微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn

OCT 20, 2008, 35(10): 1626~1632
© 2008 by Institute of Microbiology, CAS

专论与综述

微生物来源的 L-阿拉伯糖异构酶的研究进展及应用前景

程丽芳　沐万孟　张　涛　江　波*

(江南大学食品科学与技术国家重点实验室　无锡　214122)

摘　要: L-阿拉伯糖异构酶(L-AI)能分别催化L-阿拉伯糖和D-半乳糖异构为L-核酮糖和D-塔格糖，它是目前生物法生产新型功能性因子 D-塔格糖最为有效的酶。近年来，L-AI 的结构已被揭晓，其基因已获得克隆、测序和过量表达，经过蛋白质工程改造的 L-AI 将是未来工业化生产 D-塔格糖的主要用酶。本文综述了近年来国外对 L-AI 的结构与功能、催化机理、酶学性质及应用于 D-塔格糖生产方面的研究状况，并展望了其发展前景。

关键词: L-阿拉伯糖异构酶, D-塔格糖，结构与功能，酶学性质，基因工程

Research Progress on the Microbial L-Arabinose Isomerase

CHENG Li-Fang　MU Wan-Meng　ZHANG Tao　JIANG Bo*

(*State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University*, *Wuxi* 214122)

Abstract: L-arabinose isomerase (L-AI) can isomerize L-arabinose and D-galactose into L-ribulose and D-tagatose, respectively, which is currently the most effective biological catalyst for D-tagatose production. The crystal structure of L-AI has been solved recently and its gene has been cloned, sequenced and overexpressed. L-AI improved by protein engineering will be the dominant enzyme for industrial production of D-tagatose. This paper reviewed researches on protein structure and function, properties and application in D-tagatose production of L-AI, and the long-term potential development of L-AI was prospected.

Keywords: L-arabinose isomerase, D-tagatose, Structure and function, Enzyme properties, Genetic engineering

L-阿拉伯糖异构酶(EC 5.3.1.4, L-arabinose isomerase, L-AI)不仅催化 L-阿拉伯糖异构为 L-核酮糖还能催化 D-半乳糖生成 D-塔格糖(见图 1)。D-塔格糖是近年发现的一种具有特殊保健功能的新型甜味剂，甜度与蔗糖相似，并具有低能量、改善肠道菌群、降低血糖、抗龋齿等功能[1]。2000 年美国食品与药物管理局(FDA)确定 D-塔格糖为普遍公认安全食品(GRAS)，并正式批准作为甜味剂用于食品饮料业以及医药制剂中；随后联合国粮农组织和世界卫生组织联合食品添加剂委员会(JECFA)第 57 次会议批准 D-塔格糖作为食品添加剂；欧盟也于 2003 年批准 D-塔格糖在欧洲上市[2]。L-AI 是生物转化生产 D-塔格糖最有效的酶，因此通过 L-AI 实现 D-塔格糖的产业化生产正成为人们研究的热点。

基金项目：国家“十一五”高技术研究发展计划(“863 计划”)资助项目(No. 2006AA10Z334)
*通讯作者：Tel: 0510-85327332; ✉: bjiang@jiangnan.edu.cn
收稿日期：2008-03-26；接受日期：2008-05-14
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

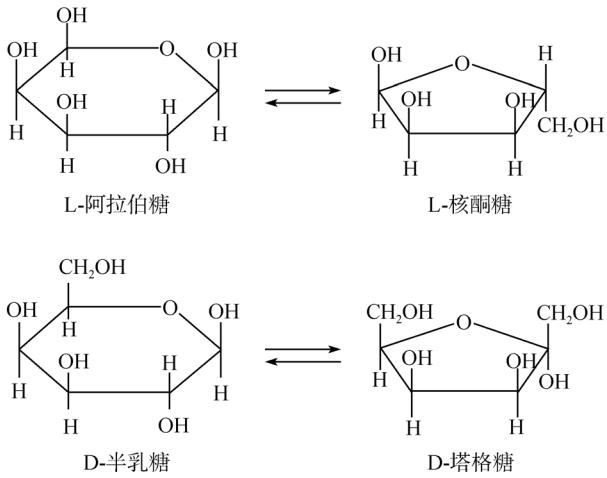

图 1　L-AI 催化的异构化反应
Fig. 1　Isomerizations catalysed by L-AI

1　L-AI 的结构

目前，已经知道大约近百种微生物来源的 L-AI 的氨基酸序列，这些序列大约具有 20%到 80%或更高的同源性。尽管 L-AI 已经被研究数十年，但其晶体结构直至最近才被解析出来[3]。大肠杆菌 L-AI 晶体结构显示(见图 2a)，其单体含有 498 个氨基酸残基，由 16 个 β 折叠和 17 个 α 螺旋构成，可分为 3 个结构域：N-端结构域(1-176 AA)、中间结构域(177-327 AA)和 C-端结构域(328-498 AA)。大肠杆菌 L-AI 需要在三聚体条件下才能发挥活性，该三聚体的外表面显示 3 个等价的裂口，每个裂口分别有 1 个亚基的 C-端结构域和中间结构域与另一个亚基的 N-端结构域构成，裂口内表面氨基酸残基分别包括：C-端结构域 M351、I373、Y335 和 H449，中间结构域的 M185 和 F279，以及 N-端结构域 H128、Q125、Y19、L18 和 Q16。在不同微生物来源 L-AI 的氨基酸序列中这些残基具有很强的保守性，并多位于一个环区域，表明其可能为调节结构以调节活性位点中底物进入和产物释放时的立体结构。晶体结构还显示，大肠杆菌 L-AI 酶活性中心包括 E306、E333、H350 和 H450 等氨基酸残基(见图 2b)，这些氨基酸的保守性更强。

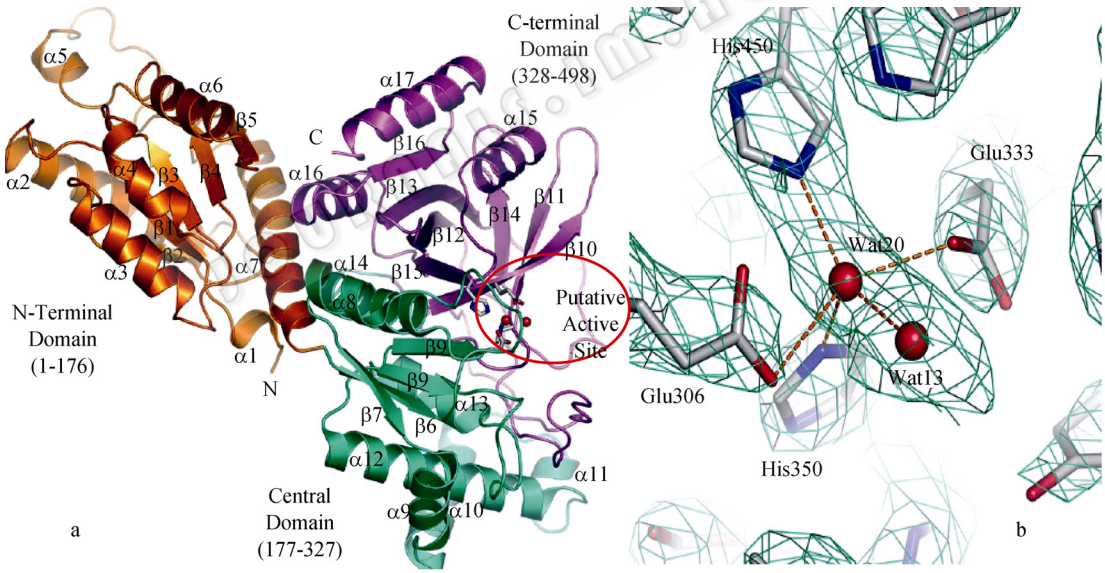

图 2　大肠杆菌 L-AI 的晶体结构(a)与活性中心(b)[3]
Fig. 2　Crystal Structure (a) and active site (b) of *Escherichia coli* L-AI[3]

2　L-AI 的催化机理

根据晶体结构数据，可以推测大肠杆菌 L-AI 的催化 D-半乳糖生成 D-塔格糖原理可能是烯二醇中间产物机制[3]，如图 3。图 2(b)中 Glu306 的 $O^{\varepsilon 2}$ 亲核进攻 D-半乳糖 C-2 的氢原子使其去质子化，形成碳碳双键，碳氧双键断裂，形成氧负离子，氧负离子结合质子，最终形成 ene-diol(烯二醇)中间体；Glu333 的 $O^{\varepsilon 2}$ 亲核进攻 D-半乳糖 C-2 的羟基氢，生成 C-2 位置的碳氧双键，C-1 与 C-2 之间的碳碳双键断裂，生成碳负离子，结合质子，最终生成 D-塔格糖。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

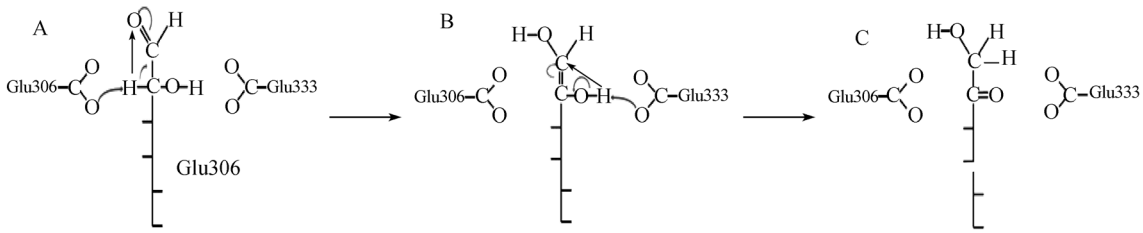

图 3 L-AI 酶反应机理—烯二醇中间体反应机理

Fig. 3 Catalytic mechanism of L-AI—ene-diol intermediate

3 微生物来源的 L-AI 及其酶学性质

3.1 微生物来源的 L-AI

研究发现，L-AI 广泛存在于各种微生物中，如常温微生物、嗜热微生物、嗜酸微生物、甚至一些极端微生物中。这些 L-AI 的酶学性质相差很大。表 1 给出了目前已报道的用于转化生成 D-塔格糖的各种微生物来源的 L-AI 的酶学性质比较。

表 1 不同微生物来源的 L-AI 及其相关生化性质

Table 1 Biochemical properties of L-AIs from different microorganisms

L-AI 的微生物来源 Microbial origin of L-AI	最适温度 Optimum temperature(°C)	最适 pH Optimum pH	半衰期 Half life(min)	金属离子 Metal ion
Aerobacter aerogenes[4]	50	6.4~6.9	NR	Mn^{2+}
Alicyclobacillus acidocaldarius[5]	65	6.0	NR	Mn^{2+}
Bacillus halodurans[6]	50	7.5~8.0	20 (70°C)	Mn^{2+}
B. stearothermophilus US100[7]	80	7.5~8.0	110 (75°C)	No
Escherichia coli[8]	30	8.0	60 (50°C)	Fe^{2+}, Mn^{2+}
Geobacillus stearothermophilus T6[6]	70	7.0~7.5	52 (80°C)	Mn^{2+}
G. stearothermophilus[9]	65	8.5	17 (70°C)	Mn^{2+}
G. thermonitrificans[10]	70	8.5	42 (75°C)	Mn^{2+}
Lactobacillus gayonii[11]	30~40	6.0~7.0	NR	Mn^{2+}
Lactobacillus plantarum[12]	50	7.0	NR	Mn^{2+}
Mycobacterium smegmatis[13]	45	7.0~7.5	10 (45°C)	Mn^{2+}
Thermoanaerobacter mathranii[14]	65	8.0	NR	Mn^{2+}
Thermotoga neapolitana[15]	85	7.0	120 (90°C)	Mn^{2+}, Co^{2+}
T. maritima[16]	90	7.0~7.5	185 (90°C)	Mn^{2+}, Co^{2+}
Thermus sp.[17]	60	8.5	NR	Mn^{2+}

Note: NR: Not reported

3.2 L-AI 的酶学性质

3.2.1 L-AI 反应最适温度：L-AI 多来源于常温微生物，其反应最适温度大都在 30°C~50°C 之间，如 *Aerobacter aerogenes*[4], *Bacillus halodurans*[6], *Escherichia coli*[8], *Lactobacillus gayonii*[11], *Lactobacillus plantarum*[12] 和 *M. smegmatis*[13]；嗜热微生物来源的 L-AI 的最适温度集中在 60°C~80°C 之间，如 *B. stearothermophilus*[7], *Geobacillus stearothermophilus*[6,9], *G. thermodenitrificans*[10,18], *Thermus* sp.[17]和 *Thermoanaerobacter mathranii*[14]；极端嗜热微生物，如 *Thermotoga neapolitana*[15] 和 *T. maritima*[16]的 L-AI 的最适反应温度则在 85°C~90°C 之间。

反应温度是生物催化醛酮糖异构反应中一个非常重要的参数。D-半乳糖与 D-塔格糖之间的异构反应的平衡受温度影响较大，反应温度越高，反应速度就越快；较高温条件下(60°C 以上)更有利于 D-塔格糖的生成[19]，因此可以降低 D-塔格糖的生产成本和提高产物产量。但是，反应温度超过 80°C 时，容

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

易促使褐变反应, 因此适合工业化生物转化生产 D-塔格糖的反应温度通常在 60°C~70°C 之间。

在葡萄糖异构酶法生产高果糖浆研究中, 通过蛋白质工程技术提高酶的最适反应温度和高温耐热性一直是研究的重点。而在 L-AI 的蛋白质工程研究中, Kim[20]等通过 Error-Prone PCR 获得的源自 *Geobacillus stearothermophilus* L-AI 三点突变酶(M322V、T393A 和 V408A), 其最适反应温度从野生型的 60°C 提高到 65°C, 在 70°C 时其活性是野生型的 3.64 倍。由此可见突变酶的最适反应温度和热稳定性都得到了显著提高。同时, 一些嗜热菌和极端嗜热菌野生酶的最适温度和高温耐热性已经相当高, 具备工业化生产 D-塔格糖的潜力。

3.2.2 L-AI 反应最适 pH 值：来源于不同微生物的 L-AI 的最适 pH 都在 6.0~8.5 之间, 并且大部分集中在中性偏碱 7.0~8.0 之间。其中只有 *Alicyclobacillus acidocaldarius*[5]的 L-AI 的最适 pH 为 6.0, 而 *G. stearothermophilus*[9], *G. thermodenitrificans*[10,18] 和 *Thermus* sp.[17]的为 8.5。

D-塔格糖工业生产通常以乳糖为廉价原料, 经过 pH 5.0~6.0 条件下酶解成半乳糖, 再异构化为 D-塔格糖, 而乳糖酶解的最适 pH 为 5.0~6.0, L-AI 最佳 pH 大多为 7.0~8.5。D-塔格糖的工业生产要求 L-AI 最适反应 pH 值最好为 5.0~6.0 之间, 因为在偏酸性条件可以减少非特异性副反应、可以减少褐变反应, 并实现与乳糖水解同 pH 条件, 降低生产成本[19]。

通过比较研究嗜酸菌 *Alicyclobacillus acidocaldarius*、中性菌 *Geobacillus stearothermophilus* 与嗜碱菌 *Bacillus halodurans* 三种种属的 L-AI(其最适 pH 分别是 6.0、7.0~7.5 和 7.5~8.0)的氨基酸序列, Lee 推测在 *Alicyclobacillus acidocaldarius* 与 *Bacillus halodurans* 种属 L-AI 分子中, 影响酶最适反应 pH 的重要氨基酸残基分别为 K269 与 E268[5]。如果将 *Alicyclobacillus acidocaldarius* L-AI 的碱性氨基酸 K269 突变成酸性氨基酸 Glu, 其最适 pH 值由 6.0 变成 7.0; 而将 *Bacillus halodurans* L-AI 的 E268 突变为 Lys, 其最适 pH 值由 8.0 变成 7.0。说明该位置氨基酸残基若具有带正电荷的侧链, 有利于促使 L-AI 在较低 pH 条件下反应。

Oh[21]等研究表明, *Geobacillus stearothermophilus* L-AI 分子中 V408 对于酶最适 pH 和酶活性具有重要的影响。V408Q 和 V408R 两个单突变体酶的最适 pH 由野生酶的 8.5 降低至 7.5, 同时该两个突变体酶在 pH 7.5 时的活性比野生酶在 pH 8.5 时的活性分别高 60%和 30%。可能是 V408 在空间结构中接近酶活性中心, 若将该非极性氨基酸突变成极性或带有正电荷的氨基酸, V408 残基位置的电场改变, 促使临近的酶活性中心微环境比周边更显碱性, 从而有利于酶在低 pH 值条件下发生反应。

3.2.3 金属离子与 L-AI：金属离子是单糖异构酶重要的辅因子, 对于醛酮糖异构酶蛋白空间结构的稳定具有重要作用, 它通常结合在酶的活性中心。L-AI 与其他醛酮糖异构酶一样, 发挥酶活通常需要金属离子的参与。研究表明, Mn^{2+}和/或 Co^{2+}对于很多 L-AI 发挥活性和维持热稳定性是必需的。Lee[22]等研究了二价金属离子 Mn^{2+}对 L-AI 的催化作用和酶蛋白结构的影响, 发现 Mn^{2+}的存在对 L-AI 是必需的, 并证实了在较高温条件下金属离子的存在可以使耐热酶蛋白的构象发生改变, 使之形成一种更易于与底物结合的稳定的活性结构, 这也是高温促进异构化反应进行的原因之一。Rhimi[7]等人发现来源于 *B. stearothermophilus* US100 的 L-AI 不依赖于任何金属离子以发挥其活性, 但在 65°C 以上时该 L-AI 还是需要低浓度 Mn^{2+}和 Co^{2+}的存在以有效提高酶的热稳定性。在推测的该 L-AI 结构中, E306、E331、H348 和 H447(类似于大肠杆菌 L-AI 的 E306、E333、H350 和 H450, 见图 2b)是结合金属离子(Mn^{2+})的重要氨基酸, 同时 E351、D308 和 H446 分别与 H348、H447 和 E331 相互作用使酶活性中心的空间结构更加稳定[23](见图 4)。并且还发现 F329 在稳定金属离子的结合过程中显示着重要的作用, 可能由于 F329 同时与 H348 和 H447 作用, 使该两个 His 空间位置更稳定, 从而增加了结合金属离子的强度。

3.2.4 L-AI 的酶反应动力学参数：L-AI 可分别以 L-阿拉伯糖和 D-半乳糖为底物, 表 2 比较了不同来源的 L-AI 对两种底物的动力学参数。所有报道的微生物来源的 L-AI 对 L-阿拉伯糖的底物专一性都高于 D-半乳糖, 但是却随着酶最适反应温度的升高呈降低的趋势。最适反应温度为 50°C 的 *B. halodurans* L-AI 对 D-半乳糖和 L-阿拉伯糖的催化效率(*kcat*/*K*m)之比为 127.5; 最适反应温度为 70°C 的 *G. stearo-*

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

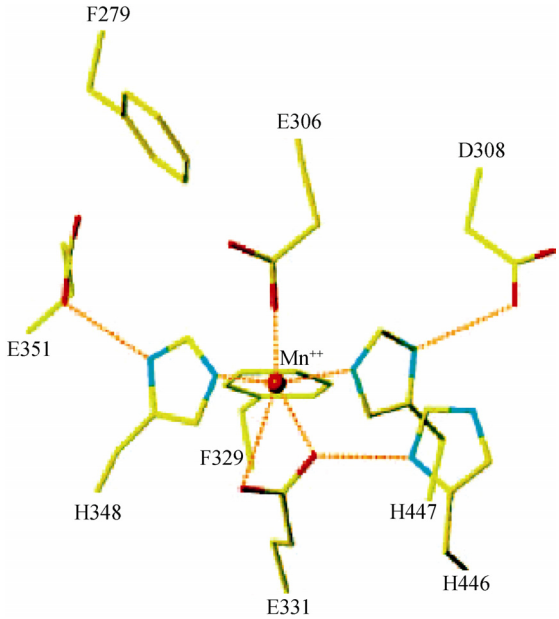

图 4 *Bacillus stearothermophilus* US 100 L-AI 结构中金属离子的结合位置及酶活中心[23]

Fig. 4 Active-site region of the US100 L-AI model showing the catalytic residues and other crucial residues bound to metal ion[23]

thermophilus 的 L-AI 对 D-半乳糖和 L-阿拉伯糖的催化效率之比为 50.8; 最适温度为 90°C 的 *T. maritima* 的催化效率之比则仅为 9。这说明高温条件下的 L-AI 对底物的专一性逐渐从 L-阿拉伯糖转向 D-半乳糖。

4 L-AI 与 D-塔格糖的生产

表 3 列出了利用不同微生物来源的 L-AI 生产 D-塔格糖的情况。30°C 时在 *E. coli* L-AI 的作用下 D-半乳糖的转化率为 28.8%[24], 而 80°C 时耐热菌 *Thermotoga neapolitana* 的 L-AI 可使 D-半乳糖的转化率可达 68%[15]。这是因为随着反应温度的升高, D-半乳糖与 D-塔格糖之间的异构平衡逐渐偏向 D-塔格糖, 因此 D-半乳糖的转化率呈现上升的趋势。

固定化 L-AI 或产 L-AI 的微生物细胞是提高塔格糖生产效率的有效途径。Oh[25]等人分别研究了硅胶吸附法、海藻酸钠包埋法、微型包囊法、戊二醛交联法等不同固定化方法对大肠杆菌 L-AI 的固定

表 2 不同来源的 L-AI 分别对 L-阿拉伯糖和 D-半乳糖的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of various L-AIs

底物 Substrate	L-AI 来源 Microbial origin	V_{max} (U/mg)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/min)	k_{cat}/K_m [L/(mmol·min)]
L-阿拉伯糖	*Aerobacter aerogenes*[4]	NR	33	NR	NR
	Alicyclobacillus acidocaldarius[5]	35.5	48	1989	41
	Bacillus halodurans[6]	33	36	1864	51
	B. stearothermophilus US100[7]	42	29	2040	71
	Escherichia coli[8]	248	60	NR	NR
	Geobacillus stearothermophilus T6[6]	37	63	2048	33
	G. stearothermophilus[20]	96	67	4100	61
	G. stearothermophilus (mutant enzyme)[20]	134	100	6475	65
	G. thermonitrificans[10]	86	145	6960	48
	G. thermonitrificans (mutant enzyme)[18]	178	106	14434	136
	Thermoanaerobacter mathranii[14]	NR	80	NR	NR
	Thermotoga neapolitana[15]	119	116	6740	58
	Thermotoga maritime[16]	41	31	2340	75
D-半乳糖	*Aerobacter aerogenes*[4]	NR	270	NR	NR
	Alicyclobacillus acidocaldarius[5]	7.5	129	NR	NR
	Bacillus halodurans[6]	1.3	167	120	0.4
	B. stearothermophilus US100[7]	8.9	57	438	8.5
	Escherichia coli[8]	NR	14800	NR	NR
	Geobacillus stearothermophilus T6[6]	9.0	120	516	4.3
	G. stearothermophilus[20]	7.8	145	173	1.2
	G. stearothermophilus (mutant enzyme)[20]	37.6	578	1211	2.1
	G. thermonitrificans[10]	6.9	408	204	0.5
	G. thermonitrificans (mutant enzyme)[18]	35.4	399	1046	3.1
	Thermoanaerobacter mathranii[14]	NR	120	NR	NR
	Thermotoga neapolitana[15]	14.3	250	810	3.2
	Thermotoga maritime[16]	8.9	60	504	8.4

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 3 利用不同微生物来源的 L-AI 生产 D-塔格糖
Table 3 D-Tagatose production from D-galactose by various L-AIs

微生物来源 Microbial origin	反应温度 Temperature(°C)	D-半乳糖 D-galactose (g/L)	D-塔格糖 D-tagatose (g/L)	转化率 Conversion rate (%)	产率 Yield [g/(L·d)]
E. coli[24]	30	100	28.8	28.8	4.1
Lactobacillus plantarum[12]	35	100	39	39	9.8
G. stearothermophilus[9]	60	100	31	30.6	46
G. thermodenitrificans[19]	60	300	158	52.7	190
Thermus sp.[17]	60	1.0	0.5	54.0	0.2
Thermoanaerobacter mathranii[14]	65	300	126	42.0	63
B. stearothermophilus[7]	70	0.9	0.4	48.0	1.5
Thermotoga maritima[16]	70	1.8	1.0	56.0	4.0
Thermotoga neapolitana[15]	80	1.8	1.2	68.0	1.5

化及生产 D-塔格糖的影响。结果表明, 利用海藻酸钠为载体, 戊二醛为交联剂的固定方法最有效。来自 *G. stearothermophilus* 的 L-AI, 采用固定化酶连续反应器的方式, 塔格糖的日平均产率可达到 1296 g/L, 为所报道的最高产率[26]。

此外, 工业上生产 D-塔格糖需要以比 D-半乳糖更为廉价的乳糖为初始原料, 乳糖经乳糖酶水解生成 D-半乳糖再由 L-AI 异构化为 D-塔格糖。Jørgensen 等尝试了双酶(L-AI 和 β-半乳糖苷酶)和三酶(L-AI、β-半乳糖苷酶和 D-葡萄糖异构酶)偶联的固定化酶连续反应器以乳糖为初始原料生产含塔格糖和果糖的混合糖浆[14]; Rhimi[27]等对 L-AI 和 D-葡萄糖异构酶进行了在大肠杆菌中共表达的研究, 并固定化同时表达了两种酶的大肠杆菌细胞, 采用连续反应器的方式生产 D-塔格糖和果糖, 为实现 D-塔格糖生产的工业化开辟了新思路。

5 前景与展望

目前虽然已对多种微生物来源 L-AI 进行了研究, 但缺乏对不同 L-AI 的共性研究。因此, 在 L-AI 结构的基础上, 确定影响其性质的关键区域, 通过分子生物手段来改变其最适 pH、温度以及提高底物的特异性将具有重要意义。

通过基因工程构建基因工程菌从而获得大量目的酶已成为塔格糖研究的主流趋势, 但是塔格糖作为一种功能性食品添加剂, 用大肠杆菌作为宿主菌存在着安全隐患。因此构建食品级的基因工程菌将成为塔格糖的新研究热点。

D-塔格糖作为新型的功能性甜味剂, 由于其特殊的生理功能而存在着巨大的潜在市场, 因此其工业化受到人们的关注。实现耐热性乳糖酶与 L-AI 在基因工程菌中的共表达, 将对 D-塔格糖的生产具有现实意义。

参 考 文 献

[1] Levin GV. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J Med Food*, 2002, **5**: 23–36.

[2] Lu Y, Levin GV, Donner TW. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. *Diabetes Obes Metab*, 2008, **10**(2): 109–134.

[3] Manjasetty BA, Chance MR. Crystal structure of *Escherichia coli* L-arabinose isomerase (ECAI), the putative target of biological tagatose production. *J Mol Biol*, 2006, **360**: 297–309.

[4] Yamanaka K, Wood WA. L-Arabinose isomerase. *Methods Enzymol*, 1966, **9**: 596–602.

[5] Lee SJ, Lee DW, Choe EA, *et al*. Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(12): 7888–7896.

[6] Lee DW, Choe EA, Kim SB, *et al*. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerase from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys*, 2005, **434**(2): 333–343.

[7] Rhimi M, Bejar S. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive l-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760**: 191–199.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

[8] Yoon SH, Kim P, Oh DK. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalysis for tagatose production. *World J Microbiol Biotechnol*, 2003, **19**(1): 47–51.

[9] Kim HJ, Ryu SA, Kim P, *et al*. A feasible enzymatic process for D-tagatose production by an immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**(2): 400–404.

[10] Kim HJ, Oh DK. Purification and characterization of an Larabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. *J Biotechnol*, 2005, **120**(2): 162–173.

[11] Nakamatu T, Yamanaka K. Crystallization and properties of Larabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Biochim Biophys Acta*, 1969, **178**: 156–165.

[12] Zhang H, Jiang B, Pan B. Purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum* producing D-tagatose. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007, **23**(5): 641–646.

[13] Izumori K, Ueda Y, Yamanaka K. Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerases induced by L-arabinose and D-galactose. *J Bacteriol*, 1978, **133**(1): 413–414.

[14] Jørgensen F, Hansen OC, Stougaard P. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 816–822.

[15] Kim BC, Lee YH, Lee HS, *et al*. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **212**: 121–126.

[16] Lee DW, Jang HJ, Choe EA, *et al*. Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(3): 1397–1404.

[17] Kim JW, Kim YW, Roh HJ, *et al*. Production of tagatose by a recombinant thermostable Larabinose isomerase from *Thermus* sp. IM6501. *Biotechnl Lett*, 2003, **25**: 963–967.

[18] Oh HJ, Kim HJ, Oh DK. Increase in D-tagatose production rate by site-directed mutagenesis of L-arabinose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 145–149.

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

[20] Kim HJ, Kim JH, Oh HJ. Characterization of a mutated *Geobacillus stearothermophilu*s L-arabinose isomerase that increases the production rate of D-tagatose. *J Appl Microbiol*, 2006, **101**: 213–221.

[21] Oh DK, Oh HJ, Kim HJ, *et al*. Modification of optimal pH in L-arabinose isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* for D-galactose isomerization. *J Mol Catal B Enzym*, 2006, **43**: 108–112.

[22] Lee W, Choe EA, Kim SB, *et al*. Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys*, 2005, **434**: 333–343.

[23] Rhimi M, Juy M, Aghajari N, *et al*. Probing the essential catalytic residues and the substrate affinity in the thermoactive *Bacillus stearothermophilus* US100 L-arabinose isomerase by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol*, 2007, **189**: 3556–3563.

[24] Kim P, Yoon SH, Roh HJ, *et al*. High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase. *Biotechnol Prog*, 2001, **17**: 208–210.

[25] Oh DK, Kim HJ, Ryu SA, *et al*. Development of an immobilization method of L-arabinose isomerase for industrial production of tagatose. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**: 1859–1862.

[26] Ryu SA, Kim CS, Kim HJ, *et al*. Continuous D-tagatose production by immobilized thermostable L-arabinose isomerase in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**(6): 1643–1647.

[27] Rhimi M, Messaoud EB, Borgi MA, *et al*. Co-expression of l-arabinose isomerase and D-glucose isomerase in *E. coli* and development of an efficient process producing simultaneously D-tagatose and D-fructose. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**: 1531–1537.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn