

발간등록번호
11-1541000-001387-01

**벼짚으로부터 고부가가치 의약용 단당
엘-리보스의 효소적 생산**

(Enzymatic production of L-ribose as a high-value
medical monosaccharide from rice straw)

건국대학교

농림수산식품부

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “벗짚으로부터 고부가가치 의약품 단당 엘-리보스의 효소적 생산에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 건국대학교
주관연구책임자 : 오 덕근
연구원 : 박창수
연구원 : 김영수
연구원 : 염수진
연구원 : 김경록
연구원 : 임유리
연구원 : 신경철
연구원 : 권현정
연구원 : 이재희
연구원 : 유미현
연구원 : 주영철
연구원 : 김정은
연구원 : 홍승혜
연구원 : 남현구
연구원 : 김백중
연구원 : 서민호
연구원 : 이선화
연구원 : 이혜지
협동연구기관명 : 에스티팜 (주)
협동연구책임자 : 노갑수
연구원 : 최강현
연구원 : 김병균

요 약 문

I. 제 목

벚짚으로부터 고부가가치 의약품 단당 엘-리보스의 효소적 생산에 관한 연구

II. 연구개발의 목적

벚짚으로부터 효소적 전환법으로 고부가가치 의약품 단당 엘-라이보스의 생산공정을 개발하고자 함.

- (1) 반섬유소로부터 기능성당 L-arabinose 의 생물학적 분해공정 개발
- (2) L-Arabinose로부터 고부가가치 의약품 단당 L-ribose의 생물전환 공정 개발
- (3) 반섬유소로부터 L-arabinose 및 L-ribose의 대량 생산 조건 확립
- (4) L-Arabinose 및 L-ribose의 시제품 제조

III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 반섬유소로부터 L-arabinose의 생물학적 분해공정 개발
 - 고효성 arabinan 분해효소 발굴: 발굴 시스템 확립 및 효소 라이브러리 구축
 - 고효성 arabinan 분해효소 대량생산 기술 개발: 효소발현 최대화 및 고농도 효소 생산법 개발
 - L-Arabinose 생산 최적화: 효소반응 조건 최적화
 - 반섬유소로부터 L-arabinose의 생산
- (2) L-Arabinose로부터 L-ribose의 생물전환 공정 개발
 - 고효성 L-ribose 생산효소 발굴: 발굴 시스템 확립 및 효소 라이브러리 구축
 - 고효성 L-ribose 생산효소 개량: 효소의 유전자 진화 및 분자 모델링에 의한 효소 개량
 - 고효성 L-ribose 생산효소 대량생산 기술 개발: 효소발현 최대화 및 고농도 효소 생산법 개발
 - L-Ribose 생산 최적화: 효소반응 조건 최적화
- (3) 반섬유소로부터 L-arabinose 및 L-ribose의 대량 생산 조건 확립
 - 고정화 효소 함유 생물반응기에 의한 L-arabinose의 대량 생산 조건 확립
 - 고정화 효소 함유 생물반응기에 의한 L-ribose의 대량 생산 조건 확립
 - L-Arabinose 및 L-ribose의 정제 조건 확립
- (4) L-Arabinose 및 L-ribose의 시제품 제조

IV. 연구개발결과

- (1) 반섬유소로부터 L-arabinose의 생물학적 분해공정 개발
 1. 고효성 arabinan 분해효소 발굴: *Bacillus licheniformis*와 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 유래 endo-arabinanase 및 *C. saccharolyticus* 유래 alpha-L-arabinofuranosidase의 cloning, 발현 및 활성 확인
 2. 효소특성 규명: *Bacillus licheniformis*와 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* 유래 endo-arabinanase 및 *C. saccharolyticus* 유래 alpha-L-arabinofuranosidase의 효소정

제, 분자량 측정, 온도 및 pH 최적화, 열 안정성 측정 및 기질특이성 조사, 분해특성 조사

3. L-Arabinose 생산 최적화: *C. saccharolyticus* 유래 endo-arabinanase와 alpha-L-arabinofuranosidase를 사용하여 두 효소의 비율, 온도, pH, 효소량, 기질량을 최적화하여 최적 조건에서 20 g/l arabinan으로부터 2시간 동안 16 g/l L-arabinose를 생산
4. 반섬유소로부터 L-arabinose 생산: 벧짚과 sugar beet 2 g에서 각각 L-arabinose가 1.5 mg과 12 mg이 생산되어 sugar beet가 8배 높은 효율을 보임.

(2) L-Arabinose로부터 L-ribose의 생물전환 공정 개발

1. 고효율 L-ribose 생산효소 발굴: *Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans* 및 *Thermotoga neopolitana* 유래 L-Arabinose isomerase, *Bacillus subtilis*, *G. thermodenitrificans*, *Thermus thermophilus*, *T. thermophilus* R142N 및 *G. thermodenitrificans* W17Q N90A L129F mannose-6-phosphate isomerase의 cloning, 발현 및 활성 확인
2. 효소특성 규명: *G. stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans* 및 *Thermotoga neopolitana* 유래 L-arabinose isomerase, *Bacillus subtilis*, *G. thermodenitrificans*, *Thermus thermophilus*, *T. thermophilus* R142N 및 *G. thermodenitrificans* W17Q N90A L129F mannose-6-phosphate isomerase의 효소정제, 분자량 측정, 온도 및 pH 최적화, 열 안정성 측정 및 기질특이성 조사, 생물전환 특성 조사
3. L-Ribulose 생산 최적화: *G. thermodenitrificans* 유래 L-arabinose isomerase를 사용하여 온도, pH, 효소량, 기질량을 최적화하여 500 g/l L-arabinose로부터 2시간 반응하여 95 g/l L-ribulose 생산
4. L-Ribose 생산 최적화: *B. subtilis*, *G. thermodenitrificans* 및 *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase를 사용하여 온도, pH, 효소량, 기질량을 최적화하여 최고 활성을 지닌 *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase가 300 g/l L-ribulose로부터 3시간 동안 213 g/l L-ribose를 생산하여 전환 수율 71% 및 생산성 $71 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 을 얻었음.
5. 고효율 L-ribose 생산효소 개량:
 - 효소의 유전자 진화: *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase를 error-prone PCR과 site-directed mutagenesis를 사용하여 W17Q N90A L129F variant를 얻고 이 변이주는 wild-type 효소보다 비 활성이 3.1배, catalytic efficiency가 7.1배 L-ribose 생산성이 4.5 배 증가하여 300 g/l L-ribulose로부터 1시간 동안 213 g/l L-ribose를 생산하여 전환 수율 71% 및 생산성 $213 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 을 얻었음.
 - 효소의 분자모델링: *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase에 L-ribulose를 docking하여 phosphate-binding site가 기질결합에 중요한 잔기임을 알아내고 잔기를 최적화하여 R142N 변이주를 개발함. 이 변이주는 wild-type 효소보다 비 활성이 1.4배, catalytic efficiency가 1.6배 L-ribose 생산성이 1.5 배 증가하여 300 g/l L-ribulose로부터 2시간 동안 213 g/l L-ribose를 생산하여 전환 수율 71% 및 생산성 $107 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 을 얻었음.

6. L-Arabinose로부터 L-ribose 생산 최적화: *G. thermodenitrificans* 유래 L-arabinose isomerase와 mannose-6-phosphate isomerase를 사용하여 최적비율, 온도, pH, 효소량, 기질량을 최적화하여 최적 조건에서 500 g/l L-arabinose으로부터 3시간 동안 118 g/l L-ribose를 생산하여 전환 수율 24% 및 생산성 39 g L⁻¹ h⁻¹을 얻었음.

(3) 반섬유소로부터 L-arabinose 및 L-ribose의 대량 생산 조건 확립

1. 고정화 효소 함유 생물반응기에 의한 L-arabinose의 생산: Duolite A568에 endo:exo=1:10으로 고정화효소 생물반응기에서 pH 6.0, 80°C, 회석율 0.6 h⁻¹로하여 20 g/l sugar beet arabinan로부터 14일간 12 g/l이상 L-arabinose 생산
2. 고정화 효소 함유 생물반응기에 의한 L-ribose의 생산: Alginate에 L-arabinose isomerase와 mannose-6-phosphate isomerase가 함유된 고정화세포 생물반응기에서 pH 7.5, 60°C, 회석율 0.1 h⁻¹로하여 300 g/l L-arabinose 로부터 최초 3일간 평균 103 g/l L-ribose 및 103g⁻¹ l⁻¹ d⁻¹ 의 L-ribose 생산성을 보였으며 4일차부터 서서히 감소하였고 이후에는 초기 대비 50% 활성이 10일까지 유지됨.
3. L-Arabinose 및 L-ribose의 정제 조건 확립: 농축액에 3배의 ethanol을 첨가하여 결정화를 시킨후 여액을 Dowex monosphere 99CA resin으로 분리하고 정제수를 특정 fraction을 회수하여 농축하여 정제품을 얻었음.
4. L-Arabinose 및 L-ribose의 시제품 제조: 시제품 97.5%의 L-ribulose 19 gram 및 80.9%의 L-ribose 5.5 gram 제조

V. 연구성과 및 성과활용 계획

(1) 연구성과

1. 논문: 외국 SCI Journal Bioresorce Technology (IF=4.365) 포함 총 9편
2. 특허: 국내특허 등록 3편, 국내특허 출원 5편, PCT 특허 1편 포함 총 9편

(2) 성과활용 계획

기술이전을 통한 산업화에 활용 예정.

SUMMARY

I. Title

Enzymatic production of L-ribose as a high-value medical monosaccharide from rice straw

II. Objective

Development of enzymatic process for the production of L-ribose as a high-value medical monosaccharide from hemicellulose

- (1) Enzymatic hydrolysis of hemicellulose for L-arabinose production
- (2) Bioconversion of L-arabinose into L-ribose as a medical monosaccharide
- (3) Optimization for the production of L-arabinose and L-ribose from hemicellulose
- (4) Preparation of the purified L-arabinose and L-ribose

III. Contents and Scopes

- (1) Enzymatic hydrolysis of hemicellulose for L-arabinose production
 - Screening, selection, cloning, and expression of highly active arabinan-hydrolytic enzymes
 - Characterization of arabinan-hydrolytic enzymes
 - Optimization of L-arabinose production by arabinan-hydrolytic enzymes
 - L-Arabinose production from hemicellulose
- (2) Bioconversion of L-arabinose into L-ribose
 - Screening, selection, cloning, and expression of highly active L-ribose-producing enzymes
 - Improvement for activities of L-ribose-producing enzymes by DNA evolution and molecular modeling
 - Optimization of L-ribose production by L-ribose-producing enzymes
- (3) Optimization for the production of L-arabinose and L-ribose from hemicellulose
 - L-Arabinose production by immobilized L-arabinose-producing enzymes in a bioreactor
 - L-Ribose production by immobilized L-ribose-producing enzymes in a bioreactor
 - Purification of L-arabinose and L-ribose from the reaction products
- (4) Preparation of the purified L-arabinose and L-ribose

IV. Results

- (1) Enzymatic hydrolysis of hemicellulose for L-arabinose production
 1. Screening, selection, cloning, and expression of endo-arabinanases from *Bacillus licheniformis* and *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*; and alpha-L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus*.

2. Enzyme purification, molecular mass determination, optimization of temperature and pH, thermostability measurement, and substrate specificity determination of endo-arabinanases from *B. licheniformis* and *C. saccharolyticus*; and alpha-L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus*.
 3. The ratio of two enzymes, temperature, pH, and the concentrations of enzymes and substrate were optimized. Under the optimal conditions, endo-arabinanase and alpha-L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus* produced 16 g/l L-arabinose from 20 g/l arabinan.
 4. L-Arabinose production from hemicellulose: 1.5 mg and 12 mg L-arabinose was produced 2 g rice straw and 2 g sugar beet, respectively.
- (2) Bioconversion of L-arabinose into L-ribose
1. Screening, selection, cloning, and expression of L-arabinose isomerases from *Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans*, and *Thermotoga neopolitana*; mannose-6-phosphate isomerases from *Bacillus subtilis*, *G. thermodenitrificans*, *Thermus thermophilus*, *T. thermophilus* R142N, and *G. thermodenitrificans* W17Q N90A L129F.
 2. Enzyme purification, molecular mass determination, optimization of temperature and pH, thermostability measurement, and substrate specificity determination of L-arabinose isomerases from *Geobacillus stearothermophilus*, *G. thermodenitrificans*, and *Thermotoga neopolitana*; mannose-6-phosphate isomerases from *Bacillus subtilis*, *G. thermodenitrificans*, *Thermus thermophilus*, *T. thermophilus* R142N, and *G. thermodenitrificans* W17Q N90A L129F.
 3. Optimization of L-ribulose production: The temperature, pH, and the concentrations of enzyme and substrate by L-arabinose isomerase from *G. thermodenitrificans* were optimized. Under the optimal conditions, the enzyme produced 95 g/l L-ribulose from 500 g/l L-arabinose for 2 h.
 4. Optimization of L-ribose production: The temperature, pH, and the concentrations of enzyme and substrate by mannose-6-phosphate isomerases from *B. subtilis*, *G. thermodenitrificans*, and *T. thermophilus* were optimized. Under the optimal conditions, *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase produced 213 g/l L-ribose from 300 g/l L-ribulose for 3 h, with a conversion yield of 71% and productivity of 71 g L⁻¹ h⁻¹.
 5. Improvement for activities of L-ribose-producing enzymes by DNA evolution and molecular modeling
 - A W17Q-N90A-L129F variant of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase was obtained using error-prone PCR and site-directed mutagenesis. The specific activity, catalytic efficiency, and productivity of the variant were 3.1-, 7.1-, and 4.5-fold higher than the wild-type enzyme, respectively. The variant produced 213 g/l L-ribose from 300 g/l L-ribulose for 1 h, with a conversion yield of 71% and productivity of 213 g L⁻¹ h⁻¹.

- As L-ribulose was docked to *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase based on molecular modeling, its phosphate-binding site was found to be a molecular determinant. The R142N variant was developed through substrate-tailored optimization. The specific activity, catalytic efficiency, and productivity of the variant were 1.4-, 1.6-, and 1.5-fold higher than the wild-type enzyme, respectively. The variant produced 213 g/l L-ribose from 300 g/l L-ribulose for 2 h, with a conversion yield of 71% and productivity of 107 g L⁻¹ h⁻¹.
- 6. The ratio of two enzymes, temperature, pH, and the concentrations of enzymes and substrate were optimized. Under the optimal conditions, L-arabinose isomerase and mannose-6-phosphate isomerase from *G. thermodenitrificans* produced 118 g/l L-ribose from 500 g/l L-arabinose for 2 h, with a conversion yield of 24% and productivity of 39 g L⁻¹ h⁻¹.
- (3) Optimization for the production of L-arabinose and L-ribose from hemicellulose
 1. Immobilized L-arabinose-producing enzymes in a bioreactor produced more than 12 g/l L-arabinose for 14 days from 20 g/l sugar beet arabinan at endo:exo ratio of 1:10 absorbed on Duolite A568, pH of 6.0, temperature of 80°C, and dilution rate of 0.6 h⁻¹.
 2. Immobilized cells containing L-arabinose isomerase and mannose-6-phosphate isomerase in a bioreactor produced more than 50 g/l L-ribose for 10 days from 300 g/l L-arabinose absorbed on alginate at pH of 7.5, temperature of 60°C, and dilution rate of 0.1 h⁻¹.
 3. Purification of L-arabinose and L-ribose from the reaction products: After crystallization by adding 3 times volume of ethanol to the concentrated reaction solution, filtrate was applied to Dowex monosphere 99CA resin. The active fraction of the elute was collected, concentrated and dried. The dried product was the purified L-arabinose or L-ribose.
- (4) Preparation of the purified L-arabinose and L-ribose as 19 gram of 97.5% L-ribulose and 5.5 gram of 80.9% L-ribose.

V. Achievement and Its Practical Use

(1) Achievement

1. Paper: 9 papers publication of international SCI journal including Bioresource Technology (IF=4.365)
2. Patent: 9 patents, including 3 patents registered and 5 patents applied in the Korean Intellectual Property Office and 1 patents applied to PCT.

(2) Practical Use

We have a plan for the industrialization of L-arabinose and L-ribose production by transferring skill.

CONTENTS

Chapter 1. Overview	1
Section 1. Objective	1
Section 2. Needs and scopes	1
Chapter 2 Current State of Affairs	3
Section 1. Current state of market	3
Section 2. Current state of patent	5
Section 3. Current state of paper	6
Section 4. Current state of field	6
Chapter 3. Contents and Results	8
Section 1. Production of L-arabinose from hemicellulose	8
Section 2. Production of L-ribulose from L-arabinose	25
Section 3. Production of L-ribose from L-ribulose	31
Section 4. Production of L-ribose from L-arabinose	51
Section 5. Preparation of the purified L-ribose and L-ribulose	68
Chapter 4. Achievement of Objective and Contribution in Field	73
Section 1. Achievement of objective	73
Section 2. Achievement of quantitative objective	74
Section 3. Contribution in field	75
Chapter 5. Outcome and Application Plan	76
Section 1. Outcome	73
Section 2. Application plan	78
Chapter 6. References	80

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
1		
제 1 절	연구개발의 목적	1
제 2 절	필요성 및 범위 등을 기술	1
제 2 장	국내외 기술개발 현황	3
제 1 절	시장 현황	3
제 2 절	특허 현황	5
제 3 절	논문 현황	6
제 4 절	국내외 관련분야 환경변화	6
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	8
제 1 절	반섬유소에서 L-arabinose 생산	8
제 2 절	L-Arabinose에서 L-ribulose 생산	25
제 3 절	L-Ribulose에서 L-ribose 생산	31
제 4 절	L-Arabinose에서 L-ribose 생산	51
제 5 절	L-Ribose 및 L-ribulose의 분리 정제	68
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	73
제 1 절	연구개발 목표의 달성도	73
제 2 절	정량적 목표의 달성도	74
제 3 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	75
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	76
제 1 절	연구개발 성과	73
제 2 절	성과활용 계획	78
제 6 장	참고문헌	80

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

(1) 기술적 목적

- **소규모 장치에서 고부가가치 당인 L-arabinose와 L-ribose 연속적으로 생산을 할 수 있는 기술 개발:** 고정화 효소를 이용하여 생물반응기로 L-arabinose와 L-ribose를 연속적으로 생산하면 높은 생산성을 기대할 수 있고 경제적인 녹색성장 기술임. 생물전환법은 화학합성법보다 생산성이 높고 부산물이 적고 정제가 용이하며 우수한 품질의 기능성 당을 값싸게 공급할 수 있어 가격 및 품질 경쟁력이 있음. 산업화되면 향후 세계시장을 주도할 수 있고 국내 시판은 물론 수출도 가능해져서 산업발전에 이바지 할 수 있음. 아울러 기존 발효 공장과 달리 소규모 생물반응기(컬럼)와 간단한 정제설비로 생산이 가능하여 중소기업에 의한 산업화도 가능함.

(2) 경제적·산업적 목적

- **반섬유소의 활용성을 증진:** 반섬유소 내의 L-arabinose는 반섬유소의 곁가지에 알파 결합으로 이루어져있어 (Morana et al. 2007) L-arabinose만 효소적 분해가 가능하고 처리 후의 L-arabinose만의 제거되어 반섬유소를 바이오 에탄올 생산에 더 효율적으로 이용할 수 있음. 그 결과 바이오매스 자원 중에 높은 비율을 차지하는 반섬유소의 활용성을 증진시켜야 함.
- **반섬유소로부터 고부가가치 L-arabinose와 L-ribose의 생산:** 볏짚으로부터 가수분해로부터 생산되는 단당류나 이를 활용한 바이오에너지는 단가가 \$5/kg 미만이나 본 과제의 L-arabinose는 \$33/kg와 L-ribose \$570/kg 이므로 환경친화적 생물공학적인 방법으로 가 창출되어 농가소득 향상에 기여됨.
- **새로운 생물학적 생산법 개발:** 그 동안 L-ribose는 복잡한 화학합성법으로 생산되어 고가이었지만 생물전환법이 개발되면 가격경쟁력이 확보되어 가격을 낮출 수 있고 기술의 독점을 통하여 세계를 주도할 수 있음.

제 2 절 필요성 및 범위

- 반섬유소 내의 L-arabinose는 반섬유소의 곁가지에 알파 결합으로 이루어져있어 L-arabinose만 효소적 분해가 가능하고 처리 후의 L-arabinose만의 제거되어 반섬유소를 바이오 에탄올 생산에 더 효율적으로 이용할 수 있음. 그 결과 바이오매스 자원 중에 높은 비율을 차지하는 반섬유소의 활용성을 증진이 필요함.
- 신규 기능성 소재 발굴기술, 바이오매스의 가수분해 기술, 효소의 분자진화기술, 효소구조 변형기술, 미생물 배양 기술, 효소 생산기술, 효소의 분리정제기술, 효소 고정화기술, 생물

- 반응기의 개발기술, 기능성 당 정제 기술 등의 생물공학의 핵심기술을 개발이 필요함
- BT의 효소진화기술과 NT가 결합된 효소 구조 변형기술에 접합된 기능성 바이오 신소재 생산기술은 핵심적 원천기술로 확보가 필요함.
 - 대부분의 의약품은 당을 포함하고 있고 이러한 당을 본 과제를 통하여 개발된 L-arabinose나 L-ribose를 그 유도체로 대체함으로써 신규 의약품 개발이 가능하며, 또한 생산과정 중에 개발된 효소들은 다른 기능성 소재나 고가 의약품 개발에 직접 사용될 수 있으므로 L-arabinose나 L-ribose 생산 연구가 필요함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 시장 현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

■ L-Arabinose 시장

(출처: 천연물을 이용한 기능성 물질 개발과 이용보고서, 한국과학기술정보연구원, 전문연구위원회 박무현 외 2명, 2004)

- 최근 기능성 식품 (functional food)의 첨가제로서 섭취시 저(무)칼로리 단당이 많은 각광을 받고 있으며, L-arabinose 도 저칼로리 단당으로의 이용 가능성에 대해서 높은 주목을 받고 있음.
- 국내에서도 국민 건강 증진에 대한 관심의 증가로 기능성 식품에 대한 시장이 매년 증가하고 있음.
- 국내에서도 기능성 식품에 대한 제품화를 위한 지원으로 2002년도에만 10억원 이상의 규모의 금액이 지원되었으며, 매년 꾸준히 증가하고 있음.
- 특히, 기능성 식품에 대한 연구 및 제품화를 위해 기능성 식품 신소재에 대한 연구 분야가 만들어져 지속적으로 지원이 이루어지고 있음.
- 국내 건강 기능식품에 대한 정확한 시장 조사는 불가능 하지만 2000년도에 3조 4천억원 정도로 집계되어 있으므로, 현재는 더욱더 방대한 시장으로 성장되어 있을 것으로 예측됨.
- L-Arabinose는 설탕과 같이 섭취시 설탕의 흡수를 차단하므로써 기능성 식품 및 당뇨병 환자와 비만 환자에 대한 대체 감미료로의 사용될 수 있으므로 L-arabinose은 높은 잠재 시장성을 내포하고 있음.
- L-Arabinose는 국내 회사 GeneChem에서 시판하고 있으며, 화학적 공정을 통해서 생산이 이루어지고 있음.
- L-Arabinose 자체로의 시판은 이루어지고 있으나, 국내에는 L-arabinose를 이용한 제품화의 실례는 아직보고 되어 있지 않음.

■ L-Ribose 시장

(출처: 발효산업의 현황과 발전방안, 한국과학기술정보연구원, 전문연구위원회 임변삼, 2004)

- 국내에서의 L-ribose 생산은 화학적 공정에 의해 삼천리 제약, GenChem에서 이루어지고 있음.
- L-Form 핵산 계열의 약제 원료로서 AIDS 및 B형 간염 치료제 원료로서 각광을 받고 있지만 L-ribose를 원료로 약품의 제품화 기업은 현재로서는 없음. 단, 국내 기업 중 부광약품에서 B형 간염치료제 "클레부딘(Clevudine)" 합성에 관한 2'-플루오로-5-메틸-β-L-아라비노 푸라노실유리딘 (L-FMAU)의 제조 원료로서 L-ribose를 이용한 연구를 실행.
- Bulk로 \$1,000/kg (삼천리 수입가 530\$/kg) 으로 시판되고 있으며, 신약 개발에 대한

- 중요성의 부각으로 L-ribose를 원료로 한 제약 시장의 성장은 향후 클 것으로 추정 됨.
- 국내에서 L-ribose 생산이 생물학적 공정으로 이루어지고 있는 것은 없는 것으로 파악되며, 최근에 특허, 및 연구 분석에 의하면 L-ribose 의 생물학적 생산에 대한 중요성이 많이 부각되고 있으며, L-ribose의 제약 원료로서의 이용에 높은 잠재 시장이 내재되어 있다는 판단으로부터 향후 L-ribose 생산에 대한 국내 시장은 높은 성장을 할 것으로 기대됨.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

■ L-Arabinose 시장

(출처: 천연물을 이용한 기능성 물질 개발과 이용보고서, 한국과학기술정보연구원, 전문연구위원회 박무현 외 2명, 2004; www.danisco.com, Japanese Society of Nutrition and Food Science)

- 국외에서는 오래전부터 기능성 식품 (functional food)에 대한 관심이 높았음.
- 유럽에서는 functional food science 라는 새로운 연구 분야의 시작을 통해 국민 건강증진에 기여하기 위한 연구를 지원.
- 세계 기능성 식품 시장은 미국, 유럽이 약 70%를 점유하고 있으며, 일본이 20% 그리고, 기타 국가의 시장이 나머지를 차지하고 있음.
- L-Arabinose는 미국, 일본 등 선진국에서는 설탕이용을 억제하는 체중감소 보조제와 당뇨병 환자의 치료 보조제로 사용되기 시작하였으며 기능성 식품의 첨가 신소재로서 높은 잠재 시장을 가지고 있으므로 향후 시장 확대가 예상됨.
- L-Arabinose에 대한 생산에 있어서도 Healtang Biotech (중국), Sigma-Aldrich (미국), Danisco (핀란드)등의 회사에서 생산, 판매 되고 있으며, 화학적 공정을 통해 생산이 이루어지고 있음.

■ L-Ribose 시장

(출처: 발효산업의 현황과 발전방안, 한국과학기술정보연구원, 전문연구위원회 임변삼, 2004; www.danisco.com, 삼천리제약 연구소)

- L-form 핵산당 의약품들의 합성 시작물질로서 새로운 항포진제 (Antiherpes)로 개발되고 있는 BW1263w94 (Glaxo Wellcome)와 B형간염 치료제로 개발되고 있는 L-FMAU(Bukwang & Triangle)등의 핵심중간체로서 그 수요가 급증 (표 4)
- L-nucleoside, L-nucleotide, riboflavin 등의 원료로 쓰이며, 특히 L-nucleoside는 항바이러스제인 Bezimidavir의 합성 원료로 쓰임.
- Healtang Biotech (중국), Sigma-Aldrich (미국), Carbosynth (영국), Tokyo chemical (일본), Danisco (핀란드)에서 화학적 공정을 통해 제조, 판매하고 있음.
- L-Ribose 및 그 유도체의 세계시장은 2001년 Roche에서 판매되는 Capecitabine (상품명 Xeloda)등을 포함하여 약 11억불(1.5조원)이었다 (표 5).
- 국내와는 달리 L-ribose를 실제 치료제의 원료로서 이용하여 제품화 단계에 이르러있으며 향후, L-ribose 를 원료로 한 치료제 시장은 지속적으로 성장 할 것으로 기대됨.
- 국외에서도 현재까지 L-ribose의 생물학적 생산에 대한 산업화에 대한 보고가 없어, 시

장성 과학에는 한계가 있으나, 국제 특허 및 연구 보고에 의하면 L-ribose 생물학적 생산에 관여하는 효소에 대한 연구가 지속적으로 늘고 있으므로, L-ribose의 생물학적 생산에 관한 시장성도 향후 높은 성장을 보일 잠재 시장을 내재하고 있는 분야로 기대됨.

표. L-Ribose, L-deoxyribose 기반의 개발 중인 약물 리스트

물질명	개발사	적용증	개발단계
Clevudine (Revovir)	부광약품 Pharmasset	HBV	한국: '07 승인 기타: Phase III
Marivavir (Camvia)	ViroPharma GSK	CMV	유럽 승인 미국, 캐나다 Phase III
LFdC (Pentacept)	Pharmasset	HBV	전임상 중

표. 2001년도 L-Ribose 및 그 유도체의 세계시장

물질명	판매사 (브랜드)	매출 (M\$)	미국시장 (톤)
Acadesine	Kyowa Hakko (Arasin)		
Capecitabine	Roche (Xeloda)	110	8
Cytidine	Ursapharm (Posilent)		
Doxyfluridine	Roche (Flurtulon)	170	
Ribavarin	ICN Pharmaceuticals	470	37
Riboflavin	Roche, BASF	330	19

제 2 절 특허 현황

■ L-Arabinose 특허

지금까지 생물학적인 L-arabinose를 생산법은 효소적으로 생산 가능성만 시사하였고 산업적인 효소 공정은 아직까지 확립되지 않았음.

■ L-Ribose 특허

지금까지 생물학적인 L-ribose 생산법 중 산업적 이용이 가능한 유일한 방법은 Mitsubishi Chemical社 등록한 USP 6,348,326 (Feb.19, 2002) 포도당을 원료로 발효와 효소법을 L-ribose 생산임.

이 방법은 발효를 수행하여 glucose에서 ribitol을 생산하고 이단반응으로 L-ribulose를 거쳐 L-ribose를 생산하는 과정임. 수율은 18.9%이지만 ribitol을 정제를 해야 하는 한계가 있음 (그림).

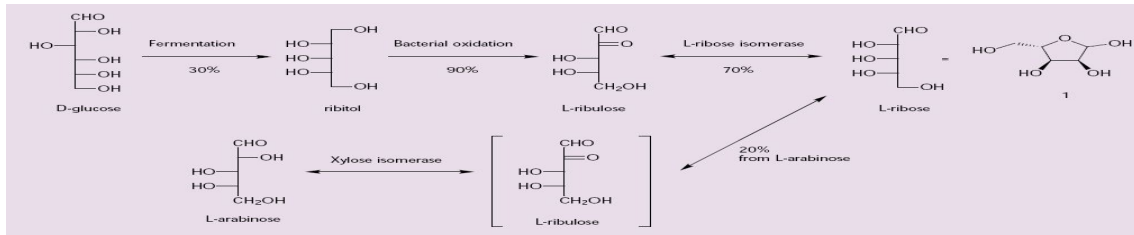


그림. Glucose로부터 발효와 두단계 효소반응으로 L-ribose 생산

제 3 절 논문 현황

■ L-Arabinose 논문

지금까지 생물학적인 L-arabinose를 생산법은 Arabinan 분해에 대한 효소적 특성 규명에
 만 연구가 한정되어 산업적인 효소 공정은 아직까지 확립되지 않았음(Beldman et al.
 1997; Saha 2000; Shallom and Shoham 2003).

■ L-Ribose 논문

- NAD-dependent mannitol-1-dehydrogenase가 포함된 재조합 대장균
 을 사용하여 100 g/L ribitol로부터 배양 72시간 후에 55%의 전환율과 $0.72 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$
 의 생산성으로 55 g/L L-ribose를 얻음(Woodyer et al. 2008).
- L-Ribulokinase-deficient *E. coli*를 이용하여 균주 반응으로 36 g/L L-arabinose로부
 터 약 20 시간 후에 약 20% 전환율과 $1.84 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ 의 생산성으로 6.5 g/L의
 L-ribose를 생산(Helanto et al. 2009).

제 4 절 국내외 관련분야 환경변화

- 바이오매스 활용에 대한 연구 관심이 해마다 커지고 있고 바이오매스의 대부분 (80%
 이상)을 차지하는 섬유평과 반섬유평 중 특히, 반섬유평은 다양한 단당을 구성성분
 (D-xylose, L-arabinose, D-galactose, D-mannose 등)으로 하고 있기에 구성단당으
 로 분해를 하였을 때 기능성 단당 또는 그 생산 원료로 이용될 수 있는 유용한 단당들
 을 확보 할 수 있음. 이 중 L-arabinose는 다른 당이 베타결합으로 이루어져 있는 것과
 달리 알파 결합으로 이루어져있어 기존 알파결합인 전분의 예를 볼 때 기존의 산 분해
 법에 대하여 효소적 분해법이 경쟁력이 있음.
- L-Arabinose는 일반적으로 미생물이 에탄올 발효에 잘 이용하지 못하므로 반섬유평로
 부터 효소법으로 L-arabinose를 생산하면 반섬유평의 결가지를 구성하고 있는
 L-arabinose이 제거되어 반섬유평을 바이오 에탄올 생산에 더 효율적으로 이용 할 수
 있음. 이러한 방법은 산분해법으로는 불가능함.
- L-Arabinose는 설탕이용을 억제하는 체중감소 보조제, 당뇨병 환자의 치료 보조제 및

의약품의 전구체로 사용되고 있고, 세계적으로 높은 관심과 연구가 집중되고 있는 L-ribose 생산의 원료당으로서 이용 될 수 있기에 바이오매스로부터 저가의 원료당의 생산과 함께 생물학적 방법으로 당전환을 통해 기능성 단당 생산의 공정 시스템의 확립은 바이오매스로부터 고부가가치 창출에 이바지 할 수 있음 .

- L-ribose는 고가의 당 (\$570/kg)으로 많은 L-형태의 핵산당 의약품들의 합성 시작물질로서 항바이러스제인 methyl-L-riboflanoside (BezimidavirTM) 등의 합성에 사용되어 L-ribose 및 그 유도체의 세계시장은 2001년 약 11억불이었고, 최근에는 새로운 항포진제(Antiherpes)로 개발되고 있는 BW1263W94 (Glaxo Wellcome)와 B형간염 치료제로 개발되고 있는 L-FMAU (Bukwang & Triangle) 등의 핵심중간체로서 그 수요가 급증하고 있어, 산업적으로 이용 가능한 그의 제조방법을 개발하는 것은 동 분야 많은 연구진들의 관심의 대상임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 반섬유소에서 L-arabinose 생산

반섬유소의 결합지를 구성하고 있는 L-arabinose를 생물학적 방법으로 제거 및 획득을 위해서는 반드시 arabinan (L-arabinose가 alpha-1,5 결합으로 구성된 주폴리머에 결합지로 alpha-1,3 결합으로 L-arabinose가 결합되어 있는 당질폴리머) 분해에 관여하는 효소들의 발굴이 요구되어진다(Lim et al. 2010; Voragen et al. 1987). Arabinan 분해 효소로는 arabinan backbone을 arabino-oligosaccharides로 분해하는 endo-1,5-alpha-L-arabinanase (EC 3.2.1.99) (Dunkel et al. 1994; Hong et al. 2009; Leal and Sa-Nogueira 2004; Miyazaki 2005, Takao et al. 2002a, 2002b)와 arabino-oligosaccharides 및 arabinan side chain 을 분해하여 L-arabinose로 전환하는 alpha-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)의 두가지 효소로 구성되어 있다(Brigissson et al. 2004; Canakci et al. 2007, 2008; Debeche et al. 2002). 특히, arabinan 분해에 관여하는 효소들은 cellulase, xylanase 등과 비교하여 그 연구가 많이 진행되어져 있지 않은 상태이고 최근 기능성 식품 (functional food)의 첨가제로서 섭취시 저(무)칼로리 단당이 많은 각광을 받고 있으며, L-arabinose 도 저칼로리 단당으로의 이용 가능성에 대해서 높은 주목을 받고 있다(Osaki et al. 2001; Seri et al. 1996).

1) 토양 분리세균 *Bacillus licheniformis* endo-1,5- α -L-arabinanase 특성규명

1. Arabinan 분해 세균의 분리, 선별 및 동정

1% arabinan과 0.05% trypan blue 함유된 LB agar plate를 이용하여 clear zone이 활성에 비례하는 것을 이용하여 5,000 colony로부터 arabinan 분해능력이 큰 7가지 미생물 균주를 선별하였다 (Table 1). 가장 높은 활성을 지닌 균주의 16S rRNA gene 분석 결과 *Bacillus licheniformis*와 99.9% 일치하였다.

Table 1. Activity and identification of bacteria that hydrolyze arabinan

Strain number	Identified strain	Identity of 16S rRNA gene	Activity (mU/ml)
KS12	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9%	411
KS48	<i>Bacillus arsenicus</i>	99.7%	136
KS33	<i>Bacillus megaterium</i>	99.9%	71
KS28	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	99.8%	65
KS45	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98.7%	36
KS5	<i>Paenibacillus lactis</i>	99.5%	32
KS32	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	99.0%	25

The analysis of 16S rRNA gene for bacteria isolated from soil was performed by

SolGent (Daejeon, Korea).

2. *Bacillus licheniformis* endo-1,5- α -L-arabinanase의 유전자 클로닝, 효소 발현 및 정제

B. licheniformis DSM13 (GenBank accession number, AE 017333)의 putative endo-1,5- α -L-arabinanase의 유전자를 기본으로 하여 클로닝을 하여 *E. coli*에서 발현시켰다. 유전자는 987 bp의 open reading frame으로 이루어졌고 발현시 37 아미노산의 signal peptide가 함유된 328 아미노산 으로 구성된 효소이다. 이 효소의 유전자를 DDBJ/EMBL/GenBank DNA database에 올려 accession number BAI47539를 부여 받았다. 균체 파쇄액을 His-Trap affinity chromatography으로 정제하여 SDS-PAGE에서 분자량을 확인한 결과 33 kDa (Fig. 1A) 이었고 gel filtration chromatography로 측정된 분자량도 33 kDa로 monomer이었다 (Fig. 1B).

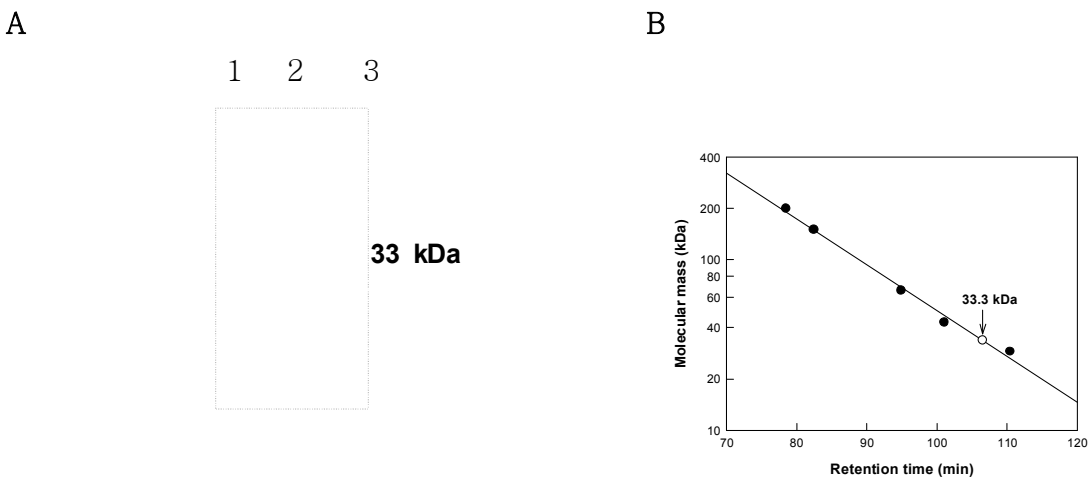


Fig. 1. (a) SDS-PAGE analysis of purified enzyme from each purification step. *Lane1*, molecular mass markers; *lane2*, crude enzyme; *lane3*, His-Trap column product (purified enzyme). **(b).** Determination of molecular mass of endo-1,5- α -L-arabinanase from *B. licheniformis* by gel-filtration chromatography using a Sephacryl S-300 HR 16/60 column. The reference proteins (●) were b-amylase from sweet potato (200 kDa), aldolase (158 kDa), albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa) and carbonic anhydrase from bovine (29 kDa). The molecular mass of endo-1,5- α -L-arabinanase was 33.3 kDa (○).

3. *Bacillus licheniformis* endo-1,5- α -L-arabinanase의 생화학적 특성

이 효소의 debranched arabinan (linear 1,5- α -L-arabinan)에 대한 최적 pH는 6.0 이었고 최적온도는 35 $^{\circ}$ C이었다 (Fig. 2). 이 효소는 35 $^{\circ}$ C에서 30분간 안정하였으나 45 $^{\circ}$ C에서는 30분 후 5%활성을 보여주었다 (Fig. 3).

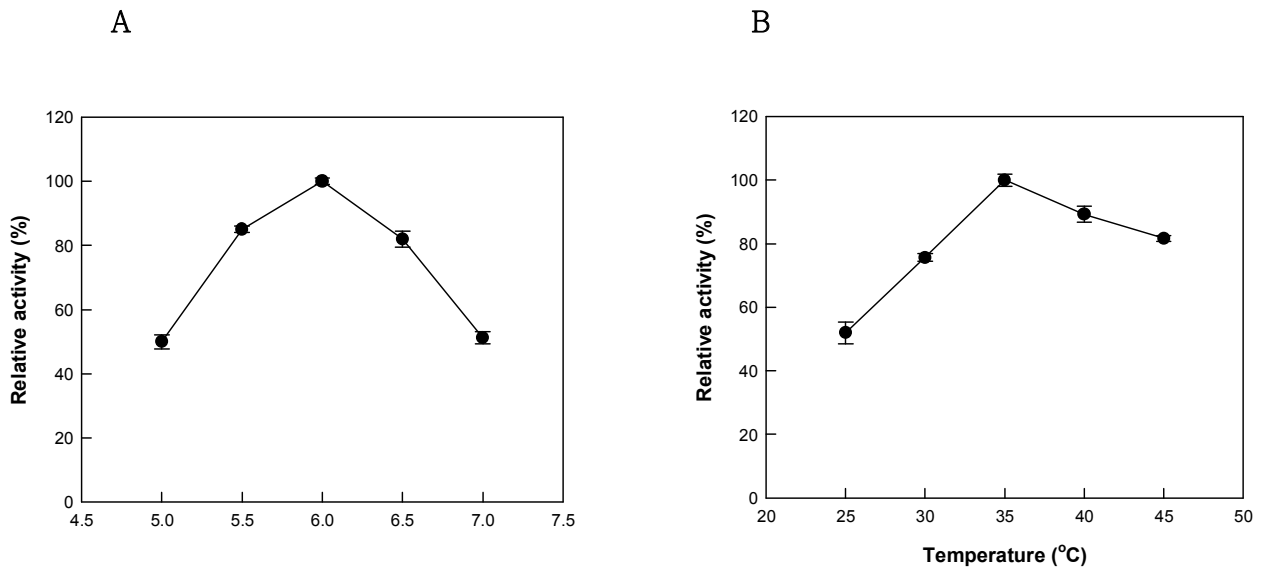


Fig. 2. Effects of (a) pH and (b) temperature on the activity of endo-1,5- α -L-arabinanase from *B. licheniformis*

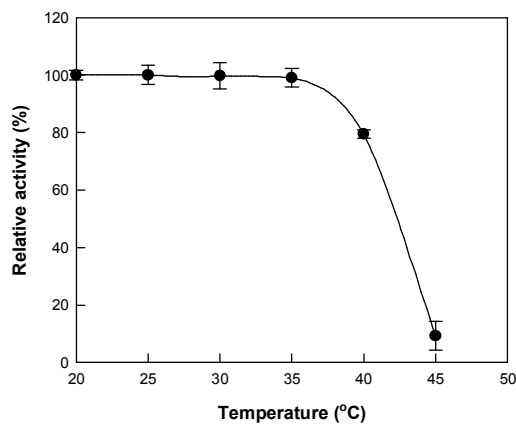


Fig. 3. Effect of temperature on the enzyme stability.

이 효소의 기질특이성은 debranched arabinan (linear 1,5- α -L-arabinan)에서 가장 높았고 (Table 2), *B. licheniformis* endo-1,5- α -L-arabinanase의 debranched arabinan에 대한 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m)는 sugar beet arabinan 대한 값의 140배 높았다 (Table 3).

Table 2. Substrate specificity of endo-1,5- α -L-arabinanase from *B. licheniformis*

Substrate	Specific activity (U/mg)
Debranched arabinan	27 ± 0.35
Sugar beet arabinan	0.7 ± 0.006
Starch	ND
Arabinoxylan	ND
Arabinogalactan	ND
Xylan	ND
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -l-arabinofuranoside	ND

Table 3. Kinetics parameters of endo-1,5- α -L-arabinanase from *B.licheniformis*KS12

	K_m (mg ml ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mg ml ⁻¹ s ⁻¹)
Debranched arabinan	19 ± 0.2	161 ± 1.2	8.47 ± 0.16
Sugar beet arabinan	24 ± 0.3	1.4 ± 0.05	0.06 ± 0.002

2) 고온세균 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase 특성규명

1. *C. saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase의 정제 및 분자량 측정

Caldicellulosiruptor saccharolyticus endo-1,5- α -L-arabinanase를 열처리와 His-trap affinity chromatography로 정제 과정을 거친 결과, 12 U mg⁻¹의 specific activity를 확인할 수 있었다 (Table 4). 정제한 결과 SDS-page 상에서 확인한 효소의 분자량은 56 kDa 이었고, gel-filtration으로 확인한 효소의 native 분자량은 112kDa으로 dimer 이었다 (Fig. 4).

Table 4. Purification of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C. saccharolyticus*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	162	46	0.28	100	1
Heat treatment	5.6	27	4.8	59	17
His-Trap HP	0.6	6.6	11	14	39

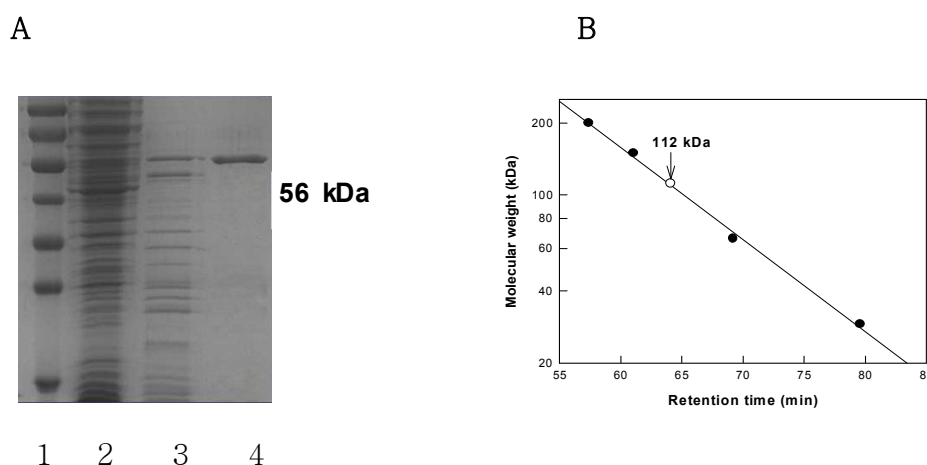


Fig. 4. (a) SDS-PAGE analysis of purified enzyme from each purification step. (b) Determination of molecular mass of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C. saccharolyticus* by gel-filtration chromatography using a Sephacryl S-300 HR16/60 column.

2. *C. saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase의 생화학적 특성

효소의 기질특이성을 test해 본 결과 1,5- α -L-arabinan인 debranched arabinan에서 최대 활성을 나타내어 이 효소가 endo-1,5- α -L-arabinanase로 규명되었다 (Table 5). 효소의 최적 pH는 6.5으로 확인 되었고, 최적 온도는 75 $^{\circ}$ C로 확인 되었다 (Fig. 5). 열안정성에 있어서 half-lives는 65, 70, 75 $^{\circ}$ C에서 각각 2440, 254, 93 h로 나타나 보고된 endo-1,5- α

-L-arabinanase중에 가장 열안정성이 높았다 (Fig. 6). Debranched arabinan에 대한 K_m 이 18 mg ml^{-1} , k_{cat} 이 50 s^{-1} 및 k_{cat}/K_m 이 $2.8 \text{ mg ml}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이었다 (Fig. 7).

Table 5. Specific activity of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C.saccharolyticus*

Substrate	Specific activity (U mg^{-1})
Debranched arabinan	12 ± 0.40
Sugar beet arabinan	2.6 ± 0.03
Arabinoxylan	ND
Xylan	ND
Starch	ND
<i>p</i> -Nitrophenyl- α -L-arsabinofuranoside	ND

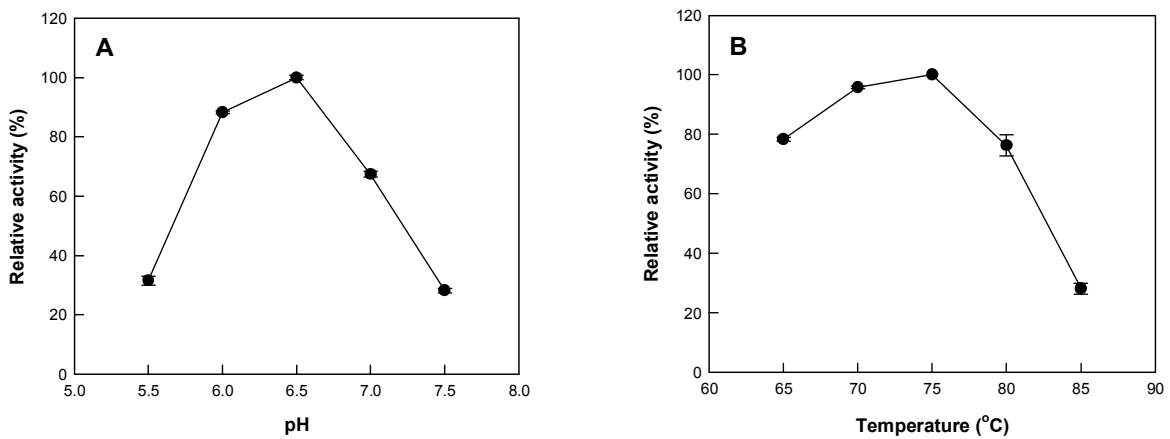


Fig. 5. Effects of (a) pH and (b) temperature on the activity of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C. saccharolyticus*.

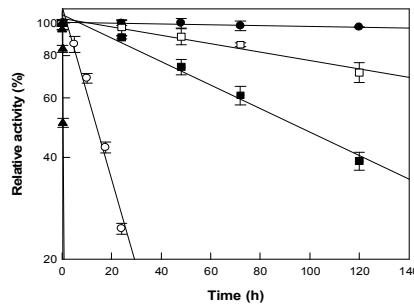


Fig. 6. Thermal inactivation of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C.s accharolyticus*. Temperatures are 65 (●), 70 (□), 75 (■), 80 (○), and 85°C (▼).

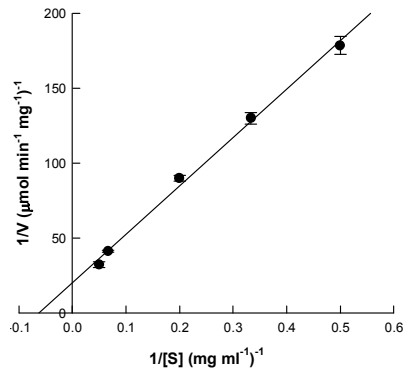


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of endo-1,5- α -L-arabinanase from *C. saccharolyticus* for debranched arabinan.

3) 고온세균 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase 특성규명

1. *C. saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase의 정제 및 분자량 측정

Caldicellulosiruptor saccharolyticus α -L-arabinofuranosidase를 열처리와 His-trap affinity chromatography로 정제 과정을 거친 결과, 28 U mg⁻¹의 specific activity를 확인 할 수 있었다 (Table 6). *C. saccharolyticus*를 배양하여 원하는 유전자를 클로닝 하여 *E. coli*에서 발현하였다. 얻은 효소는 α -L-arabinofuranosidase의 GH family 51의 공통적인 서열인 Arg-Tyr-Pro-Gly-Gly (RYPGG)의 PGG locus, Ile-Gly-Glu-Asn (IGEN)의 acid-base catalytic locus 및 Asp-Glu-Trp (DEW)의 nucleophilic catalytic locus가 보존되어 있어 (Pei and Shao 2008) *C. saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase는 GH family 51에 속한다 (Fig. 8). 고온의 효소를 열처리방법과 음이온교환 방법을 이용하여 58 kDa의 정제된 효소를 얻었다 (Fig. 9). 효소는 Sephacryl S-300 HR 16/60 preparative-grade column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 이용하여 150 mM NaCl이 포함된 50 mM citric acid buffer (pH 5.5)에서 1 ml/min의 유속으로 분석하였고 그 분자량은 58-kDa 팔량체로 이루어진 460 kDa으로 확인되었다.

Table 4. Purification of α -L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1094	1203	1.1	100	1
Heat treatment	63	951	15.1	79	14
His-Trap HP	5	141	28.2	12	26


```

CSAraf 19 KRIYGSFLEHMGRAIYTGIEYEPDHPQADEMGFRKDVLELVRKLNVPVIRYPGGNFVSGYN
GCAraf 24 KRIYGSFIEHLGRAVYGGIYEPGHPQADERGFRRDVIELVKELQVPLIRYPGGNFVSGYN
BSAraf 24 KRIYGSFIEHLGRAVYGGIYEPGHPQADENGFRQDVIELVKELQVPIIRYPGGNFVSGYN
AKAraf 21 KRIYGSFIEHLGRAVYGGIYEPGHPQADENGFRQDVIELVKALQVPIIRYPGGNFVSGYN
BLAraf 61 PRLFGSFVEHLGRCVYGGIYEPSHPTADENGFRQDVLDELVKELGVTQVRYPGGNFVSNYN
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

CSAraf 139 VEYCNFPGGYSDLRQRHGQYEQPHNIKVWCLGNEMDGDWQIGHKTAVEYGRGLAREAAKV
GCAraf 144 VEYCNHPSGSYSDLRISHGYKEPHKIKTWCLGNEMVGPWQIGHKTAVEYGRICEAAKV
BSAraf 141 VEYCNHPSGSYSDLRISHGYKEPHKIKTWCLGNEMDGPWQIGHKTAVEYGRICEAAKV
AKAraf 141 VEYCNHPSGSYSDLRISHGYKEPHKIKTWCLGNEMDGPWQIGHKTAVEYGRICEAAKV
BLAraf 181 LEYVNGAPGTAWADQQRVANGIEEPMDIKMWCIGNEMDGPWQVGHMSPEEYAGAVDKVAHA
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

CSAraf 253 KNFVAKSLEMEEFIKTIVISTIDYVKAKKRSKVKVNSIFDQWNVVYHAHLEGK-----
GCAraf 258 ANYLALTLEMDDFIRSVVAIADYIKAKKRSKKTLYLSFDQWNVVYHSNEA-----
BSAraf 255 ANYLALSLEMDDFIRSVVAIADYVKAKKRSKKTIHLSFDQWNVVYHSNEA-----
AKAraf 255 ANYLAMSLEMDDFIRSVVTIADYVKAKKRSKKTLYLSFDQWNVVYHSNEN-----
BLAraf 301 QDFLASEDMTKFIATVSDAADQAREANNKTDIALSFDQWGVVYSDKWNEQEDQWKAEA
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
      :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Fig. 8. Alignment of the amino acid sequences of *C. saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase with GH family 51 α -L-arabinofuranosidases. CSAraf, *C. saccharolyticus*; GSAraf, *Geobacillus caldoxylosilyticus*; BSAraf, *Bacillus stearothermophilus*; AKAraf, *Anoxybacillus kestanbolensis*; and BLAraf, *Bifidobacterium longum*. The catalytic residues (E173 and E292) and consensus sequences of GH family 51 are highlighted with black and gray backgrounds, respectively.

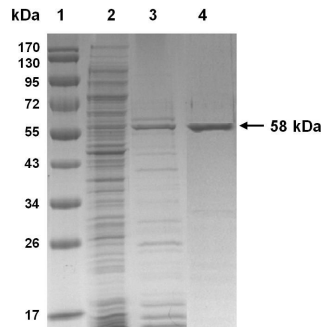


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of each purification step. Lane 1 marker proteins; lane 2 crude extract; lane 3 supernatant after heat treatment at 75°C for 10 min; lane 4 Hi-Trap Q HP chromatography column product (purified enzyme).

2. *C. saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase의 생화학적 특성

각 1 mM의 Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 그리고 Fe^{2+} 8가지의 이온을 50 mM citric acid buffer (pH 5.5)에 80°C에서 반응한 결과 이온에 Cu^{2+} 에서 약간의 역가 감소를 보이고 그 외에는 비의존적임을 확인하였다. 50 mM citric acid buffer (pH 5.5)를 이용하여 온도와 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5-5.5) and 50 mM maleic acid buffer (pH 5.5-6.5)를 이용하여 pH 실험을 한 결과 pH 5.5와 온도 80°C에서 최적을 보였다 (Fig. 10). 65, 70, 75, 그리고 80°C에서 효소의 온도 안정성 실험을 한 결과 효소의 활성이 반으로 떨어지는 시간이 70°C에 390시간, 75°C에 49시간, 80°C에는 0.4시간이었다 (Fig. 11). *p*-nitrophenyl- α -L-arabinopyranoside의 k_{cat} 은 $285 s^{-1}$, K_m 은 1.29 mM이었다.

A

B

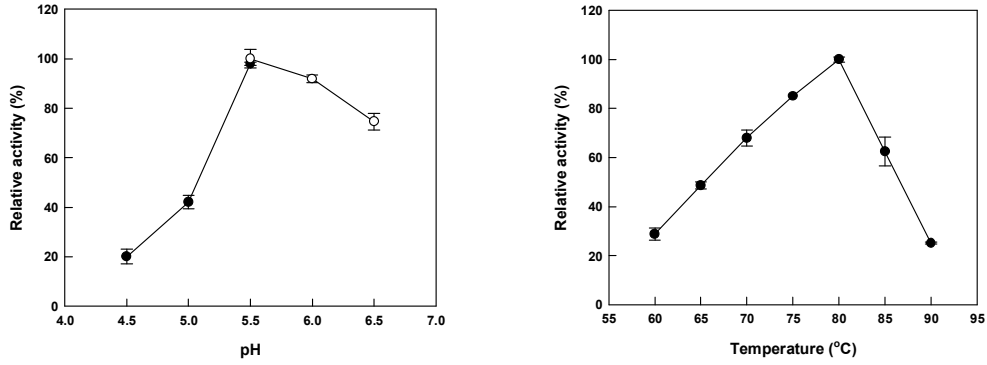


Fig. 10. Effects of (a) pH and (b) temperature on the activity of α -L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus*.

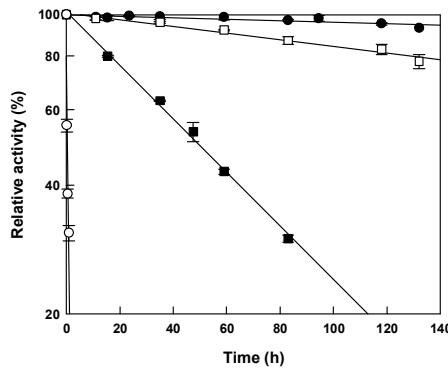
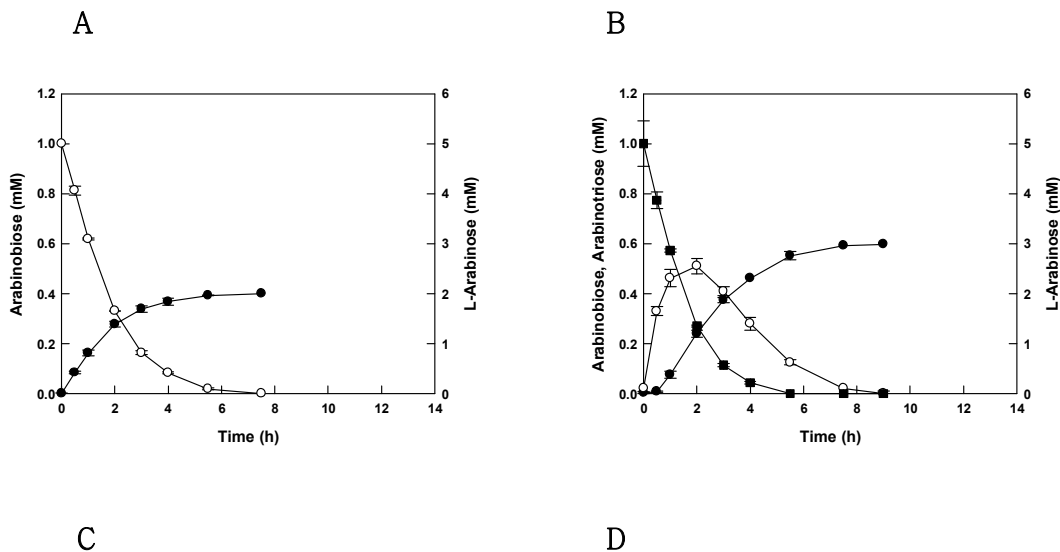


Fig. 11. Thermal inactivation of α -L-arabinofuranosidase from *C.s accharolyticus*. Temperatures are 65 (●), 70 (□), 75 (■), and 80°C (○).

3. *C. saccharolyticus* α-L-arabinofuranosidase에 의한 arabinooligosaccharides에서 L-arabinose 생산

기질 arabinobiose, arabinotriose, arabinotetraose, 그리고 arabinopentaose를 이용하여 효소의 활성을 확인하고 그 역가를 확인하였다. 본 효소는 기질의 말단에 작용하여 분해하는 효소로 각 기질을 말단부터 분해하여 최대 13시간만에 모든 당을 분해하는 패턴을 보였다 (Fig. 12).



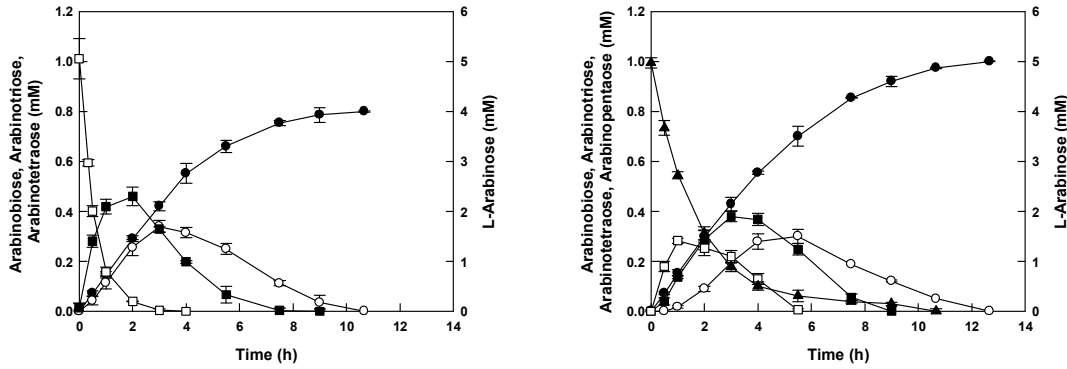


Fig. 12. Hydrolysis for arabino-oligosaccharides from n=2 to 5 of *C. saccharolyticus* α -L-arabinofuranosidase. (a) Arabinobiose. (b) Arabinotriose. (c) Arabinotetraose. (d) Arabinopentaose. The used concentrations of arabino-oligosaccharides from n=2 to 5 were 1 mM. Symbols; L-arabinose (●), arabinobiose (○), arabinotriose (■), arabinotetraose (□), and arabinopentaose (▲).

4) 고온세균 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase 와 α -L-arabinofuranosidase의 두 효소에 의한 L-arabinose 생산 (Debranched arabinan)

*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*에서 클로닝 하여 얻은 말단을 분해작용하는 효소 (α -L-arabinofuranosidase, CSabf) 와 중간을 분해작용하는 효소 (endo-1,5- α -L-arabinanase, CSabn) 두가지 를 이용하여 debranched arabinan을 이용하여 그 분해 효과를 어느정도까지 증대효과가 있는지 실험하였다.

1. 두 효소의 최적 비율의 결정

Debranched arabinan 0.1%를 이용하여 endo-1,5- α -L-arabinanase (중간에서 분해작용하는 효소)과 α -L-arabinofuranosidase (말단에 분해작용하는 효소)를 이용하여 각 비율별로 최고의 분해를 보이는 비율을 확인하였고, 그 비율은 3:1이었다. (Fig. 13). 이때 endo-1,5- α -L-arabinanase 1 Unit은 1시간동안 1% debranched arabinan에서 1 μ M의 L-arabinose를 분해하는 능력, α -L-arabinofuranosidase의 1 Unit은 1시간동안 1 mM *p*-nitrophenyl- α -L-arabinopyranoside에서 1 μ M L-arabinose를 분해하는 능력을 나타낸다.

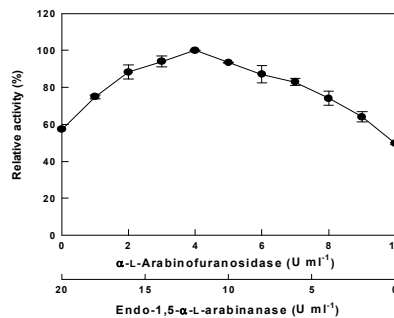


Fig. 13. Effect of the ratio of endo-1,5- α -L-arabinanase to α -L-arabinofuranosidase on L-arabinose production from debranched arabinan by endo-1,5- α -L-arabinanase and α -L-arabinofuranosidase from *C. saccharolyticus*.

2. 두 효소의 최적 비율에서 반응 조건 최적화

CSabn과 CSabf의 3 : 1 unit의 비율에 맞춰 온도와 pH 별로 실험한 결과 pH는 pH 6.5에서 온도는 75°C에서 최적이었다 (Fig. 14). 온도 65, 70, 75, 80, 그리고 85°C에서 효소를 두고 활성을 측정 하였을때 그 효소의 활성이 반이 되는 시간은 각 1215, 347, 126, 12, 그리고 0.12시간이었다 (Fig. 15)

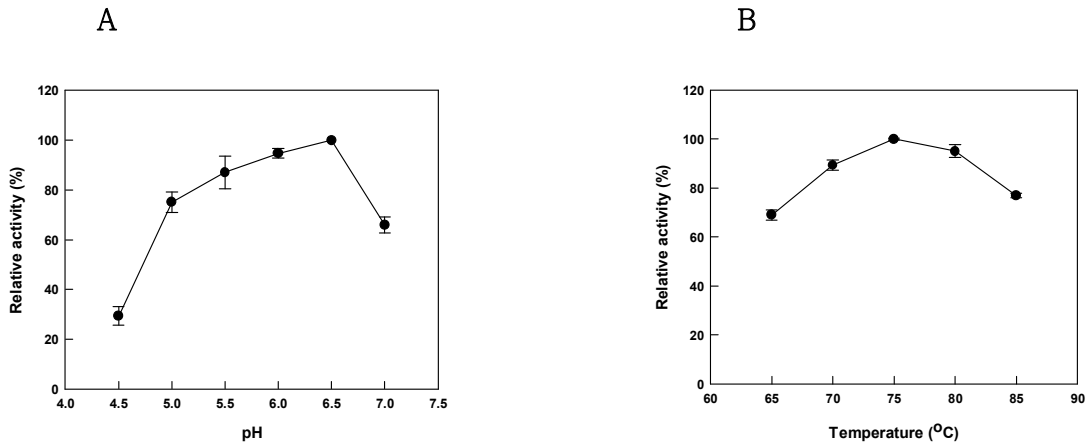


Fig. 14. Effects of (a) pH and (b) temperature on the L-arabinose producing activity at the optimal unit ratio (3 : 1 of CSabn:CSabf) from *C. saccharolyticus*.

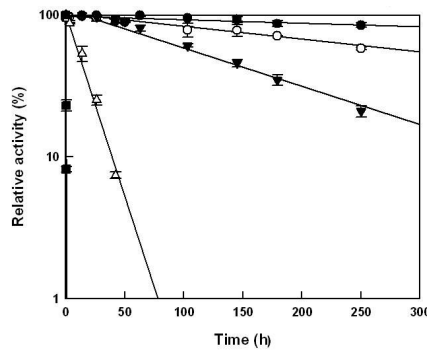


Fig. 15. Thermal inactivation of the L-arabinose producing activity at the optimal unit ratio (3 : 1 of CSabn:CSabf) from *C. saccharolyticus*. Temperatures are 65 (●), 70 (○), 75 (▼), 80 (△) and 85°C (■).

3. 두 효소의 최적 비율에서 반응 조건 최적화 (효소와 기질 농도)

CSabn과 CSabf의 3 : 1 unit의 비율에 pH 6.5와 온도 75도에서 L-arabinose 생산 최대화를 위해 효소와 debranched arabinan 농도별 실험을 진행하였다. 효소는 각 CSabn을 0~120 u/ml과 CSabf를 0~40 U/ml의 농도로 진행하였고, 기질은 0~50 g/l의 농도에서 진행하였으며, 각 효소는 CSabn 42 U/ml과 CSabf 14 U/ml에서 최적(Fig. 16a)을 나타내었고, 기질 20g/l에서 가장 높은 production을 보이는 것(Fig. 16b)을 확인하였다.

A

B

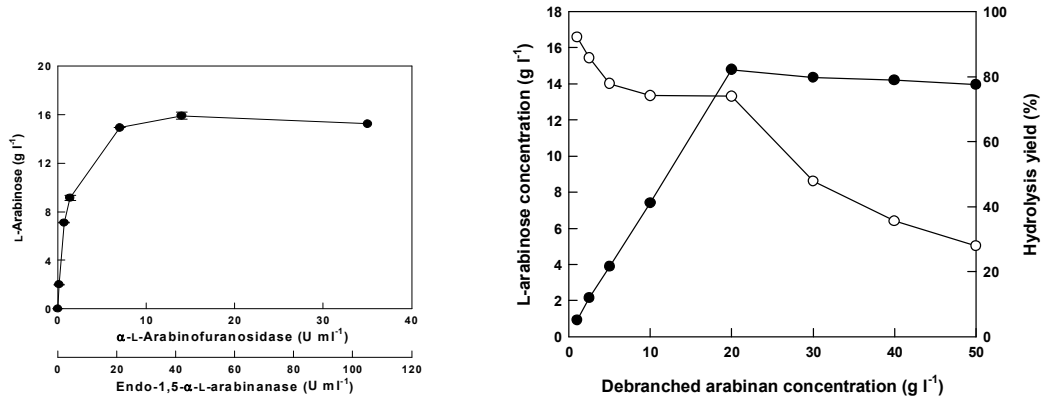


Fig. 16. (a) Effect of enzymes concentration on L-arabinose production from debranched arabinan at the optimal unit ratio (endo-1,5- α -L-arabinanase: α -L-arabinofuranosidase=3:1) (b) Effect of substrate concentration on L-arabinose production from debranched arabinan with 42 U/ml endo-1,5- α -L-arabinanase and 14 U/ml α -L-arabinofuranosidase.

4. 두 효소의 최적 비율과 최적 반응 조건에서 L-arabinose 생산

CSabn과 CSabf의 3 : 1 unit의 최적비율에서 pH 6.5와 온도 75°C에서 L-arabinose 생산 최대화를 위해 시간대별로 L-arabinose 생산을 진행하였다. 그결과 L-arabinose를 2시간 안에 20 g/l debranched arabinan을 사용해서 16 g/l의 L-arabinose를 얻어 80%의 수율을 보여주었다(Fig. 17). Debranched arabinan의 조성은 arabinose : galactose : rhamnose : galacturonic acid가 88:4:2:6이므로 구성 성분의 arabinose에 대한 수율은 91%이다.

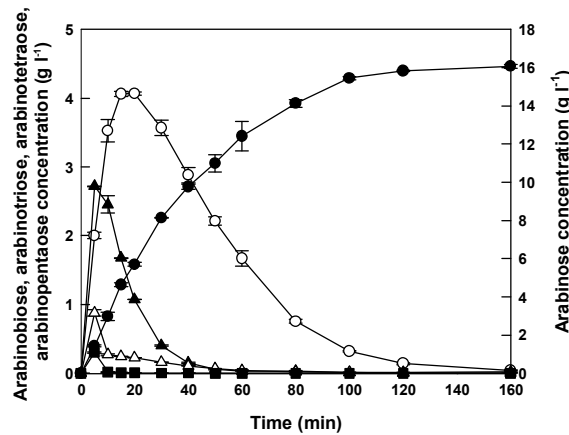


Fig. 17. Time courses of L-arabinose production from debranched arabinan under the optimal conditions. The optimal conditions for debranched arabinan were pH 6.5, 75 °C, 20 g/l debranched arabinan, 42 U/ml endo-1,5- α -L-arabinanase, and 14 U/ml α -L-arabinofuranosidase. L-Arabinose (●), arabinobiose (△), arabinotriose (■), arabinotetraose (□), and arabinopentaose (▲).

5) 고온세균 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase 와 α -L-arabinofuranosidase의 두효소에 의한 L-arabinose 생산(Sugar beet arabinan)

*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*에서 클로닝 하여 얻은 말단을 분해작용하는 효소 (α -L-arabinofuranosidase, CSabf) 와 중간을 분해작용하는 효소 (endo-1,5- α -L-arabinanase, CSabn) 두가지 를 이용하여 sugar beet arabinan을 이용하여 그 분해 효과를 어느정도까지 증대효과가 있는지 실험하였다.

1. 두 효소의 최적 비율의 결정

Sugar beet arabinan 0.1%를 이용하여 CSabn(중간에서 분해작용하는 효소)과 CSabf(말단에 분해작용하는 효소)를 이용하여 각 비율별로 최고의 분해를 보이는 비율을 확인하였고, 그 비율은 1:8이었다. (Fig. 18).

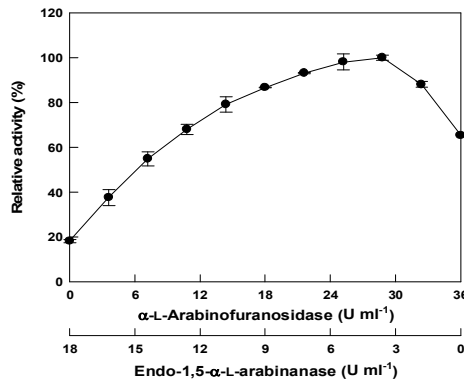


Fig. 18. Effect of the ratio of CSabn to CSabf on L-arabinose production from sugar beet arabinan by CSabn and CSabf from *C. saccharolyticus*.

2. 두 효소의 최적 비율에서 반응 조건 최적화 (온도, pH)

CSabn과 CSabf의 3 : 1 unit의 비율에 맞춰 온도와 pH 별로 실험한 결과 pH는 pH 6.0에서 온도는 75°C에서 최적이었다(Fig. 19).

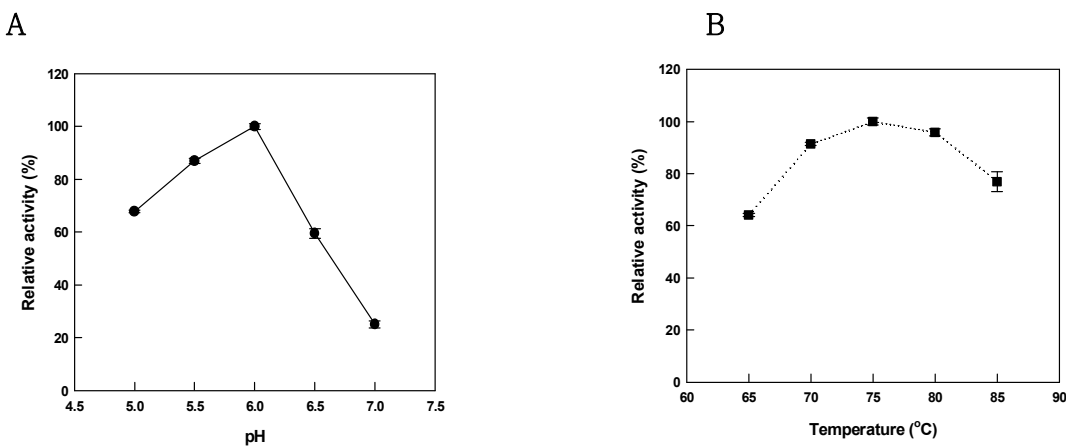
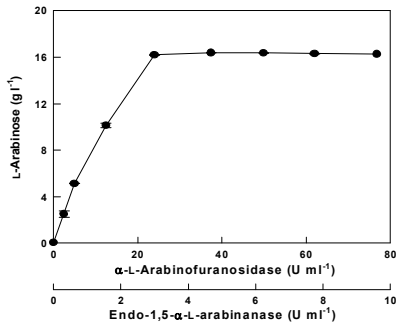


Fig. 19. Effects of (a) pH and (b) temperature on the L-arabinose producing activity at the optimal unit ratio (1 : 8 of CSabn:CSabf) from *C. saccharolyticus*.

3. 두 효소의 최적 비율에서 반응 조건 최적화 (효소와 기질 농도)

CSabn과 CSabf의 1 : 8 unit의 비율에 pH 6.0와 온도 75도에서 L-arabinose 생산 최대화를 위해 효소와 기질 농도별 실험을 진행하였다. 효소는 각 CSabn을 0~8 u/ml과 CSabf를 0~70 U/ml의 농도로 진행하였고, 기질은 0~50 g/l의 농도에서 진행하였으며, 각 효소는 CSabn 3 U/ml과 CSabf 24 U/ml에서 최적을 나타내었고, 기질 20g/l에서 가장 높은 production을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 20).

A



B

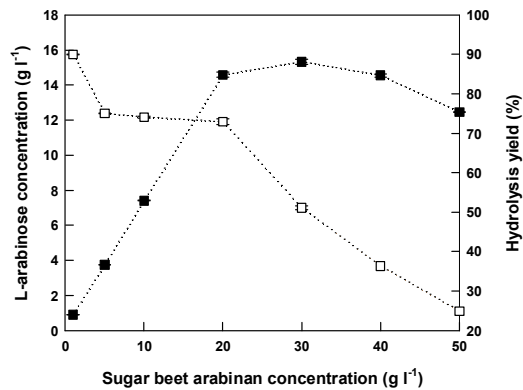


Fig. 20. (a) Effect of enzymes concentration on L-arabinose production from Sugar beet arabinan at the optimal unit ratio (endo-1,5- α -L-arabinanase: α -L-arabinofuranosidase=1:8) (b) Effect of substrate concentration on L-arabinose production from Sugar beet arabinan with 3 U ml⁻¹ endo-1,5- α -L-arabinanase and 24 U ml⁻¹ α -L-arabinofuranosidase.

4. 두 효소의 최적 비율과 최적 반응 조건에서 L-arabinose 생산

CSabn과 CSabf의 1 : 8 unit의 최적비율에서 pH 6.0와 온도 75°C에서 L-arabinose 생산 최대화를 위해 시간대별로 L-arabinose 생산을 진행하였다. 그 결과 L-arabinose를 2시간 안에 20 g/L sugar beet arabinan을 사용해서 16 g/l의 L-arabinose를 얻어 80%의 수율을 보여주었다(Fig. 21). Sugar beet arabinan의 조성은 arabinose:galactose:rhamnose:galacturonic acid가 88:4:2:6이므로 sugar beet arabinan중의 arabinose로부터 생성된 arabinose의 수율은 91%이다.

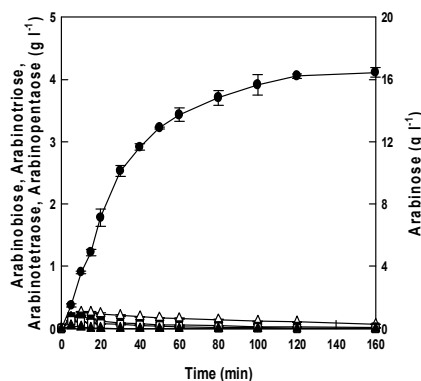


Fig. 21. Time courses of l-arabinose production from sugar beet arabinan under the optimal conditions. The optimal conditions for sugar beet arabinan were pH 6.0, 75 °C,

20 g l⁻¹ sugar beet arabinan, 3 U ml⁻¹endo-1,5- α -l-arabinanase, and 24 U ml⁻¹ α -l-arabinofuranosidase. l-Arabinose (●), arabinobiose (△), arabinotriose (■), arabinotetraose (□), and arabinopentaose (▲).

6) 고온세균 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* endo-1,5- α -L-arabinanase 와 α -L-arabinofuranosidase 두효소의 고정화를 통한 sugar beet arabinan으로부터 L-arabinose 생산

*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*에서 클로닝 하여 얻은 말단을 분해작용하는 효소 (α -L-arabinofuranosidase, CSabf) 와 중간을 분해작용하는 효소 (endo-1,5- α -L-arabinanase, CSabn) 두가지 효소를 고정화 담체에 고정화 하여 sugar beet arabinan을 이용하여 그 분해 효과를 어느정도까지 증대효과가 있는지 실험하였다.

1. 고정화 담체 선정

다양한 고정화 담체를 이용하여 CSabn(중간에서 분해작용하는 효소)과 CSabf(말단에 분해작용하는 효소)를 고정화 하여 sugar beet arabinan에 최고의 분해를 보이는 담체를 조사 하였다. 그결과 Duolite A568 담체에 고정화한 효소에서 최적의 분해능을 보였다(Table. 6).

Table 6. Relative conversion of arabinanase on to different supports.

Support	Conversion rate (%)
Free enzyme	80
Duolite A568	79.56
Duolite S761	36.4
Duolite A7	35.42
IRA-120S	43
IRA-400	0
Chitopearl	28
Nano-particle	40
Glutaraldehyde	0

2. 고정화 효소의 최적 비율의 결정

CSabn(중간에서 분해작용하는 효소)과 CSabf(말단에 분해작용하는 효소)를 각각 Duolite A568 고정화 담체에 고정화 하였을때 각각의 고정화 효소를 이용하여 각 비율별로 최고의 분해를 보이는 비율을 확인하였고, 그 비율은 1:10이었다(Table 7).

Table 7. Effect of the ration of endo-1,5- α -L-arabinanase to α -L-arabinofuranosidase on L-arabinose production from sugar beet arabinan.

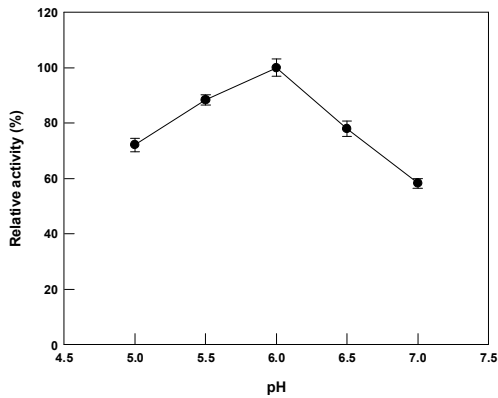
Ratio	Relative production (%)
1:5	73.2
1:6.6	89.5
1:8.3	96.7
1:10	100
1:12.5	99.9
1:16.6	93.3

3. 두 효소의 최적 비율에서 반응 조건 최적화

(1) 최적 온도, pH

고정화 효소인 CSabn과 CSabf의 1 : 10 unit의 비율에 맞춰 온도와 pH 별로 실험한 결과 pH는 pH 6.0에서 온도는 80°C에서 최적이었다(Fig. 22). 온도 70, 75, 그리고 80°C에서 효소를 두고 활성을 측정 하였을때 그 효소의 활성이 반이 되는 시간은 각 532, 240, 그리고 31 시간이었다(Fig. 23).

(a)



(b)

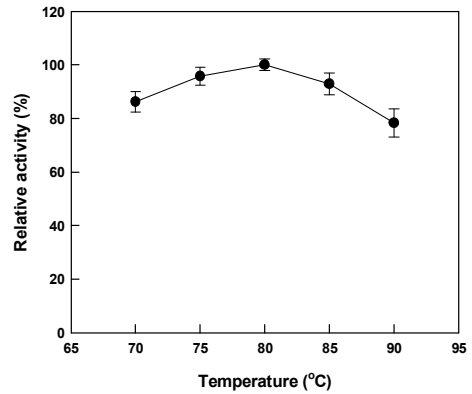


Fig. 22. Effects of (a) pH and (b) temperature on the L-arabinose production by immobilized enzymes.

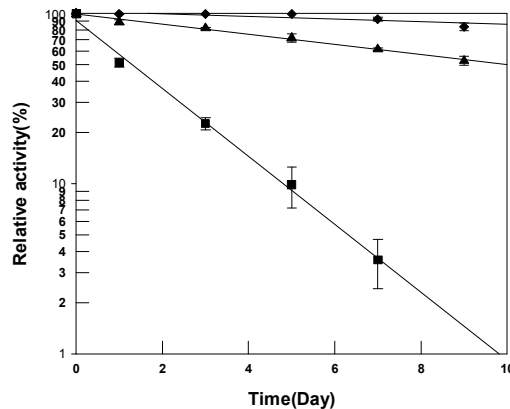


Fig. 23. Thermal inactivation of the L-arabinose production by immobilized enzymes. Temperatures are 75 (●), 75 (▲), and 80°C (■).

(2) 최적 기질 농도

고정화 효소인 CSabn과 CSabf의 1 : 10 unit의 비율에 맞춰 sugar beet arabinan 농도별로 실험한 결과 20 g/l 농도의 sugar beet arabinan 조건에서 최고의 L-arabinose 생산을 나타내었다(Fig. 24).

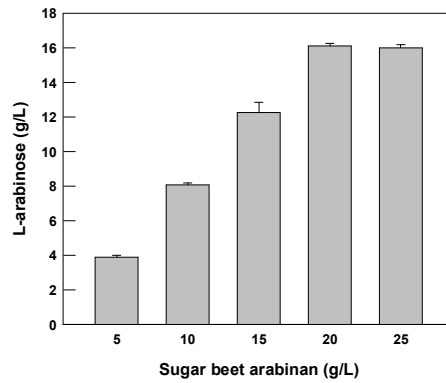


Fig. 24. Effect of sugar beet arabinan concentration on the L-arabinose production by immobilized enzymes.

(3) 생물 반응기에서의 최적 조건

고정화 효소인 CSabn과 CSabf의 packed bed bioreactor 운영을 위해 XK16/20 column에 고정화 효소를 충전하여 dilution rate별로 실험한 결과 0.6 h^{-1} 에서 최고의 arabinose 생산을 나타내었다 (Fig. 25).

(a)



(b)

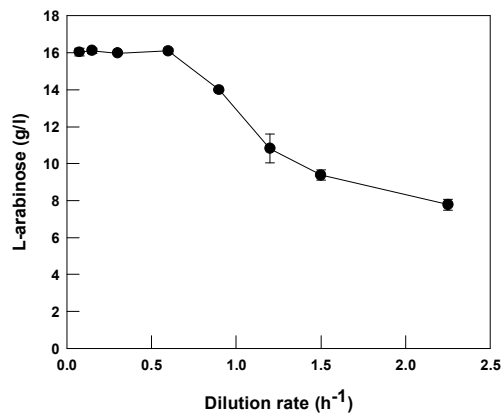


Fig. 25. (a) A packed-bed reactor with CSabn and CSabf immobilized on Duolite A568 (b) Effect of dilution rate on L-arabinose production in a packed bed reactor.

(4) Packed bed reactor에서의 L-arabinose 생산

고정화 효소를 이용한 packed bed reactor에서 20g/l의 sugar beet arabinan으로부터 L-arabinose 생산을 조사한 결과 8일차 까지 꾸준히 16g/L의 L-arabinose를 생산 하였고, 그 이후부터 L-arabinose 생산이 감소하는 것을 확인 하였다(Fig. 26).

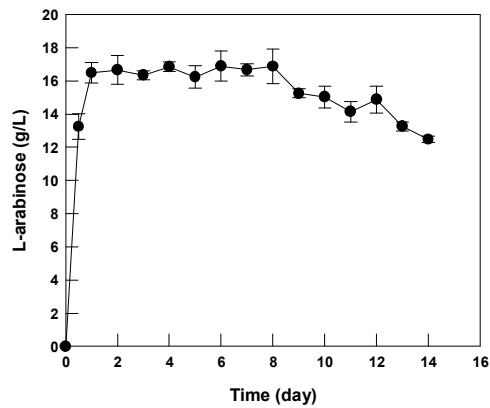


Fig. 26. Continuous L-arabinose production from sugar beet arabinan in a packed bed reactor at dilution rate of 0.6 h^{-1} .

7) 사탕무 폐액과 볏짚에서의 L-arabinose 생산

1. Sugar beet arabinan에서 L-arabinose 함량

Sugar beet arabinan의 경우 그 안의 단당류 함량이 arabinose, galactose, rhamnose 그리고 galacturonic Acid가 각각 88%, 3%, 2% 그리고 7%의 비율로 되어있어 arabinose가 매우 다량이 포함되어 있다. 따라서 사탕무 폐액 중의 sugar beet arabinan을 이용하여 L-arabinose를 얻는 방법이 볏짚에서 L-arabinose를 얻는 것보다 더 나음을 비교 실험을 통하여 확인하였다.

2. 볏짚과 사탕무 폐액 에서 hemicellulose의 분리 방법

본 연구에서는 볏짚과 사탕무 폐액 중의 sugar beet arabinan을 이용하여 hemicellulose를 만들고 만들어진 hemicellulose를 이용하여 L-arabinose를 생산하는 것도 연구되고 있으며 그 방법은 참고논문(Carbohydrate Polymers 42 (2000) 111-122)을 적용하여 실험에 들어갔다.

이 방법은 toluene-ethanol을 이용하여 dewaxed straw를 만들고, 이를 1% NaOH를 55도에서 2 h 처리한 뒤 6M HCl로 pH 8.5을 맞춘다. 그 후 filtration을 이용하여 얻은 상등액을 6M HCl을 이용하여 다시 pH 5.5를 만들어 중화를 시킨다. 그리고 얻은 용액의 3배 부피의 100% ethanol을 이용하여 석출시킨 뒤 filtration을 이용하여 석출된 것을 회수 한다. 그 후 70% ethanol을 이용하여 석출된 pellet을 washing한 후 사용할 수 있다.

이러한 방법으로 얻은 hemicellulose와 L-arabinose의 함량을 Table 6에 나타내었다. 볏짚 2g을 이용하여 arabinose를 약 0.075%수율과, sugar beet sludge 건조물을 이용하여 arabinose를 약 0.6%의 수율을 확인 할 수 있었으므로 설탕을 추출하고 남은 sugar beet sludge (중국산, UK Agriculture)를 구입하여 약 8배 높은 arabinose를 얻을 수 있었다. 이로써 사탕무 폐액을 이용하여 L-arabinose를 생산하는 것이 더 효율적으로 arabinose를 얻을 수 있다고 여겨진다.

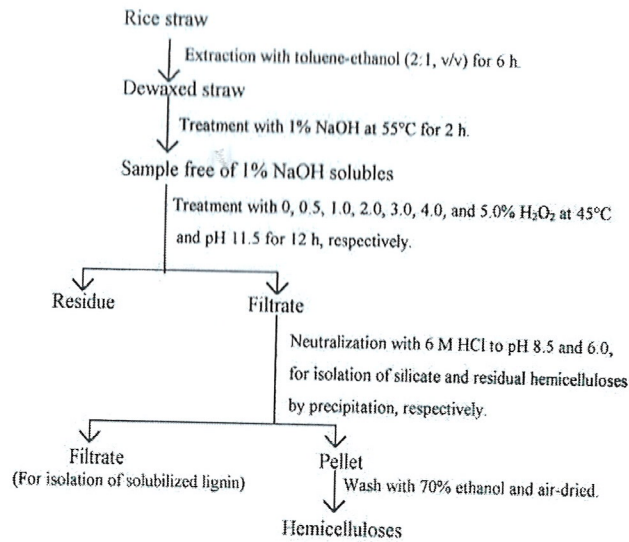


Fig. 27. Scheme for extraction of hemicelluloses.

Table 9. L-Arabinose production from rice straw and sugar beet

	Total amount (mg)	Hemicellulose (mg)	L-arabinose 생산 (mg)
rice straw	2000	8	1.5
sugar beet	2000	20	12

제 2 절 L-Arabinose에서 L-ribulose 생산

L-Ribose는 많은 L-form 핵산당 의약품들의 합성 시작물질이다(Okano 2009). L-Ribose는 주로 L-arabinose, L-xylose, D-glucose, D-galactose, D-ribose 또는 D-mannono-1,4-lactone로부터 화학합성법으로 생산되어 왔다(Cho et al. 2005). 그러나, 화학합성법은 낮은 총수율, 많은 화학반응 단계, 복잡한 정제과정 및 부산물 형성하는 등 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여, ribitol 또는 L-ribulose로부터 생물학적 L-ribose 제조법이 연구되고 있다. 최근에는 NAD-dependent mannitol-1-dehydrogenase (MDH)를 포함하는 재조합 대장균을 사용하여 100 g/L ribitol로부터 발효 72시간에 55% 전환 수율을 얻었지만 L-ribose의 생산성은 L-arabinose로부터 만드는 화학합성법보다 약 28 배 낮았다(Woodyer et al. 2008). *Klebsiella pneumonia* 유래 D-arabinose isomerase, *Pseudomonas stutzeri* 유래 L-rhamnose isomerase, *Streptomyces rubiginosus* 유래 D-xylose isomerase 및 *Lactococcus lactis* 유래 galactose-6-phosphate isomerase는 광범위한 기질 특이성을 지녀 L-ribulose를 L-ribose로 전환시킬 수 있지만 그 전환속도는 매우 느리다. L-Ribulose는 생화학적으로 L-ribose로부터 *Acinetobacter* sp. 유래 L-ribose isomerase, *Escherichia coli* 유래 L-arabinose isomerase mutant, *Actinoplanes missouriensis* 유래 D-xylose isomerase mutant 및 *Cohnella laevoribosii* 유래 d-lyxose isomerase를 사용하여 전환되어 왔다(Cho et al. 2005; De Munynck et al. 2007; Mizanur et al. 2001; Park et al. 2010; Santa et al. 2005). 그러나 생산성이 낮을 뿐만 아니라 L-ribulose로부터 L-ribose의 효소적

생산은 아직 보고 되고 있지 않다. 그러므로 L-ribose 생산성이 높은 경제적인 생물학적인 방법이 개발되어야 한다.

Sugar phosphate isomerase는 고유 기질인 sugar phosphate 뿐만 아니라 구조적 유사성에 의해서 sugar 를 전환할 수 있어 희소 단당류 생산에 사용할 수 있는 좋은 효소이다. 자연에는 D-allose isomerase가 존재하지 않기 때문에 D-allose 대사에 관여하는 ribose-5-phosphate isomerase를 사용하여 D-allose를 생산한 예도 있다. L-Ribose isomerase는 단 한가지 만 보고 되어 있고 이와 유사한 효소는 전혀 보고 되지 않고 있다. 또한, 본 실험실에서 수년간 screening하였지만 L-ribose isomerase는 찾을 수 없었다. 그러므로, *Acinetobacter* sp. 유래 L-ribose isomerase와 *Cohnella laevoribosii* 유래 d-lyxose isomerase가 L-ribose, D-lyxose 및 D-mannose에 활성이 있다는 것에 착안하여 sugar phosphate isomerase를 조사한 결과 L-ribose 및 D-lyxose에 관련된 sugar phosphate isomerase가 없지만 D-mannose에 관련된 mannose-6-phosphate (EC 5.3.1.8) isomerase가 있어 이 효소를 L-ribose 생산에 적용하였다. *Geobacillus thermodinitrificans* 유래 L-arabinose isomerase를 사용하여 저가 당인 L-arabinose (bulk price, \$50/kg)로부터 L-ribulose를 생산하고 mannose-6-phosphate isomerase를 사용하여 L-ribulose로부터 고가당인 L-ribose (bulk price, \$1,000/kg)를 생산하는 것은 산업적으로 가치 있는 일이다. 그 과정을 Fig. 28에 나타내었다.

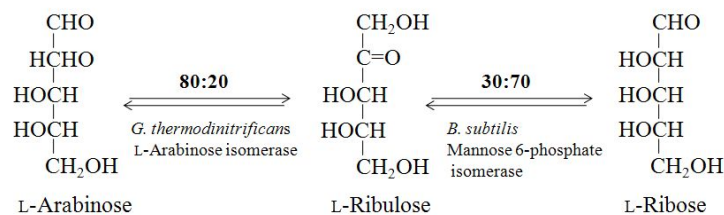


Fig. 28. Schematic representation for the production of L-ribulose from L-arabinose by L-arabinose isomerase from *G. thermodinitrificans* and the production of L-ribose from L-ribulose by mannose-6-phosphate isomerase from *B. subtilis*.

L-Ribulose는 ribitol과 L-arabinose로부터 acetic acid bacteria와 lactic acid bacteria의 resting cells 를 사용하여 생산하여 왔다. 비록 *Escherichia coli*, *Lactobacillus gayonii*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Mycobacterium smegmatis*에서 분리된 L-arabinose isomerase의 특성은 규명되었지만, L-arabinose에서 L-ribulose 생산은 보고되지 않았다. 본 연구에서는 *Geobacillus thermodinitrificans* L-arabinose isomerase (GTAI) double-site mutant enzyme을 사용하여 L-arabinose로부터 L-ribulose 생산을 조사하였다.

1. L-Ribulose 생산에 미치는 pH, 온도 및 온도 안정성 영향

GTAI double-site 돌연변이 효소를 사용하여 pH 및 온도의 영향을 살펴본 결과 L-arabinose에서 L-ribulose 생산은 70°C 및 pH 8에서 최대이었다. *E. coli*, *L. gayonii*, *L. plantarum*, 및 *M. smegmatis*의 L-arabinose isomerases의 L-arabinose에 대한 L-ribulose로의 전환은 각각 pH 6-8와 37°C, pH 6-7와 30-40°C, pH 7와 30-40°C, pH 7-7.5와 45°C에서 최적이었다. GTAI double-site 돌연변이 효소의 열안정성을 여러 시간에서 활성을 측정

하여 결정하였다. 열안정성은 1차 kinetics를 따랐고 반감기($t_{1/2}$)는 60, 65, 70, 75, 및 80°C에서 각각 90 시간, 50 시간, 32 시간, 4.5 시간, 및 0.3 시간을 보여주었다 (Fig. 29). 이러한 결과는 75°C 이상에서는 효소가 불안정하다는 것을 의미하여 특별히 언급이 없으면 다음의 모든 반응은 70°C 및 pH 8에서 수행하였다.

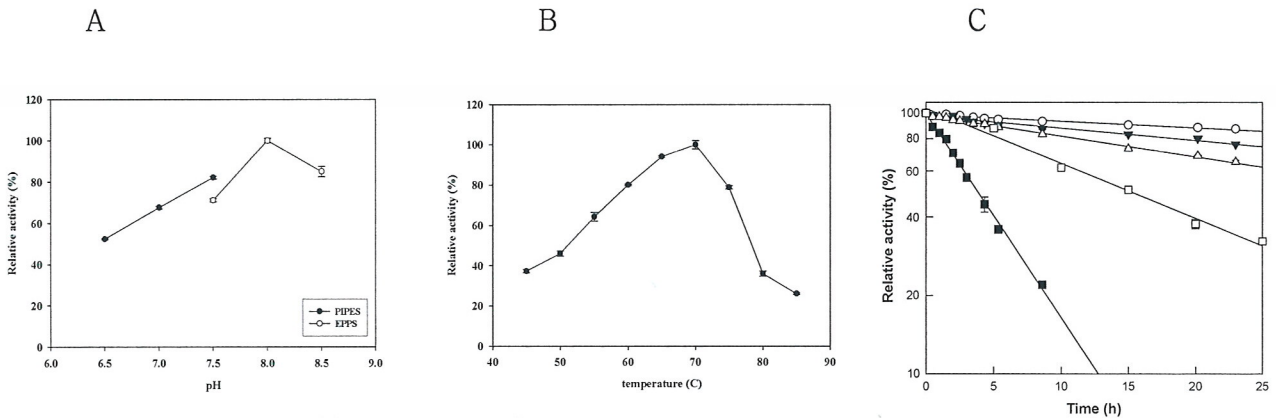


Fig. 29. Effects of (a) pH and (b) temperature on L-ribulose production using GTAI double-site mutant enzyme. (c) Thermal inactivation of GTAI double-site mutant enzyme for L-ribulose production at temperatures of 60 (○), 65 (▼), 70 (△), 75 (□), and 80°C (■).

2. GTAI double-site mutant enzyme의 kinetics

기질로서 L-arabinose와 L-ribulose에 대한 GTAI double-site 돌연변이 효소의 kinetics를 조사하였다 (Fig. 30). L-Ribulose의 K_m (37 mM)은 L-arabinose (185 mM) 보다 약 5배 작았고 L-ribulose에 대한 k_{cat} ($42,127 \text{ min}^{-1}$)은 L-arabinose ($25,173 \text{ min}^{-1}$)보다 약 2배 높았다. 그 결과, L-ribulose에 대한 k_{cat}/K_m ($1,145 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)이 L-arabinose에 대한 k_{cat}/K_m ($136 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) 보다 8배 높았다. 이러한 결과는 L-ribulose로부터 L-arabinose로의 전환이 L-arabinose로부터 L-ribulose로의 전환 보다 빠르다는 것을 나타낸다. GTAI double-site 돌연변이 효소는 L-arabinose에 대한 k_{cat} 및 k_{cat}/K_m 의 값이 mesophiles, thermophiles, 및 hyperthermophiles를 포함하는 모든 세균에서 가장 높다고 보고되었다.

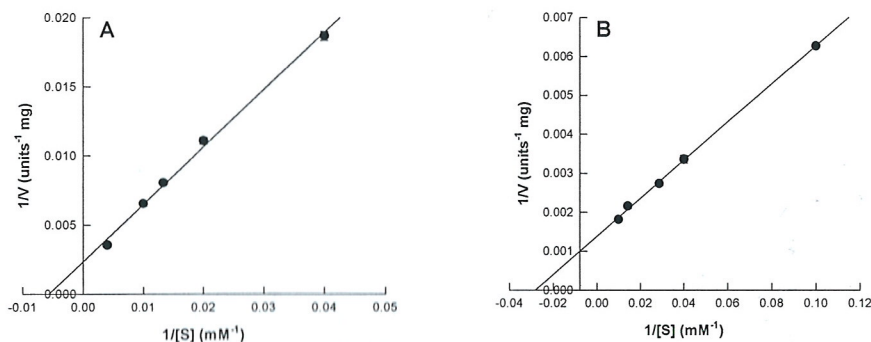


Fig. 30. Lineweaver-Burk plots of GTAI double-site mutant enzyme for (a) L-arabinose and (b) L-ribulose.

3. L-Arabinose 와 L-ribulose의 평형비율

L-Arabinose와 L-ribulose의 평형비율 GTAI double-site 돌연변이 효소를 높은 효소량과

낮은 기질농도를 사용하여 25-75°C에서 조사하였다 (Table 10). 온도가 높을수록 평형은 L-ribulose 생산 쪽으로 나타났다. 이는 L-ribulose 생산을 증가시키려면 열에 안정한 효소를 사용하여 고온에서 반응시켜야 한다는 것을 의미한다. 화학적 방법으로 분석하였을 때 L-arabinose와 L-ribulose의 평형비율은 *L. plantarum* L-arabinose isomerase를 사용하여 25°C에서 약 9:1을 나타낸 보고가 있다 (Heath et al. 1958).

Table 10. Equilibrium ratio of L-arabinose to L-ribulose

Temperature (°C)	L-Arabinose : L-Ribulose
25	88.8 : 11.2
40	84.1 : 15.9
55	80.0 : 19.0
70	78.7 : 21.3
75	78.0 : 22.0

4. L-Arabinose로부터 L-ribulose의 생산

효소활성을 변화시키며 L-ribulose의 생산을 조사한 결과 효소활성 10 units/ml까지는 증가하였으나 L-ribulose의 생산이 그 이상의 농도에서는 일정하였다 (Fig. 31). 그러므로 10 units/ml를 L-ribulose의 생산의 최적 효소농도로 결정하였다. L-Arabinose의 농도를 10 g/L에서 500 g/L로 변화시켰을 때 L-ribulose 생산수율은 21.3%에서 18.3%로 감소하였다. L-Arabinose 농도 10 g/L에서 반응 2시간 후에 95 g/L의 L-ribulose가 19%의 전환 수율로 생산되었다 (Fig. 32). *L. plantarum*의 whole cells은 반응 30시간 후에 20 g/L L-arabinose에서 0.8 g/L L-ribulose를 생산하여 0.4%의 전환 수율과 $0.03 \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 의 생산성을 보여주었다. GTAI double-site 돌연변이 효소의 L-ribulose에 대한 전환 수율과 생산성은 *L. plantarum*의 whole cells보다 각각 약 50-와 1800-배 높은 결과이다. L-Arabinose에서 L-ribulose로의 이성화 반응에서는 L-ribulose 생성이 어렵다고 보고되었고, L-arabinose isomerase를 사용하여 D-tagatose 생산에 대한 연구는 많이 수행되어 왔지만 L-arabinose로부터 L-ribulose 생산은 아직까지 시도되지 않았다. 그러므로, GTAI double-site 돌연변이 효소를 사용하여 2시간 동안 95 g/L L-ribulose를 생산한 것은 의미 있는 일이다.

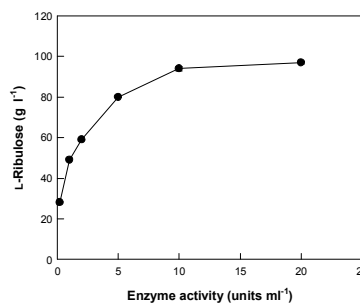


Fig. 31. Effect of enzyme activity on L-ribulose production.

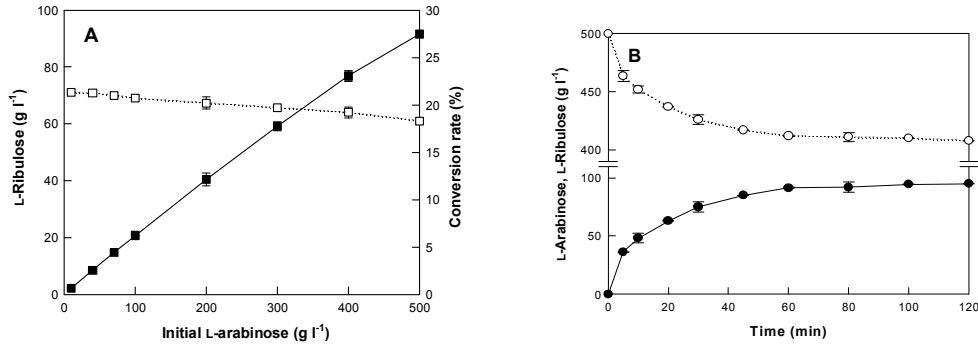


Fig. 32. Effect of substrate concentration on L-ribulose production. (a) Effect of substrate concentration on production (■) and conversion yield (□) of L-ribulose. (b) Time course of L-ribulose production (●) from 500 g/L L-arabinose (○).

5. Borate 첨가에 의한 L-arabinose로부터 L-ribulose의 생산의 증가

Borate는 특정 당당류에 선택적으로 복합체를 형성하여 평형을 전환시키는 역할을 한다. 특히, L-arabinose에는 친화도가 없어 결합하지 않으나 L-ribulose에는 강한 선택성을 지녔다. 그러므로 borate를 첨가하면 반응 평형이 L-ribulose 방향으로 전환되어 고농도 고수율 L-ribulose를 생산할 수 있다. 생산된 L-ribulose-borate complex는 Amberlite IRA-743과 Dowex X50X8 수지 4:1 혼합물을 사용하여 99.9% 이상의 borate를 제거하여 L-ribulose를 생산할 수 있었다.

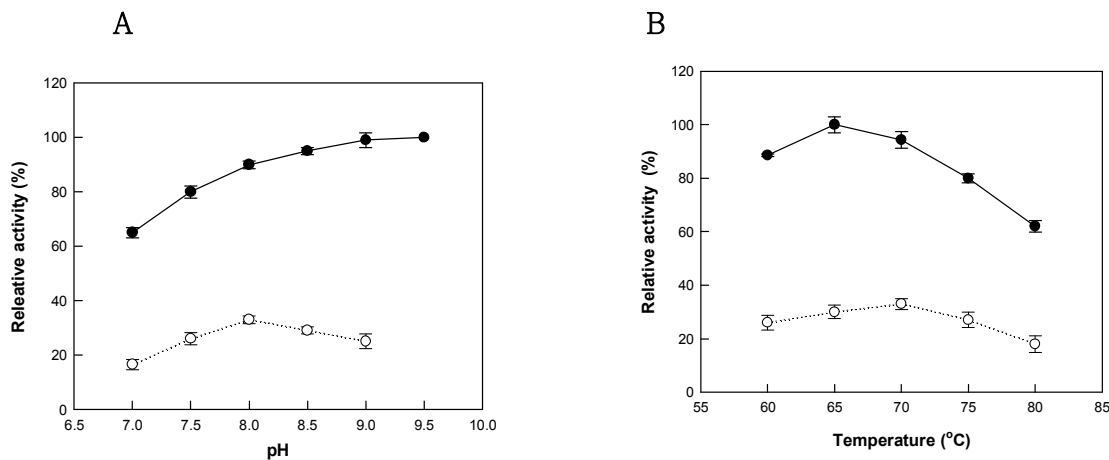


Fig. 33. Effects of (a) pH and (b) temperature on L-ribulose production using GTAI double-site mutant enzyme in the absence (○) and presence (●) of borate. The reactions for pH experiments were allowed to proceed at 70°C in 50 mM Tris-HCl or 50 mM borate buffer at 65°C. The reactions for temperature experiments were allowed to proceed at pH 8.5 in 50 mM Tris-HCl or 50 mM borate buffer at pH 9.0.

Borate를 첨가하여 하여 반응한 결과 L-ribulose 생산이 3배 가까이 생산되었고 borate가 없을 경우 최적 pH가 8.0이었지만 borate가 있을 경우에는 pH가 올라 갈수록 L-ribulose 생산이 증가하였다(Fig. 33a). 그러나 pH 8.0이상에서는 효소의 안정성이 감소되어 pH 8.5, 9.0, 9.5, 10에서의 반감기는 각각 350, 100, 40, 13 시간이었다. 그러므로 비교적 안정하고 L-ribulose 생산이 높은 pH 9.0을 최적 pH로 결정하였다. 최적 온도는 borate가 없을 경우

75°C, borate가 있을 경우에는 65°C이었다(Fig. 33b).

L-Arabinose 500 g/l에서 65°C 및 pH 9.0에서 borate 농도 별로 2시간 반응한 결과 6.0 M borate에서 전환 수율 80%인 400 g/l의 L-ribulose를 얻었다(Fig. 34). 최적 조건에서 500 g/l L-arabinose를 기질로하여 borate가 없을 경우 95 g/l borate가 있을 경우에는 400 g/l L-ribulose를 생산하였다(Fig. 35) 즉 borate를 첨가하여 하여 생산량과 수율을 4.2 배 증가시켰고 생산된 L-ribulose-borate complex는 Amberlite IRA-743과 Dowex X50X8 수지 4:1 혼합물을 사용하여 99.9% 이상의 borate를 제거하여 L-ribulose를 생산 할 수 있었다.

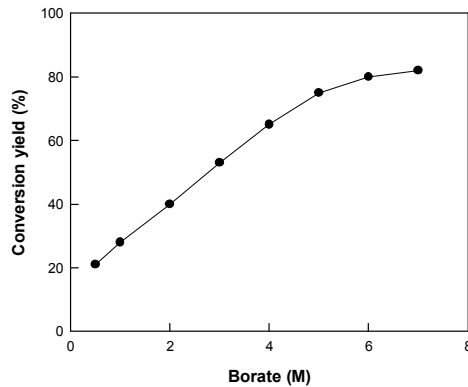


Fig. 34. Effect of borate concentration on L-ribulose production using GTAI double-site mutant enzyme The reactions were allowed to proceed at 65°C and pH 9.0 for 2 h.

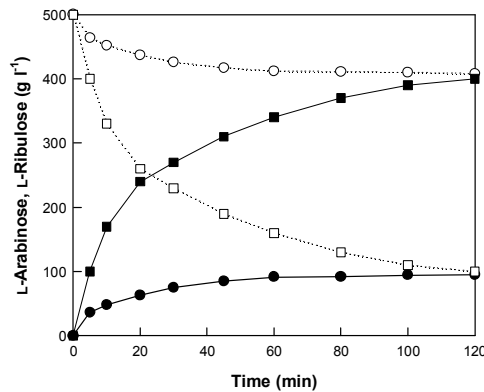


Fig. 35. Time course of L-arabinose isomerase-catalyzed production of L-ribulose from 500 g/L L-arabinose in the presence and absence of borate. L-Arabinose without borate (○) and with borate (□); and L-ribulose without borate (●) and with borate (■).

제 3 절 L-Ribulose에서 L-ribose 생산

1) *Bacillus subtilis* mannose-6-phosphate isomerase 사용

1. *Bacillus subtilis* mannose-6-phosphate isomerase의 유전자 클로닝, 아미노산 서열 비교, 분자량

B. subtilis ATCC 23857의 Ydhs 단백질(GenBank accession number D88802)의 encoding하는 유전자를 (945 bp) 클로닝하여 발현한 결과 아미노산 서열이 *B. subtilis* HB002 (GenBank accession number AF324506)의 mannose-6-phosphate isomerase로 제안된 단백질과 96.8% 유사성을 보였지만 두 효소는 아직 특성 규명이 되지 않았다. Mannose 6-phosphate isomerase 는 세가지 유형으로 구분되는데 유형 1의 효소는 단일 이성화 반응에 관여하는 단일 기능의 효소로 모든 include all eukaryotic 및 prokaryotic mannose-6-phosphate isomerase에 해당된다. 유형 2의 효소는 일부 세균에서 보이고 두가지 기능을 지녔다 (phosphomannose isomerase 및 GDP-D-mannose pyrophosphorylase). dbgud 3은 *Rhizobium meliloti* 유래의 한 단백질로 가역적 이성화 반응을 하지만 다른 유형과 서열이 많이 차이가 있다. *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase는 유형 1에 속한다. *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase의 active-site motif (9-amino acid residues, LSVQVHPDD)와 특성이 규명된 다른 유형 1과 2의 mannose-6-phosphate isomerase의 active-site motif의 서열을 비교하였다 (Fig. 36). Active site 잔기 Leu90 및 Ser 91, 또한 metal binding 잔기 Gln93 및 His95은 모든 mannose-6-phosphate isomerase에 대하여 완전히 일치하였지만 나머지 잔기는 약간의 차이를 보였고 특히 *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase의 active-site motif는 특성이 규명된 다른 mannose-6-phosphate isomerase는 차이가 있었다. 이것은 *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase가 다른 mannose-6-phosphate isomerase과는 기질특이성을 다를 수 있다는 것을 제시하는 결과이다.

이전에 클로닝된 L-ribose 전환효소들인 *Acinetobacter* sp. L-ribose isomerase, *Escherichia coli* L-arabinose isomerase mutant, *Actinoplanes missouriensis* 및 *Streptomyces rubiginosus*의 D-xylose isomerase mutant, *Cohnella laevoribosii* D-lyxose isomerase, *Klebsiella pneumonia* D-arabinose isomerase, *Pseudomonas stutzeri* L-rhamnose isomerase 및 *Lactococcus lactis* galactose-6-phosphate isomerase 과 mannose-6-phosphate isomerase와는 유전적으로 유사한 점이 전혀 없었고 이것은 유전적으로 다르다는 것을 의미한다.

<i>B. subtilis</i> (I)	83	LLDANMDLSVQVHDDDYAK	O05511
<i>A. nidulans</i> (I)	104	VLSIRKALSIQAHPNKLAELAE	P29951
<i>C. albicans</i> (I)	108	VLSIEKVLSTQAHPNKLGALGA	P34948
<i>C. elegans</i> (I)	96	VLSVLGPLSTQVHPTTEQGGK	P34650
<i>E. coli</i> (I)	94	VLCAAQPLSTQVHPNKHNSL	P00946
<i>H. sapiens</i> (I)	107	VLSVETPLSTQAHPNKLAELAE	P34949
<i>S. cerevisiae</i> (I)	106	VLSIEKVLSTQAHPTDRLGK	P29952
<i>S. enterica</i> (I)	94	VLCAAKPLSTQVHPNKRNSL	P25081
<i>S. mutans</i> (I)	92	ILDANDWLSVQVHPNDAYAL	D16594
<i>A. calcoaceticus</i> (II)	392	TVKPGQKLSIQVHHHRSEHW	X81320
<i>P. aeruginosa</i> (II)	389	TVKPGARLSIQVHHHRAEHW	P07874
<i>R. rubrum</i> (II)	398	VVQVGERLSIQVHHHRAEHW	S30187
<i>X. campestris</i> (II)	386	TVKPGATLSIQVHHHRAEHW	P29956
<i>H. pylori</i> (II)	379	EVKPNARLSIQVHHHRSEHW	O24884

Fig. 36. Multiple sequence alignment of the active-site motif found in the characterized type I and type II mannose-6-phosphate isomerases with mannose-6-phosphate isomerase from *B. subtilis*. Numbering represented the position of the motif. Bracketed numerals denote the mannose 6-phosphate isomerase type. Conserved residues are highlighted with a black background partially conserved residues are highlighted with a gray background.

Mannose-6-phosphate isomerase 는 27 fold, 33% 수율로서 정제되었고 이때 specific activity 는 22.5U/mg 이었다. 정제된 mannose-6-phosphate isomerase 의 단량체는 약 36.5 kDa이었고 S-300 겔 크로마토그래피로 native 분자량을 측정한 결과 36.5 kDa의 monomer임을 확인 할수있었다(Fig 37).

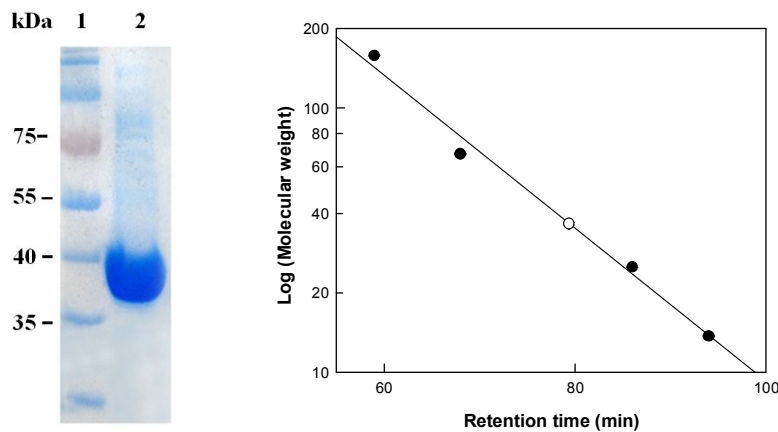


Fig. 37. PAGE analysis of the purified enzyme from *B. subtilis*. (A) SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, purified enzyme. (B) Determination of molecular mass of mannose-6-phosphate isomerase by gel-filtration chromatography.

2. L-Ribulose 생산에 미치는 금속염, pH, 온도 및 온도 안정성 영향

Mannose-6-phosphate isomerase 의 금속 이온에 대한 특이성을 조사하기 위하여, 10 mM EDTA 를 처리하고 금속 이온 (Mn^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+})을

첨가하여 반응시킨 후 다음과 같이 활성을 측정하였다. 그 결과, 정제된 효소와 EDTA 처리한 효소는 활성이 없었다. 실험한 금속염 중 *Bacillus subtilis* 유래의 mannose-6-phosphate isomerase 에 의한 리보오스 이성화에 코발트 (Co^{2+})가 가장 효과적이었고 농도별 테스트 결과 최적농도는 0.5 mM이었다. 또한 각각의 L-ribose, D-lyxose, D-talose를 포함하여 코발트, 망간, 마그네슘, 아연에 대한 affinity를 특정한 결과 각각의 sugar 당 코발트에서 가장 효과적인 결과를 볼수 있었다 (Fig 38).

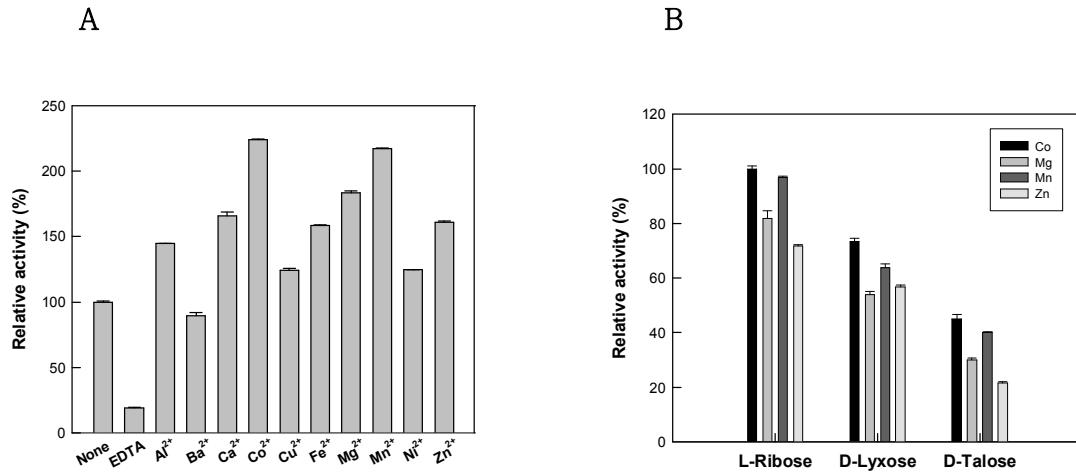


Fig. 38. (a) Effect of metal ions on the activity of *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. . (b) Effect of metal ions on activity of *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase with different substrate.

B. subtilis mannose-6-phosphate isomerase 에 대한 pH 효과를 조사하기 위하여, 기질로서 10 mM 리보오스, 0.5 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM piperazine-*N,N'*-bis (2-ethane sulfonic acid) (PIPES) buffer을 사용하여 pH 6.5에서부터 7.5 범위까지 실시하고, 10 mM 리보오스, 0.5 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(3-propane sulfonic acid)(EPPS) buffer을 사용하여 pH 7.5에서부터 8.5 범위까지 효소 반응을 실시하였다. 구체적으로, 효소반응은 40°C에서 20 분 동안 수행하고 다시 최종 농도 200 mM 염화 수소를 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 그 결과 Fig 39A에 나타난 바와 같이, 최적 pH는 7.5인 것을 확인할 수 있었다. 또한 mannose-6-phosphate isomerase 에 대한 온도 효과를 조사하기 위하여, 효소 반응은 온도 20°C에서 50°C 범위까지 10 mM 리보오스, 0.5 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM pH 7.5 EPPS buffer을 사용하여 각각 20분 동안 반응을 실시하였다. 그 다음 최종 농도 200 mM 염화 수소를 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 그 결과, 최적 온도는 40°C 인 것을 확인하였다 . 또한 열안정성에 대하여 연구한 결과 각각 25, 30, 35,40, 45, 50°C에서 열안정성이 반으로 줄어드는 시간이 461, 325, 236, 111, 56, 10시간임을 확인할 수 있었다 (Fig 39).

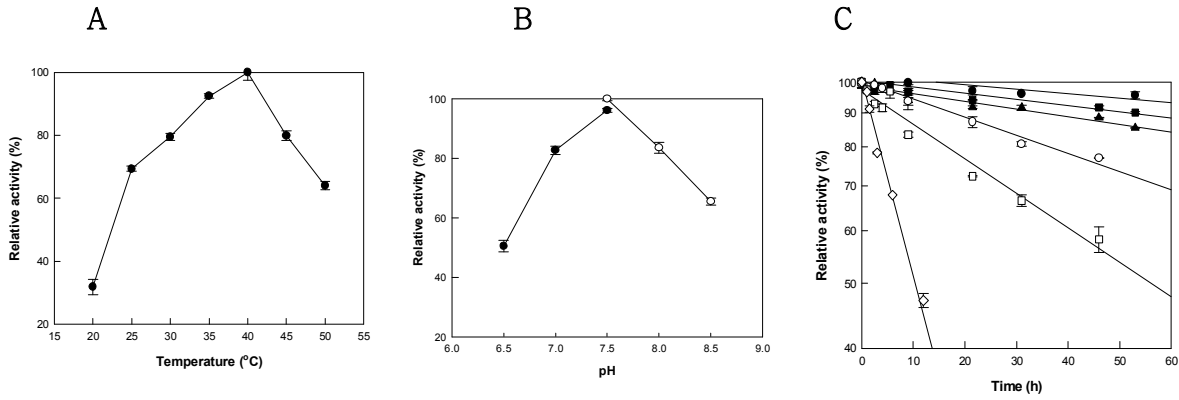


Fig. 39. (a) Effect of pH on the activity of *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. PIPES(●), EPPS(○). (b) Effect of temperature on activity of *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. (c) Thermal inactivation of *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. 25(●), 30(■), 35(▲), 40(○), 45(□), 50°C(◇).

3. *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase의 기질특이성

B. subtilis mannose-6-phosphate isomerase의 비 활성을 모든 오탄당과 육탄당의 D- and L-form에 대하여 조사하였다. 비 활성은 aldose 기질 중에 L-ribose에서 가장 높았고 그 다음으로 D-lyxose, D-talose, D-mannose, L-allose, D-ribose, L-talose, D-allose, L-lyxose 및 L-mannose의 순서 이었고 L-ribulose 비활성은 ketose 기질 뿐만 아니라 모든 오탄당 및 육탄당 중에서 가장 높았고 ketose 기질로는 그 다음으로 D-xylulose, D-ribulose, L-xylulose, D-tagatose, D-fructose, L-psicose, L-fructose, D-psicose 및 L-tagatose의 순서이었다 (Table 11). 이러한 결과는 mannose-6-phosphate isomerase가 좋은 L-ribose 생산 효소라는 것을 제시한 것이다. C2 및 C3의 OH가 같은 방향으로 이루어진 aldose 기질들이 이 효소에 의해서 ketose로 전환되었다. Mannose-6-phosphate isomerase는 왼쪽으로(Fischer projections) C2 및 C3의 OH가 같은 방향으로 이루어진 L-ribose, D-lyxose, D-talose, D-mannose 및 L-allose과 같은 aldose 기질을 D-ribose, L-talose, D-allose, L-lyxose 및 L-mannose와 같은 오른쪽으로 같은 방향으로 이루어진 aldose 기질보다 더 좋아 하였다. 이러한 결과는 *B. subtilis* mannose-6-phosphate 가 고유한 기질특이성을 지닌것을 의미한다. 이 효소에 의해서 관여되는 aldose-ketose 이성화 반응을 Fig. 40에 나타냈다. 여러 aldose의 Michaelis-Menten constants (K_m), turnover numbers (k_{cat}) 및 catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m) 를 Table 12에 나타냈다. *B. subtilis* mannose-6-phosphate의 aldose에 대한 k_{cat} 또는 k_{cat}/K_m 값의 순서는 비 활성 순서와 같았다. k_{cat}/K_m 값은 L-Ribose에서 가장 컸지만 D-talose, L-mannose, D-allose 및 L-lyxose의 kinetic parameter 값은 약 $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 이하의 낮은 활성으로 인하여 측정할 수 없었다. Mannose-6-phosphate ($770 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)의 k_{cat}/K_m 값은 L-ribose ($17.6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 보다 44-배 큰 것은 이 효소가 mannose-6-phosphate isomerase임을 의미한다. *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase의 L-ribose에 대한 k_{cat}/K_m 값은 *C. laevoribosii* D-lyxose isomerase와 *A. missouriensis* D-xylulose isomerase mutant의 k_{cat}/K_m 값 보다 현저히 높았다(각각 88- 및 3.4×10^5 -배). 그러므로 *B. subtilis* mannose-6-phosphate

isomerase의 L-ribose에 대한 k_{cat}/K_m 값은 보고된 L-ribose 전환 효소들중에 가장높은 것이다.

Table 11. Specific activity and equilibrium ratio of *B.subtilis* mannose-6-phosphate isomerase for monosaccharides

Substrate		Product	Specific activity (nmole min ⁻¹ mg ⁻¹)	Equilibrium ratio (Aldose:Ketose, %)
Aldose	L-Ribose	L-Ribulose	22.5 ± 0.1	71:29
	D-Lyxose	D-Xylulose	16.5 ± 1.5	60:40
	D-Talose	D-Tagatose	10.1 ± 0.4	9:91
	D-Mannose	D-Fructose	5.5 ± 0.51	76:24
	L-Allose	L-Psicose	4.7 ± 0.20	76:24
	D-Ribose	D-Ribulose	1.1 ± 0.04	85:15
	L-Talose	L-Tagatose	0.47 ± 0.09	10:90
	D-Allose	D-Psicose	0.21 ± 0.00	82:18
	L-Lyxose	L-Xylulose	0.16 ± 0.00	75:25
	L-Mannose	L-Fructose	0.09 ± 0.00	83:17
Ketose	L-Ribulose	L-Ribose	91.8 ± 3.2	29:71
	D-Xylulose	D-Lyxose	65.9 ± 0.9	40:60
	D-Ribulose	D-Ribose	8.4 ± 0.28	15:85
	L-Xylulose	L-Lyxose	4.3 ± 0.20	25:75
	D-Tagatose	D-Talose	2.4 ± 0.02	91:9
	D-Fructose	D-Mannose	2.1 ± 0.02	24:76
	L-Psicose	L-Allose	2.0 ± 0.06	24:76
	L-Fructose	L-Mannose	0.53 ± 0.00	17:83
	D-Psicose	D-Allose	0.09 ± 0.00	18:82
	L-Tagatose	L-Talose	0.08 ± 0.00	90:10

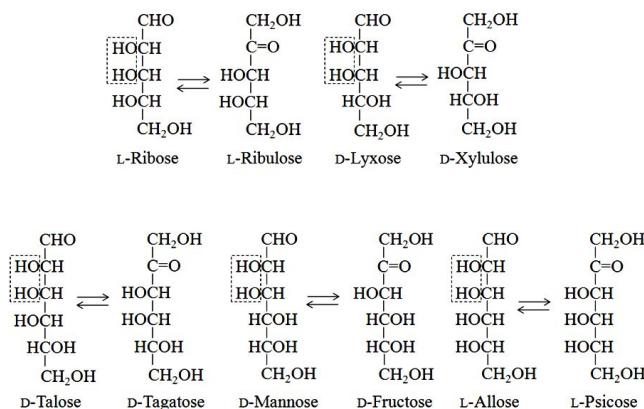


Fig. 40. Schematic representation of aldose-ketose isomerization reactions catalyzed by *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. The boxed structure indicates the hydroxyl configurations at C2 and C3 of the sugars.

Table 12. Kinetic parameters of *B.subtilis* mannose-6-phosphate isomerase for aldoses

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)
L-Ribose	998 ± 44	17595 ± 670	17.6 ± 1.0
D-Lyxose	433 ± 3	7089 ± 78	16.4 ± 0.1
D-Talose	469 ± 31	3969 ± 150	6.8 ± 0.5
D-Mannose	946 ± 7	3748 ± 240	3.5 ± 0.2
L-Allose	312 ± 14	920 ± 41	2.9 ± 0.2
D-Ribose	110 ± 1	72 ± 1	0.6 ± 0.01

B. subtilis mannose-6-phosphate isomerase의 aldose 및 ketose 평형 비율을 조사하기 위해서 효소반응을 평형비율은 고농도의 효소 (120 U/ml), 오랜 반응시간 (72-144 시간) 안 정된 온도(35°C)로 수행하였다. 평형비율은 talose와 tagatose의 평형을 제외하고 모두 aldose 방향으로 치우쳤다. L-Ribose와 L-ribulose 의 사이의 평형은 71:29으로, *Acinetobacter* sp. 유래 L-ribose isomerase으로 얻은 평형 (70:30)과 거의 유사하였다.

4. L-Ribulose로부터 L-ribose의 생산

B. subtilis mannose-6-phosphate isomerase 가 모든 오탄당과 육탄당에서 L-ribulose에 대한 활성이 가장 높았기 때문에 이 효소를 L-ribulose에서 L-ribose를 생산하는데 적용을 해보았다. 효소 농도가 25 U/ml 보타 낮아질때는 효소 농도에 따달서 L-ribose 생산 (전환 수율)이 증가되는 것을 확인 할수 있었으나, 25 U/ml 이상의 효소농도가 되었을때는 꺾어짐을 확인할 수 있었다. 그러므로 25U/ml의 효소농도에 15-300 g/L의 다양한 농도의 L-ribulose 와 반응 시킨 결과 300 g/L에서 가장 많은 양의 L-ribose가 전환됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 41).

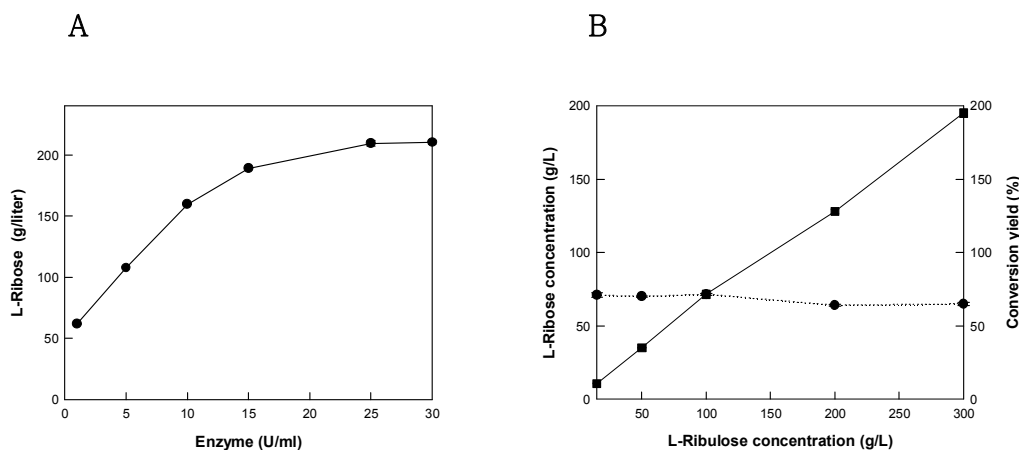


Fig. 41. (a) Effect of enzyme activity on the production and conversion yield of L-ribose by *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase. (b) Effect of substrate concentration on production (●) and conversion yield (■) of L-ribose by *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase.

위와 같은 조건으로 *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase를 이용하여 L-ribose 생산을 위한 time-course 반응을 수행하였다 (Fig 42). 그결과 300 g/L L-ribulose부터 반응 3시간 후에 213 g/L 엘-L-ribose를 얻어 생산성 시간당 71 g/L을 보여 주었다.

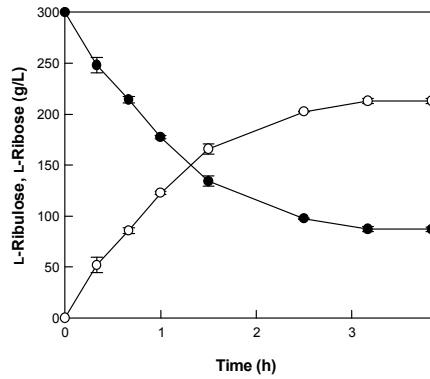


Fig. 42 Time course of L-ribose production (○) from 300 g/L L-ribulose (●) by *B. subtilis* mannose-6-phosphate isomerase.

2) *Geobacillus thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase 사용

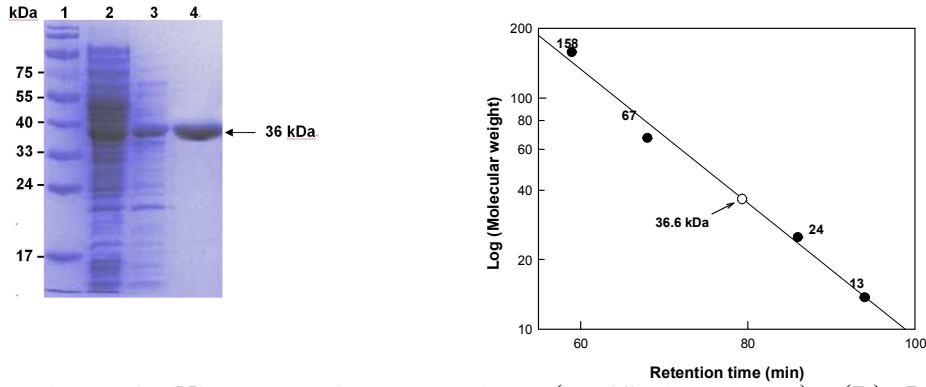
1. *Geobacillus thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase의 유전자 클로닝, 아미노산 서열 비교, 분자량

*G. thermodenitrificans*의 mannose-6-phosphate isomerase (GenBank accession number CP000557)의 encoding하는 유전자를 (963 bp) 클로닝하여 *E. coli*에서 발현하였다. 발현된 효소를 열처리와 Hi-Trap 이온교환 chromatography로 정제하여 mannose-6-phosphate isomerase 는 8.7 fold, 78% 수율로서 정제되었고 이때 specific activity 는 890 U/mg 이었다(Table 13). 정제된 mannose-6-phosphate isomerase는 SDS-PAGE에서 분자량이 36 kDa이었고, 이것은 아미노산 321개로부터 계산한 36,452 Da과 일치하였다. S-300 겔 크로마토그래피로 native 분자량을 측정한 결과 36 kDa의 monomer임을 확인 할 수 있었다(Fig 43).

Table 13. Purification of GTMpi

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	300	30600	102	100	1.0
Heat treatment	111	25300	228	83	2.2
Hi-Trap	27	24000	890	78	8.7

Fig. 43. PAGE analysis of mannose-6-phosphate isomerase from *G. thermodenitrificans*. (A) SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular mass markers; lane 2, crude extract, lane 3, supernatant after heat treatment at 70°C



for 5 min, lane 4, Hi-trap column product (purified enzyme). (B) Determination of molecular mass of mannose-6-phosphate isomerase by gel-filtration chromatography.

2. L-Ribulose 생산에 미치는 금속염, pH, 온도 및 온도 안정성 영향

Mannose-6-phosphate isomerase의 금속 이온에 대한 특이성을 조사하기 위하여, 10 mM EDTA를 처리하고 금속 이온 (Mn^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+})을 첨가하여 반응시킨 후 다음과 같이 활성을 측정하였다. 그 결과, EDTA 처리한 효소는 약 20% 활성을 보였다. 실험한 금속염 중 *G. thermodenitrificans* 유래의 mannose-6-phosphate isomerase에 의한 리보오스 이성화에 코발트 (Co^{2+})가 가장 효과적이었고 농도별 테스트 결과 최적농도는 1.0 mM이었다.

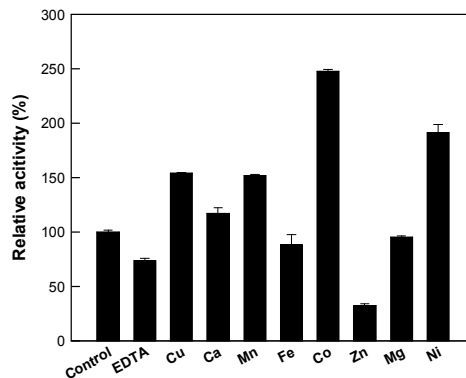


Fig. 44. Effect of metal ions on the activity of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase.

G. thermodenitrificans mannose-6-phosphate isomerase에 대한 pH 효과를 조사하기 위하여, 기질로서 10 mM 리보오스, 1.0 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM piperazine-*N,N'*-bis (2-ethane sulfonic acid) (PIPES) buffer을 사용하여 pH 6.5에서부터 7.5 범위까지 실시하고, 10 mM 리보오스, 0.5 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(3-propane sulfonic acid)(EPPS) buffer을 사용하여 pH 7.5에서부터 8.5 범위까지 효소 반응을 실시하였다. 구체적으로, 효소반응은 70°C에서 20분 동안 수행하고 다시 최종 농도 200 mM 염화 수소를 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 그 결

과 Fig 39A에 나타난 바와 같이, 최적 pH는 7.5인 것을 확인할 수 있었다. 또한 mannose-6-phosphate isomerase 에 대한 온도 효과를 조사하기 위하여, 효소 반응은 온도 60°C에서 80°C 범위까지 10 mM 리보오스, 1.0 mM 코발트와 1.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM pH 7.0 PIPES buffer을 사용하여 각각 20분 동안 반응을 실시하였다. 그 다음 최종 농도 200 mM 염화 수소를 첨가하여 상기 반응을 정지시켰다. 그 결과, 최적 온도는 70°C 인 것을 확인하였다 . 또한 열안정성에 대하여 연구한 결과 각각 60, 65, 70, 75, 80°C에서 열안정성이 반으로 줄어드는 시간이 338, 73, 27, 17, 6시간임을 확인할 수 있었다(Fig. 45).

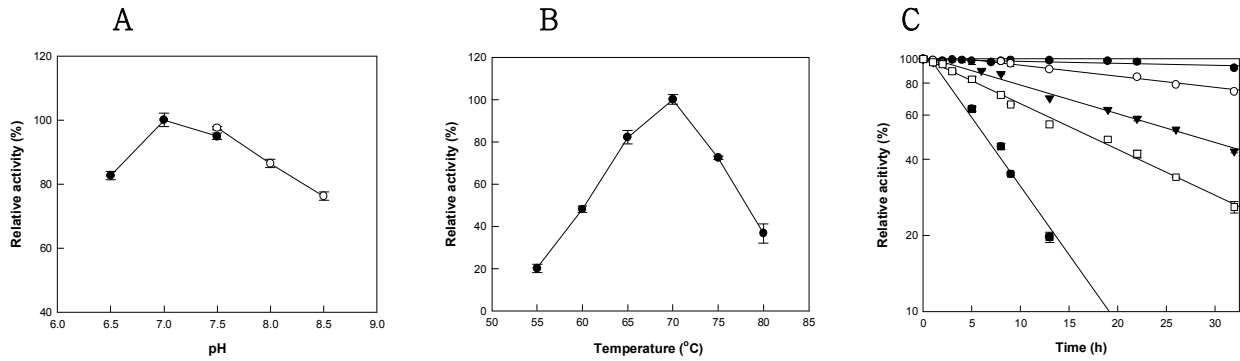


Fig. 45. (a) Effect of pH on the activity of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase. PIPES(●), EPPS(○). (b) Effect of temperature on activity of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase. (c) Thermal inactivation of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase. 60(●), 65(○), 70(▼), 75(□), 80°C(■).

3. *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase의 기질특이성

G. thermodenitrificans mannose-6-phosphate isomerase의 비 활성을 모든 오탄당과 육탄당의 D- and L-form에 대하여 조사하였다. 비 활성은 aldose 기질 중에 D-lyxose에서 가장 높았고 그 다음으로 L-ribose, D-talose, D-ribose, D-allose, L-lyxose, D-mannose, L-allose, L-talose 및 L-mannose의 순서 이었다(Table 14). 이러한 결과는 mannose-6-phosphate isomerase가 좋은 L-ribose 생산 효소라는 것을 제시한 것이다. C2 및 C3의 OH가 같은 방향으로 이루어진 aldose 기질들이 이 효소에 의해서 ketose로 전환되었다. D-lyxose의 Michaelis-Menten constant (K_m), turnover number (k_{cat}) 및 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m)는 390 mM, 74,300 s⁻¹, 191 mM⁻¹ s⁻¹이었고 L-ribose는 470 mM, 28,800 s⁻¹, 61 mM⁻¹ s⁻¹이었다. D-Lyxose의 k_{cat}/K_m 값은 *C. laevoribosii* D-lyxose isomerase보다 2.3배 컸고 L-Ribose의 k_{cat}/K_m 값은 *C. laevoribosii* D-lyxose isomerase보다 310배 컸다. 그러므로 *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase는 좋은 L-ribose producer이다.

Table 14. Specific activity and conversion ratio of GTMpi for aldoses

Substrate	Product	Specific activity (U mg ⁻¹)
D-lyxose	D-xylulose	298 ± 1.2
L-ribose	L-ribulose	82 ± 0.5
D-talose	D-Tagatose	77 ± 0.1
D-ribose	D-Ribulose	71 ± 0.3
D-allose	D-psicose	63 ± 0.5
L-lyxose	L-xylulose	60 ± 0.4
D-mannose	D-fructose	47 ± 0.1
L-allose	L-psicose	28 ± 0.1
L-talose	L-Tagatose	26 ± 0.1
L-mannose	L-fructose	5 ± 0.0

4. L-Ribulose로부터 L-ribose의 생산

G. thermodenitrificans mannose-6-phosphate isomerase 를 L-ribose에서 L-ribulose로의 전환에 적용 해보았다. 10 mM L-ribose를 사용하여 3시간 후에 L-ribose 수율 29%를 얻었다(Fig. 46).

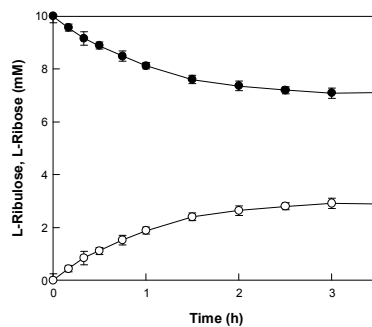
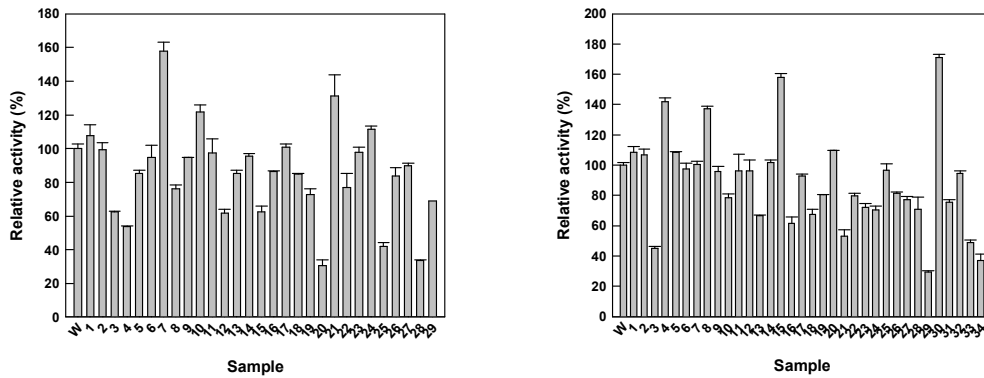


Fig. 46. Time course for the conversion of L-ribulose (○) from L-ribose (●) by *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase.

3) *Geobacillus thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase variant 사용

1. Error prone PCR을 위한 cloning

Geobacillus thermodenitrificans mannose-6-phosphate isomerase(이하 GTMPi)을 이용하여 L-ribose생산을 높이기 위해 현재 발현 vector인 pTrc99a는 정제 과정이 복잡하기에 His-taq되어 있는 vector인 pET28a(Fig. 47)로 옮겨서 사용하기로 하였다. 유전자를 옮기기 위하여 *NdeI* 제한 효소위치에 cloning이 되어져야 하므로 개시코돈부분을 *NdeI* site로 바꾸어 Forward primer를 제작하였다. 또한 Reverse primer에는 *EcoRI* site를 삽입하여 cloning에 용이하게 제작하였다. 이렇게 제작된 각각의 primer(GTMPi_F: TTT CAT ATG GAC CTT GAA CCG ATT TTT CTC A, GTMPi_R: TTT GAA TTC TTA TTT GCC TTT CCG TGG CCA)를 사용하여 PCR하고, 반응이 끝난 PCR산물을 1% agarose gel electrophoresis



4. Site directed mutagenesis

Error prone을 이용하여 변이가된 잔기들을 QuickChange site directed mutagenesis kit(Stratagene)를 이용하여 각 하나의 변이체들의 활성을 wild와 비교해서 그 잔기활성이 증가한 잔기를 선별하였다. 그중에서 L-ribose생산을 위한 최적의 변이 잔기로 W17와 N90, L129 잔기를 찾았다. 또한 이들을 각 다른 특징의 아미노산으로 치환을 시켜 각각 W17Q, N90A 그리고 L129F에서 그 활성이 높음을 확인하였다. 그리고 이들을 각각 비교하였을 때, 하나의 변이체에서는 L129F가 가장 높은 활성을, 2개의 변이체에서는 N90A와 L129F 변이 잔기에서 그 시너지 효과를 확인할 수 있었고, 이들은 각각 W17Q, N90A, L129F 변이 잔기에서 최고의 시너지 효과를 확인 하였다. (Fig. 49)

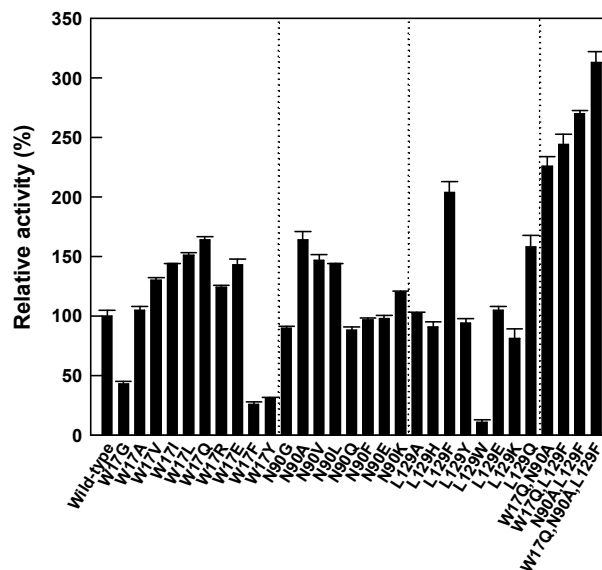


Fig. 49. L-Ribulose isomerization activities of the wild-type and variant mannose-6-phosphate isomerases from *G. thermodenitrificans*.

5. *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase의 변이체의 L-ribose의 최적 조건 최적화

W17Q와 N90A잔기를 double point mutation을 진행하여 두 잔기가 double-site mutant를 얻었다. Mutant로 L-ribose를 최대 생성하기 위한 최적 효소 반응 조건 최적화를 수행하였다. 효소의 조건을 비교하기 위해 wild와 W17Q, N90A도 함께 실험을 진행하였다. 본 실험은 각 최적 pH를 알아보기 위해 50mM PIPES 완충액을 이용하여 70°C의 온도에서 10분간 10 mM L-ribulose와 반응하였다. 최적온도를 실험할 때는 wild-type과 변함없이 pH7과 70도가 최적임을 확인하였다(Fig. 50).

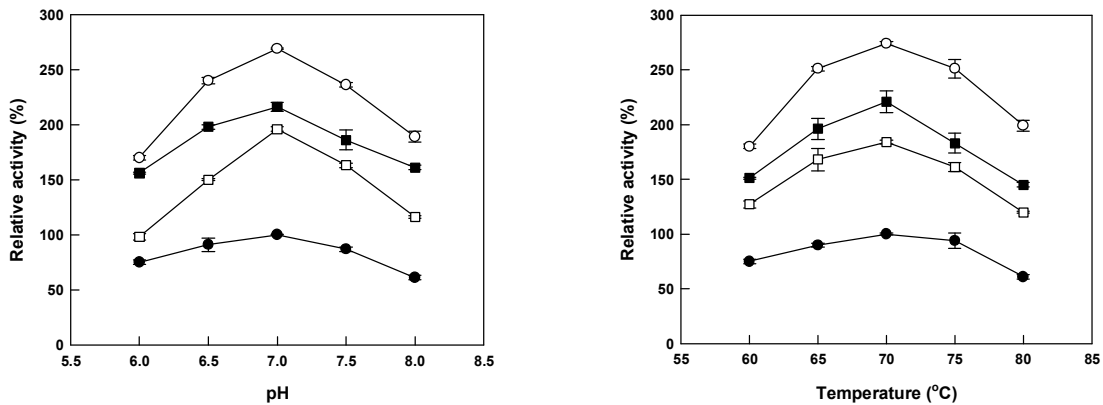


Fig. 50. (a) Effect of pH on the activity of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase and its mutants. (b) Effect of temperature on activity of *G. thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase and its mutants.

L-Ribose 생산을 위하여 온도안정성에 관련된 실험을 진행하였다. 금속이온을 실험했던것과 같이 wild-type을 기준으로 각 1개(L129F), 2개(N90A와 L129F) 그리고 3개(W17Q, N90A와 L129F)의 변이체들의 비교를 기준으로 실험에 들어갔으며 각 60도부터 80도에서 12시간 동안 효소를 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다. 이때 가장 높은 온도인 80도에서 각각 10%, 13%, 26%, 그리고 32%씩 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 온도안정성은 wild-type > single-site mutant > double-site mutant 순서로 좋았다(Fig. 51)

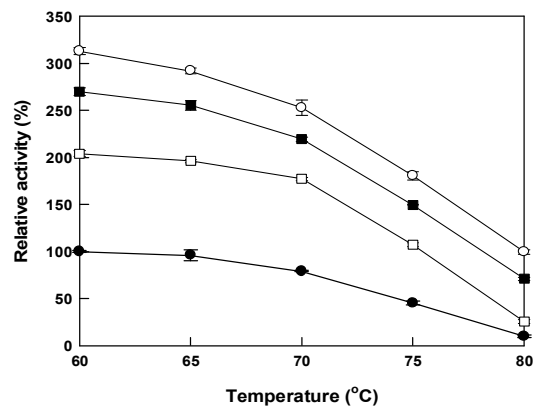


Fig. 51. Thermostability of the wild-type (●), L129F (□), N90A-L129F (■), and W17Q-N90A-L129F (○) variant mannose-6-phosphate isomerases from *G.*

thermodenitrificans for L-ribulose isomerization.

실험들은 wild-type을 기준으로 각 1개(L129F), 2개(N90A와 L129F) 그리고 3개(W17Q, N90A와 L129F)의 변이체들의 비교실험을 통하여 L-ribose 생산의 최적 생산조건을 잡는 실험을 실행하였다. 가장 먼저 이 효소의 경우 금속 이온에 의존성을 갖고있기 때문에 기존에 진행하였던 실험을 바탕으로 활성이 높았던 세가지 금속이온인 Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} 의 각 최종 농도 1mM에서 그 활성을 진행하였다. 이온에 의존적인 효소임을 감안하여 wild-type를 기준으로 높았던 금속이온 5개를 이용하여 활성비교를 시행하였을 때 역시 wild-type과 같은 코발트에서 가장 높은 활성을 확인할 수 있었고 다른 금속이온은 N90A mutant에서 효과가 좋았으나 코발트의 경우에는 double-site mutant > single-site mutant > wild-type 순서로 효과가 좋았다(Fig. 52a). 또한 L-lyxose에 대한 활성 경우에는 wild-type > single-site mutant > double-site mutant 순서로 효과가 좋았으나, L-ribose에 대한 활성 경우에는 double-site mutant > single-site mutant > wild-type 순서로 효과가 좋았다(Fig. 52b). L-ribose에 대한 활성이 증가 할수록 단당류 중 가장 활성이 높았던 L-lyxose에 대한 활성이 낮아지는 것은 기질특이성의 변화를 보여주는 결과이다.

각 wild-type을 기준으로 각 1개(L129F), 2개(N90A와 L129F) 그리고 3개(W17Q, N90A와 L129F)의 변이체들의 L-ribose 생산실험을 pH 7.0, 70°C에서 L-ribulose 300 g/L를 이용하여 1 mM Co^{2+} 와 각 2 mg/ml의 enzyme를 이용하여 실험을 진행하였다. 이때 모두 약 70 %의 L-ribose생산을 보이며 각각 wild-type은 270분에 213 g/L를 생산, 1개(L129F) 변이체는 180분, 2개(N90A와 L129F)변이체는 90분 그리고 3개(W17Q, N90A와 L129F) 변이체는 60분에 모두 생산하는 패턴을 보여 생산성이 각각 47, 71, 142과 213 g/L/h로 3개 변이체는 wild-type에 약 4.5배 높아짐을 확인할 수 있었다. (Fig. 53)

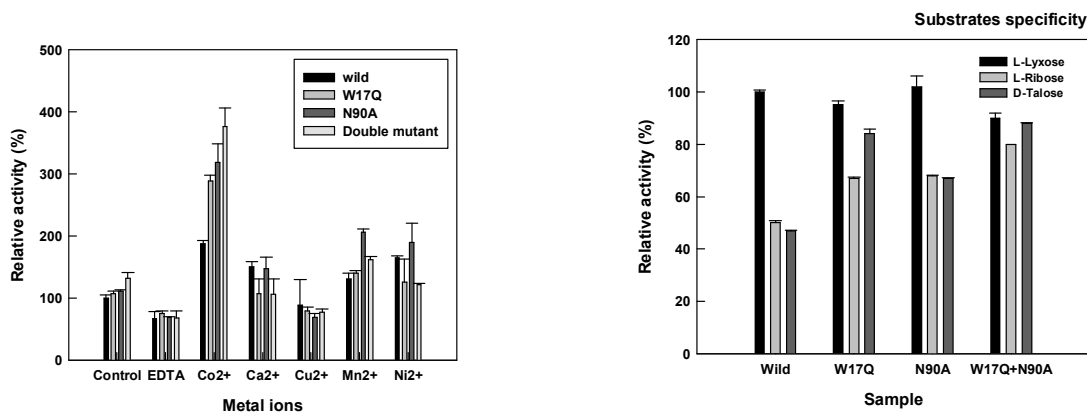


Fig. 52. Effects of (a) metal ions and (b) monosaccharide on the activity of GTMPi.

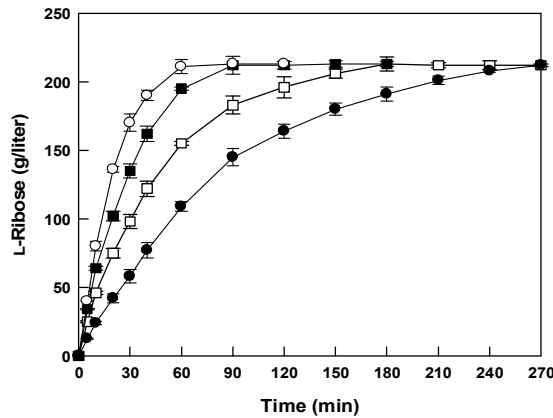


Fig. 53. Time course reactions for L-ribose production from L-ribulose by the wild-type (●), L129F (□), N90A-L129F (■), and W17Q-N90A-L129F (○) variant mannose-6-phosphate isomerases from *G. thermodenitrificans*.

4) *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase 및 그 variant 사용

1. Metal 에 대한 효과

29 kDa monomer인 *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase는 금속 이온에 대한 특이성을 조사하기 위하여, 10 mM EDTA 를 처리하고 금속 이온 (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+})을 첨가하여 반응시킨 후 다음과 같이 활성을 측정하였다. 그 결과, 실험한 금속염 중 *Thermus thermophilus* 유래의 mannose-6-phosphate isomerase 에 의한 리보오스 이성화에 구리 (Cu^{2+})가 가장 효과적이었고(Fig. 54a) 농도별 테스트 결과 최적농도는 0.5 mM이었다(Fig. 54b).

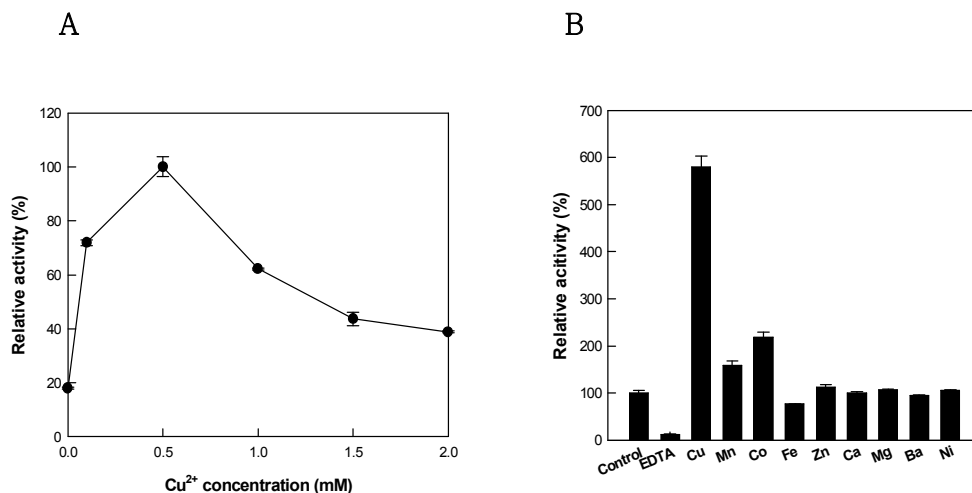


Fig. 54. (a) Effect of metal ions on the activity of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase. (b) Effect of Cu^{2+} concentration on the activity of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase.

2. 온도와 pH에 대한 효과

Thermus thermophilus mannose-6-phosphate isomerase 에 대한 pH 효과를 조사하기 위하여, 기질로서 10 mM 리보오스, 0.5 mM 구리와 42.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM piperazine-*N,N'*-bis (2-ethane sulfonic acid) (PIPES) buffer을 사용하여 pH 6.5에서부터 7.5 범위까지 실시하고, 10 mM 리보오스, 0.5 mM 구리와 42.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(3-propane sulfonic acid)(EPPS) buffer을 사용하여 pH 7.5에서부터 8.5 범위까지 효소 반응을 실시하였다. 그 결과 최적 pH는 7.0인 것을 확인할 수 있었다. 또한 mannose-6-phosphate isomerase 에 대한 온도 효과를 조사하기 위하여, 효소 반응은 온도 60°C에서 90°C 범위까지 10 mM 리보오스, 0.5 mM 구리와 42.5 U/ml 효소가 포함된 50 mM pH 7.0 PIPES buffer을 사용하여 각각 5분 동안 반응을 실시하였다. 그 결과, 최적 온도는 75 °C 인 것을 확인하였다. 또한 열안정성에 대하여 연구한 결과 열안정성이 반으로 줄어드는 시간이 각각 65, 70, 75, 85, 90°C 에서 22, 10, 5.5, 2.1, 0.3 시간임을 확인할 수 있었다(Fig. 55).

3. Substrate specificity of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase

Thermus thermophilus mannose-6-phosphate isomerase 의 specific activity 는 모든 오탄당과 육탄당에 대하여 측정을 하였다. 모든 알도즈 기질에 대하여 specific activity 는 D-talose에서 가장 높았고, 이어서 D-mannose, L-allose, L-ribose, D-lyxose, D-allose, L-talose, D-ribose, L-lyxose, L-mannose 순으로 측정값이 나왔다 (Table 15). 또한 케토즈 기질에 대하여는 L-ribulose에서 가장 높은 specific activity 값이 나왔다. 그 결과 *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase는 L-ribose 생산에 매우 잠재력이 있는 효소이며 지금까지 보고된 효소 중 가장 높은 활성을 가지고 있다.

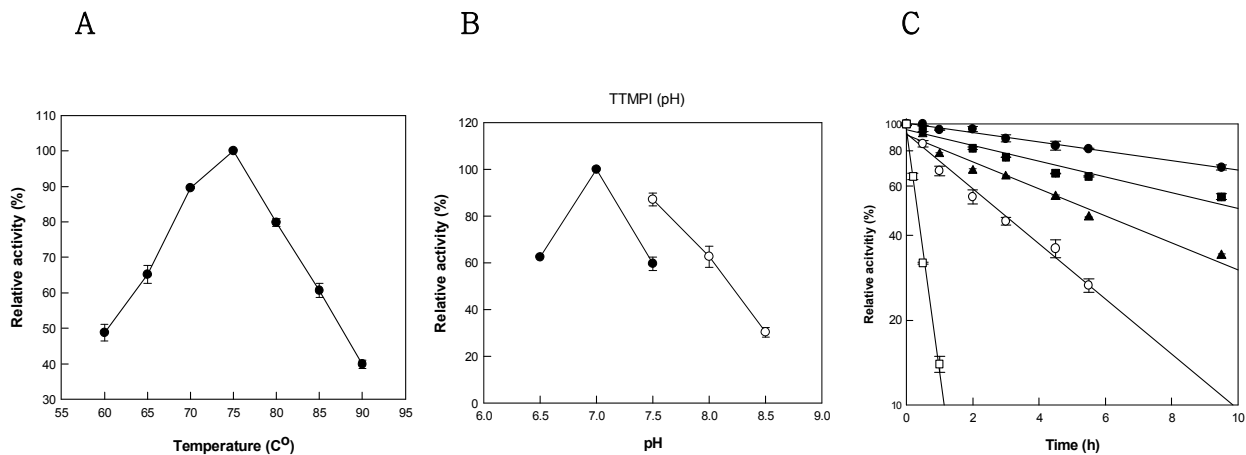


Fig. 55. (a) Effect of pH on the activity of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase. PIPES(●), EPPS(○). (b) Effect of temperature on activity of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase. (c) Thermal inactivation of *Thermus thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase. 65(●), 70(■), 75(▲), 80(○), 85(□).

Table 15. Specific activity and equilibrium ratio of *Thermus thermophilus*

mannose-6-phosphate isomerase for monosaccharides.

	Substrate	Specific activity (U/mg)
Aldose	D-Talose	1618.8±2.1
	L-Talose	63.4±1.6
	D-Allose	165.1±2.1
	L-Allose	741.7±4.5
	D-Mannose	841.7±0.5
	L-Mannose	19.1±0.1
	D-Ribose	57.7±0.1
	L-Ribose	425.4±3.1
	D-Lyxose	333.3±1.4
	L-Lyxose	22.6±0.2
Ketose	D-Ribulose	126.3±1.9
	L-Ribulose	1493.4±5.7
	D-Xylulose	128.0±3.4
	L-Xylulose	22.0±0.2
	D-Tagatose	84.8±0.6
	L-Tagatose	16.3±0.1
	D-Fructose	167.1±0.1
	L-Fructose	56.5±0.0
	D-Psicose	2.7±0.0
	L-Psicose	41.8±0.9

4. *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase를 이용하여 L-ribose 의 생산

T. thermophilus mannose-6-phosphate isomerase를 이용하여 L-ribose의 고농도 생산을 위하여, 효소의 최적 pH 7.0 및 효소활성이 절반으로 줄어든 시간을 고려한 온도(75 °C)에서 300 g/L L-ribulose로부터 L-ribose의 시간별 생산량을 측정하여, 반응 2.5 시간 후에 213 g/L의 L-ribose가 생산되어 시간당 85.2 g/L의 생산성과 25% 전환수율을 나타내었다(Fig. 56). 현재까지 L-ribose의 생산 중 가장 높은 생산성을 나타낸 것은 Molybdic acid를 사용한 화학합성법은 L-arabinose 로부터 23% 전환수율과 시간당 20 g/L 생산성을 나타내었고 *Bacillus subtilis* mannose-6-phosphate isomerase를 사용하여 300 g/L L-ribulose부터 반응 3시간 후에 213 g/L L-ribose를 얻어 생산성 시간당 71 g/L을 보여 주었다. *T.thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase의 생산성은 Molybdic acid를 사용한 화학합성법과 *Bacillus subtilis* mannose-6-phosphate isomerase 효소에서 얻은 결과 보다 각각 4.26배와 1.16배 높은 결과를 나타내어 이것은 보고된 생물학적 L-ribose 생산에서 가장 높은 생산성 및 생산농도이다.

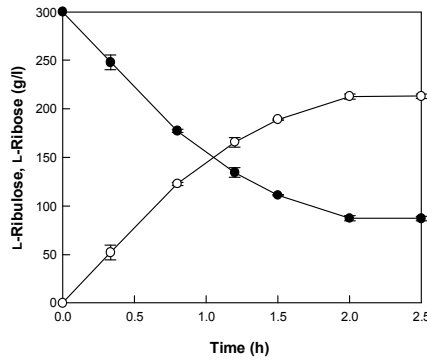


Fig. 56. Time course of L-ribose production (○) from 300 g/L L-ribulose (●) by *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase.

5. Selection of residues related to increased activity of L-ribulose isomerization by molecular modeling and Ala substitution.

T. thermophilus mannose-6-phosphate isomerase 의 L-ribulose 이성화 반응에 요구되는 잔기 선별을 위하여 homology model에 L-ribulose를 docking하였다. 그결과 L-ribulose 주위의 4.5 Å 내의 잔기가 R11, W13, L18, K37, L39, Q48, H50, K65, E67, W69, H122, L124, E132, D138 및 R142임을 확인하였다. 이 15가지 잔기를 L-ribulose 이성화 활성화에 관계되는 후보 잔기로서 선택하게 되었다. 이러한 잔기의 역할을 규명하기 위해 먼저 알려진 치환을 하였고, 각각의 돌연변이 효소는 과발현 및 정제를 하였다. 각각의 wild type 효소와 돌연변이의 효소를 L-ribulose 에 대하여 활성 측정을 한결과, 금속이온 결합 부위라고 예측되는 H50A, E67A, H122A 및 E132A 돌연변이에서는 활성이 전혀 나타나질 않았다. 마찬가지로 다른 돌연변이 효소에서 L-ribulose에 대한 활성이 감소하거나 그대로임을 확인하였다. 하지만 R142A 효소에서 1.2배의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Table 16). 이는 R142 잔기가 L-ribulose의 활성화에 영향을 줄수 있다는것을 예측할 수 있었다.

6. Kinetic analysis of the wild-type and R142N mutant mannose-6-phosphate isomerases from *T. thermophilus*.

R142 잔기의 역할을 좀더 규명하기 위하여 각각 아스파라긴, 글루타민, 타이로신, 글루탐산, 그리고 라이신으로 돌연변이를 유발하였다. 각각의 효소는 정제를 하였고, L-ribulose에 대하여 역가 활성 측정 및 kinetic study를 수행하였다. 그결과 흥미롭게도 R142N 돌연변이 효소에서 specific activity, catalytic efficiency 가 wild-type에 비해서 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(Table 17).

이는 기존 R142N 돌연변이($579 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) 가 L-ribulose 에 대하여 *T. thermophilus* ($375 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), *B. subtilis* ($43.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), and *G. thermodenitrificans* ($152 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) 유래의 mannose isomerase 보다 각각 1.5, 13.3, 그리고 3.8 배 높은 catalytic efficiency를 보였다. 이는 R142N 돌연변이 효소는 현재 L-ribose 전환효소에서 가장 높은 catalytic efficiency를 보여줌을 확인하였다. 이에따른 현상을 규명하기 위하여 분자 모델링을 수행한결과 wild 의 아르기닌과 L-ribulose의 거리는 5.6 Å 임에 반해 돌연변이 효소의 아스파라긴과 L-ribulose의 거리가 3.8 Å 으로서 거리가 상당히 가까워짐을 확인하였다 (Fig. 57).

Table 16. Specific activities of the wild-type and alanine-substituted mutant enzymes of mannose-6-phosphate isomerases from *T. thermophilus* for L-ribulose.

Enzymes	Specific activity (U/mg) ^b
Wild	1,493 ± 25
R11A	1,482 ± 45
W13A	838 ± 30
L18A	1,194 ± 42
K37A	474 ± 12
L39A	1,065 ± 60
Q48A	1,016 ± 90
H50A	- ^c
K65A	1,011 ± 60
E67A	-
W69A	1,046 ± 30
H122A	-
L124A	1,076 ± 45
E132A	-
D138A	972 ± 45
R142A	1,791 ± 13

Table 17. Kinetic parameters and specific activities of the wild-type and mutant enzymes of mannose-6-phosphate isomerases from *T. thermophilus* at position 142 for L-ribulose.

Enzymes	Specific activity (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Wild	1,493 ± 25	136 ± 4	50,644 ± 709	374 ± 11
R142A	1,791 ± 13	184 ± 5	64,873 ± 908	353 ± 11
R142N	2,152 ± 37	140 ± 4	81,063 ± 929	579 ± 18
R142Q	1,270 ± 12	150 ± 2	48,300 ± 523	322 ± 6
R142K	1,214 ± 18	228 ± 6	68,877 ± 964	302 ± 9
R142E	1,045 ± 11	151 ± 5	32,666 ± 536	216 ± 8
R142Y	1,092 ± 10	308 ± 6	56,178 ± 865	182 ± 5

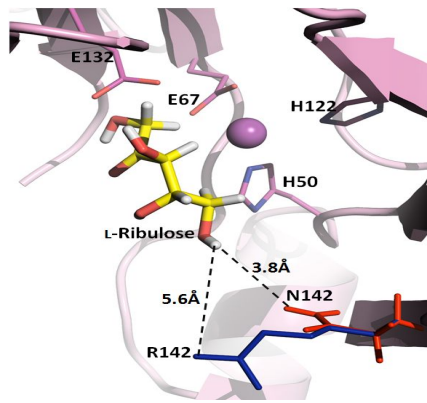


Fig. 57. Docking of L-ribulose into the active-site of the wild-type and mutant enzymes. The yellow, blue, red sticks represent L-ribulose as substrate and arginine and asparagine residues at position 142, respectively. The dashed line was distance between residue and substrate. The figure was produced using PYMOL.

7. *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase wild type 과 R142N 돌연변이를 이용하여 L-ribose 의 생산 비교

T. thermophilus mannose-6-phosphate isomerase wild type 과 R142N 돌연변이 효소를 이용하여 L-ribose의 생산 비교를 수행하였다. 그 결과 70분후 R142N 돌연변이 효소를 이용한 것의 L-ribulose로부터 L-ribose의 전환수율이 64% 로써 wild-type 효소의 51% 보다 13% 높음을 확인하였다(Fig. 58). 이는 현재 보고 된 L-ribose 생산 효소들 중에서 *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase wild type 의 L-ribose 생산율이 가장 높은 것을 감안 하였을때, *T. thermophilus* mannose-6-phosphate isomerase R142N 돌연 변이 효소는 현재 보고 된 L-ribose 생산 효소중 가장 높은 활성을 가진 효소라고 할 수 있다.

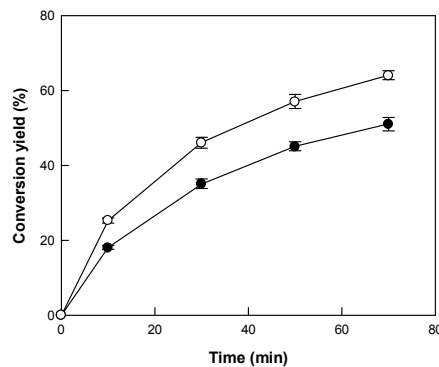


Fig. 58. Time courses of L-ribose production from L-ribulose to by the wild-type (●) and R142A mutant (○) mannose-6-phosphate isomerases from *T. thermophilus*. The reactions were performed in 50 mM PIPES buffer (pH 7.0) containing 10 mM L-ribulose, 70U/ml of enzyme, and 0.5 mM of each metal ion at 70°C for 70 min. Data represent the means of three experiments and error bars represent standard deviation.

5) L-Ribulose에서 L-ribose 생산 비교

그 동안의 본 연구에서의 L-ribulose에서 L-ribose 생산에서의 kinetic parameters를 비교 하였다(Table 18). Mannose-6-phosphate isomerase의 triple-site variant의 catalytic efficiency (k_{cat}/K_m)는 wild-type, single-site, and double-site variant 효소의 k_{cat}/K_m 값보다 각각 7.1, 4.9 및 1.2배 높았고, *B. subtilis* wild-type, *T. thermophilus* wild-type 및 *T. thermophilus* R142N variant 효소보다 각각 26, 3 및 2배 높았다.

Table 18. Kinetics parameters of the mannose-6-phosphate isomerases from *B. subtilis*, *G. thermodenitrificans*, and *T. thermophilus* in the conversion of L-ribulose to L-ribose

Microorganism	Enzyme type	Temp. (°C)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
<i>B. subtilis</i>	Wild-type	40	849	3,694	44
<i>T. thermophilus</i>	Wild-type	75	136	50,644	374
	R142N	75	140	81,063	579
<i>G. thermodenitrificans</i>	Wild-type	70	149	23,546	158
	L129F	70	243	55,123	227
	N90A L129F	70	89	85,715	965
	W17Q N90A L129F	70	100	112,098	1,120

제 4 절 L-Arabinose에서 L-ribose 생산

1) L-Arabinose isomerase 와 mannose-6-phosphate isomerase의 사용

1. L-Arabinose로부터 L-ribose 생산을 위한 *Geobacillus thermodenitrificans* 유래의 Arabinose isomerase (AI) 와 mannose-6-phosphate isomerase (MPI) 의 최적 비율 실험

L-Arabinose로부터 L-ribose 생산에서 두단계의 효소적 방법을 이용하기 위하여 AI와 MPI의 효과적인 Unit 비율을 알기위하여 AI 와 MPI의 효소액 (8 U/ml AI and 20 U/ml MPI) range를 10:90 to 90:10 (v/v)로 하여 수행하였다(Fig. 59). 그 결과 최적 L-ribose 생산은 50:50의 volume 비율에서 관찰되었고, 이때 최적 unit 비율은 AI:MPI 가 1:2.5이었다.

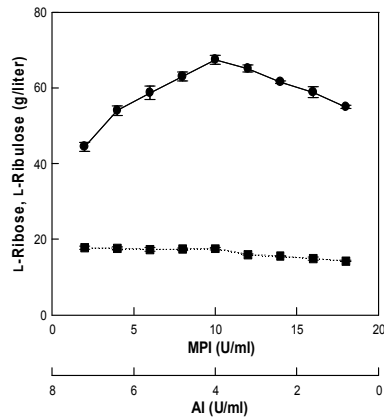


Fig. 59. Effect of the ratio of AI to MPI on L-ribose production from L-arabinose by the purified AI and MPI from *G. thermodenitrificans*. Symbols: L-ribose (●) and L-ribulose (■).

2. L-Arabinose로부터 L-ribose 생산을 위한 L-Arabinose isomerase (AI) 와 mannose-6-phosphate isomerase (MPI) 의 최적 unit 과 L-arabinose의 기질 농도에 대한 효과

앞서 연구한 최적 unit 비율 (1:2.5 = AI:MPI)을 바탕으로 500g/L의 L-arabinose를 이용하여 다양한 농도의 AI 와 MPI (0.4:1.0-9.2 : 23U/ml)를 반응한 결과 8U/ml의 AI와 20U/ml의 MPI에서 최적점에 도달하였다. 또한 기질농도에 따른 L-ribose 생산을 알기 위하여 15-500g/L의 L-arabinose를 사용하고 8U/ml의 AI와 20U/ml의 MPI를 반응한 결과 500g/L에서 가장 높은 생산을 확인하였다(Fig. 60).

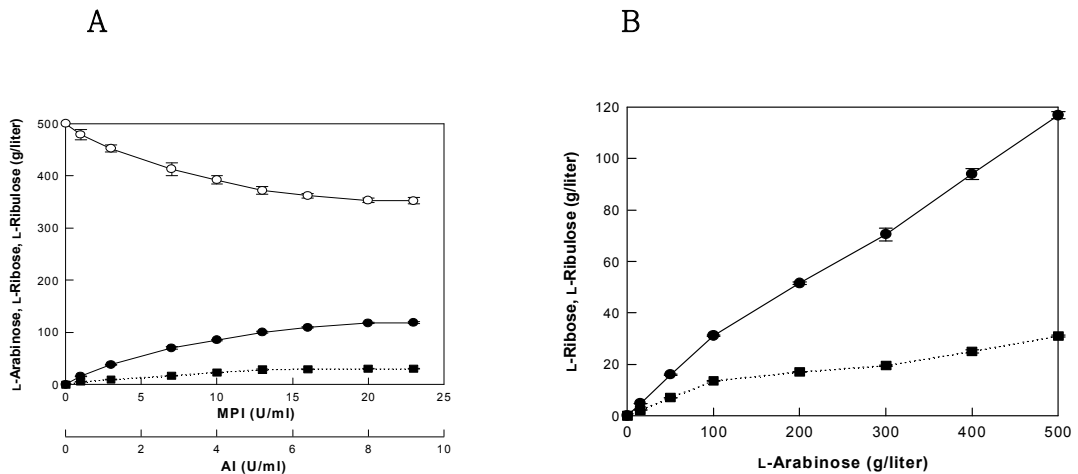


Fig. 60. (a) Effect of enzyme concentration on L-ribose production from L-arabinose at the optimal unit ratio (1:2.5 of AI:MPI). Symbols: L-ribose (●), L-ribulose (■), and L-arabinose (○). (b) Effect of L-arabinose concentration on L-ribose production. Symbols: L-ribose (●) and L-ribulose (■).

3. L-Ribose Production from L-Arabinose Using Purified L-Arabinose Isomerase and

Mannose-6-phosphate Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*

8U/ml의 AI와 20U/ml의 MPI를 이용하여 3시간 동안 time-course 반응을 수행한 결과 500g/L의 L-arabinose로부터 3시간 후 118 g/L의 L-ribose를 획득할 수 있었다. 이때 전환 수율은 23.6 %, 생산률은 $39.3 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 이다(Fig 61).

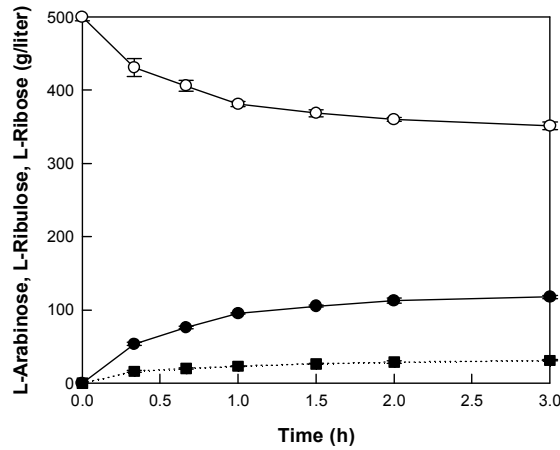


Fig. 61. Time course of L-ribose production from L-arabinose by the purified AI and MPI from *G. thermodenitrificans*. Symbols: L-ribose (●), L-ribulose (■), and L-arabinose (○).

4. Reuse of the immobilized AI and MPI from *G. thermodenitrificans* for L-Ribose production from 100 g/L L-arabinose.

Glutaraldehyde를 이용하여 cross-linked 효소를 제조한 후 L-ribose 생산에 이용하였다. 고정화된 효소는 9 번째 batch 후에도 L-arabinose로부터 L-ribose 생산이 20% 이상의 전환 수율을 보였다. 20번째 batch 이후에는 43%가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 62). 이는 고정화를 통하여 생산물과 효소를 쉽게 분리할 수 있고, 고정화 효소의 이용은 L-ribose 생산에 경제적이고 편리하게 사용될 수 있는 잠재력을 확인할 수 있었다.

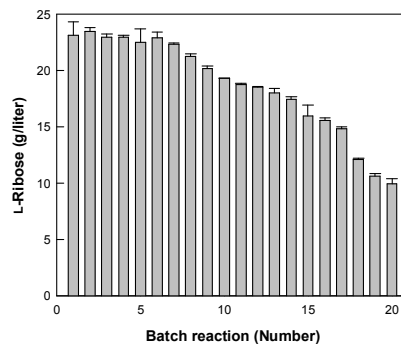


Fig. 62. Reuse of the immobilized AI and MPI from *G. thermodenitrificans* for L-Ribose production from 100 g/L L-arabinose.

2) L-Arabinose isomerase 와 mannose-6-phosphate isomerase가 함유된 whole cell 사

용

1. pTrc99a-GTAI 및 pTrc99a-GTMPI의 whole cell 반응

*Geobacillus thermodenificans*로부터 획득한 GTAI 및 GTMPI 유전자를 가지고 있는 pTrc99a-GTAI/ER2566과 pTrc99a-GTMPI/ER2566을 사용하여 공정의 간편화와 효율성 증가를 위해 wet상태의 whole cell을 사용하여도 고유의 효소 반응성이 있는지 확인하였다. 5 mL LB/amp broth에서 37°C, O/N으로 키운 다음 500 mL LB/amp broth에 옮겨서 37°C에서 O.D.가 0.6~1.0사이까지 자라도록 배양하였다. O.D.가 그 사이까지 자란 후 단백질은 발현시키기 위하여 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 4시간을 추가로 배양하였다. 4시간이 지난 후에 8000rpm, 4°C, 20분동안 cell을 harvest하여 wet cell을 획득하였다. 이렇게 얻은 GTAI wet cell과 GTMPI wet cell을 각각 200 g/L가 되도록 50 mM PIPES, pH 7.0 buffer에 현탁한 다음 L-arabinose 반응에 사용하였다. 최종 농도가 100g/L가 되도록 L-arabinose를 기질로 하여 70°C, 50°C, 37°C의 반응온도에서 각각 10 g/L GTAI wet cell만 사용하고, 10g/L GTAI wet cell과 100 g/L GTMPI wet cell을 혼합하여 사용하여 whole cell을 사용하였을때의 반응성 및 온도에 따른 반응율을 확인 하였다(Table 19). 반응 종료를 위하여 2M HCl을 사용하여 최종 0.2 M이 되도록 첨가하였다.

Table 19. Composition of reaction mixtures

μL	70°C		50°C		37°C	
	GTAI	GTAI + GTMPI	GTAI	GTAI + GTMPI	GTAI	GTAI + GTMPI
400 g/L L-arabinose	100	100	100	100	100	100
200 g/L GTAI wet cell	20	20	20	20	20	20
200 g/L GTMPI wet cell	-	200	-	200	-	200
50mM PIPES, pH7.0 Buffer	280	80	280	80	280	80
Total vol. (μL)	400					

Whole cell을 사용하여도 열처리로 정제된 단백질을 사용하였을 때와 비슷한 결과가 나왔다. 정제 과정을 거치지 않아도 같은 효과를 볼 수 있을 것이다. L-arabinose가 중간체 L-ribulose로 전환되는데 작용하는 GTAI와 L-ribulose가 L-ribose로 전환되는데 작용하는 GTMPI가 모두 작용하고 있음을 GTAI만 사용하여 실험한 결과와 GTAI와 GTMPI를 혼합하여 사용한 결과를 비교함으로써 확인 할 수 있었다(Fig. 63). Whole cell GTAI만 사용하여 반응하였을 때, L-arabinose는 70°C에서 약 15%정도 전환이 진행되고 L-ribulose가 약 15% 생성됨을 확인하였다. 온도가 낮아짐에 따라 그 전환속도 및 전환율이 낮아짐을 알았다. 여기에 whole cell GTAI와 whole cell GTMPI를 혼합하여 사용하여 반응하였을 때, L-arabinose

는 70°C에서 약 25%까지 전환이 진행되는 것을 확인하였고, GTMPI가 L-ribulose를 L-ribose로 전환시켜서 L-ribulose와 L-ribose가 약 25%까지 생성되어짐을 알 수 있었다. 이를 통하여 GTAI와 GTMPI가 모두 whole cell 상태에서도 작용됨을 알 수 있었다. 물론 정제한 GTAI와 GTMPI를 사용할 경우 보다 L-arabinose의 전환 정도가 낮기는 하나 이는 다른 조건의 변화를 통하여 개선할 수 있을 것이다.

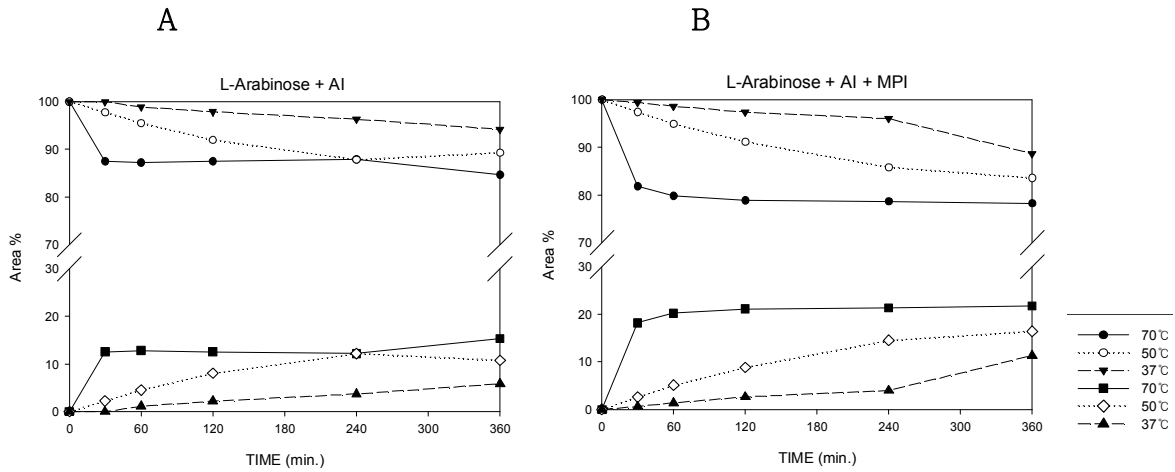


Fig. 63. a L-Ribulose production from L-arabinose by the immobilized *G. thermodenitrificans* containing AI. b L-Ribulose production from L-arabinose by the immobilized *G. thermodenitrificans* containing AI and MPI.

2. Expression vector pFRPT로의 Cloning

현재 발현 vector인 pTrc99a는 제품 생산에 사용이 불가하므로 이를 삼천리 제약 특허 보유 발현 vector인 pFRPT로 옮겨서 사용하기로 하였다. 유전자를 옮기기 위하여 *NdeI* 제한 효소 위치에 cloning이 되어야 하므로 개시코돈부분을 *NdeI* site로 바꾸어 Forward primer를 제작하였다. 또한 Reverse primer에는 *HindIII* site를 삽입하여 cloning에 용이하게 제작하였다. 이렇게 제작된 각각의 primer(GTAI-UP2: TTT CAT ATG ATG CTG TCA TTA CGT CCT, GTAI-DOWN2: TTT AAG CTT TTA CCG CCC CCG CCA AAA, GTMPI-UP: TTT CAT ATG CAT CAA GAA CCG ATT TTT CTC, GTMPI-DOWN: TTT AAG CTT TTA TTT GCT TGT CCG TGG)를 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건을 30회 반복하여 반응시켰다. 반응이 끝난 PCR산물을 1% agarose gel electrophoresis하여 확인하고 증폭된 DNA를 gel에서 분리하여 Gel Extraction Kit를 이용하여 DNA만 회수하였다(Fig. 64).

M AI MPI

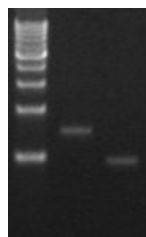


Fig. 64. PCR amplification of DNA

이렇게 회수된 DNA를 중간 cloning vector인 pGEM-T easy vector에 삽입하여

그 결과, pFRPT-AI와 pFRPT-MPI 단백질이 발현됨을 확인하였다(Fig. 67).

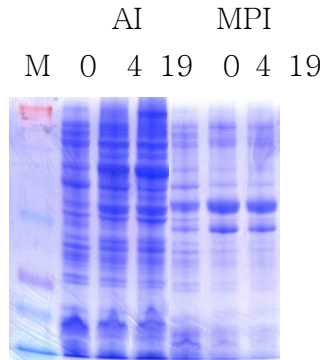


Fig. 67. Expression of AI and MPI using pFRPT-AI and pFRPT-MPI.

3. Whole cell GTMPI 반응 조건

Geobacillus thermodinitrificans mannose-6-phosphate isomerase(GTMPI) wet whole cell을 사용하여 L-ribulose로부터 L-ribose를 생산할 수 있다. wet whole cell GTAI의 반응 조건을 기준으로 하여 wet whole cell GTMPI의 반응을 최적화 할 수 있는 조건을 탐색하였다. wet whole cell GTMPI를 400 g/L가 되도록 정제수에 녹인 후, 30분 동안 sonication을 통하여 cell을 파괴하였다. 이렇게 처리된 sonicated cell을 L-ribose 생성 반응에 사용하였다. L-ribulose stock은 자체 column 정제로 얻은 97.25% HPLC 순도를 가지는 L-ribulose yellow syrup을 사용하여 400 g/L가 되도록 증류수에 녹인 후 사용하였다.

(1) 온도에 따른 효과

Wet whole cell GTAI를 사용한 반응은 100 g/L L-arabinose를 사용하여 70°C에서 반응을 진행하였다. 우선적으로 wet whole cell GTMPI의 온도에 따른 효과를 확인하기 위하여 100 g/L L-ribulose, 300 g/L sonicated GTMPI를 사용하여 40, 50, 60°C에서 반응을 실시하였다. 그 결과, 초기 반응 속도는 온도가 높을수록 빨리 진행됨을 알 수 있었다. 그러나, 오랜 시간 반응을 진행시키면 60°C에서의 반응은 4시간 이후로 평형에 도달하고 40, 50°C에서의 반응은 서서히 증가하여 결국 낮은 온도에서 전환반응이 더 증가됨을 확인하였다. 이는 온도가 높을수록 효소의 활성이 빨리 감소하는 것으로 예측할 수 있다(Fig 68).

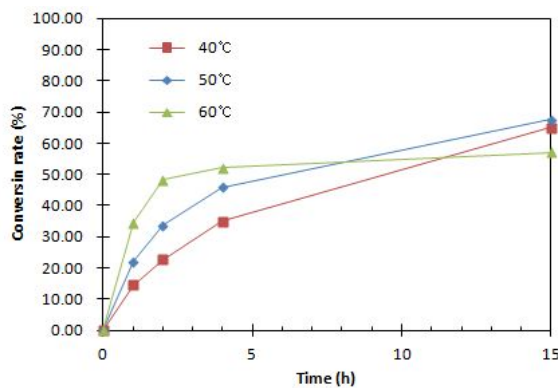


Fig 68. Effects on temperatures.

(2) 코발트(Co^{2+}) ion에 따른 효과

Purified GTMPI의 결과를 통하여 최종 1.0 mM의 코발트(Co^{2+}) ion이 활성증가에 효과적인 cofactor로 쓰인다는 것을 알았고, sonicated wet whole cell GTMPI에서도 효과적으로 작용하는지 확인하기 위하여 100 g/L L-ribulose, 300 g/L sonicated GTMPI를 사용하여 최종 1.0 mM이 되도록 코발트(Co^{2+}) ion을 첨가한 것과 하지 않은 것을 60°C에서 각각 반응시켰다.

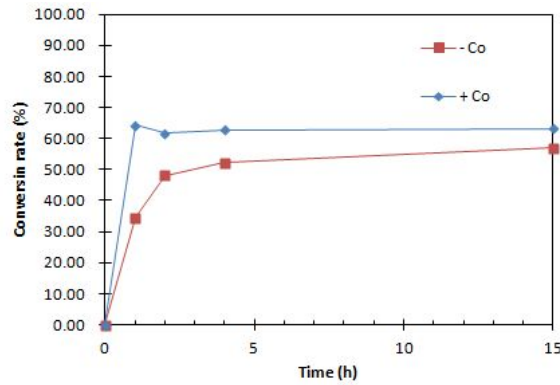


Fig 69. Effect of Cobalt(Co^{2+}) ion on the activity.

결과적으로, wet whole cell GTMPI의 활성 증가에 있어서도 코발트(Co^{2+}) ion은 효과가 있는 것을 볼 수 있었다. 60°C에서 반응을 진행시킨 결과, 초기 1시간에서의 반응속도는 2 배까지 증가함을 알 수 있었으며 오랜 시간 반응에서도 코발트(Co^{2+}) ion의 첨가 전보다 약 15% 전환이 더 이루어짐을 확인하였다(Fig 69).

또한, wet whole cell GTMPI에 대한 코발트(Co^{2+}) ion의 농도별 특성을 알아보기 위하여 100 g/L L-ribulose, 100 g/L sonicated GTMPI를 사용하여 최종 0.5, 1.0, 2.0 mM이 되도록 코발트(Co^{2+}) ion을 첨가하여 40°C에서 각각 반응시켰다. 최종 20시간 반응 후 상대적인 전환율은 1.0 mM의 코발트(Co^{2+}) ion을 사용한 경우가 약간이나마 우수함을 알 수 있었다(Fig 70).

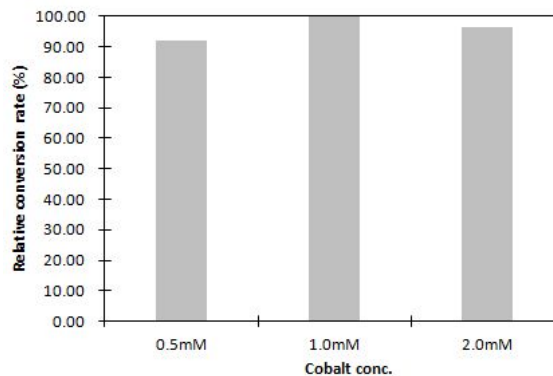


Fig 70. Relative conversion rate(%) of L-ribose by Cobalt(Co^{2+}) ion concentration.

(3) Wet whole cell GTMPI 농도에 따른 효과

Wet whole cell GTMPI가 sonication한 후 1.0mM 코발트(Co^{2+}) ion이 cofactor로 존재할 경우 L-ribulose에서 L-ribose로 전환시키는 최적의 효소 농도를 알아보기 위하여 100 g/L L-ribulose, 1.0 mM 코발트(Co^{2+}) 조건에서 각각 25, 50, 100, 200 g/L가 되도록 sonicated wet whole cell GTMPI를 적용하여 40°C에서 20시간 동안 반응을 진행하였다. 그 결과, 초기 1시간에서 반응 속도는 효소의 농도가 높을 수록 빠르게 진행됨을 보였다(Table 20).

Table 20. Conversion rate(%) at 1h.

1 시간	25g/L	50g/L	100g/L	200g/L
(%)	11.20	15.72	24.78	42.17

그러나, 20시간의 반응시간이 지난 후 전환율을 확인하였을 때, 25 g/L wet whole cell GTMPI만을 사용하여도 200 g/L의 효소를 사용하는 것과 같은 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다(Fig 71). 물론 효소의 사용량이 많으면 빠른 시간안에 반응을 종료 시킬 수 있겠지만, 그 후속 공정(cell 제거 및 정제)에 있어서 어려움을 가져 올 수 있기 때문에 최소량의 효소를 사용하여 최대 전환 반응을 유도하는 것도 유리한 방법이다.

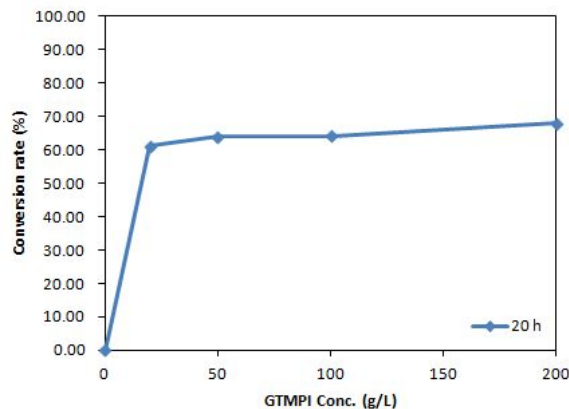


Fig 71. Effect of enzyme concentration on L-ribose conversion.

(4) 기질 농도에 따른 효과

앞서 연구한 결과, 초기의 반응 속도는 고온(60°C)일수록 증가하나 반응시간을 끌어주면 저온(40°C)에서 반응 전환율이 역전되어 더 증가되는 것을 확인하였다. 또한 1.0mM의 코발트(Co^{2+}) ion이 존재할 경우 반응성이 좋으며, 25 g/L의 sonicated wet whole cell GTMPI만 사용하여도 그 이상의 효소를 사용하였을 때와 같은 효과를 보인다는 것을 알았다. 이를 토대로 기질 농도에 따른 L-ribose 반응 전환율을 알기 위하여 25 ~ 300 g/L의 L-ribulose를 사용하여 반응액을 준비하였으며 40°C에서 반응을 하였다(Table 21).

Table 21. Composition of reaction mixture.

	25 g/L	50 g/L	100 g/L	200 g/L	300 g/L
400g/L L-ribulose	25	50	100	200	300
400g/L sonicated GTMPI	25	25	25	25	25
100mM Cobalt	4	4	4	4	4
정제수	346	321	271	171	71
Total	400 μ L				

20시간의 반응을 진행시킨 결과, 농도가 25, 50, 100 g/L에서는 wet whole cell GTMPI에 의한 상대적인 전환율이 비슷하나, 200, 300 g/L로 농도가 높아짐에 따라 그 전환율이 감소함을 알 수 있었다(Fig 72).

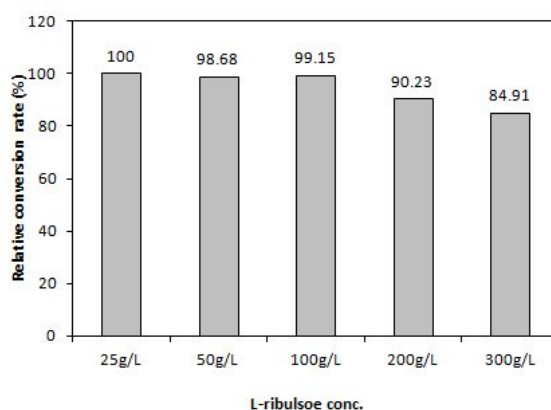


Fig 72. Relative conversion rate(%) of L-ribose by L-ribulose concentration.

100 g/L L-ribulose로 반응할 경우 69.4 g/L L-ribose, 50 g/L L-ribulose는 34.54 g/L L-ribose, 25 g/L L-ribulose는 17.5 g/L L-ribose가 생성되는 것이다. 이는 같은 조건에서 많은 기질을 사용하여 최대한의 수율을 올리는 것이 유리하므로 100 g/L L-ribulose를 사용하여 L-ribose로의 전환반응을 하는 것이 최적임을 알 수 있었다.

(5) 온도에 따른 효과(II)

지금까지 조건 탐색으로부터 100 g/L L-ribulose, 1.0 mM 코발트(Co^{2+}) ion, 25 g/L wet whole cell GTMPI로 반응액을 구성하고 40°C에서 반응을 할 때 L-ribose로의 전환반응이 가장 우수함을 확인하였다. 최적의 반응액 구성을 확인한 상태에서 온도에 따른 전환율의 차이를 다시 측정하였다. 조건에 맞는 반응액을 만든 다음, 40, 50, 60, 70°C에서 반응을 진행하였다(Table 22).

Table 22. Composition of reaction mixture.

400 g/L L-ribulose	100
400 g/L sonicated GTMPI	25
100 mM Cobalt	4
정제수	271
Total	400 μ L

결과적으로, 초기 반응 속도는 온도가 높을수록 낮은 온도보다 빠르게 진행되는 것을 재

확인 할 수 있었다. 초기 1시간에서 반응 전환율만 보면 70℃에서 L-ribose로 전환이 더 많이 된 것을 알 수 있다(Table 23).

Table 23. Conversion rate(%) at 1h.

1 시간	40℃	50℃	60℃	70℃
(%)	13.00	18.28	19.24	19.80

그러나, 시간이 지날수록 높은 온도의 반응은 낮은 전환율에서 평형에 도달한 반면에 낮은 온도에서의 반응은 천천히 반응이 진행되어 24시간 반응 결과에서는 40℃에서 최대 전환율(67%)에 이르는 것을 확인하였다(Fig 73).

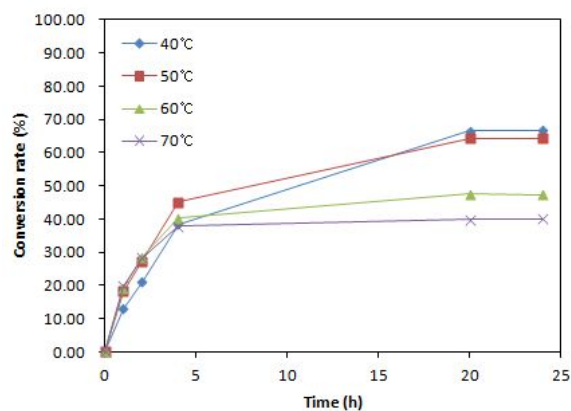


Fig 73. Effect of reaction temperature on L-ribose production.

결국 wet whole cell GTMPI를 사용한 L-ribulose의 L-ribose로의 전환 반응은 100 g/L L-ribulose, 25 g/L GTMPI, 1.0mM Cobalt로 구성된 반응 혼합물을 40℃에서 반응을 진행하였을 때 최적의 효과를 보인다는 것을 알았다.

4. GTAI와 GTMPI에 의한 one-step whole cell 반응

반응 전환율을 좀 더 증가시키기 위하여 wet whole cell GTAI와 wet whole cell GTMPI 각각을 자체 wet whole cell로 사용, wet whole cell을 sonication 후 사용, wet whole cell을 sonication 후 70℃ 열처리 정제 후 사용을 하였을 때를 비교하여 보았다. 200g/L로 wet whole cell을 녹인 후 wet whole cell, 200g/L로 wet whole cell을 녹인 후 30분 동안 sonication을 통하여 cell을 파괴한 sonicated cell, 200g/L로 wet whole cell을 녹인 후 30분 동안 sonication을 통하여 cell을 파괴한 다음 cell down후 sup.만 70℃에서 10분 동안 열처리하고 다시 debris down후 sup.만 0.2mm filtration시킨 열처리 정제 cell을 사용하여 L-arabinose에 대한 반응에 사용하였다. Control로 PIPES에 200g/L로 wet whole cell을 녹인 후 반응을 보내어 비교하였다. 아래와 같이 각각의 반응 mixture를 제조하였다(Table 24).

Table 24. Composition of reaction mixture

	wet whole cell	Sonicated cell	열처리 cell	whole cell in PIPES
400g/L L-arabinose	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
200g/L GTAI	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
200g/L GTMPI	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L
D.W.	90 μ L	90 μ L	90 μ L	-
50mM PIPES(pH7.0)	-	-	-	90 μ L
Total volume	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L

wet whole cell을 자체로 사용하는 것 보다는 sonicated cell, sonicated cell 보다는 열처리 cell이 반응성이 우수한 것을 확인할 수 있었다. wet whole cell을 사용할 경우에는 D.W.나 PIPES의 경우 전환율에서 큰 차이는 보이지 않았다(Table 25).

Table 25. Results of L-arabinose reaction with wet whole cell, sonicated cell, heat treatment cell

%	L-ribulose	L-ribose	L-arabinose
whole cell	16.55	12.89	69.18
sonicated cell	14.81	15.70	69.13
열처리 cell	14.00	17.17	67.45
whole cell in PIPES	18.17	12.30	68.21

3) Mannose-6-phosphate isomerase와 L-arabinose isomerase 함유한 고정화 cell를 사용

고정화는 효소의 산업적 이용 시 발생하는 열, 강산, 알칼리, 유기 용매 및 기타 환경에 대한 불안정성을 극복하고 안정적으로 효소 및 효소를 생산하는 균을 산업적 생산에 계속적으로 이용하기 위하여 유용하고 사용되고 있다. 본 연구에서는 L-ribose 대량생산을 위한 방안으로 고온성 L-arabinose isomerase (AI)와 mannose phosphate isomerase (MPI)를 포함하는 2개의 plasmid를 형질전환 시킨 대장균 재조합 균주를 전 세포 고정화하여 L-arabinose를 기질로 L-ribose 생산에 이용하고자 하였다. 또한 열 안정성과 전환효율이 대폭 향상된 MPI variant를 함께 이용하고 고정화를 통해 비교하고자 하였다.

1. Expression vector로의 Cloning

Geobacillus thermodenitrificans 유래의 mannose-6-phosphate isomerase 와 arabinose isomerase를 이용하여 L-ribose의 생산성을 높이기 위하여 one vector system 과 two vector system 으로 각각 cloning 하여 실험을 진행하였다. one vector system 에서는 pET-Duet vector를 사용하였고, two vector system 으로는 *Geobacillus thermodenitrificans* mannose-6-phosphate isomerase(이하 GTMPi)는 pET28a, *Geobacillus thermodenitrificans* arabinose isomerase(이하 GTAI)는 pTrc 99a (Fig. 74)의

각각의 발현 vector를 사용하여 cloning 된 plasmid를 여러 종류의 host를 이용하여 발현 정도를 test 하였다. 실험에 사용한 host는 *E. coli* ER2566, DH5a, K12, MG1655, BL21, 및 BL21 Gen-X이며, 이중 two vector system을 이용한 BL21 Gen-X에서 높은 발현율을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 75).

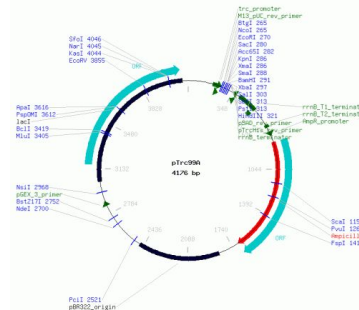
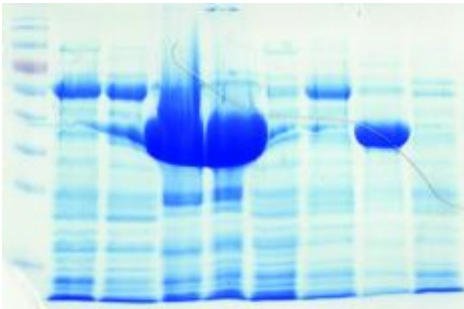


Fig. 74. pTrc 99a vector map

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1 lane : Ladder
 2,3 lane : one vector (BL21 Gen-X)
 4,5 lane : two vector (BL21 Gen-X)
 6 lane : two vector (DH5a)
 7 lane : two vector (K12)
 8 lane : two vector (BL21)
 9 lane : two vector (MG1655)

Fig. 75. Expression of vector system

2. Two vector system을 이용한 cell 고정화

MPI/AI two vector system의 cell을 고정화하기 위하여 2L flask에 500mL의 LB 배지를 만들고 two vector system *E. coli* BL21 Gen-X cell을 final 1% 되게 접종하여 37°C에서 200rpm으로 600nm 파장에서 O.D. 0.6일때 0.1 mM IPTG를 첨가하고 16°C, 150rpm으로 낮추어 16시간 배양하였다. 그 후 4°C, 3000rpm에서 centrifuge를 사용하여 cell down 하여 0.85% saline 으로 washing 하여 다시 4°C, 3000rpm에서 centrifuge를 사용하여 cell down 하였다. 키운 cell을 D.C.W. 값에 근거하여 g/l로 환산하고 Tris-HCl pH 7.5 buffer를 첨가하여 cell을 풀고 final sodium alginate 2% 첨가하여 O/N으로 교반하여 녹인후 다음날 주사기를 이용하여 압력을 걸고 지름 0.1 mm 크기로 떨어지게 하였다. CaCl₂ 용액을 이용하여 O/N으로 교반하며 경화시켜 사용하였다. 고정화 한 cell의 활성을 측정하기 위하여 cell 농도는 45 g/l 와 80 g/l로 위와 같은 방법으로 bead를 제작하여 L-arabinose를 기질로 사용하여 반응하였다. L-arabinose의 농도는 활성의 유무를 알아보기 위하여 낮은 농도인 1.5 g/l, 10 g/l, 50 g/l로 각각의 cell 농도로 진행하였으며, 반응온도는 60°C에서 420 min간 반응하였다(Fig. 76).

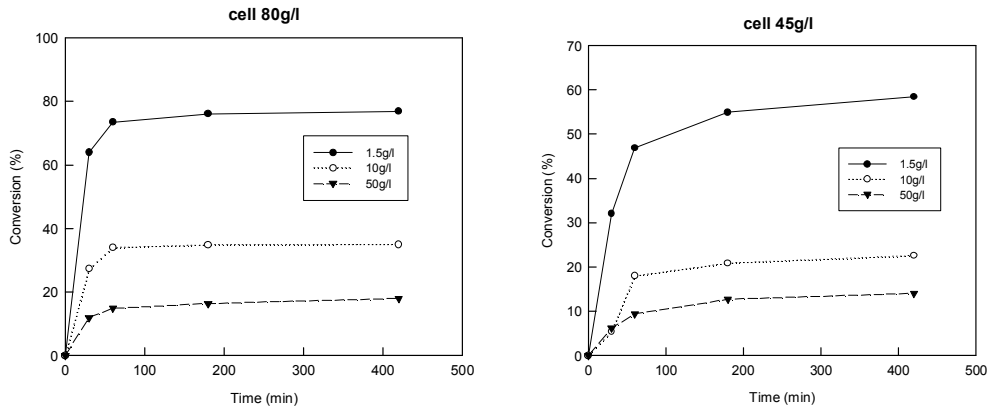


Fig. 76. Conversion yield of whole cells with GTMPI/GTAI by varying L-arabinose concentration.

두 개의 plasmid (GTAI+pTrc99a, GTMPI+pET-28a(+))를 *E. coli* (ER2566)에 형질전환하여 얻은 단일집락을 ampicillin과 kanamycin이 각각 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 포함된 LB broth에 접종 후 37°C에서 진탕배양하고 0.1 mM IPTG로 induction한 후 16°C에서 하룻밤 진탕 배양하여 두 단백질이 충분히 발현하도록 하였다. 이를 원심분리로 회수한 균체를 saline (0.85% NaCl)으로 washing한 후 고정화에 사용하였고 이를 편의상 이하 wild cell로 한다. 또한 3개의 잔기를 바꾸어 얻은 MPI variant를 pET-28a에 동일하게 구축하여 AI-pTrc99a와 함께 동일하게 형질전환하고 배양하여 얻은 것을 이하 variant cell로 하였다.

고정화를 위한 담체는 alginate (Na^+ 염)를 사용하고 최종농도는 2%로 하였다. Bead의 제조는 배양된 세포를 적절하게 희석하여 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같이 적절한 세포농도를 결정하였다.

$$\text{Cell concentration} = \text{O.D}(600\text{nm}) \times 0.34(\text{기울기값}) \times \text{희석배수}$$

회수한 세포를 50 g/L에서 100g/L까지 각 10 g/L 단위로 농도를 희석한 후 2% sodium alginate를 넣고 4°C에서 하룻밤동안 천천히 agitation하여 반응하도록 한 후 얼음위에서 0.2 M CaCl_2 solution에 injection하여 bead를 제조하여 사용하였다. 제조된 bead는 평균 0.5 mm 내외의 직경인 것만 회수한 후 2시간 간격으로 0.2M CaCl_2 를 3회 교체해 주면서 경화시켰다. 충분한 경화가 이루어진 후 증류수와 buffer 순서로 washing 한 후 실험에 사용하였다.

고정화에 사용할 최적 세포농도를 조사하기 위해 농도별로 제조된 bead를 반응 2 mL tube에 wet weight로 500g씩의 bead를 넣고 10 g/L L-arabinose를 기질로 하여 60°C에서 3시간 반응 후 bio-LC 측정 결과 wild와 variant 모두 80 g/L에서 최고 활성을 나타내었다(Fig. 77). 따라서 이하 실험에는 80 g/L로 하여 최종농도로 제조하여 사용하였다.

최적 기질 농도를 조사하기 위해 100 g/L에서 600 g/L까지 100 g/L간격으로 L-arabinose 농도를 달리하여 최적기질 농도를 알아본 결과 wild와 variant 모두 300 g/L부근에서 최적농도를 가지는 것으로 판단되었다(Fig. 78). wild의 경우 최대 30% conversion을 보인 반면 variant는 41%의 conversion을 보였으며 L-ribose 수율은 300 g/L L-arabinose 공급 시 wild가 75 g/L variant가 105 g/L를 보였다.

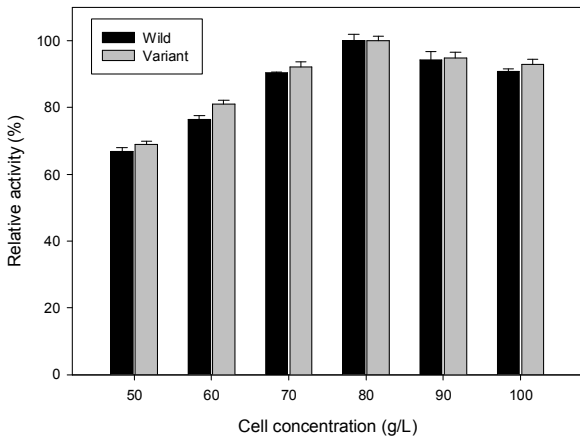


Fig. 77. Effect of concentration of immobilized enzyme. Wild-black, Variant-gray.

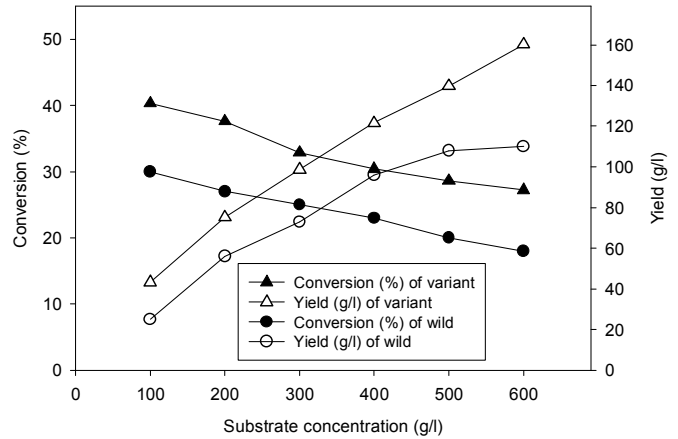


Fig. 78. Effect of substrate concentration. Wild: conversion (●) and yield (■), Variant: conversion (▲) and yield (△).

3. 고정화 및 운용 조건 최적화

적절한 생산조건을 최적화하기 위해 먼저 최적 반응 pH를 조사하였다. 50mM PIPES (pH 6.5 ~ 7.5)와 50mM EPPS(pH 7.5 ~ 8.5) buffer를 이용하여 10g/L L-arabinose를 기질로 하여 조사하였다. 그 결과 wild와 variant 모두 pH 7.5 (PIPES)에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 79).

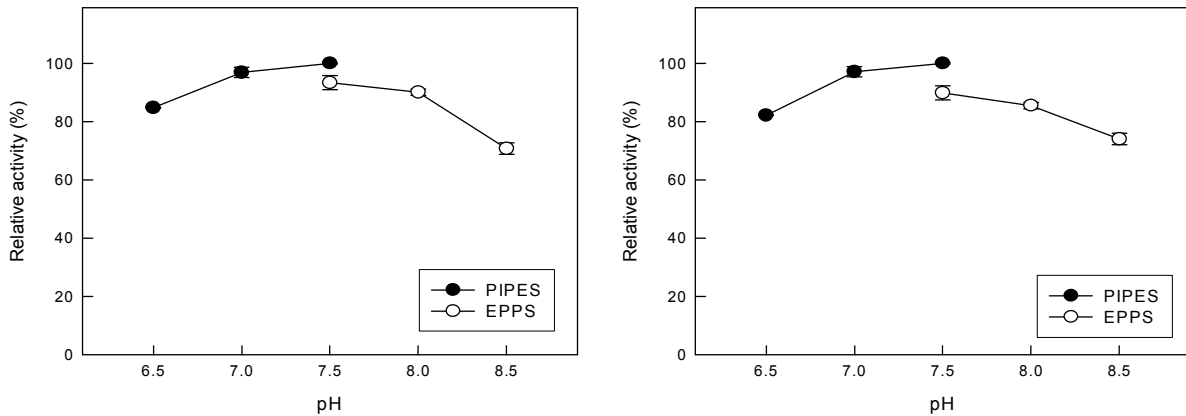


Fig. 79. Effect of pH in wild-type(left) and variant(right). PIPES (●) EPPS (◻)

금속이온의 고정화 전환 시 효과를 조사하기 위해 CoCl_2 를 최종농도 2.5mM로 하여 반응한 결과 cobalt염 존재 시 약 두 배의 전환율 증가를 보였다(Fig. 80). 최적 Co 농도는 2.5mM-5mM까지 변화시켜도 큰 차이가 없어 향후 고정화에는 2.5mM cobalt를 사용하였다. 최적 반응 온도를 알아보기 위해 50mM PIPES buffer (pH 7.5)와 2.5mM CoCl_2 , 10g/L L-arabinose를 기질로 하여 45°C-75°C까지 5°C 단위로 조사한 결과 wild와 variant 모두 60°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. Wild와 variant 모두 60°C 이하에서는 유사한 양상을

보였으나 65°C 이상의 온도에서 variant가 활성이 더 높게 나타남을 알 수 있어 variant가 온도 안정성이 증가했을 것을 예상할 수 있다(Fig. 81). 구체적인 온도 안정성을 조사하기 위해 동일 반응조건에서 온도를 55-70°C로 5°C 단위로 주기적으로 시료를 채취하여 bio-LC를 분석함으로써 온도안정성을 조사하였다. 그 결과 그림에서와 같이 wild는 상대적 활성 반감기 (half life)가 55°C, 60°C, 65°C, 70°C에서 각각 50시간, 36시간, 29시간, 12.7시간인데 비해 variant는 55°C, 60°C, 65°C, 70°C에서 각각 1,450시간, 690시간, 356시간, 50시간을 나타내어 wild에 비해 variant의 온도 안정성이 29배, 19배, 12배, 4배 각각 증가하였다(Fig. 82).

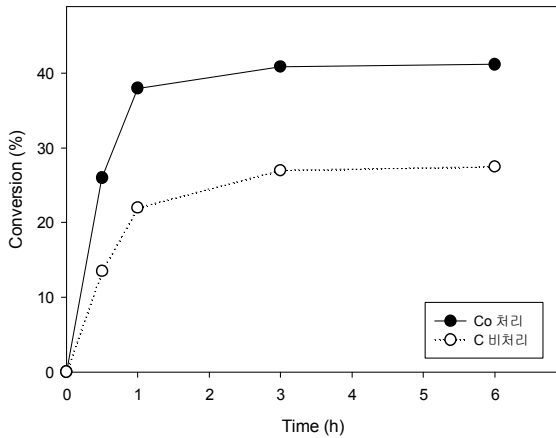


Fig. 80. Effect of CoCl_2 on L-ribose production. Treatment (●), No treatment (■)

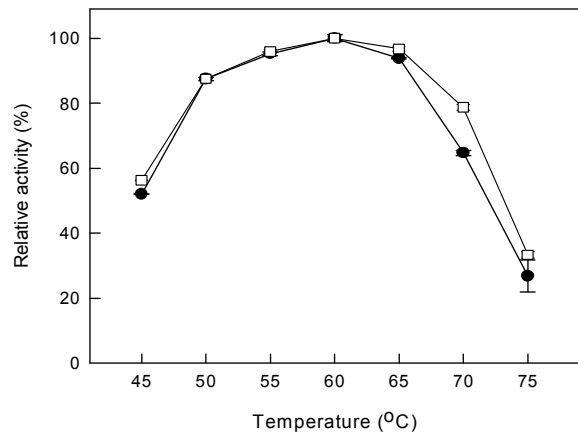


Fig. 81. Effect of temperature. Wild (●), Variant (□).

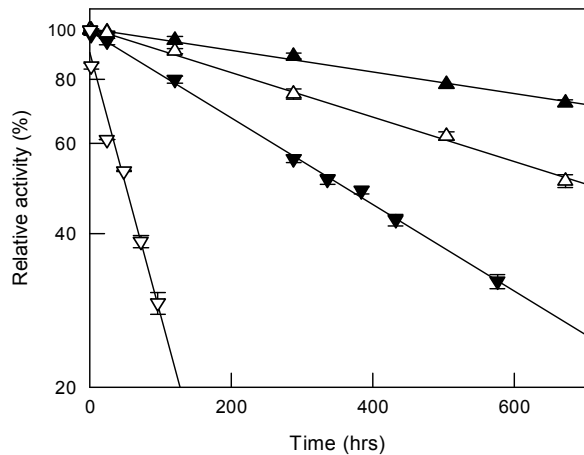
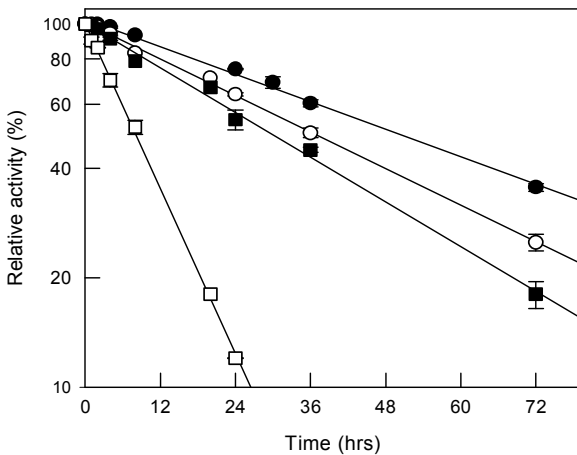


Fig. 82. Thermostability of wild-type (left) and variant (right). Wild: 55°C (●), 60°C (■), 65°C (▲), 70°C (□). Variant: 55°C (▲), 60°C (△), 65°C (▼), 70°C (▽).

조사한 반응조건들을 기반으로 80g/L wild와 variant cell로 각기 제조한 bead를 이용하여 300g/L L-arabinose (50mM PIPES, pH 7.5; 2.5mM CoCl_2)를 기질로 60°C에서 time-course 반응하여 시간별로 채취한 시료를 bio-LC로 분석하여 비교하였다. 그 결과 wild의 경우 3시간에서 300g/L L-arabinose로부터 72g/L의 L-ribose로 전환한 반면 variant는 3시간에 98.9g/L L-ribose를 전환하였다. 이때 전환수율은 wild가 24%였으며 variant는

32.9%를 보였다. 생산율은 wild가 $24.0 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 이었고 variant는 $32.9 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 를 보였다 (Fig. 83).

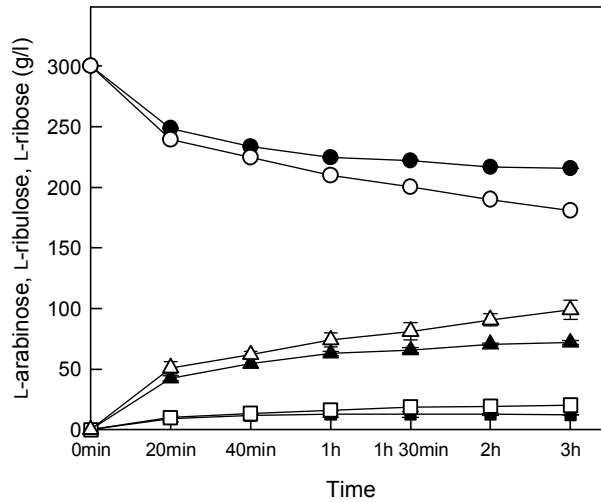


Fig. 83. Time courses of L-ribose production for wild-type and variant. L-arabinose (wild: ●, variant: ■), L-ribose (▲, △), L-ribulose (■, □).

3. Bioreactor 운용

Bioreactor상에서 고정화에 의한 L-ribose생산을 위해 packed bioreactor를 구축하였다 (Fig. 84). Bed volume을 15mL로 하여 bead를 채우고 300g/L 기질이 포함된 PIPES buffer (pH 7.5, 2.5mM CoCl_2)를 이용하고 온도는 60°C 로 하였다. 먼저 희석율 (dilution rate)를 조사하기 위해 peristaltic pump를 이용하여 기질액을 공급하면서 아래 식과 같이 계산하였다.

$$D = \frac{V}{F} \quad (D=\text{dilution}, V=\text{feeding rate}, F=\text{reactor volume})$$

그 결과 Fig. 85과 같이 wild는 1.6mL/h, variant의 경우 1.4mL/h로 큰 차이를 보이지는 않았다.

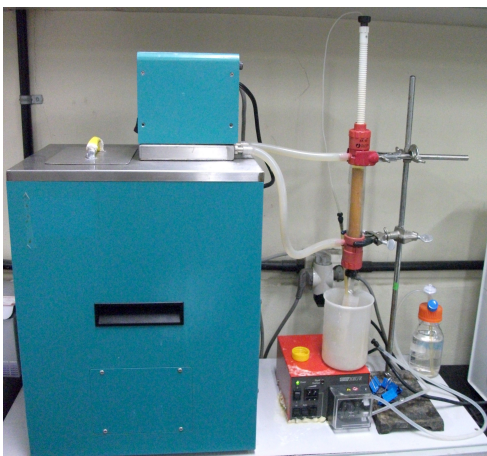


Fig. 84. Packed-bed reactor with immobilized enzyme

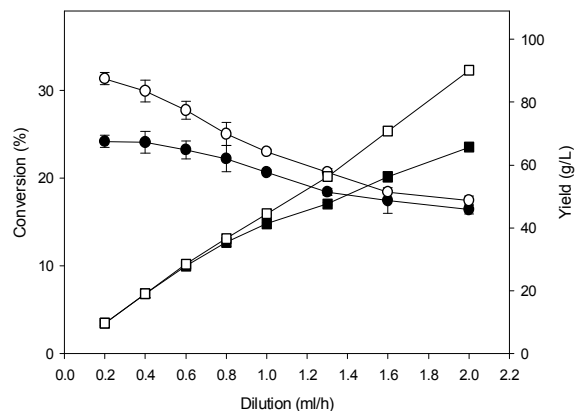


Fig. 85. Effect of dilution rate
Conversion: (●), yield: (■),
wild-type and variant (■, □).

L-ribose 전환율과 열 안정성이 좋은 variant cell로 제조한 bead를 이용한 반응기를 직접 운용하여 L-ribose 생산성을 조사하였다(Fig. 86). 운영조건은 상기와 같으며 10일 이상 운영한 결과 그림과 같이 최초 3일간 평균 $103\text{g}^{-1} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 의 L-ribose 생산성을 보였으며 4일차부터 서서히 감소하였고 이후에는 초기 대비 50% 활성이 유지되는 양상을 보였다. 향후 bead 제조 및 고정화반응기의 안정성을 높인다면 더 장기간의 안정적 운용이 가능하다고 판단된다.

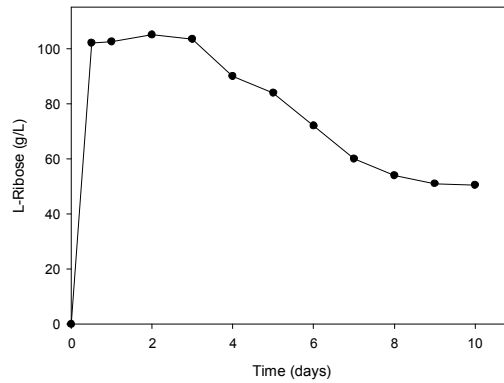


Fig. 86. Long-term operation of L-ribose production in a packed-bed reactor

Cell이 고정화된 bead의 재사용을 통한 L-ribose 생산성으로 재활용 가능성을 조사하였다. 고정화된 cell은 5 번째 batch 후에도 L-arabinose (300g/L)로 부터 L-ribose 생산이 25% 이상의 전환 수율을 보였고 10번째 batch 이후에도 50% 이상 활성을 유지하였다 (Fig. 87). 이는 세포 고정화를 통하여 L-ribose 생산에 경제적이고 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다.

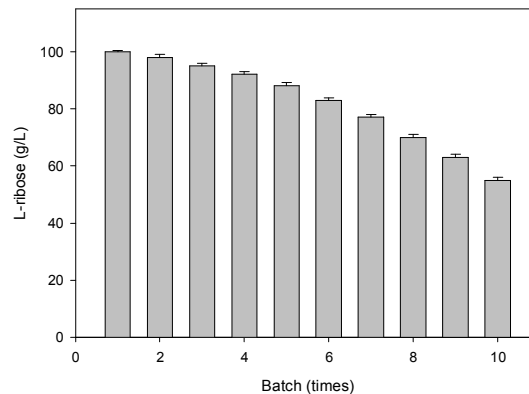


Fig. 87. L-Ribose production by recycling reactions.

제 5 절 L-Ribose 및 L-ribulose의 분리 정제

1. L-Ribulose의 분리 정제 분리, 정제 및 결정화

Geobacillus thermodinitrificans L-arabinose isomerase(GTAI) wet whole cell을 사용하여 L-arabinose로부터 L-ribulose를 생산하였다. wet whole cell GTAI는 200 g/L가 되도록 정제수에 녹인 후, 30분 동안 sonication을 통하여 cell을 파괴하였다. 이렇게 처리된

sonicated cell을 L-ribulose 생성 반응에 사용하였다. 100g의 L-arabinose를 100 g/L L-arabinose, 5 g/L sonicated cell GTAI, D.W., 70°C 조건에서 효소 반응을 진행하여 아래와 같이 반응 생성물을 얻었다(Table 26).

Table 26. Results of L-arabinose conversion with GTAI.

L-ribulose	L-arabinose
18.7 %	81.3 %

반응이 완료된 반응액을 실온으로 냉각한 후 celite를 통과시켜 반응에 사용된 wet whole cell GTAI를 제거하였다. cell이 제거된 여액은 evaporator를 사용하여 60°C에서 감압농축을 실시하여 농축잔사를 얻었다. 이렇게 얻은 농축잔사에 포함되어진 수분을 제거하기 위하여 EtOH 50mL을 사용하여 공비를 실시하였다. 공비까지 마친 농축잔사에 초기에 투입되어진 L-arabinose 대비 3배의 EtOH인 300mL을 사용하여 L-arabinose 제거를 실시하였다. EtOH가 투입된 농축잔사를 60°C에서 3시간 환류교반, 실온 서냉, 4°C에서 3시간 교반을 하여 결정을 유도하였다. 이렇게 생성된 결정을 여과하여 cake과 여액으로 분리를 하였다. 그 결과, EtOH 결정 cake은 99.8% HPLC 순도를 가진 L-arabinose가 회수되었다. 여액은 evaporator를 사용하여 60°C에서 감압농축을 실시하여 82.8% HPLC 순도(17.2% L-arabinose)를 가진 L-ribulose crude 23.65g을 확보하였다. 이렇게 1차 정제된 L-ribulose crude는 정제수에 녹인 다음 dowex monosphere 99CA resin을 사용하여 column을 실시하였다. 정제수를 사용하여 elution하여 15 mL씩 총 70 fraction을 회수하였다. HPLC 확인을 통하여 24 fraction에서부터 L-arabinose가 제거됨을 확인하고 24 ~ 70 fraction을 모아서 60°C에서 감압농축을 하였다. 그 결과, 97.5%의 L-ribulose yellow syrup 8.77g을 얻었다(Fig 1).

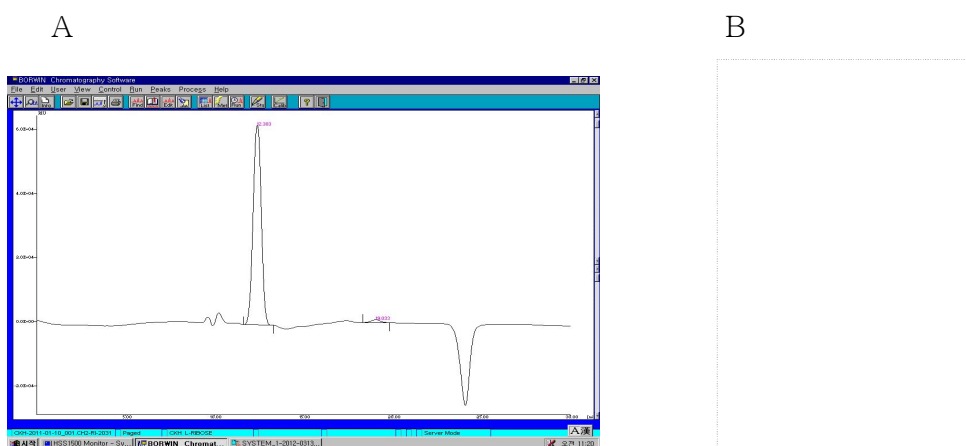


Fig 88. a. HPLC chromatogram of purified L-ribulose yellow syrup. **b.** Column purified L-ribulose yellow syrup.

또한 2배인 200g의 L-arabinose를 100 g/L L-arabinose, 5 g/L sonicated cell GTAI, D.W., 70°C 조건에서 효소 반응을 진행하여 19.7% 전환된 반응액을 만들었다. 이 반응액을 위의 방법과 동일하게 celite를 통과시켜 cell을 제거하고, 여과 여액을 농축하였다. 농축 잔사

에 EtOH 600mL을 사용하여 L-arabinose를 결정 유도 후 여과하여 98.7% HPLC 순도를 가진 L-arabinose를 cake으로 회수하고, 그 여액을 농축하여 81.8% HPLC 순도를 가진 L-ribulose crude를 51.52g을 확보하였다. 이 1차 정제된 L-ribulose crude를 dowex monosphere 99CA resin을 사용한 column을 실시하여 97.25%의 L-ribulose yellow syrup 19.02g을 얻었다.

100g과 200g L-arabinose scale로 whole cell GTAI 반응을 거쳐 L-ribulose로 전환반응을 시키면 평균 19.2%의 전환율을 보이고, L-ribulose는 1차 crude일 때 약 82.3% HPLC 순도에 L-arabinose 대비 24.71% 수율로 생성되며, dowex monosphere 99CA column을 통한 정제 결과, L-ribulose는 평균 약 97.38% HPLC 순도로 L-arabinose 대비 9.14% 수율을 보이는 것을 확인 하였다. L-ribulose의 반응 및 정제는 Fig 89와 같이 정리할 수 있다.

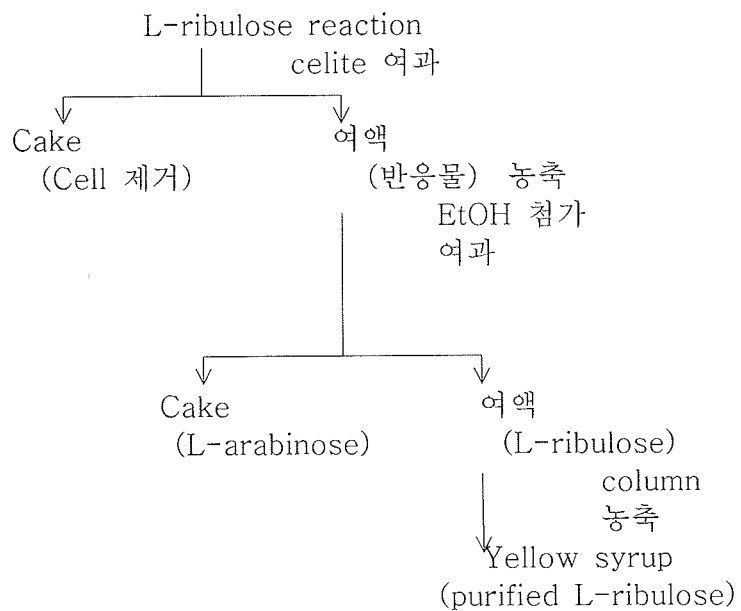


Fig 89. Scheme of L-ribulose production and purification.

그리고, 회수된 L-arabinose를 사용하여 반응에 다시 사용이 가능한지에 대한 실험을 하였다. 1차 wet whole cell GTAI 반응에 사용 후 회수된 L-arabinose를 반응에 다시 사용하면 원가 절감의 효과가 있다. 200g L-arabinose scale로 반응을 진행시킨 후 회수된 98.7% HPLC 순도를 가진 L-arabinose를 사용하여 2차 wet whole cell GTAI 반응을 실시하였다 (Fig 90, Table 27).

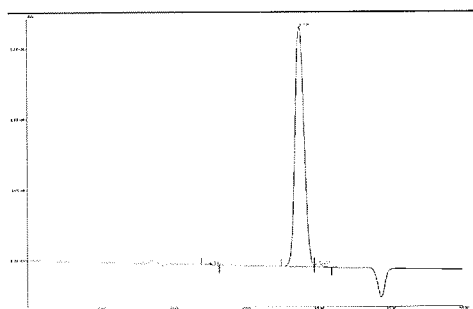


Fig 90. HPLC chromatogram of recovered L-arabinose.

Table 27. Composition of reaction mixture.

L-arabinose	40g
200g/L sonicated GTAI	10mL
최종 volume	400mL

100g/L L-arabinose가 되도록 하고 5g/L sonicated cell GTAI를 사용하여 1L round flask에서 egg bar로 교반을 주며 70°C가 유지된 상태로 water bath에서 반응을 진행하였다. 반응 진행 결과, 회수된 L-arabinose를 사용하여도 4시간이면 19.2%의 L-ribulose 전환율을 보였으며, 추가로 20시간까지 반응을 진행하여도 더 이상 반응이 진행되지 않고 유지됨을 확인하였다. 이로써 L-arabinose에 wet whole cell GTAI 반응으로 약 20%의 L-ribulose로 전환 후 반응하지 않고 남은 약 80%의 L-arabinose는 회수를 통하여 다시 반응에 사용이 가능함을 확인 할 수 있었다.

2. L-Ribose의 분리 정제 분리, 정제 및 결정화

G. thermodinitrificans mannose-6-phosphate isomerase(GTMPI) wet whole cell을 사용하여 L-ribulose로부터 L-ribose를 생산하였다. GTMPI를 400 g/L가 되도록 정제수에 녹인 후, 30분 동안 sonication을 통하여 cell을 파괴하였다. 이렇게 처리된 sonicated cell을 L-ribose 생성 반응에 사용하였다. L-ribulose는 자체 column 정제로 얻은 97.25% HPLC 순도를 가지는 L-ribulose yellow syrup을 사용하였다. 100 g/L L-ribulose, 25 g/L wet whole cell GTMPI, 1.0 mM 코발트(Co^{2+}) ion의 구성으로 반응액을 제조하였다(Table 28).

Table 28. Composition of reaction mixture.

L-ribulose	5 g	100g/L(0.67M)
400 g/L sonicated GTMPI	3.125 mL	25g/L
100mM Cobalt	0.5 mL	1.0mM
Total	50 mL	

위의 반응액을 250 mL round flask에서 egg bar를 사용하여 교반을 주며 40°C가 유지된 상태에서 water bath에서 반응하였다. 그 결과, 5 g L-ribulose로 반응 scale을 키워 wet whole cell GTMPI 반응을 진행하여도 문제없이 반응이 진행됨을 확인하였다. 최종 20시간 동안 전환반응을 진행시켜 68% L-ribose로의 전환율을 달성하였다. 이는 3.4 g L-ribose가 생성된 것이다(Fig 10).

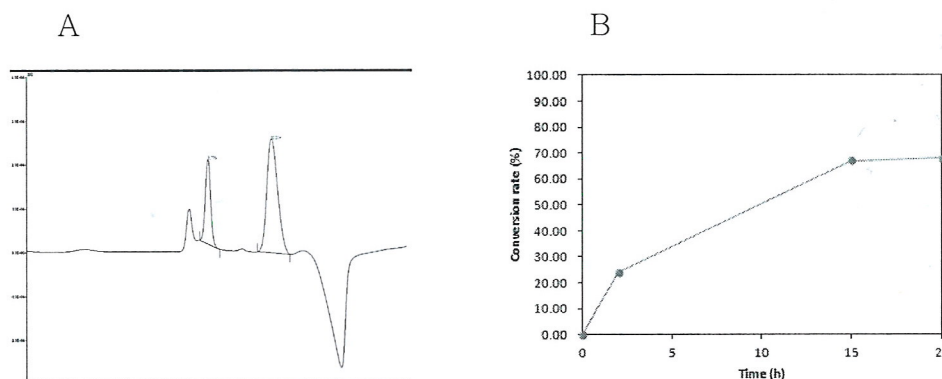


Fig. 91. a. HPLC chromatogram after GTMPI reaction completion. b. Time course of L-ribose production from 5 g scale L-ribulose.

반응이 완료된 반응액은 실온으로 냉각한 후 celite를 통과시켜 반응에 사용된 wet whole cell GTMPI를 제거하였다. cell이 제거된 여액은 evaporator를 사용하여 60°C에서 감압농축을 실시하여 농축잔사를 얻었다. 이렇게 얻은 농축잔사에 포함되어진 수분을 제거하기 위하여 EtOH 10 mL을 사용하여 공비를 실시하였다. 10 mL EtOH을 다시 투입하고 4°C로 냉각하여 결정을 유도하였다. 24시간 동안 결정을 유도하여도 결정의 생성을 확인 할 수 없었다. L-ribose seed를 더하여 24시간동안 4°C에서 결정을 추가적으로 유도하였으나 결정의 생성은 확인할 수 없었다. 이렇게 EtOH에 녹아있는 상태에서 다른 용매들(acetone, iso-propyl alcohol, n-hexane, ethyl acetate)을 각각을 첨가하여 L-ribose가 추출되도록 하였으나, 결정이 이루어지지 않고 엉킴 현상이 발생하였다. 또한 EtOH를 대신하여 초기부터 다른 용매들(acetone, iso-propyl alcohol, n-hexane, ethyl acetate)을 사용하고, 4°C로 냉각하여 결정을 유도하였다. 24시간 결정을 유도하여도 결정의 생성을 확인 할 수 없었으며, 농축잔사자체가 풀리지 않고 계속 엉킴현상이 발생하였다.

또, 100 g/L L-ribulose, 25 g/L wet whole cell GTMPI, 1.0 mM 코발트(Co^{2+}) ion의 구성으로 반응액 조건에서 10 g L-ribulose scale로 반응액을 만들고(Table 8), 500 mL round flask에서 egg bar를 사용하여 교반을 주며 40°C가 유지된 상태에서 water bath에서 반응을 진행하여도 문제없이 반응이 잘 진행되어 20시간 후에 69% L-ribose로 전환되어 6.9 g의 L-ribose가 생성되었음을 확인하였다.

Table 29. Composition of reaction mixture.

L-ribulose	10 g
400g/L sonicated GTMPI	6.25 mL
100mM Cobalt	1.0 mL
Total	100 mL

반응이 완료된 반응액은 실온으로 냉각한 후 celite를 통과시켜 반응에 사용된 wet whole cell GTMPI를 제거하였다. cell이 제거된 여액은 evaporator를 사용하여 60°C에서 감압농축을 실시하여 농축잔사를 얻었다. 이렇게 얻은 농축잔사를 정제수에 녹인 후 column용 시료로 준비하였다. 다음에 dowex monosphere 99CA resin을 사용하여 column을 실시하였다. 정제수를 사용하여 elution하여 총 65 fraction을 회수하였다. HPLC 분석을 통하여 fraction을 모은 결과, 4.5 g L-ribose의 순도는 80.9%까지 증가시킬 수 있었다. 이렇게 모은 fraction은 evaporator를 사용하여 60°C에서 감압농축을 실시하여 농축잔사를 얻었다. 이렇게 얻은 농축잔사에 포함되어진 수분을 제거하기 위하여 EtOH 20mL을 사용하여 공비를 실시하였다. 20mL EtOH을 다시 투입하고 4°C로 냉각하여 결정을 유도하였다. 24시간 동안 결정을 유도하여도 결정의 생성을 확인 할 수는 없었다. L-ribose seed를 더하여 24시간동안 4°C에서 결정을 추가적으로 유도하였음에도 L-ribose 결정의 생성은 확인할 수 없었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

구분 (연도)	과제구분	연구개발의 목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2009)	제 1 세부	Arabinan 분해 효소 특성 규명	100	- Arabinan 분해 효소 유전자의 클로닝 - Arabinan 분해 효소 정제 및 특성조사
		L-Ribose 생산 효소 확보	100	- L-Ribose 생산 효소 유전자의 클로닝 - L-Ribose 생산 효소 유전자의 고발현
	제 1 협동	L-Arabinose 생산 최적화	100	- Arabinan 분해 효소의 생산 - L-arabinose 생산 최적화
2차년도	제 1 세부	생물반응기에서 L-arabinose 생산	100	- 효소 반응조건 최적화 - 고정화 담체 선정 및 고정화 조건 최적화 - 생물반응기에서 작동 최적화
		L-Ribose 생산 효소 특성 규명	100	- 관련 효소 유전자 및 효소 확보 - 우수 효소 선별 - L-Ribose 생산 효소 특성 규명
	제 1 협동	L-Ribose 생산 최적화	100	- L-ribose 효소공정 최적화 - L-ribose 효소생산 최적화
3차년도	제 1 세부	Arabinan 분해 최적화	100	- Arabinan 분해 개량효소 최적화 - L-Arabinose 생산 효소 개량
		L-Ribose 생산 효소활성 향상	100	- 분자진화에 의한 L-ribose 생산 효소 개량 - 분자모델링에 의한 L-ribose 생산 효소 개량
	제 1 협동	L-Ribose 생산 향상	100	- 고정화 효소를 이용한 L-ribose 생산 향상 - 생물반응기에서 L-ribose 대량 생산
		L-Ribose 정제	100	- L-Ribose의 정제 최적화 - 시제품생산

제 2 절 정량적 목표의 달성도

항목	목표	결과
효소 유전자의 클로닝	Arabinan 분해 및 L-ribose 생산 효소: 각각 5 건 이상	1. Endo-arabinanase from <i>Bacillus licheniformis</i> . 2. Endo-arabinanase from <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> 3. Alpha-L-arabinofuranosidase from <i>C. saccharolyticus</i> . 4. L-Arabinose isomerase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 5. L-Arabinose isomerase from <i>G. thermodenitrificans</i> 6. L-Arabinose isomerase from <i>Thermotoga neopolitana</i> . 7. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>B. subtilis</i> 8. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>G. thermodenitrificans</i> 9. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>Thermus thermophilus</i> 10. Mannose-6-phosphate isomerase R142N from <i>Thermus thermophilus</i> 11. Mannose-6-phosphate isomerase W17Q N90A L129F from <i>G. thermodenitrificans</i>
효소 특성 조사	Arabinan 분해 및 L-ribose 생산 효소: 각각 3 건 이상	1. Endo-arabinanase from <i>Bacillus licheniformis</i> . 2. Endo-arabinanase from <i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> 3. Alpha-L-arabinofuranosidase from <i>C. saccharolyticus</i> . 4. L-Arabinose isomerase from <i>G. thermodenitrificans</i> 5. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>B. subtilis</i> 6. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>G. thermodenitrificans</i> 7. Mannose-6-phosphate isomerase from <i>Thermus thermophilus</i> 8. Mannose-6-phosphate isomerase R142N from <i>Thermus thermophilus</i> 9. Mannose-6-phosphate isomerase W17Q N90A L129F from <i>G. thermodenitrificans</i>
효소 specific activity - L-Arabinofuranosidase - Endo-arabinanase - L-Arabinose isomerase - Mannose-6-phosphate isomerase	10 U/mg 이상 10 U/mg 이상 130 mM ⁻¹ min ⁻¹ 이상 60 mM ⁻¹ s ⁻¹ 이상	28 U/mg 11 U/mg 130 mM ⁻¹ min ⁻¹ 1120 mM ⁻¹ s ⁻¹
생산 - L-Arabinose - L-Ribose	50 g/L 이상 90 g/L L-ribose 이상 농도, 전환 수율 25% 이상, 생산성 10 g L ⁻¹ h ⁻¹ 이상	16 g/L L-Ribulose로부터: 210 g/L, 전환 수율 70%, 생산성 210 g L ⁻¹ h ⁻¹ L-Arabinose로부터: 118 g/L, 전환 수율 24%, 생산성 39 g L ⁻¹ h ⁻¹
생산 - L-Arabinose - L-Ribose	정제 수율 80% 이상 정제 수율 60% 이상	정제 수율 37% 정제 수율 80%
시제품생산	시제품 생산	97.5%의 L-ribulose 19 g 80.9%의 L-ribose 5.5 g

제 3 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 본 과제에서 개발되는 신규 기능성 소재 발굴기술, 바이오매스의 가수분해 기술, 효소의 분자진화기술, 효소구조 변형기술, 미생물 배양 기술, 효소 생산기술, 효소의 분리정제기술, 효소 고정화기술, 생물반응기의 개발기술, 기능성 당 정제 기술 등의 생물공학의 핵심 기술은 다른 생물소재 개발에 활용할 수 있고 다른 기능성 당 생산에도 활용될 수 있음.
- BT의 효소진화기술과 NT가 결합된 효소 구조 변형기술에 접합된 기능성 바이오 신소재 생산기술은 핵심적 원천기술로 다른 효소 및 바이오 기능성 신소재 개발에 광범위하게 활용됨.
- 대부분의 의약품은 당을 포함하고 있고 이러한 당을 본 과제를 통하여 개발된 L-arabinose나 L-ribose를 그 유도체로 대체함으로써 신규 의약품 개발이 가능하며, 또한 생산과정 중에 개발된 효소들은 다른 기능성 소재나 고가 의약품 개발에 직접 사용될 수 있음.
- 고정화 효소를 이용하여 생물반응기로 L-arabinose와 L-ribose를 생산하면 소규모 장치에서 연속적인 생산을 할 수 있으므로 높은 생산성을 기대할 수 있고 경제적인 녹색성장 기술임. 생물전환법은 화학합성법보다 생산성이 높고 부산물이 적고 정제가 용이하며 우수한 품질의 기능성 당을 값싸게 공급할 수 있어 가격 및 품질 경쟁력이 있음. 산업화되면 향후 세계시장을 주도할 수 있고 국내 시판은 물론 수출도 가능해져서 산업발전에 이바지할 수 있음. 아울러 기존 발효 공장과 달리 소규모 생물반응기(컬럼)와 간단한 정제설비로 생산이 가능하여 중소기업에 의한 산업화도 가능함.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구개발성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 생산 수입 관매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						2		
	달성	1						2		
2차년도	목표	2	1				1	3		
	달성	4	0				1	4		
3차년도	목표	2	2				1	4		
	달성	1	3				1	3		
계	목표	5	3				2	9		
	달성	6	3				2	9		

2. 논문게재 성과

1. M. R. Hong, C. S. Park, D. K. Oh Characterization of a thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinanase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol. Lett.* **31(9)**, 1439-1443 (2009) (IF=1.768)
2. S. J. Yeom, N. H. Kim, C. S. Park, D. K. Oh. L-Ribose production from L-arabinose by using purified L-arabinose isomerase and mannose-6-phosphate isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75(21)**, 6941-6943 (2009) (IF=3.778)
3. E. S. Seo, Y. R. Lim, Y. S. Kim, C. S. Park, D. K. Oh. Characterization of a recombinant endo-1,5-alpha-L-arabinanase from the isolated bacterium *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Biopro. Eng.* **15(4)**, 590-594 (2010) (IF=1.004)
4. Y. R. Lim, R. Y. Yoon, E. S. Seo, C. S. Park, D. K. Oh. Hydrolytic properties of a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* **109(4)**, 1188-1197 (2010) (IF=3.778)
5. S. J. Yeom, E. S. Seo, B. N. Kim, Y. S. Kim, D. K. Oh. Characterization of a mannose-6-phosphate isomerase from *Thermus thermophilus* and increased L-ribose production by its R142N mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **77(3)**, 762-767 (2011) (IF=3.778)
6. Y. R. Lim, S. J. Yeom, Y. S. Kim, D. K. Oh. Synergistic production of L-arabinose from arabinan by the combined use of endo- and exo-arabinanases from

Caldicellulosiruptor saccharolyticus. *Bioresor. Technol.* **102(5)**, 4277-4280 (2011)
(IF=4.365)

7. S. J. Yeom, Y. S. Kim, Y. R. Lim, K. W. Jeong, J. Y. Lee, Y. Kim, D. K. Oh.
Molecular characterization of a novel thermostable mannose-6-phosphate
isomerase from *Thermus thermophilus*. *Biochimi.* **93(10)**,1659-1667 (2011)
(IF=3.787)
8. Y. S. Kim, Y. R. Lim, S. J. Yeom, D. K. Oh. L-Arabinose production from sugar
beet arabinan by immobilized endo- and exo-arabinanases from
Caldicellulosiruptor saccharolyticus in a packed-bed reactor. *J. Biosci. Bioeng.*
113(2), 239-241 (2012) (IF=1.707)
9. Y. R. Lim, S. J. Yeom, D. K. Oh. Production of L-ribose from L-ribulose by a
triple-site variant of mannose-6-phosphate isomerase from *Geobacillus*
thermodenitrificans. *Appl. Environ. Microbiol.* (2012) **78(11)**, 3880-3884
(IF=3.778)

3. 특허 성과

출원

1. 오덕근, 염수진, “만노스-6-인산 이성화효소를 이용하여 엘-리보스를 제조하는 방법”, 한국특허 출원번호 10-2009-0101300 (2009) 10월 23일
2. 오덕근, 임유리, “신규한 알파-엘-아라비노푸라노시데이즈 및 그 효소를 이용한 반섬유소 아라비난으로부터 아라비노스의 제조 방법” 한국특허 출원번호 10-2010-0047986 (2010) 5월 24일
4. 오덕근, 염수진, “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 및 그 변이체 및 그 용도”, 한국특허 출원번호 10-2010-0062366 (2010) 6월 29일
5. 오덕근, 염수진, “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 및 그 변이체 및 그 용도”, 한국특허 출원번호 10-2010-0067901 (2010) 7월 4일
6. 오덕근, 서은선, 임유리 “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 돌연변이체 및 그 용도” 한국특허 출원번호 10-2010-0103592 (2010) 10월 22일
7. 오덕근, 염수진, “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 및 그 변이체 및 그 용도”, PCT 출원번호 KR2010/007295 (2010) 10월 22일
8. 오덕근, 김영수, “고정화 효소 알파-엘-아라비노푸라노시데이즈와 엔도-1,5-알파-엘-아라비난에이즈 함유 생물반응기에서 엘-아라비노스의 제조 방법” 한국특허 출원번호 10-2011-0016538 (2011) 2월 24일
9. 오덕근, 임유리, “지오바실러스 썬모디니트리피칸스 만노스-6-인산 이성화효소의 변이체 및 이를 이용한 엘-리보스 생산방법” 한국특허 출원번호 10-2011-0049206 (2011) 5월 24일

등록

1. 오덕근, 염수진, “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 및 그 변이체 및 그 용도”, 한국특허 등록번호 10-1063960 (2011) 9월 2일
2. 오덕근, 염수진, “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 및 그 변이체 및 그 용도”, 한국특허 등록번호 10-1063961 (2011) 9월 2일
3. 오덕근, 염수진, “두 단계 효소반응에 의한 엘-아라비노스로부터 엘-리보스의 생산방법”, 한국특허 등록번호 10-1081604 (2011) 11월 2일
4. 오덕근, 서은선, 임유리 “신규한 만노스-6-인산 이성화효소 돌연변이체 및 그 용도” 한국 특허 등록번호 10-1155507 (2012) 6월 5일

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획

1) 산업화 방향

- L-Arabinose와 L-ribose는 현재 화학합성법 생산되고 있는데 이 방법은 많은 양의 에너지를 소모할 뿐만 아니라 산 및 고온에 견딜 수 있는 고가의 생산장비를 필요로 하며 또한 이때 발생하는 폐기물의 처리비용 등으로 인하여 생산단가가 높아질 뿐만 아니라 열처리 과정에서 원치 않는 부산물의 생성을 초래하며 정제를 어렵게 만드는 요인으로 작용함. L-Arabinose와 L-ribose는 환경문제등을 고려했을 때 친환경적인 방법의 청정 기술 개발로 산업화를 해야 함.
- 생물학적 공정의 산업화를 위해 높은 활성 효소의 발굴 및 개량, 효소 대량 생산을 통한 효소 확보의 비용 절감, 특히 효소 고정화를 통한 생물반응기의 연속 생산 공정의 확립으로 생산하여 L-arabinose와 L-ribose의 생산 경제성 확보하는 방향으로 산업화해야 함.
- 많은 연구팀이 바이오매스 중 섬유포에서 바이오에너지 생산 공정에 주력하고 있어 반섬유포의 활용성을 높인다면 상승효과가 있어 바이오매스 활용을 최대화하는 방향으로 산업화 수행함. L-arabinose는 일반적으로 미생물이 에탄올 발효에 잘 이용하지 못하므로 반섬유포로부터 효소법으로 반섬유포의 걸가지를 구성하고 있는 L-arabinose를 생산하고 고가의 기능성 단당 L-ribose를 친환경적으로 생산함. 또한 이과정 중에 생산된 L-arabinose만의 제거된 반섬유포를 바이오 에너지 생산 원료로 이용하면 농산물 바이오매스로부터 부가가치 창출이 가능해져 농가소득 증대에 크게 기여할 수 있음.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : \$1000)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과 (매출액)		450 (1 ton)	1,350 (3 ton)	2,250 (5 ton)	3,600 (8 ton)	6,300 (14 ton)	13,950 (31 ton)
경제적 파급효과 (영업이익)		150	450	750	1,200	2,100	4,650
부가가치 창출액		300	900	1,500	2,400	4,200	9,300
합 계		900	2,700	4,500	7,200	12,600	27,900

- ※ 직접 경제효과 : L-Ribose 판매단가를 \$450/kg이고 환율을 1,360원/\$일때 단가 750000원/kg을 기준
- ※ 경제적 파급효과 : Sugar beet arabinan의 10%가 L-arabinose이고, Sugar beet arabinan에서 L-arabinose 회수율이 85%, L-arabinose에서 L-ribose 회수율이 recycling 3번 기준으로 58% (1회 25%, 2회 19%, 3회 14%)이고 정제수율이 70%이면 최종수율은 3.45%.
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화가 되면 90% 정도는 수출을 할 것이고 생물학적 방법으로 청정이미지와 기술력의 효과 등으로 브랜드가치가 높아지고 개발된 기술은 다른 기능성 당 생산에 적용되고 개발된 효소는 다른 의약품 개발에도 사용될 수 있음. 또한, L-ribose는 항바이러스제 원료의약품으로 사용되고 있으나 공급에 한계가 있으므로 부가가치 창출은 직접 경제효과에 2배 정도는 될 것으로 생각됨.

2. 추가연구, 타연구에 활용 계획

(1) 추가연구

- Pilot 규모에서 원료인 sugar beet arabinan으로부터 L-arabinose를 생산하고 간이 정제하여 생물전환법으로 L-ribose를 생산하고 정제하는 생산 전과정의 scale-up 연구를 수행하여 사업화 가능성을 조사함.

(2) 타연구에 활용

- 반섬유소 내의 L-arabinose는 반섬유소의 결가지에 알파 결합으로 이루어져있어 L-arabinose만 효소적 분해가 가능하고 처리 후의 L-arabinose만의 제거되는 방법으로 L-arabinose를 생산하고 이 기술을 바이오에너지 생산 연구에 활용하여 L-arabinose가 제거된 반섬유소를 바이오 에탄올 생산에 더 효율적으로 이용 할 수 있음. 그 결과 바이오 매스 자원 중에 높은 비율을 차지하는 반섬유소의 활용성을 증진시킴.
- 본 과제에서 개발되는 신규 기능성 소재 발굴기술, 바이오매스의 가수분해 기술, 효소의 분자진화기술, 효소구조 변형기술, 미생물 배양 기술, 효소 생산기술, 효소의 분리정제기술, 효소 고정화기술, 생물반응기의 개발기술, 기능성 당 정제 기술 등의 생물공학의 핵심 기술은 다른 생물소재 개발에 활용할 수 있고 다른 기능성 당 생산에도 활용될 수 있음.
- BT의 효소진화기술과 NT가 결합된 효소 구조 변형기술에 접합된 기능성 바이오 신소재 생산기술은 핵심적 원천기술로 다른 효소 및 바이오 기능성 신소재 개발에 광범위하게 활용될 수 있음.
- 대부분의 의약품은 당을 포함하고 있고 이러한 당을 본 과제를 통하여 개발된 L-arabinose나 L-ribose를 그 유도체로 대체함으로써 신규 의약품 개발이 가능하며, 또

한 생산과정 중에 개발된 효소들은 다른 기능성 소재나 고가 의약품 개발에 활용될 수 있음.

제 7 장 참고문헌

- Beldman G, Schols HA, Piston SM, Searle-van Leeuwen MJF, Voragen AGJ (1997) Arabinans and arabinan degrading enzyme. *Adv Macromol Carbohydr Res* 1:1-64
- Birgisson H, Fridjonsson O, Bahrani-Mougeot FK, Hreggvidsson GO, Kristjansson JK, Mattiasson B (2004) A new thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from a novel thermophilic bacterium. *Biotechnol Lett* 26:1347-1351
- Canakci S, Belduz AO, Saha BC, Yasar A, Ayaz FA, Yayli N (2007) Purification and characterization of a highly thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Geobacillus caldoxylolyticus* TK4. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:813-820
- Canakci S, Kacagan M, Inan K, Belduz AO, Saha BC (2008) Cloning, purification, and characterization of a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari. *Appl Microbiol Biotechnol* 81:61-68
- Cho BH, Kim JH, Jeon HB, Kim KS (2005) A new efficient and practical synthesis of 2-deoxy-L-ribose *Tetrahedron* 61:4341-4340
- Cho EA, Lee DW, Cha YH, Lee SJ, Jung HC, Pan JG, Pyun YR (2007) Characterization of a novel D-lyxose isomerase from *Cohnella laevoribosii* RI-39 sp. nov. *J. Bacteriol.* 189:1655-1663
- De Muyneck C, Van der Borght J, De Mey M, De Maeseneire SL, Van Bogaert IN, Beauprez J, Soetaert W, Vandamme E (2007) Development of a selection system for the detection of L-ribose isomerase expressing mutants of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1051-1057
- Dische Z, Borenfreund E (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192:583-587
- Debeche T, Bliard C, Debeire P, O'Donohue MJ (2002) Probing the catalytically essential residues of the alpha-L-arabinofuranosidase from *Thermobacillus xylanilyticus*. *Protein Eng* 15:21-28
- Dunkel MPH, Amadó R (1994) Purification and physico-chemical properties of an endo-1,5-alpha-L-arabinanase (EC 3.2.1.99) isolated from an *Aspergillus niger* pectinase preparation. *Carbohydr Polym* 24:247-263
- Helanto M, Kiviharju K, Granstrom T, Leisola M, Nyysola A (2009) Biotechnological production of L-ribose from L-arabinose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:77-83
- Hong MR, Park CS, Oh DK (2009) Characterization of a thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinanase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *Biotechnol Lett* 31:1439-1443
- Leal TF, de Sa-Nogueira I (2004) Purification, characterization and functional analysis of an endo-arabinanase (AbnA) from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 241:41-48
- Lim YR, Yoon RY, Seo ES, Kim YS, Park CS, Oh DK (2010) Hydrolytic properties of a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *J Appl Microbiol* 109:1188-1197
- Mizanur RM, Takata G, Izumori K (2001) Cloning and characterization of a novel gene

- encoding L-ribose isomerase from *Acinetobacter* sp. strain DL-28 in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1521:141-145
- Miyazaki K (2005) Hyperthermophilic alpha-L-arabinofuranosidase from *Thermotoga maritima* MSB8: molecular cloning, gene expression, and characterization of the recombinant protein. *Extremophiles* 9:399-406
- Morana A, Paris O, Maurelli L, Rossi M, Cannio R (2007) Gene cloning and expression in *Escherichia coli* of a bi-functional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinosidase from *Sulfolobus solfataricus* involved in xylan degradation. *Extremophiles* 11:123-132
- Okano K (2009) Synthesis and pharmaceutical application of L-ribose. *Tetrahedron* 65:1937-1949
- Osaki S, Kimura T, Sugimoto T, Hizukuri S, Iritani N (2001) L-Arabinose feeding prevents increases due to dietary sucrose in lipogenic enzymes and triacylglycerol levels in rats. *J Nutr* 131:796-799
- Park CS, Yeom SJ, Lim YR, Kim YS, Oh DK (2010) Substrate specificity of a recombinant D-lyxose isomerase from *Serratia proteamaculans* that produces D-lyxose and D-mannose. *Lett. Appl. Microbiol.* 51:343-350
- Pei J, Shao W (2008) Purification and characterization of an extracellular alpha-L-arabinosidase from a novel isolate *Bacillus pumilus* ARA and its over-expression in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:115-121
- Saha BC (2000) Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18:403-423
- Santa H, Kammonen J, Lehtonen O, Karimaki J, Pastinen O, Leisola M, Turunen O (2005) Stochastic boundary molecular dynamics simulation of L-ribose in the active site of *Actinoplanes missouriensis* xylose isomerase and its Val135Asn mutant with improved reaction rate. *Biochim. Biophys. Acta* 1749:65-73
- Seri K, Sanai K, Matsuo N, Kawakubo K, Xue C, Inoue S (1996) L-Arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism* 45:1368-1374
- Shallom D, Shoham Y (2003) Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol* 6:219-228
- Takao M, Akiyama K, Sakai T (2002a) Purification and characterization of thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinase from a strain of *Bacillus thermodenitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 68:1639-1646
- Takao M, Yamaguchi A, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T (2002b) Molecular cloning of the gene encoding thermostable endo-1,5-alpha-L-arabinase of *Bacillus thermodenitrificans* TS-3 and its expression in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:430-433
- Voragen AGJ, Rombouts FM, Searle-van Leeuwen MJF, Schols HA, Pilnik W (1987) The degradation of arabinans by endo-arabinase and arabinofuranosidases purified from *Aspergillus niger*. *Food Hydrocolloids* 1:423-437
- Woodyer RD, Wymer NJ, Racine FM, Khan SN, Saha BC (2008) Efficient production of L-ribose with a recombinant *Escherichia coli* biocatalyst. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2967-2975