

Staphylococcus aureus 유래 비금속성 이성화효소인 Tagatose-6-phosphate Isomerase의 기질다양성

오덕근¹ · 지은수 · 권영덕 · 김혜정¹ · 김 필*
가톨릭대학교 생명공학전공, ¹세종대학교 생명공학과

Substrate Variety of a Non-metal Dependent Tagatose-6-phosphate Isomerase from *Staphylococcus aureus*. Oh, Deok-Kun¹, Eun-Soo Ji, Young-Deok Kwon, Hye-Jung Kim¹, and Pil Kim*. Major in Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, ¹Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea - To investigate the substrate variety of a putative non-metal dependent isomerase, the tagatose-6-phosphate isomerase (E.C. 5.3.1.26) structural genes (*lacB*; 510bp and *lacA*; 430bp) of *Staphylococcus aureus* were subcloned and co-expressed. Based on the substrate configuration, various aldoses were surveyed for substrate of ketose isomerization. Among the 10 aldoses tested, D-ribose and D-allose were isomerized by the enzyme. The subunit A and B showed more than 95% activity for D-ribose and 75% for D-allose in the presence of 1mM EDTA compared with non-EDTA conditions, which implying tagatose-6-phosphate isomerase is a non-metal dependent isomerase. Each of subunit A or subunit B alone showed no activity for any of the substrates tested. The affinity constant (K_m) of tagatose-6-phosphate isomerase against D-ribose and D-allose were 26 mM and 142 mM, respectively.

Key words: Tagatose-6-phosphate isomerase, *Staphylococcus aureus*, non-metal dependent isomerase, substrate variety

당류 이성화효소는 알도오스와 케토오스 사이의 이성화 반응을 촉매하는 효소이다. 대표적으로 가장 많이 연구가 되어 있는 이성화효소는 xylose isomerase[EC 5.3.1.5]이며, 생체 내에서 xylose와 xylulose 간의 상호전환을 촉매한다[3]. 산업적으로 xylose isomerase는 포도당을 이성화하여 고과당 시럽을 만드는 공정에도 이용되어지고 있다[2]. 생체 내에서는 arabinose와 ribulose의 상호전환을 촉매하는 L-arabinose isomerase[EC 5.3.1.4] 또한 최근에 산업적 측면에서의 관심을 끌고 있는데, 그 이유는 기능성 대체당으로 가치있는 D-tagatose를 D-galactose로부터 생산할 수 있다는 사실이 알려졌기 때문이다[4, 0-12, 5]. 이러한 xylose isomerase와 arabinose isomerase는 모두 생체 내에서의 반응기질과 산업적 용도의 기질이 다른 특징을 가지고 있으며 동시에 모두 활성화 부위에 금속이온을 조효소로 가지고 있다는 공통점을 갖는데, 그 이유는 이들 효소를 EDTA와 같은 금속이온 킬레이터와 함께 처리하면 이성화활성이 급격히 감소하기 때문이다[12, 20]. 금속이온 조효소가 관여하는 이성화반응의 기작은 hydride shift로 알려진 반응기작이 제안되어 있다. 즉, 이성화반응에서 발생하는 1번과 2번 탄소에 결합되어 있던 hydride의 환 구조 개방 및 이동, 환 구조

재형성에 금속이온이 중요한 역할을 한다고 알려진 기작이다[1, 3, 6, 17]. 이러한 기작의 금속성 이성화효소는 효소학적으로 반응속도가 빠르고, 열 안정성이 우수한 특징들을 지니고 있다. 그러나 상업적 관점에서 이러한 금속성 이성화효소의 단점들은 다음과 같이 지적할 수 있다. 금속이온을 손실하는 반응환경(킬레이터의 존재, 단백질 변성에 따른 금속이온의 손실 등)에서 이성화반응의 활성을 모두 상실할 수 있고, 특히 코발트, 망간이온과 같은 금속이온이 반응물로 유리되어 식품으로 사용이 제한될 수도 있다. 또한 상업적 응용성의 증대를 위한 효소의 분자진화 측면에서도 금속이온에 결합하는 아미노산을 치환하지 못함에 따라 기질특이성이나 반응속도 증대 등에 있어 제한이 있을 수 있다. 당류의 이성화반응 기작에는 hydride shift mechanism 이외에 enediol mechanism으로 알려진 이성화 기작이 존재하며, 주로 sugar-phosphate 형태의 기질에 작용하는 것으로 알려져 있다[17]. 가장 잘 알려진 enediol 기작을 갖는 이성화효소는 해당과정중에서의 glucose-6-phosphate와 fructose-6-phosphate간의 이성화반응을 촉매하는 phosphoglucose isomerase이다[7, 14, 18]. 이 기작의 특징은 조효소의 도움 없이 효소 내 아미노산 잔기에 의한 이성화반응 촉매 특성을 지니고 있다.

Tagatose-6-phosphate isomerase [EC 5.3.1.26](이하 TPI)은 몇 종류의 lactic acid bacteria에서 발견되는 tagatose-6-phosphate pathway의 관여 효소들 중의 하나이다[8, 9, 16,

*Corresponding author
Tel: 82-2-2164-4922 Fax: 82-2-2164-4865
E-mail: kimp@catholic.ac.kr

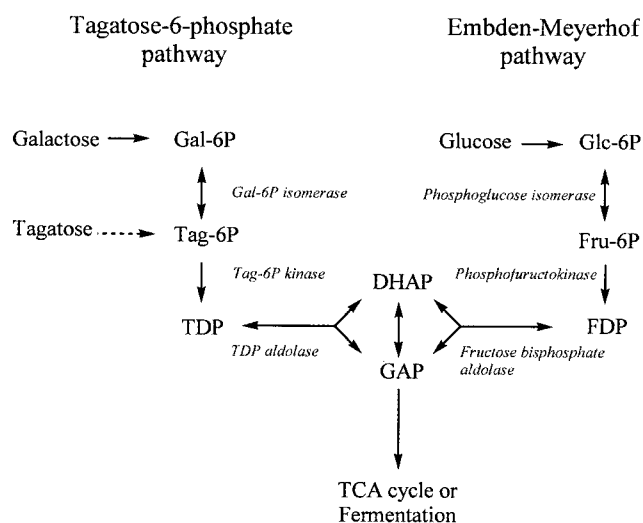


Fig. 1. Comparison of Embden-Meyerhof pathway and tagatose-6-phosphate pathway. Abbreviation: Gal-6P (galactose-6-phosphate), Tag-6P (tagatose-6-phosphate), TDP (tagatose diphosphate), Glc-6P (glucose-6-phosphate), Fru-6P (fructose-6-phosphate), FDP (fructose diphosphate), DHAP (dihydroxyacetone phosphate), GAP (glyceraldehydes-3-phosphate).

19]. 이 경로는 galactose의 인산화, 이성화, 재인산화를 거쳐 dihydroxyacetone phosphate와 glyceraldehydes-3-phosphate로 분해됨으로써 구연산회로나 발효경로로 삽입되는 면에서 통상적인 해당과정과 유사한 당 분해경로이다(Fig. 1). 따라서 endiol mechanism으로 잘 알려진 해당과정의 phosphoglucose isomerase의 역할을 수행하는 tagatose-6-phosphate 경로의 TPI 역시 동일기작에 의해 sugar-phosphate의 이성화반응을 촉매할 수 있으므로, 비금속성 이성화효소일 가능성이 높다. 이러한 비금속성 이성화효소는 금속성 이성화효소가 갖는 산업적응용의 잠재적 제한을 극복할 수 있는 단서를 제공할 수도 있다[11].

본보에서는 추정적으로 TPI를 생합성 하는 것으로 알려진

Staphylococcus aureus N315(KCTC 1621)를 PCR base subclone하여 생합성되는 효소가 비금속성 이성화효소임을 확인해 보고, 동시에 비금속성 이성화효소처럼 비특이적인 aldose-ketose 전환이 가능한지의 여부를 여러종류의 기질을 사용하여 확인한 바를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

플라스미드 제조를 위해서는 *Escherichia coli* DH5a를 사용하였고, 제조된 플라스미드에서 발현되는 단백질 생산을 위해서는 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 사용하였다. TPI의 A subunit과 B subunit의 발현을 유도하기 위해서는 지수성장기의 균주에 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 0.5 mM가 되도록 첨가하였다. 필요한 경우에는 *E. coli*가 생장하는 LB 배지에 ampicillin을 50 μ g/ml이 되도록 첨가하여 선별을 유도하였다. *Staphylococcus aureus*(KCTC 1621)는 Trypticase-Soy broth(Brcton-Dickinson, Cockeysville, MD) 배지에서 37°C, 250 rpm의 조건으로 배양한 후 유전체 획득을 위한 재료로 사용하였다.

DNA와 플라스미드

TPI의 구조 유전자들(*lacB*와 *lacA*)은 *S. aureus* 유전체 (GenBank code: NC_002745)를 주형으로 하여 PCR 증폭한 후 pTrc99A 벡터에 순차적으로 subcloning 하여 pTrc-*lacA*와 pTrc-*lacB*를 각각 제조하였다. 플라스미드 pTrc-*lacAB*의 제조를 위해서는 *lacA*의 3' 말단과 *lacB*의 5' 말단 사이에는 AGGA 서열을 포함한 13bp의 리보솜결합부위 (rbs)와 6bp의 제한효소부위를 첨가하여 동일 프로모터로부터 동시 발현이 되도록 설계하였다(Table 1). Subunit A를 위한 oligonucleotides는 5'-CCA TGG CGA TTA TTA TTG GTT CAG ATG AAG-3'(NcoI site 밑줄)과 5'-GAG CTC

Table 1. Oligonucleotides and plasmids.

Oligonucleotides and Plasmids	Description	Comments
<i>lacA</i> forward	5'-CCA <u>TGG</u> CGA TTA TTA TTG GTT CAG ATG AAG-3'	<i>NcoI</i> site: underline, Start codon: bold
<i>lacA</i> backward	5'- <u>GAG CTC</u> TTA GCA CAT TTT ATT AAG CAT ATC TAC-3'	<i>SacI</i> site: underline, Stop codon: bold
<i>lacB</i> forward	5'- <u>GAG CTC</u> AGG AGG AAC AGA CAT GAA GAT TGC ATT AGG ATG CGA CCA-3'	<i>SacI</i> site: underline, Start codon: bold, Ribosome binding site is 7 bp after start codon.
<i>lacB</i> backward	5'- <u>CCC GGG</u> TTA ATC GTG GTA TTC GCC TCT GTC CC-3'	<i>SmaI</i> site: underline, Stop codon: bold
pCRII	PCR cloning vector with A-overhang, Amp ^r	Invitrogen Co.
pTrc99A	IPTG inducible expression vector, Amp ^r	AP biotech Co.
pTrc- <i>lacA</i>	Vector containing the <i>NcoI-SacI</i> digestion product of <i>lacA</i> gene derived from pTrc99A	This study
pTrc- <i>lacB</i>	Vector containing the <i>SacI-SmaI</i> digestion product of <i>lacB</i> gene derived from pTrc99A	This study
pTrc- <i>lacAB</i>	Vector containing the <i>SacI-SmaI</i> digestion product of <i>lacB</i> gene derived from pTrc- <i>lacA</i>	This study

TTA GCA CAT TTT ATT AAG CAT ATC TAC-3'(SacI site 밑줄)을 사용하였다. Subunit B를 위한 oligonucleotides는 5'-GAG CTC AGG AGG AAC AGA CAT GAA GAT TGC ATT AGG ATG CGA CCA-3'(SacI site 밑줄)과 5'-CCC GGG TTA ATC GTG GTA TTC GCC TCT GTC CC-3' (SmaI site 밑줄)을 사용하였다. 두 종류의 PCR 산물들(lacB; 510bp; lacA; 430 bp)은 각각 pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA) 벡터에 우선 삽입하여 각각 pCRII-lacA와 pCRII-lacB를 제조한 후 이들 벡터로부터 각기 NcoI-SacI digestion product(lacA, 430 bp)와 SacI-SmaI digestion product(lacB, 510 bp)를 정제하여 다시 발현용도의 pTrc99A 벡터로 subcloning하였다. pTrc99A-lacAB는 pTrc99A-lacA와 lacB digestion product(pCRII-lacB 유래 SacI-SmaI 절단된 510 bp 조각)를 재조합하여 제조하였다. 완성된 발현용도의 벡터를 Fig. 2에 표시하였다.

DNA 조작은 통상적인 기술을 사용하였고, QIAEX II gel extraction kit(Qiagen, Germantown, MD)를 사용하여 agarose gel로부터의 DNA 단편정제를 수행하였다. Oligonucleotides는 Bioneer Co.(Taejon, Korea)에서 주문 제작하였고, DNA sequencing은 Macrogen Co.(Seoul, Korea)에서 수행하였다.

효소액의 준비 및 효소활성 측정

pTrc-lacA, pTrc-lacB, 또는 pTrc-lacAB를 포함하고 있는 E. coli BL21(DE3)를 사용하여 TPI subunit A, subunit B, 그리고 subunit A-B를 발현시킨 후 효소활성 측정을 위한 재료로 사용하였다. Ampicillin 50 µg/ml을 포함하고 있는 LB 배지에서 지수생장기에 있는 각각의 E. coli BL21(DE3) 세포들에 대하여 IPTG를 0.5 mM가 되도록 첨가함으로써 TPI 각 subunit의 발현을 유도하였다. 2시간의 유도과정을 거쳐 각 세포들은 원심분리를 통해 획득하였고, 2회의 세척 이후 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.2)에 재현탁하였다. 현탁된 세포는 얼음 내에서 4 Watt, 6분간 sonication(sonics

& materials inc., Newtown, CT, USA)을 통해 파쇄한 후, 원심분리를 통해 상등액을 취해 추후 실험에 사용하였다. 단백질 농도는 Protein Assay kit(BioRad, Lajolla, CA)를 사용하여 BSA를 표준물질로 정량하였다.

TPI의 기질다양성을 조사하기 위해 여러가지 종류의 aldose를 기질로 조사하였다. 효소-기질 반응액 30 µl는 상기한 조효소액 15 µl와 aldose 기질후보 3 µmole을 50 mM Tris-HCl (pH 8.2)에 녹여 사용하였다. 사용된 aldose 기질후보는 D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-mannose, D-allose, D-fucose, D-ribose, and L-arabinose, D-arabinose, L-ribose였다. 비금속성 이성화효소를 확인하기 위해서는 반응액에 1 mM EDTA를 첨가하여 그렇지 않은 경우와 비교하였다.

효소의 활성은 이성화반응 후 형성된 각 ketose를 정량하여 표시하였다. 형성된 ketose의 정량에는 cystein-carbazole 법[5]을 사용하여 발색한 후 multi-plate 분광광도계로 정량하였다. D-glucose, D-galactose, D-ribose, D-xylose, D-allose 및 L-arabinose의 이성화반응 결과로 형성된 ketose 정량을 위한 표준물질로는 각각 D-fructose, D-tagatose, D-ribulose, D-xylulose, D-psicose, 및 D-ribulose를 사용하였다. D-mannose and D-fucose의 이성화반응 후의 ketose 표준물질로는 D-fructose와 D-tagatose를 해당 ketose 대신 사용하였다.

결과 및 고찰

TPI의 기질다양성

Tagatose-6-phosphate 경로를 갖는 Staphylococcus aureus의 TPI subunit A, B, 그리고 A & B를 각각 대장균에서 발현한 후, 세포 파쇄액을 효소원으로 하여 여러가지 단당류 aldose에 대한 이성화반응 촉매여부를 조사하였다. 이때 각 aldose의 초기농도는 100 mM이고, pH 8.2, 37°C에서 반응을 진행하였다. 반응의 진행정도에 따라 각 기질별로 반

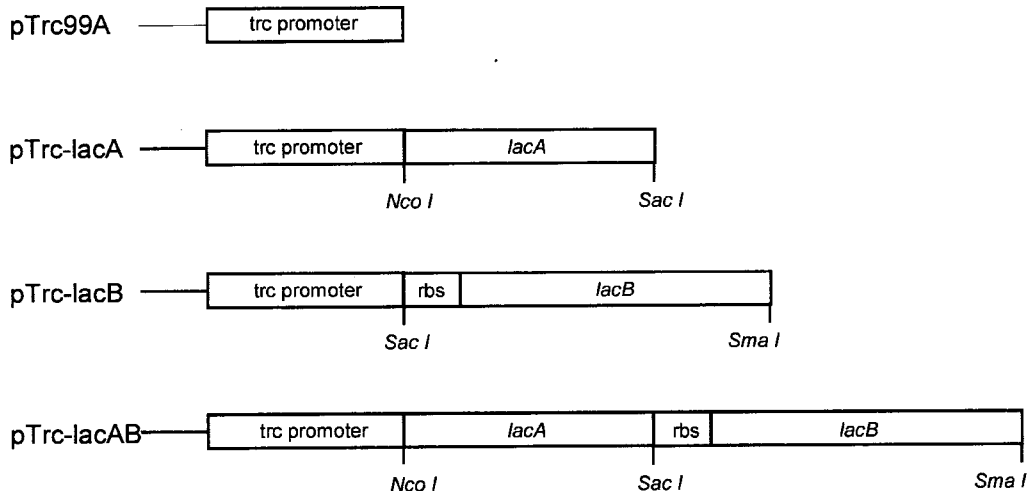


Fig. 2. Structure of expression plasmids pTrc-lacA, pTrc-lacB, and pTrc-lacAB.

Table 2. Substrate variety of TPI from *Staphylococcus aureus*.

Substrate (PS, RT)	Gal (Tag, 150)	Ara (Rbu, 40)	Fuc (Tag, 150)	Rib (Rbu, 10)	Glc (Fru, 150)	Xyl (Xlu, 40)	Man (Fru, 150)	All (Psi, 10)	D-Ara (Rbu, 150)	L-Rib (Rbu, 150)
Control	0.1	11.0	0.0	0.4	0.7	3.0	0.0	1.5	0.2	0.2
Subunit A	0.1	5.2	0.3	0.8	0.4	1.3	0.2	0.5	0.2	0.1
Subunit B	0.2	3.8	0.4	0.1	0.6	0.0	0.3	0.8	0.1	0.0
Subunit A & B	0.6	14.4	1.1	347.8	0.4	10.1	0.5	94.8	0.7	0.5

Abbreviations: PS (standard to estimate product); RT (reaction time in min); Gal (D-galactose); Ara (L-arabinose); Fuc (D-fucose); Rib (D-ribose); Glc (D-glucose); Xyl (D-xylose); Man (D-mannose); All (D-allose); D-Ara (D-arabinose); L-Rib (L-ribose); Tag (D-tagatose); Rbu (D-ribulose); Fru (D-fructose); Xlu (D-xylulose); Psi (D- Psicose)

Each data represents the mean of triplicates in $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}$ unit.

응시간은 10분에서 150분까지 변화시켰으며, 최종적인 각 기질에 대한 이성화반응의 정도는 1분간 1g의 세포단백질로부터 전환된 ketose의 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}\cdot\text{protein}$ 로 표시하여 Table 2에 나타내었다. 이때 Control, Subunit A, Subunit B, 그리고 Subunit A & B는 각각 그 효소원이 pTrc99A, pTrc-lacA, pTrc-lacB, 그리고 pTrc-lacAB 벡터를 포함하는 대장균의 세포파쇄액을 의미한다. D-Galactose, D-fucose, D-glucose, D-mannose, D-arabinose, L-ribose에 대해서는 모든 경우에 있어서는 control과 동일한 유의수준의 활성을 나타낸 것으로 미루어, TPI이 기질로 작용하지 못하는 것으로 결론지었다. L-Arabinose, D-xylose에 대해서는 각각 14.4, 10.1 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}\cdot\text{protein}$ 으로 매우 약한 효소활성이 발견되었다. 반면에 D-Ribose와 D-allose에 대해서는 347.8, 94.8 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}\cdot\text{protein}$ 으로 비교적 높은 활성이 발견되었다. 이때 D-ribose와 D-allose에 대한 활성은 오직 subunit A & B의 동시발현 경우에만 나타났고, 각각의 subunit A나 또는 subunit B에서는 활성이 발견되지 않았다. 이것으로 미루어 볼 때 TPI의 활성을 위해서는 subunit A와 subunit B가 동시에 결합하여 이성화 활성부위를 구성하는 것으로 추정할 수 있었다.

금속이온 킬레이터의 효과

Tagatose-6-phosphate 경로의 TPI가 해당과정의 phosphoglucose isomerase처럼 금속이온이 조효소로 필요하지 않은 비금속성 이성화효소임을 조사하기 위하여, TPI가 이성화반응 활성을 보인 D-ribose와 D-allose에 대하여 금속이온 킬레이터인 EDTA의 효과를 조사하였다. Tris-HCl buffer(pH 8.2)에 100 mM이 최종 농도가 되도록 각 aldose를 첨가한 이후 EDTA가 1 mM이 되도록 첨가한 혼합액과 첨가하지 않은 혼합액을 37°C에서 반응시켜 각각의 해당 ketose(D-ribulose, D-psicose)형성을 통한 효소활성 차이를 비교하였다(Table 3). EDTA가 첨가되었을 때 D-ribose와 D-allose는 각각 TPI subunit A & B에 의하여 339.0, 72.5 $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}\cdot\text{protein}$ 의 활성을 나타내었다. 이것은 EDTA가 첨가되지 않았을 경우에 비교하여 각각 95%, 75%에 해당하는 효소활성이었다. 금속성 이성화효소의 경우에는 1 mM EDTA

Table 3. Effect of EDTA metal chelation on the activity of TPI against D-ribose and D-allose.

	Substrate			
	Ribose with EDTA	Ribose w/o EDTA	Allose with EDTA	Allose w/o EDTA
Control	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.5	1.5 ± 0.6
Subunit A & B	339.0 ± 22.2	347.8 ± 47.0	72.5 ± 4.3	94.8 ± 10.8

Each data represents the mean of triplicates ± standard deviation in $\mu\text{mole}/\text{min}\cdot\text{g}$ unit.

처리에 따라 효소활성이 10% 이하로 감소하고, 금속이온을 추가로 첨가하는 경우 150% 이상 이성화 활성이 증가하는 결과들과 비교해 보면[12, 13, 20], TPI subunit A & B는 금속이온이 조효소로 작용하지 않고 있다는 사실을 알 수 있었다. D-Ribose와 D-allose에 대해 각각 EDTA 처리에 의한 약간의 활성감소는 아마도 효소 자체에 영향을 주었다기 보다는 세포파쇄액 내에 포함되어 있던 다른 금속이온에 의해 비특이적으로 일어난 이성화반응의 감소에 기인하는 것으로 생각되어진다.

D-Ribose와 D-Allose에 대한 TPI의 효소적 특성

TPI subunit A & B에 미치는 D-ribose와 D-allose 기질 농도의 영향을 조사하기 위해 기질농도를 변화시켰을 때의 반응속도를 측정 후 Lineweaver-Burk plot을 그렸다. Fig. 3에 나타난 것처럼 D-ribose에 대한 K_m 과 V_{max} 는 각각 26 mM, 3.690 mmole/min·g·protein이었고, D-allose에 대해서는 142 mM, 0.087 mmole/min·g·protein이었다. 대장균의 금속성 이성화효소인 L-arabinose isomerase의 경우에는 *in vivo* 기질인 L-arabinose에 대한 K_m 값인 60 mM이나 *in vitro* 기질인 D-galactose에 대한 K_m 값인 300 mM보다 기질 친화성이 상대적으로 높았다[20].

TPI subunit A & B는 알려지지 않았던 D-ribose와 D-allose에 대해서도 이성화 활성이 있는 것으로 조사되었다. 새로운 기질인 D-ribose와 D-allose의 구조를 Fisher 투영도로 비교해 보면, 5탄당과 6탄당의 차이를 제외하고는 모두 수산화기의 입체방향이 동일함을 알 수 있다(Fig. 4). 홍미

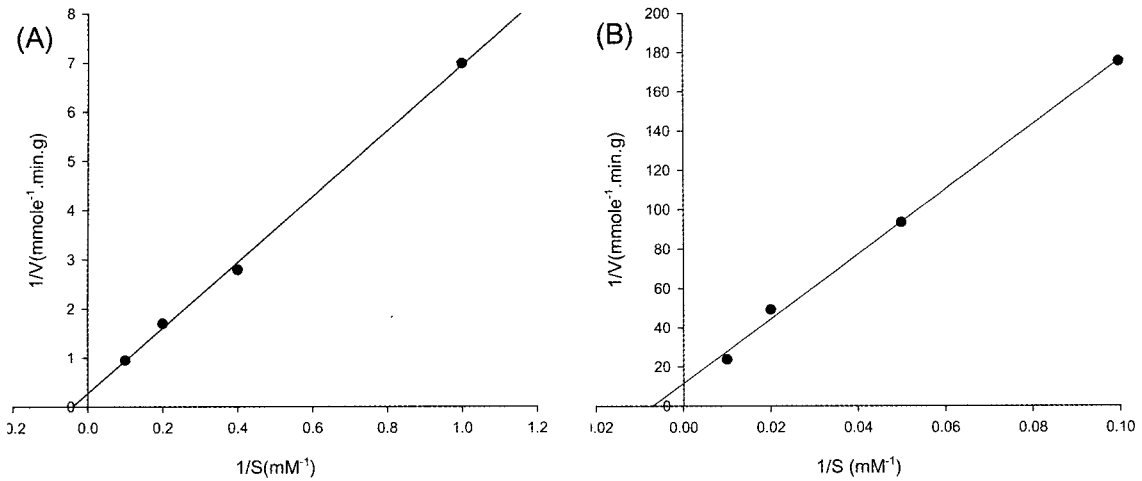


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot of TPI against D-ribose (A) and D-allose (B). The K_m and V_m are 26 mM and 3.690 (mmole/min.g) for D-ribose, 142 mM and 0.087 mmole/min.g for D-allose, respectively.

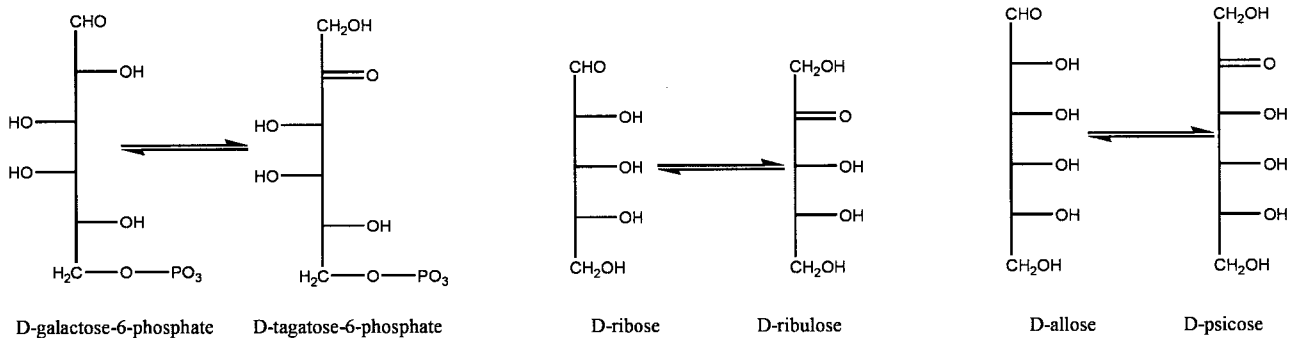


Fig. 4. Substrate and product configurations of TPI from *Staphylococcus aureus*.

로운 사실은 새로운 기질들이 최초로 알려진 기질(D-galactose-6-phosphate)과는 상당히 차이를 갖는 구조로 되어 있다는 점이다. TPI subunit A & B는 산업적으로 잘 알려진 xylose isomerase나 arabinose isomerase와는 달리 비금속속성 이성화효소로 추정되어지므로, 전술한 것처럼 분자진화라는 측면에서 생각해 볼 때 금속이온과의 결합이 끊어지면 모든 이성화 활성을 잃게 되는 금속속성 이성화효소보다 더 다양한 경우의 분자진화가 가능하리라는 추정을 할 수 있다 [11]. 더욱이 원래의 기질과는 상당히 다른 구조의 aldose를 이성화 촉매할 수 있다는 점에서 변화의 폭이 더 클 수 있다는 기대를 갖게 한다. 저자들은 금속속성 이성화효소보다 더 큰 진화가능성을 지닐 수 있는 비금속속성 이성화효소를 이용하여 분자진화를 통한 희귀당의 생물전환을 시도하고 있다.

요 약

비금속속성 이성화효소로 추정되는 *Staphylococcus aureus* 의 tagatose-6-phosphate isomerase(E.C. 5.3.1.26)의 기질 다양성을 조사하기 위해서 그 구조유전자(*lacB*; 510bp와 *lacA*; 430bp)를 대장균에서 동시발현하였다. 알려진 기질 이외에

D-ribose와 D-allose에 대해 이성화활성이 새롭게 관찰되었다. EDTA 1 mM 존재하에서도 D-ribose와 D-allose에 대하여 각각 EDTA 비존재 조건에 대비하여 95%, 75%의 이성화활성을 나타내는 것으로 미루어 tagatose-6-phosphate isomerase가 비금속속성 이성화효소임을 밝혔다. 이때 *lacA* 또는 *lacB*의 단독발현시에는 이성화활성이 전혀 발견되지 않았다. D-Ribose와 D-allose에 대한 기질친화상수 (K_m)은 각각 26 mM와 142 mM였다.

감사의 글

실험준비에 도움을 준 가톨릭대 조중호, 민윤선, 임미영 학부생들에게 감사합니다.

REFERENCES

1. Asboth, B. and G. Naray-Szabo. 2000. Mechanism of action of D-xylose isomerase. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1: 237-254.
2. Bhosale, S. H., M. R. Rao, and V. V. Deshpande. 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60: 280-300.

3. Blow, D. M., C. A. Collyer, J. D. Goldberg, and O. S. Smart. 1992. Structure and mechanism of D-xylose isomerase. *Faraday Discuss.* **92**: 67-73.
4. Cheetham, P. S. J. and A. N. Wootton. 1993. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 105-108.
5. Dische, Z. and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**: 583-587.
6. Garcia-Viloca, M., C. Alhambra, D. G. Truhlar, and J. Gao. 2003. Hydride transfer catalyzed by xylose isomerase: mechanism and quantum effects. *J. Comput. Chem.* **24**: 177-190.
7. Graham Solomons, J. T., E. M. Zimmerly, S. Burns, N. Krishnamurthy, M. K. Swan, S. Krings, H. Muirhead, J. Chirgwin, and C. Davies. 2004. The crystal structure of mouse phosphoglucose isomerase at 1.6Å resolution and its complex with glucose 6-phosphate reveals the catalytic mechanism of sugar ring opening. *J. Mol. Biol.* **342**: 847-860.
8. Hamilton, I. R. and H. Lebttag. 1979. Lactose metabolism by *Streptococcus mutans*: evidence for induction of the tagatose 6-phosphate pathway. *J. Bacteriol.* **140**: 1102-1104.
9. Jagusztyn-Krynicka, E. K., J. B. Hansen, V. L. Crow, T. D. Thomas, A. L. Honeyman, and R. 3rd. Curtiss. 1992. *Streptococcus mutans* serotype c tagatose 6-phosphate pathway gene cluster. *J. Bacteriol.* **174**: 6152-6158.
10. Kim, J. W., Y. W. Kim, H. J. Roh, H. Y. Kim, J. H. Cha, K. H. Park, and C. S. Park. 2003. Production of tagatose by a recombinant thermostable L-arabinose isomerase from *Thermus* sp. IM6501. *Biotechnol. Lett.* **25**: 963-967.
11. Kim, P. 2004. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 243-249.
12. Lee, D. W., E. A. Choe, S. B. Kim, S. H. Eom, Y. H. Hong, S. J. Lee, H. S. Lee, D. Y. Lee, and Y. R. Pyun. 2005. 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.* **434**: 333-343.
13. Patrick, J. W. and N. Lee. 1968. Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **243**: 4312-4318.
14. Read, J., J. Pearce, X. Li, H. Muirhead, J. Chirgwin, and C. Davies. 2001. The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. *J. Mol. Biol.* **309**: 447-463.
15. Roh, H. J., P. Kim, Y. C. Park, and J. H. Choi. 2000. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (Pt 1): 1-4.
16. Rosey, E. L., B. Oskouian, and G. C. Stewart. 1991. Lactose metabolism by *Staphylococcus aureus*: characterization of lacABCD, the structural genes of the tagatose 6-phosphate pathway. *J. Bacteriol.* **173**: 5992-5998.
17. Swan, M. K., J. T. Solomons, C. C. Beeson, T. Hansen, P. Schonheit, and C. Davies. 2003. Structural evidence for a hydride transfer mechanism of catalysis in phosphoglucose isomerase from *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **278**: 47261-47268.
18. Topper, Y. J. 1957. On the mechanism of action of phosphoglucose isomerase and phosphomannose isomerase. *J. Biol. Chem.* **225**: 419-425.
19. van Rooijen, R. J., S. van Schalkwijk, and W. M. de Vos. 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **266**: 7176-7181.
20. Yoon, S. H., P. Kim, and D. K. Oh, 2003. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalysis for tagatose production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 47-51.

(Received Feb. 22, 2005/Accepted Apr. 29, 2005)