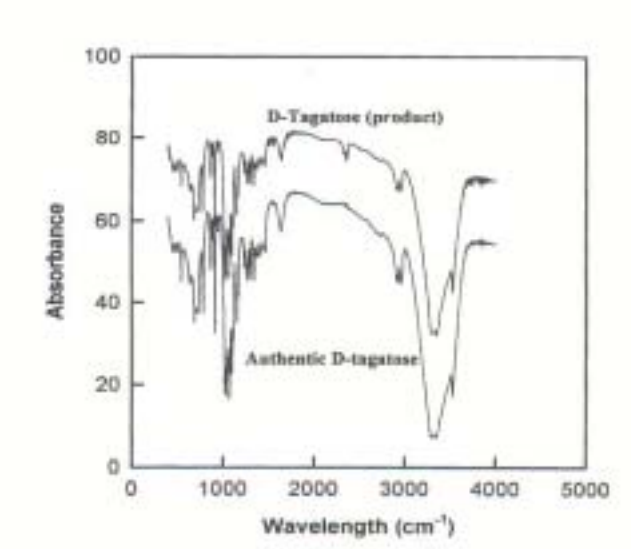



Fig. 89. Infrared spectra of authetic D-tagatose and the product.

Fig. 90. Cost evaluation

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1절 목표달성도

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 달성내용 | 달성도 (%) |
|---|---|---|---|
| 1차 년도 (2002) | - 타가토스 생산을 위한 효소반응조건 최적화 | - 타가토스 생산을 위한 효소 반응조건 최적화 | 100 |
| | - 타가토스 생산을 위한 고정화 방법 개발 | - 효소를 여러 담체에 고정화하여 최적 담체 및 최적 반응조건 선정 | 100 |
| | - 유전자 선별을 통한 타가토스 생산 고온 효소 선별 | - 내당성 및 반응속도가 빠른 고온효소 선별 | 100 |
| | - 타가토스 생산을 위한 생물반응기 작동 | - 생물반응기에서 갈락토스로부터 타가토스 연속 생산 | 100 |
| 2차 년도 (2003) | - 유당 분해 전환 효소 반응 최적화 | - β-galactosidase를 유당에 첨가하여 갈락토스 생산의 최적 조건 선정 | 100 |
| | - 고정화 균체에 의한 타가토스생산 | - 효소 대신 균체를 고정화하여 타가토스를 생산 | 100 |
| | - 갈락토스로부터 타가토스 생산후 정제 | - 갈락토스로부터 타가토스 생산후 정제 | |
| | - 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량 | - 반응속도가 빠른 효소 개발 | 100 |
| 3차 년도 (2004) | - 유당으로부터 타가토스 생산 후 정제 | - 유당으로부터 타가토스 생산 후 정제 | 100 |
| | - 유당으로부터 시작하여 타가토스 생산 | - 유당에서 타가토스의 전환 공정 확립 및 최적화 | 100 |
| | - 유전자 진화를 통한 타가토스 생산 효소 개량 | - 반응속도가 빠른 효소 개발: | 100 |
| | - 유당분해, 타가토스 생산 및 정제의 scale-up 실험 | - 유당에서 타가토스의 전환 전단계 scale-up | 100 |
| | - 타가토스 시제품 생산 | - 타가토스 시제품 생산 | 100 |
| | - 경제성 분석 | - 경제성 분석 | 100 |

# 제 2 절 관련분야에의 기여도

## 1. 기술적 측면

○ 관련 기본 기술수준의 진보: 유전공학적인 기술과 배양기술을 도입하여 미생물에서 L-arbinose isomerase를 생산하였고 균주의 유전자 조작 기술, 효소의 유전자 error-prone PCR, site-directed mutagenesis 등의 첨단기술이 확보되었고 재조합 미생물 배양 기술, 효소의 분리정제기술, 효소 및 균체의 고정화 기술, 생물반응기의 개발기술, 당의 분리정제기술, 생물공정의 최적화 개발기술 등이 확보되어 관련 산업의 산업적 기술 수준의 진보가 기대되며, 이러한 생물공학의 핵심기술의 발전으로 우리나라 생물산업수준도 국제 경쟁력을 제고 된 것으로 생각된다.

○ 화학합성법을 대체하는 청정기술의 확보: 생명공학 기술을 이용하여 환경친화적인 생물전환법으로 타가토스를 생산하는 기술을 확보되어 현재 고온 고압하에 생산하는 타가토스의 화학합성법과 경쟁이 예상된다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

○ 새로운 시장 창출: Tagatose는 설탕과 가장 유사한 특성을 가지고 있으나 소화되지 않는 저칼로리 탄수화물 감미료이며, 또한 정장효과, 풍미증진 효과 등 여러 가지 우수한 기능성을 가지고 있어 기능성 대체 감미료로서 세계시장 규모는 연간 10조원 이상에 달할 것으로 예측되며, bulking agent, 카이랄 화합물 중간체로서 새로운 시장 창출에 기여할 것으로 기대된다.

○ 수입시장 대체 및 수출: 국내의 경우 음료 및 유제품 등에 적용할 경우 출시 초기에 약 50-60억 정도의 시장을 형성할 것으로 보이나, 모두 수입해야 하기 때문에 이 제품을 국산화할 경우 수입대체 효과가 최소 초기에 50억원에 이를 것으로 추정되고 당알코올인 자일리톨보다 설탕 대체 효과가 커서 시장이 확대 대면 1,000억까지도 가능하리라 생각된다. 본 기술이 성공적으로 개발되어 향후 산업화 연구를 추가적으로 진행하면 농산 폐기물을 활용하고 효소법의 우수성으로 kg당 공급가격이 국제공급 가격보다 낮은 수준인 $4.0/kg 이하로 가능할 것으로 보여 선진국으로의 역수출까지 기대할 수 있다.

# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

## 제 1 절 타 연구에 응용

- 생물전환적 방법으로 생산되는 다른 기능성 물질 생산에 적용할 수 있다.
- 산업적으로 중요한 다른 유사 효소들을 대량생산에 활용할 수 있다.
- 관련된 효소의 진화 기술, 효소를 분비시키는 기술, 효소 정제 기술, 고정화 기술, 생물반응기 기술 등이 확보되어 다른 효소 생산에도 적용될 수 있다.

## 제 2 절 기업화 추진 방안

- 본 과제의 성공적인 수행으로 tagatose 생산을 위하여, lactose 가수분해 공정, galactose 이성화공정, 각종 당류의 효율적인 크로마토그래피 분리, 핵심효소인 L-arabinose isomerase의 활성 증진 및 고정화기술 확립, 타가토스의 결정화 등 핵심기술을 완성되어, 대기업과 연계하여 공정 단위별로 소규모 pilot scale 장치의 건설 및 기존 시설을 이용하여 생산 공정 개발, scale-up 연구를 수행하여 실제 타가토스의 생산 공정 시스템을 구축한다. 과제 수행 결과를 기반으로 lactose로부터 tagatose의 시험생산을 위한 demonstration unit를 완성하고 시제품을 출시하며 건강 기능성 소재로 시장을 창출한다.
- 과제 종료 후 사업화 연구가 완료되면 대기업과 연계하여 pilot 및 demonstration unit의 운전 자료와 시장성을 고려하여 생산시설을 건설하고 본격적인 사업을 수행할 예정이다.
- 시장의 1차 target은 타가토스의 저 칼로리와 기능성을 강조하여 여성 다디어트 식품용, 당뇨병환자식 등 건강 기능성 식품소재로서 판매를 개척하며 점진적으로 화장품, 재약용 등 비식품용으로 시장을 확대한다.
- 또한, 세계시장 진출을 위하여 시기에 따라 외국기업에 개발기술의 licensing out도 추진한다.

# 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 수행하면서 해외과학정보의 수집은 주로 문헌, 특허, 인터넷 검색사이트, 해외학회 중심으로 행하였다.

- 미국의 Spheric사는 1994년 칼슘을 촉매로 하여 D-galactose를 D-tagatose로 전환하는 화학적 이성화법을 개발하였다 (Fig. 2). 즉 galactose를 20 ~ 25℃의 저온에서 금속수산화물인 tagatose · $Ca(OH)_2$ 복염을 형성시킨 후 복염을 여과하여 회수하고 $CO_2$를 취입하여 중화시킨다. 복염은 알칼리 조건에서는 안정하나 산성조건에서는 불안정하므로 pH 7 이하가 되면 tagatose가 유리되고 $CaCO_3$ 침전이 생긴다. 여과, 탈이온 과정을 거쳐 정제한 공업체인 Arla Foods사에서는 5백만 불의 로열티를 지불하고 미국 Biospheric사로부터 이와 같은 화학이성화법에 의한 tagatose 특허 기술을 이전 받았다. Biospheric사는 계속적인 기술지원대가와 tagatose의 판매액에 대한 running royalty로서 계약기간 동안 약 5억불 이상의 수익이 예상되는 것으로 보도되고 있다.
- 독일의 Nordzucker는 Arla Foods와 joint venture를 설립하고 연간 생산 1250 M/T의 tagatose 생산 공장을 Hanover에 건설하여 2003년부터 Gaio tagatose란 상품명으로 생산하고 있다.
- Kraft Foods사는 cheese whey로부터 효소법에 의한 tagatose 생산 공정을 보고하였다. Cheese whey를 UF, RO의 막분리에 의해 단백질과 염을 제거한 다음 고정화 β-galactosidase를 이용하여 lactose를 galactose와 glucose로 가수분해 시켰다. 이 가수분해액을 알코올 발효하여 glucose를 알코올로 전환시킨 후 알코올을 증발 제거하여 galactose 용액을 얻고 이를 고정화 L-arabinose isomerase(AI)를 이용하여 tagatose로 전환하였다. 덴마크의 Bioneer사는 2004년 혐기성 내열성 세균 *Thermoanaerobacter mathranii* 유래 L-AI를 *E. coli*에서 발현시키고, 이 재조합 효소를 고정화하여 65℃에서 galactose를 tagatose로 42% 전환시켰다고 보고하였다.
- Tagatose는 2001년 미국 FDA로부터 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 인정받아 미국에서 식품첨가물로 사용하는데 문제가 없으며 2003년 8월 Arla Foods사에서는 우리나라에서도 tagatose가 승인된 것으로 발표하였다.

# 제 7 장 참고문헌


Aiyar A.; Xiang Y.; Leis J. (1996) Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol.* **57,** 177191.

Asboth, B., Naray-Szabo, G. (2000) Mechanism of action of D-xylose isomerase. Curr. *Protein Pept. Sci.* **1**, 237-254.

Baek D.H.; Lee Y, Sin HS, Oh DK (2004) A new thermophile strain of *Geobacillus thermodenitrificans* having L-arabinose isomerase activity for tagatose production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14,** 312316.

Banerjee, S.; Anderson, F.; Farber, G. K. (1995) The evolution of sugar isomerases. *Protein Eng.* **8**, 1189-1195.

Bar, A.; Lina, B.A.; de Groot, D.M.; de Bie, B.; Appel, M.J. (1999) Effect of D-tagatose on liver weight and glycogen content of rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **29**, S11-S28.

Batra, N.; Singh, J.; Banerjee, U. C.; Patnaik, P. R.; Sobti, R. C. (2002) Production and characterization of a thermostable β-galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**, 16-19.

Becerra M.; Cerdan E.; Gonzalez Siso M. I. (1997) Heterologous *Kluyveromyces lactis* -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic-remedial thermosensitive autolytic mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **1335,** 235-241.

Becerra M.; Prado S. D.; Siso M.I.; Cerdan M. E. (2001) New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis*-galactosidase. *Protein Eng.* **14,** 379-386.

Berger J. L.; Lee B. H.; Lacroix C. (1997) Purification, properties and characterization of a high-molecular-mass β-galactosidase isoenzyme from *Thermus aquaticus* YT-I. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **25,** 2941-2944.

Bibel, M.; Brettl, C.; Gosslar, U.; Kriegshauser, G.; Liebl, W. (1998) Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic

bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiololgy Letters* **158**, 915-918.

Bowden, A. C. (1995) Fundamentals of enzyme kinetics. Portland Press, London, pp. 112-114.

Bradford, M. M. A. (1976) rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72**, 248-254.

Brown, S. H.; Sjholm C.; and Kelly R. M. (1993) Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biotechnol. Bioeng.* **41,** 878-886.

Bruins, M. E.; Janssen, A. E.; Boom R. M. (2001) Thermozymes and their applications: a review of recent literature and patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **90,**155-186.

Buemann, B.; Toubro, S.; Raben, A.; Astrup, A. (1999) Human tolerance to a single, high dose of D-tagatose. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. **29,** 66-70.

Beadle, J. R.; Saunder, J. P.; Wajada, T. J. (1992) Process for manufacturing tagatose.WO 92/12263.

Carrara, C. R.; Rubiolo, A. C. (1996) Determination of kinetics parameters for free and immobilized β-galactosidase, *Process Biochem*. **31**, 243-248.

Cavaille D.; Combes D. (1995) Characterization of β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol. Appl. Biochem*. **22,** 55-64.

Cheetham, P. S. J.; Wootton, A. N. (1993) Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 105-108.

Collyer, C. A.; Blow, D. M. (1990) Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1362-1366.

Collyer, C. A.; Henrick, K.; Blow, D. M., (1990) Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by

a 1,2-hydride shift. *J. Mol. Biol.* **212**, 211-235.

Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**,1088110890.

Cubellis, M. V.; Rozzo, C.; Montecucchi, P.; Rossi, M. (1990). Isolation and sequencing of a new -galactosidase-encoding archaebacterial gene. *Gene* **94**, 89-94.

De La Cadena M. P.; Cabezas J.A.; Prez-Gonzlez M. N. (1987) Heterogeneity of acid β-galactosidase from rabbit kidney. *International J. Biochem.* **19**, 685-691.

Demirjian, D. C.; Moris-Varas, F.; Cassidy, C. S. (2001) Enzymes from extremophiles. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **5**,144151.

Dische, Z.; Borenfreund, E. A. (1951) new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugar and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**, 583-587.

Donner, T. W.; Wilber, J. F.; Ostrowski, D. (1999) D-Tagatose, a novel hexose: acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **1**, 285-291.

Fontes E. A. F.; Passos F. M. L.; Passos F. J. V. (2001) A mechanistical mathematical model to predict lactose hydrolysis by -galactosidase in a permeabilized cell mass of *Kluyveromyces lactis*: validity and sensitivity analysis. *Process Biochem.* **37**, 267-274.

Fourage L.; Dion, M.; Colas, B. (2000) Kinetic study of a thermostable -glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconjugate J.* **17**,377383.

Gabelsberger, J.; Liebl, W.; Schleifer, K. H.(1993) Cloning and characterization of -galactoside and -glucoside hydrolysing enzymes of *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiology Letters* **109**, 131-137.

Garcia-Garibay, M.; Lopez-Munguia, A.; Barzana, E. (2000) Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a

hyperthermophilic β-glycosidase. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 627-632.

Garcia-Viloca, M.; Alhambra, C.; Truhlar, D. G.; Gao, J. (2003) Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: mechanism and quantum effects. *J. Comput. Chem.* **24,** 177-190.

Gekas V.; Lopez-Leiva M. (1985) Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* **20,** 212.

Hansson, T.; Adlercreutz. P. (2001) Enhanced transglucosylation/ hydrolysis ratio of mutants of *Pyrococcus furiosus* β-glucosidase: effects of donor concentration, water content, and temperature on activity and selectivity in hexanol. *Biotech. Bioeng.* **75**, 656-665.

Hartley, B. S.; Hanlon, N.; Jackson, R. J.; Rangarajan, M. (2000) Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. Biochimi. Biophys. Acta 1543, 294-335.

Hidaka, M.; Fushinobu, S.; Ohtsu, N.; Motoshima, H.; Matsuzawa, H.; Shoun H.; Wakagi, T. (2002) Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose. *J. Mol. Biol.* **322**: 7991.

Huber, R. E.; Langworthy, T. A.; Knig, H.; Thomm, M.; Woese, C. R.; Sleytr, U. B.; Stetter, K. O. (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 9 0℃. *Arch. Microbiol.* **144**,324-333.

Huber R.E.; Hlede, I.Y.; Roth, N. J.; McKenzie K.C.; Ghumman K. K. (2001) His-391 of β-galactosidase (*Escherichia coli*) promotes catalyses by strong interactions with the transition state. *Biochem. Cell Biol.* **79**: 183-193.

Hung M. N.; Lee, B. H. (1998) Cloning and expression of -galactosidase gene from *Bifidobacterium infantis* into *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **20**: 659-662.

Hung M. N.; Xia, Z.; Hu, N. T.; Lee, B. H. (2001) Molecular and biochemical analysis of two -galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl.*

*Environ. Microbiol.* **67,** 4256-4263.

Ibrahim, O. O.; Spradlin, J. E. (2000) Process for manufacturing D-tagatose. U. S. Patent 6,057,135. **2000**

Izumori, K.; Miyoshi, T.; Tokuda, S.; Yamabe, K. (1984) Production of D-tagatose from ducitol by *Arthrobacter globiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46,** 1055-1057.

Izumori, K.; Tsuzaki, K. (1988) Production of D-tagatose from D-galactitol by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66,** 225-227.

Izumori, K.; Ueda, Y.; Yamanaka, K. (1978) Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerases induced by L-arabinose and D-galactose. *J. Bacteriol.* **133,** 413-414.

Jrgensen, F.; Hansen, O. C.; Stougaard, P. (2004) Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 816-822.

Juers, D. H.; Heightman, T. D.; Vasella, A.; McCarter, J. D; Mackenzie, L.; Withers, S. G.; Matthews, B. W. (2001) A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) -galactosidase. *Biochemistry* **40,** 14781-14794.

Kempton, J. B.; Withers, S. G. (1992) Mechanism of *Agrobacterium* β-glucosidase: kinetic studies. *Biochemistry* **31**,9961-9969.

Kierstan, M. P. J.; Coughlan, M. P. (1985) Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. In *Immobilised Cells and Enzymes, A Practical Approach* Woodward, J., ed. IRL Press Oxford, pp. 39-54.

Kim, B. C.; Lee, Y. H.; Lee, H. S.; Lee, D. W.; Choe, E. A.; Pyun, Y. R. (2002) Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**, 121-126.

Kim, C. S.; Ji, E. S.; Oh, D. K. (2004) A new kinetic model of recombinant β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and

transgalactosylation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Communi.* **316**, 738-746.

Kim, C. S.; Ji, E. S.; Oh, D. K.; (2004) Characterization of a thermostable galactosidase from *Thermotoga maritima*. *J. of Appl. Microbiol.* **97**, 1006-1014.

Kim H. J.; Oh D. K. (2005) Purification and characterization of an l-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing d-tagatose. *J. Biotechnol.* **120,** 162-173.

Kim, H. J.; Ryu, S. A.; Kim, P.; Oh, D. K. (2003) A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **19,** 400-404.

Kim J. W.; Kim Y. W.; Roh H. J.; Kim H. Y.; Cha J. H.; Park K. H.; Park C. S. (2003) Production of tagatose by a recombinant thermostable l-arabinose isomerase from *Thermus* sp. IM6501. *Biotechnol. Lett.* **25**: 963967.

Kim, P. (2004) Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65,** 243-249.

Kim, P.; Yoon, S. H.; Roh, H. J.; Choi, J. H. (2001) High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Prog.* **17,** 208-210.

Kim, P.; Yoon, S. H.; Oh, D. K.; Choi, J. H. (2001) Improvement of tagatose conversion rate by genetic evolution of thermostable galactose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**, 99-102.

Laerke, H. N.; Jensen, B. B., (1999) D-Tagatose has low small intestinal digestibility but high large intestinal fermentability in pigs. *J. Nutr.* **129,** 1002-1009.

Ladero, M.; Santos, A.; Garca, J. L.; Carrascosa, A. V.; Pessela, B. C.;

Garca-Ochoa F. (2002) Studies on the activity and the stability of -galactosidases from *Thermus* sp strain T2 and from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **30,** 392-405.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680685.

Lee, D. W.; Choe, E. A.; Kim, B. C.; Eom, S. H.; Hong, Y. H.; Lee, S. J.; Lee, H. S.; Lee, D. Y.; Pyun, Y. R. (2005) Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerase from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **434,** 333-343.

Lee, D. W.; Jang, H. J.; Choe, E. A.; Kim, B. C.; Lee, S. J.; Kim, S. B.; Hong, Y. H.; Pyun,Y. R. (2004) Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70,** 1397-1404.

Levin G. V. (2002) Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J. Med. Food* **5**: 2336.

Levin G. V.; Zehner, L. R.; Saunder J. P.; Beadle, J. R. (1995) Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* **62,** 1161-1168.

Livesey, G.; Brown, J. C. (1996) D-Tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. *J. Nutr.* **126**, 1601-1609.

Longo, M. A.; D. Combes (1999) Thermostability of modified enzymes: a detailed study. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 25-32.

Mariani, N. J.; Martnez, O. M.; Barreto, G. F. (2001) Computing radial packing properties from the distribution of particle centers. *Chem. Eng. Sci.* **56,** 5693-5707.

Marzur, A. W. Functional sugar substitutes with reduced calories. (1989) EP 341062.

Miller, P. L.; Jrgensen, F.; Hansen, O. C.; Madsen, S. M.; Stougaard, P. (2001) Intra- and extracellular β-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **67,** 22762283.

Moore, J. B.; Markiewicz, P.; Miller. J. H. (1994) Identification and sequencing of the *Thermotoga maritima lacZ*gene, part of a divergently transcribed operon. *Gene* **147**, 101-106.

Muniruzzanman, S.; Tokunaga, H.; Izumori, K. (1994) Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221e from soil, a potent D-tagatose producer from galactitol. *J. Ferment. Bioeng.* **78,**145-148.

Nakamatu, T.; Yamanaka, K. (1969) Crystalization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **178,** 156-165.

Nelson, K. E.; Clayton, R. A.; Gill, S. R.; Gwinn, M. L.; Dodson, R. J.; Haft D. H.; Hickey, E. K.; Peterson, J. D.; Nelson, W. C.; Ketchum, K. A.; MacDonald L.; Utterback, T. R.; Malek, J. A.; Linher K. D.; Garrett, M. M.; Stewart, A. M.; Cotton, M. D.; Pratt, M. S.; Philips, C. A.; Richardson, D.; Heidelberg J.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Eison, J. A.; White, O.; Salzberg, S. L.; Smith, H. O.; Venter, J. C.; Fraser, C. M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**, 323-329.

Nogueira, S. I.; Nogueira, T. V.; Soares, S.; Lencastre. H. D. (1997) The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiology* **143,** 957-969.

Oh, D. K.; Kim, H. J.; Ryu, S. A.; Kim P. (2001) Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1859-1862.

Oh, D. K.; Roh, H. J.; Kim, S. Y.; Noh, B. S. (1998) Optimization of culture conditions for D-tagatose production from D-galactose by *Enterobacter agglomerans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26,** 250-256.

Ohtsu, N.; Motoshima, H.; Goto, K.; Tsukasaki, F.; Matsuzawa, H. (1998) Thermostable β-galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus*sp. A4: enzyme purification and characterization, and gene cloning and sequencing. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 1539-1545.

Paschke E.; Niemann, R.; Strecker, G.; Kresse, H. (1982) Aggregation properties of β-galactosidase of human urine and degradation of its natural substrates by a purified preparation of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **704,** 134143.

Patrick, J. W.; Lee, N. (1968) Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **243,** 4312-4318.

Pearson, W. R.; Wood, T.; Zhang, Z.; Miller, W. (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* **46**, 24-36.

Perez-Pons, J. A.; Rebordosa, X.; Querol, E. (1995) Properties of a novel glucose-enhanced β-glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). *Biochimi. Biophys. Acta* **1251**, 145-153.

Pessela, B. C.; Vian, A.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Garcia, J. L.; Guisan, J. M.; Carrascosa, A. V. (2003) Overproduction of *Thermus*sp. strain T2 -galactosidase in *Escherichia coli* and preparation by using tailor-made metal chelate supports. *Appl. Environ. Microbiol.* **69,** 1967-1972.

Petzelbauer, I.; Kuhn, B.; Splechtna, B.; Kulbe, K. D.; Nidetzky, B. (2002) Development of an ultra high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. IV. Immobilization of two thermostable β -glycosidases and optimization of a packed-bed reactor for lactose conversion. *Biotechnol. Bioeng.* **77,** 619-31.

Petzelbauer, I.; Nidetzky, B.; Haltrich, D.; Kulbe, K. D. (1999) Development of an ultra-high-temperature process for the enzymatic hydrolysis of lactose. I. The properties of two thermostable β-galactosidases. *Biotechnology and Bioengineering* **64**, 322-332.

Petzelbauer, I.; Splechtna, B.; Nidetzky, B. (2001) Galactosyl transfer catalyzed by thermostable -glycosidases from *Sulfolobus solfataricus* and *Pyrococcus furiosus*: kinetic studies of the reactions of galactosylated enzyme intermediates with a range of nucleophiles. *Journal of Biochemistry* **130**, 341-349.

Poch, O.; L'Hote, H.; Dallery, V.; Debeaux, F.; Fleer, R.; Sodoyer, R. (1992) Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* **118,** 55-63.

Prenosil, J. E.; Stuker, E.; Bourne, J. R. (1989) Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis. Part I: state of art. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 1019-1025.

Roh, H. J.; Kim, P.; Park, Y. C.; Choi, J. H. (2000) Bioconversion of D-galactose to D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 1-4.

Roh, H. J.; Yoon S. H.; Kim P. (2000) Preparation of L-arabinose isomerase originated from *Escherichia coli* as a bioatalyst for D-tagatose production. *Biotechnol. Lett.* **22**, 197-199.

Roth, N. J.; Huber R. E. (1996) The β-galactosidase (*Escherichia coli*) reaction is partly facilitated by interactions of His-540 with the C6 hydroxyl of galactose. *J. Biol. Chem.* **271,** 14296-14301.

Roth, N. J.; Rob, B.; Huber R. E. (1998) His-357 of β-galactosidase (*Escherichia coli*) interacts with the C3 hydroxyl in the transition state and helps to mediate catalysis. *Biochemistry* **37**: 10099-10107.

Rubio-Texeira, M.; Arevalo-Rodriguez, M.; Lequerica, J. L.; Polaina, J. (2001) Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis LAC* genes. *J. Biotechnol.* **84,** 97106.

Ryu, S. A.; Kim, C. S.; Kim, H. J.; Baek, D. H.; Oh, D. K. (2003) Continuous D-tagatose production by immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **19,** 1643-1647.

Santos, M. L.; Ladero, M.; Garca-Ochoa, F. (1998) Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β-galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme Microb. Technol.* **22,** 558-567.

Scheibe, R.; Hein, K.; Wenzel, K. W. (1990) Lysosomal β-galactosidase from rat liver: purification, molecular forms and association with neuraminidase. *Biomed. Biochim. Acta.* **49**: 547-556.

Sheetz RM, Dickson RC (1981) *LAC4* is the structural gene for β-galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **98**: 729-745.

Shimonishi, T.; Okumura, Y.; Izumori, K. (1994) Production of D-tagatose from galactitol by *Klebsiella pneumoniae* strain 40b. *J. Ferment. Bioeng.* **78,** 145-148.

Sofer, G. K.; Nystrom, L. E. (1989) *Process Chromatography; A Practical Guide* Academic Press Inc.: San Diego, p 56.

Sreekrishna K, Dickson RC (1985) Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82,** 7909-7913.

Stickel, J. J.; Fotopoulos, A. (2001) Pressure-flow relationships for packed beds of compressible chromatography media at laboratory and production scale. *Biotechnol. Prog.* **17**, 744-751.

Ulrich, J. T.; McFeters, G. A.; Temple. K. L. (1972) Induction and characterization of β-galactosidase in an extreme thermophile. *J. Bacteriol.* **110**, 691-698.

Vian, A.; Carrascosa, A. V.; Garca, J. L.; Corts, E. (1998) Structure of the β-galactosidase gene from *Thermus* sp. strain T2: expression in *Escherichia coli*and purification in a single step of an active fusion protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2187-2191.

Voget C. E.; Flores, M. V.; Faloci, M. M.; Ertola, R. J. J. (1994) Effects of the ionic environment on the stability of *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **27,** 324-330.

Yamanaka, K.; Wood, W. A. (1966) L-Arabinose isomerase. *Methods Enzymol.* **9,** 596-602.

Yang, S. T.; Okos, M. R. (1989)A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten-type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 763-773.

Yoon, S. H.; Kim, P.; Oh, D. K. (2003) Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19,** 47-51.

Wallace, L. J.; Eiserling, F. A.; Wilcox, G. (1978) The shape of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253,** 3717-3720.

Zeikus, J. G.; Vieille, C.; Savchenko, A. (1998) Thermozymes: biotechnology and structure-function relationships. *Extremophiles* **2,** 179-183.

Zehener, L. R. (1988) D-Tagatose as a low-calorie carbohydrate sugar and bulking agent. EP 257626.

Zhou Q. Z. K.; Chen X. D. (2001) Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Engin. J.* **9,** 33-40.