

國立臺灣海洋大學食品科學系碩士班

專題討論書面報告

從低成本表現 L-阿拉伯糖異構酶到一鍋式

生產 D-塔格糖之應用探討

From Low-Cost L-Arabinose Isomerase

Expression to One-Pot D-Tagatose Production

Applications

授課老師：黃崇雄 老師

蔡博崴 老師

指導老師：方翠筠 老師

方翠筠

學 號：11432047

學 生：賴昱亘

報告日期：114 年 11 月 12 日

From Low-Cost L-Arabinose Isomerase Expression to One-Pot D-Tagatose Production Applications.

賴昱亘 (5109)

2025/11/12

Outline

1. Introduction
2. Alternative Heterologous Expression of *L-Arabinose Isomerase* from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 By Residual Whey Lactose Induction
3. One-pot production of tagatose using L-arabinose isomerase from *Thermotoga maritima* and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*
4. Conclusion

Abstract

L-arabinose isomerase (L-AI) is a key enzyme in the conversion of D-galactose into the low-calorie rare sugar D-tagatose. Efficient production of L-AI and optimization of its reaction conditions can help reduce production costs and increase industrial yield. In the first study, L-AI from *Enterococcus faecalis* DBFIQ E36 was expressed in *E. coli* BL21(DE3), using lactose and residual lactose from whey as inducers. The results showed that good enzyme performance and tagatose yield (approximately 23%) could be obtained while reducing costs, demonstrating the feasibility of using dairy byproducts. The second study employed a "one-pot" strategy, utilizing both β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* and heat-stable L-AI on lactose to directly convert it into D-tagatose. This method is more efficient than traditional stepwise reactions, and due to the high stability of heat-stable L-AI, it can be carried out at high temperatures, improving yield and ease of operation. In summary, these two studies demonstrate a continuous production process from low-cost enzyme preparation to high-efficiency catalytic conversion, highlighting the industrial application potential of L-AI in the sustainable biomanufacturing of rare sugars.

1. 前言

D-塔格糖是一種由半乳糖衍生的稀有糖，具有低升糖指數、低熱量及益生元特性，被視為具潛力的替代性甜味劑，使用生物製程進行反應將更具永續性。L-阿拉伯糖異構酶（L-AI）能將半乳糖異構化為 D-塔格糖，是生物轉化製程的主要酵素。要達成塔格糖的工業化生產，需解決酵素的生產成本、純度和乳糖轉換成塔格糖效率的提升。因此本報告選取兩篇研究進行比較分析，包括利用乳清乳糖進行 L-AI 低成本誘導表現，以及將 β -半乳糖苷酶與嗜熱型 L-AI 整合於一鍋式反應的塔格糖製備方法，呈現出從酵素製備到製程應用的完整系統。

2. Alternative Heterologous Expression of L-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 By Residual Whey Lactose Induction

本研究中，為提高 L-AI 的產量，以三種不同培養基進行搖瓶培養（LBamp + IPTG、含 D-乳糖的自動誘導培養基、去蛋白乳清培養基），接著使用 SDS-PAGE 凝膠電泳來分析各組條件下 L-AI 的表現量。利用商業乳糖或脫蛋白乳清中殘留乳糖替代 IPTG 作為誘導劑，並透過 SDS-PAGE 驗證重組 L-AI 的表現（圖 1、2）。不同殘留乳清乳糖濃度（2、4、8 g/L）之中，以 4 g/L 在約 11 小時培養時可獲得最佳酵素表現。相較之下，使用商業乳糖的酶表現出的誘導時間較快（約 9 小時），顯示殘留乳清乳糖的誘導反應較為緩和。此外，商業乳糖誘導所得之酵素產量略高於使用殘留乳清乳糖者（表 2）。

為了提高提取物的產量，使獲得更高的蛋白質濃度，細胞懸浮液的裂解次數從一次增加到三次，而當比較酶活性時，觀察到商業乳糖和殘餘乳清乳糖比 IPTG 的酶活性高出兩倍，為更好的誘導劑，且使用乳清乳糖時生產率更高（表 3）。

顯示了在使用商業乳糖和殘留乳清乳糖的自動誘導培養基中獲得的細胞生長曲線（圖 3）。計算使用商業乳糖的細胞生長率(μ X)時，獲得了 0.907/h 的 μ X，而對於殘餘乳清乳糖 μ X 的範圍為 0.801-0.827/h，但在培養 9 小時後達到了相同的細

胞濃度，如表 3 表示使用乳清乳糖時，生產力更高。

在不同誘導劑條件下，ZYM-5052 自動誘導培養基中三種碳源的代謝轉換過程（圖 4a、b）。葡萄糖首先被利用且消耗得快。因此當分別使用商業乳糖或殘留乳清乳糖作為誘導劑時，葡萄糖在試驗過程的 5 或 3 小時之前完全耗盡，並達到穩定期。接著，開始消耗甘油和乳糖。當使用商業乳糖時，兩者最初同時被吸收，但從 9 h 開始甘油轉化率保持恆定(大約 20%)，而乳糖轉化率隨著時間增加高達 77%。當使用殘餘乳清乳糖時，在結束時僅使用了 27.7%的可用甘油，表示甘油為次要碳源，且不會抑制分解代謝。

甘油和乳糖消耗曲線也證明了這種行為（圖 5a）。可以看到甘油在超過 2 小時內消耗速率下降，而乳糖的保持恆定向上，乳糖消耗速率在 5 小時達到最大值。當剩餘的乳清乳糖被消耗時，甘油和乳糖的體積消耗率變得不同，甘油消耗率緩慢增加，直到 9 小時後保持恆定(圖 5b)。乳糖不僅可以作為誘導劑，還可作為碳源，因此當使用商業乳糖或殘留乳清乳糖時，可能看到乳糖消耗及甘油積累。

顯示了純化過程中不同樣品的 SDS-PAGE 圖譜(圖 6)。在純化後細胞提取物的比活性的增加，表明存在更高濃度的 L-AI。使用 IPTG 作為誘導劑獲得的酶提取物，在純化後獲得的 L-AI 比活性為 0.33 U/mg，比粗提取物的比活性高 3.3 倍。使用商業乳糖從自動誘導培養基中獲得的酶提取物在純化後顯示出 1.5 U/mg 的比活性，與粗提取物相比提高了 150%，而使用殘餘乳清乳糖進行三次裂解的酶提取物顯示出最高的比活性。

透過比較粗提取物和純化的酶，可以觀察到約 55 kDa 的蛋白質濃度。純化後酶活性比粗提取物高約 4.5 倍，有顯著的提高（圖 6b）。

在這些條件下研究異構化反應的操作條件，測試酶的高轉化率和快速反應速率。pH 值對酶活性的影響（圖 7a）。顯示在 50°C、60 分鐘下，該酶在 pH5-7 時保持 80%以上的活性，並在 pH 5.6 時達到最大值。在微酸性 pH 下具有高活性的酶在工業水平上的應用，能夠產生更高質量的塔格糖和更低的總加工成本。

溫度對催化活性影響純化的 rL-AI 的穩定性在 40 - 65° C 內持續 60 分鐘進行

1 評估 (圖 7b)。發現最佳溫度是 50 °C，但本篇研究結果顯示該酶在 55° c 時保持
2 了 90% 以上的活性，而在 60° c 以上的溫度時，觀察到其活性迅速下降。

3 在 55°C 和 pH 5.6 下，使用 0.114 U/mL 的 L-AI 和兩種不同的半乳糖終濃度(164
4 和 500 mM)將半乳糖轉化為 D-塔格糖(圖 8)。反應溫度越高，獲得的塔格糖產率越
5 高。因為異構化是一種平衡反應，在較高的溫度下更有利。由於酶的穩定性較高，
6 轉化試驗的溫度被確定為 55 °C，模擬了酶在工業上應用的條件。

7 使用較高的半乳糖濃度時，塔格糖濃度也隨之增加，當起始基質濃度為 164
8 mM 時，反應 6 小時達到 13.8 mM 的塔格糖濃度和 8.4% 的半乳糖轉化率。當半乳
9 糖濃度為 500 mM 時，在 28 小時達成平衡，塔格糖的生成量為 97.7 mM，轉化率
10 約為 20%，表示 D-tagatose 濃度隨著時間過程反應而增加，直到建立異構化平衡
11 (圖 8)。

12 3. One-pot production of tagatose using L-arabinose isomerase from 13 *Thermotoga maritima* and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*

14 米麴菌 β -galactosidase (β -gal)較其他商業 β -gal 具備更高熱穩定性、高比活性、
15 寬溫域及成本效益，此特性對於採用嗜熱海棲熱袍菌 L-AI 進行一鍋式塔格糖合成
16 極具優勢，故選用此酶與 L-AI 共同進行塔格糖一鍋合成的進一步研究。

17 採用來自海棲熱袍菌 (*T. maritima*) 之重組 L-AI 與來自米麴菌 (*A. oryzae*)
18 之商業 β -gal 進行單鍋塔格糖生產 (圖 9) 在 100 g/L 乳糖濃度、pH 7.0 和 60°C 下，
19 評估了塔格糖一鍋法合成中 β -gal 對 L-AI 比率(mg β -gal/mg L-AI, R β -gal/L-AI)
20 (0.1 – 1.2 mg β -gal/mg L-AI)的影響。

21 評估的 R β -gal/L-AI 的乳糖轉化率(XLac)，在糖比例等於或高於 0.8 下，反應 6
22 小時獲得高於 90 % 的 XLac，在 R β -gal/L-AI 0.2-0.6 下需反應 24 小時才能高於 90%
23 (圖 10A)。

24 顯示了 R β -gal/L-AI 在塔格糖合成過程中的作用。隨著高比例的 R β -gal/L-AI 增
25 加導致 XLac 漸增，產生大量的半乳糖，也加快被異構化為塔格糖的速率(圖 10B)。

26 乳糖由 β -gal 的水解和轉半乳糖基化反應分別可生成單醣(包括葡萄糖及半乳

糖)和低聚半乳糖(galacto-oligosaccharides, GOS)，半乳糖經 L-AI 異構化可生成塔格糖。GOS 在一開始時由 β -gal 合成，隨後在反應中水解。在 R β -gal/L-AI 0.2–1.2，反應的 5 至 15 分鐘之間觀察到平均最大 GOS 產率(YGOS)為 $14.72 \pm 0.32\%$ ，反應的最初 6 小時內觀察到高水解速率，而在 β -gal 對 L-AI 比率(β -gal and L-AI ratio, R β -gal/L-AI)為 0.1 時，只能觀察到合成，直到達到最大產量，之後才轉變為水解(圖 10C)。

R β -gal/L-AI 對塔格糖產率(YTag)和 YGOS 的影響。在較高 R β -gal/L-AI 下觀察到較高的塔格糖產量，而在 GOS 觀察到相反的效果，在 R β -gal/L-AI 1.2 下，獲得最大 YTag 23 %和最小 YGOS 1.2 % (圖 10D)。

顯示了在 R β -gal/L-AI 1.2 下、48 小時內一鍋合成中碳水化合物生產的時間過程。塔格糖在 48 小時達到 23 %的平衡值。半乳糖在 2 小時達到 37.3 %的最大濃度，之後隨著其被用於塔格糖的異構化而降低。葡萄糖的最大濃度在 6 小時為 49.3 %，並且在整個反應過程中保持恆定(圖 10E)。反應結束時(以乾基計)，最終產物組成為：0.454 葡萄糖、0.232 半乳糖、0.23 塔格糖、0.043 果糖、0.029 乳糖及 0.012 GOS。此結果顯示在乳糖水解生成葡萄糖的同時，L-AI 能催化葡萄糖生成果糖，形成葡萄糖中果糖的酶合成。為驗證此假設，作者以乳糖、乳糖水解混合物及葡萄糖為基質，分別在有無 L-AI 和 β -gal 的情況下進行對照實驗，結果僅在葡萄糖與 L-AI 同時存在時觀察到果糖生成。這說明 L-AI 對阿拉伯糖、半乳糖及葡萄糖均具催化能力，可能被視為同時具有半乳糖與葡萄糖異構化活性的酵素。然而，葡萄糖生成果糖的速率仍低於以半乳糖為基質時的異構化速率。與(Zhang ., 2021)利用代謝工程植物乳桿菌從乳糖生產塔格糖的研究相比，本研究的轉化效率仍較低(65° C、pH 7.5 下 56 小時乳糖轉化率達 33%)，但若利用蛋白質工程改善 L-AI 的基質特異性，系統效率仍具進一步提升潛力。

R β -gal/L-AI 對塔格糖比生產率(π Tag)、糖類比(RTag/Gal)和轉換數(TON)的影響。在 R β -gal/L-AI 為 0.3 和 0.5 時獲得最高 TON。在較高的 R β -gal/L-AI 濃度下，RTag/Gal 值達到 ≈ 1 反應時間需要超過 72 小時(表 4)。

1 $R\beta$ -gal/L-AI 為 1.2 意味著 β -gal 為 6 毫克/毫升，L-AI 為 5 毫克/毫升。因此，
2 β -gal 濃度產生了更高程度的水解，提供了更多的半乳糖，使其異構化成塔格糖。
3 因此選擇最高的 $R\beta$ -gal/L-AI 來分析溫度和初始乳糖濃度對一鍋法生產塔格糖的
4 影響。

5 在 $R\beta$ -gal/L-AI 為 1.2、pH 7.0、60°C 的條件下，評估了乳糖濃度在 100 至 500
6 g/L 範圍內對一鍋法合成塔格糖的影響。

7 在 β -半乳糖苷酶濃度相同 (6 mg/mL) 的情況下，所有測試的乳糖濃度在反應
8 24 小時後可獲得高於 95% 的 XLac (圖 11A)。

9 結果顯示，初始乳糖濃度對塔格糖與 GOS 的生成具有顯著影響 (圖 11B -
10 E)。當乳糖濃度由 100 g/L 提高至 500 g/L 時，塔格糖最終產量由 23 g/L 增至
11 109.4 g/L，而 GOS 的最高濃度亦由 14 g/L 增至 106 g/L，顯示總產量隨基底濃
12 度增加而上升。

13 然而，在 YTag 中卻相反，在 24 小時、乳糖濃度為 100 g/L 時，反應速率較
14 快，YTag 達 20.9%，高於 500 g/L 乳糖的 14%，但經過 72 小時後，各系統均
15 趨近平衡，YTag 約為 23% (圖 11D)。

16 乳糖濃度對 π Tag、RTag/Gal 和 TON 的影響如所示。在較高的乳糖濃度下實
17 現了更高的 π Tag 和 TON，而 RTag/Gal 則表現出相反的效果。反應結束時，分別
18 使用 100 和 500 g/L 的乳糖獲得 RTag/Gal $\approx$ 1 和 0.78。在較高的乳糖濃度下，
19 RTag/Gal $\approx$ 1 的反應時間超過 72 小時 (表 4)。

20 溫度對一鍋塔格糖生產的影響在 40 至 60°C 的範圍內進行評估，保持初始乳糖
21 濃度(100 g/L)、 $R\beta$ -gal/L-AI 為 1.2 和 pH 為 7.0 不變。

22 顯示了類似於 XLac 在 50 和 60°C、24 小時下 β -gal 對溫度有類似水解曲線。
23 在 40°C 時水解速率較低，但在 24 小時後達到了 97 % 的轉化率 (圖 12A)。

24 在 40、50 和 60°C 下，反應 72 小時獲得的 YTag 分別為 16.3、19.5 和 23 % (圖
25 12B)。

26 關於 GOS 的合成，在反應 5 分鐘時獲得最高產率，在 40、50 和 60°C 時分別

1 達到 5.5、7.7 和 14.2 % 的值，在反應 6 小時 GOS 幾乎完全水解(圖 12C)。

2 在 60°C 時達到最高值。因此溫度將影響乳糖的 GOS 反應和塔格糖產率。為避
3 免影響 β -半乳糖苷酶的性能，未進行更高溫度下的實驗。如先前研究 (Guerrero .,
4 2018)，可使用固定化 β -半乳糖苷酶或共價固定化生物催化劑 (L-AI 和 β -半乳糖苷
5 酶) 進行進一步研究以提高其穩定性。在 60° C 時 YTag 達到 23 %, RTag/Gal $\approx$ 1，
6 達到其最大值。

7 為了進行比較，評估了塔格糖的兩個步驟連續水解和異構化。在 100 g/L 乳糖
8 濃度、pH 7.0 和 60 °C 的條件下進行乳糖水解，並加入與一鍋法系統中相同量的酵
9 素。顯示了水解反應過程 (圖 13A)。4 小時後乳糖轉換率達到 98.9%。反應結束
10 時，碳水化合物組成如下：葡萄糖 0.506 g/g，半乳糖 0.476 g/g，乳糖 0.01 g/g，GOS
11 0.008 g/g。然後在反應混合物中加入 5 mg L-AI 進行異構化。

12 顯示了異構化反應的過程，反應 72 小時後，YTag 的產率為 16.5%，低於一
13 鍋法反應中獲得的 23% (圖 13B)。

14 顯示與一般反應相比，一鍋法系統在 YTag、 π Tag、RTag/Gal 和 TON 方面都
15 更優異，由於反應時間縮短塔格糖的產率顯著提高，塔格糖的生產力有明顯的提
16 高 (表 5)。

17 4. 結論

18 本研究比較的兩篇文獻分別對應塔格糖生產中的酵素製備與生物轉化應用。
19 以乳糖或乳清乳糖取代 IPTG 進行 *E. faecium* L-AI 的異源表達，可降低生產成
20 本並提升酵素產量，具有食品級、安全與可放大之優勢，使 L-AI 得以具備工業使
21 用條件。另一方面，將 β -半乳糖苷酶與嗜熱型 L-AI 整合於單鍋反應，可同時完
22 成乳糖水解與半乳糖異構化，不僅提高塔格糖產率，也凸顯 L-AI 熱穩定性對製程
23 效率的重要性。整體而言，兩篇研究形成從酵素來源到生物催化製程的連續策略，
24 顯示 L-AI 在稀有糖生產中的應用潛力與工業化前景。

Reference

- de Souza, T. C., Oliveira, R. C., Bezerra, S. G. S., Manzo, R. M., Mammarella, E. J., Hissa, D. C., & Gonçalves, L. R. (2021). Alternative heterologous expression of l-Arabinose isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 by residual whey lactose induction. *Molecular Biotechnology*, 63(4), 289-304.
- Aburto, C., Vera, C., Arenas, F., Illanes, A., & Guerrero, C. (2024). One-pot production of tagatose using l-arabinose isomerase from *Thermotoga maritima* and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *LWT*, 194, 115787.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

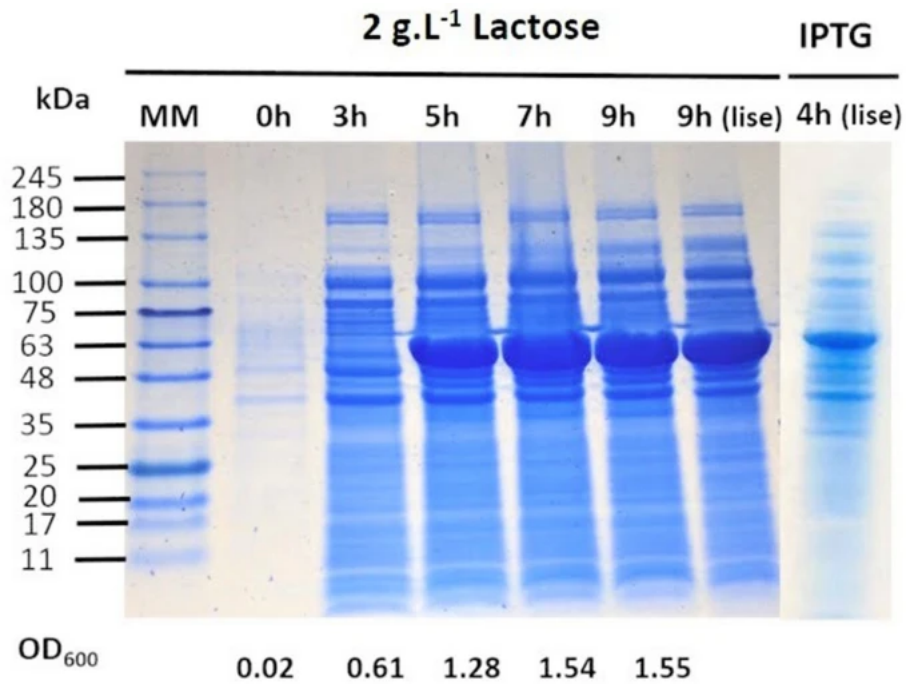
1. Roy, S., Chikkerur, J., Roy, S. C., Dhali, A., Kolte, A. P., Sridhar, M., & Samanta, A. K. (2018). Tagatose as a potential nutraceutical: Production, properties, biological roles, and applications. *Journal of Food Science*, 83(11), 2699-2709.
2. Guerrero-Wyss, M., Durán Agüero, S., & Angarita Dávila, L. (2018). D-Tagatose is a promising sweetener to control glycaemia: A new functional food. *BioMed Research International*, 2018(1), 8718053.
3. Mogha, K. V., Chaudhari, A. R., & Aparnathi, K. D. (2016). Tagatose: A low calorie multifunctional sweetener. *Res. Rev. J. Dairy Sci. Technol*, 5, 29-35.
4. Patra, F., Tomar, S. K., & Arora, S. (2009). Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *Journal of food science*, 74(1), R16-R23.
5. Lu, Y., Levin, G. V., & Donner, T. W. (2008). Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. *Diabetes, obesity and metabolism*, 10(2), 109-134.
6. Donner, T. W., Magder, L. S., & Zarbalian, K. (2010). Dietary supplementation with D-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol. *Nutrition research*, 30(12), 801-806.
7. Levin, G. V. (2002). Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *Journal of medicinal food*, 5(1), 23-36.
8. Kim, P. (2004). Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(3), 243-249.
9. Mei, W., Wang, L., Zang, Y., Zheng, Z., & Ouyang, J. (2016). Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus coagulans* NL01 and its application for D-tagatose production. *BMC biotechnology*, 16(1), 55.
10. Ahmed, A., Khan, T. A., Dan Ramdath, D., Kendall, C. W., & Sievenpiper, J. L. (2022). Rare sugars and their health effects in humans: a systematic review and narrative synthesis of the evidence from human trials. *Nutrition reviews*, 80(2), 255-270.

- 1 11. Ansari, S. A., & Damanhory, A. A. (2023). Biotechnological application of *Aspergillus*
2 *oryzae* β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified zinc oxide
3 nanoparticles. *Heliyon*, 9(2).
- 4 12. Bober, J. R., & Nair, N. U. (2019). Galactose to tagatose isomerization at moderate
5 temperatures with high conversion and productivity. *Nature Communications*, 10(1), 4548.
- 6 13. Bortone, N., & Fidaleo, M. (2020). Stabilization of immobilized L-arabinose isomerase for
7 the production of d-tagatose from D-galactose. *Biotechnology Progress*, 36(6), e3033.
- 8 14. Bosso, A., MORIOKA, L. R. I., SANTOS, L. F. D., & Suguimoto, H. H. (2016). Lactose
9 hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and
10 skimmed milk. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36(1), 159-165.
- 11 15. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
12 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*
13 *biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- 14 16. Chahed, A., Nesler, A., Navazio, L., Baldan, B., Busato, I., Ait Barka, E., ... & Perazzolli,
15 M. (2020). The rare sugar tagatose differentially inhibits the growth of *Phytophthora*
16 *infestans* and *Phytophthora cinnamomi* by interfering with mitochondrial
17 processes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 128.
- 18 17. Chang, C., Park, B. C., Lee, D. S., & Suh, S. W. (1999). Crystal structures of thermostable
19 xylose isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: possible
20 structural determinants of thermostability. *Journal of molecular biology*, 288(4), 623-634.
- 21 18. Cheng, S., Metzger, L. E., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2020). One-pot synthesis of
22 sweetening syrup from lactose. *Scientific reports*, 10(1), 2730.
- 23 19. Cheng, L., Mu, W., Zhang, T., & Jiang, B. (2010). An L-arabinose isomerase from
24 *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: cloning, expression, purification, and
25 characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(4), 1089-1097.
- 26 20. Choi, M. N., Shin, K. C., Kim, D. W., Kim, B. J., Park, C. S., Yeom, S. J., & Kim, Y. S.
27 (2021). Production of D-allose from D-allulose using commercial immobilized glucose
28 isomerase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 681253.
- 29 21. Córdova, A., Astudillo-Castro, C., Henriquez, P., Manriquez, N., Nuñez, H., Guerrero,
30 C., ... & Lehuedé, L. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic synthesis of galacto-
31 oligosaccharides using native whey with two commercial β -galactosidases: *Aspergillus*
32 *oryzae* and *Kluyveromyces var lactis*. *Food Chemistry*, 426, 136526.
- 33 22. Choi, M. N., Shin, K. C., Kim, D. W., Kim, B. J., Park, C. S., Yeom, S. J., & Kim, Y. S.
34 (2021). Production of D-allose from D-allulose using commercial immobilized glucose

1 isomerase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 681253.

2

3



4

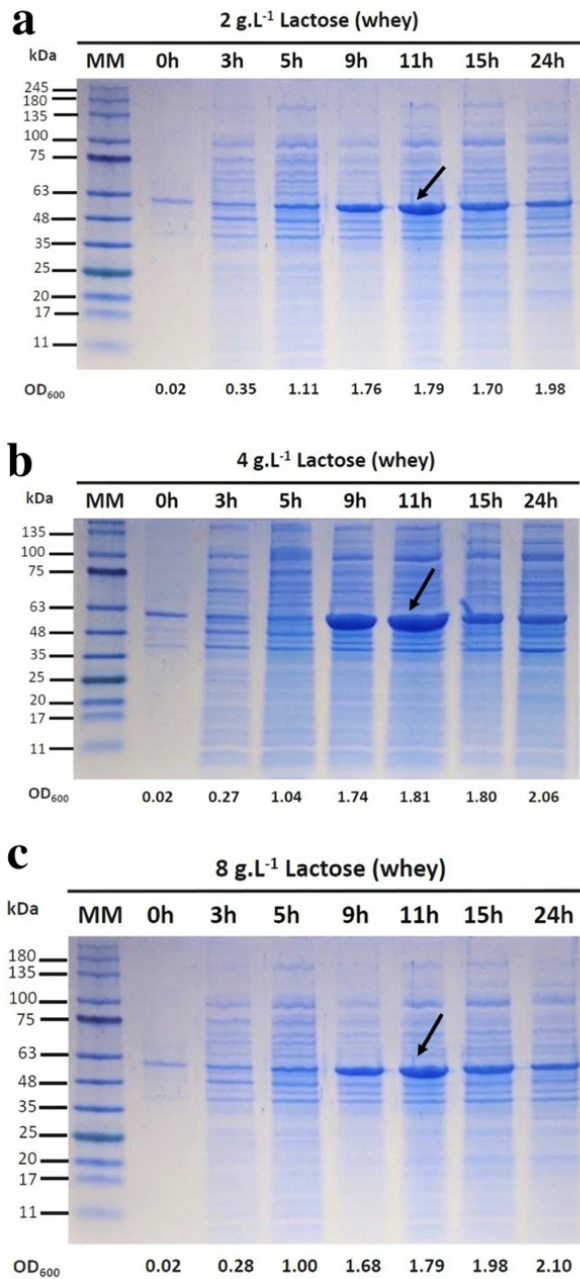
5 **Figure 1.** Electrophoretic profile of cell extracts produced after *E. faecium* L-AI
6 overexpression in *E. coli* BL21 using autoinduction medium with commercial lactose
7 or IPTG: effect of type of inducer and time of induction. Molecular weight standards
8 (MM) are on the left side of the gel and the sample time is given above each lane.

9

(Souza *et al*,2021)

10

1



2

3 **Figure 2.** Expression profiles of L-arabinose isomerase using different concentrations
 4 of residual whey lactose (whey) as the inducer. Induction was done at the concentration
 5 of 2 g/L (a), 4 g/L (b), and 8 g/L (c). Target recombinant protein is indicated by arrows

6

(Souza *et al*,2021)

7

1 **Table 1.** Area of the rL-AI bands and relative percentage (%) of protein production
2 using an auto-induction medium containing commercial lactose or residual whey
3 lactose for induction

Sampling time (h)	Lactose (commercial) 2 g/L		Lactose (whey) 2 g/L		Lactose (whey) 4 g/L		Lactose (whey) 8 g/L	
	Area	RP (%)	Area	RP (%)	Area	RP (%)	Area	RP (%)
3	0	0	1,380,698	32	1,280,870	18	1,201,577	23
5	9,836,217	81	1,825,941	43	1,281,234	18	1,938,012	38
9	12,117,246	100	4,006,891	93	6,767,125	96	4,360,184	85
11	n.d.	–	4,295,154	100	7,017,196	100	5,113,690	100
15	n.d.	–	3,693,719	86	2,636,790	38	3,664,548	72
24	n.d.	–	2,517,941	59	2,787,033	40	2,217,577	43

(Souza *et al*,2021)

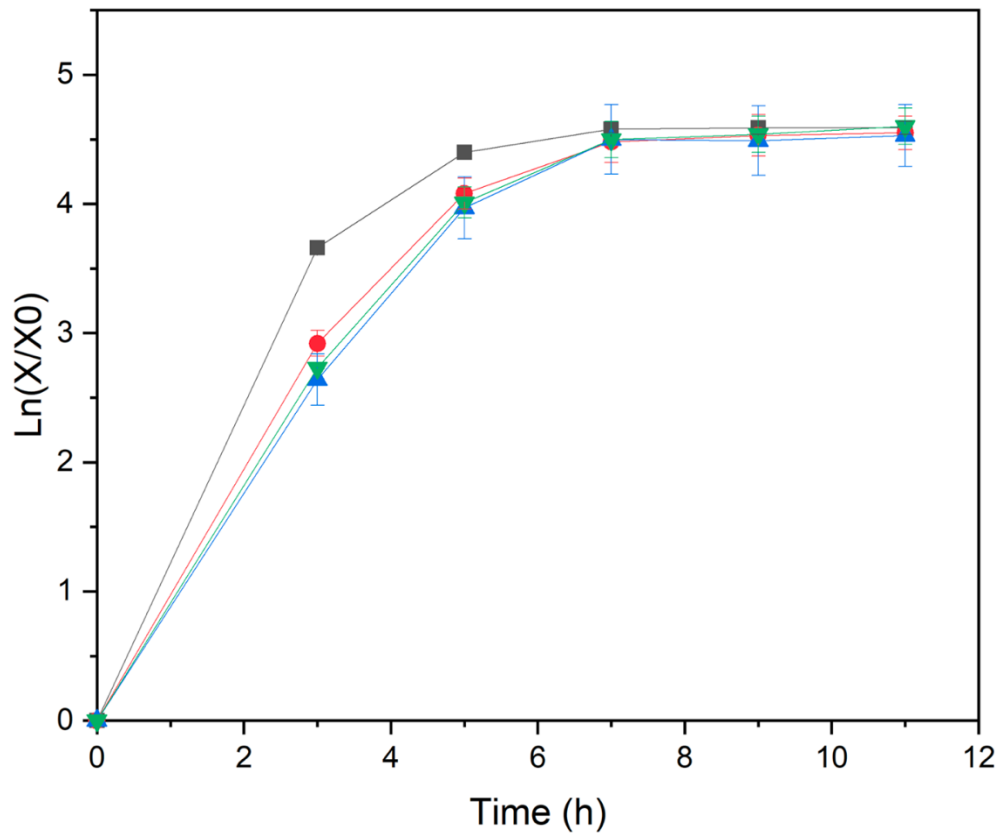
1 **Table 2.** Shake flasks production of rL-AI by *E. coli* expressing L-AI from *E. faecium*
2 DBFIQ E36 using different inducers: IPTG, commercial lactose (lac), and residual
3 whey lactose (lac–whey).

CM	Ind	<i>T</i> (h)	<i>At</i> (U/mL)	<i>Pr</i> (mg/mL)	<i>Sp act</i> (U/mg)	<i>P_p</i> (U/mL/h)
LB	IPTG	8	0.7±0.04	7.40±0.2	0.10	0.09
ZYM-5052	Lac	9	1.67±0.14	2.68±0.1	0.62	0.18
ZYM-5052	Lac–whey	11	1.52±0.01	4.60±0.1	0.33	0.14
ZYM-5052	Lac–whey*	11	3.8±0.00	7.08±0.06	0.53	0.34

5 (Souza *et al*,2021)

6

1



2

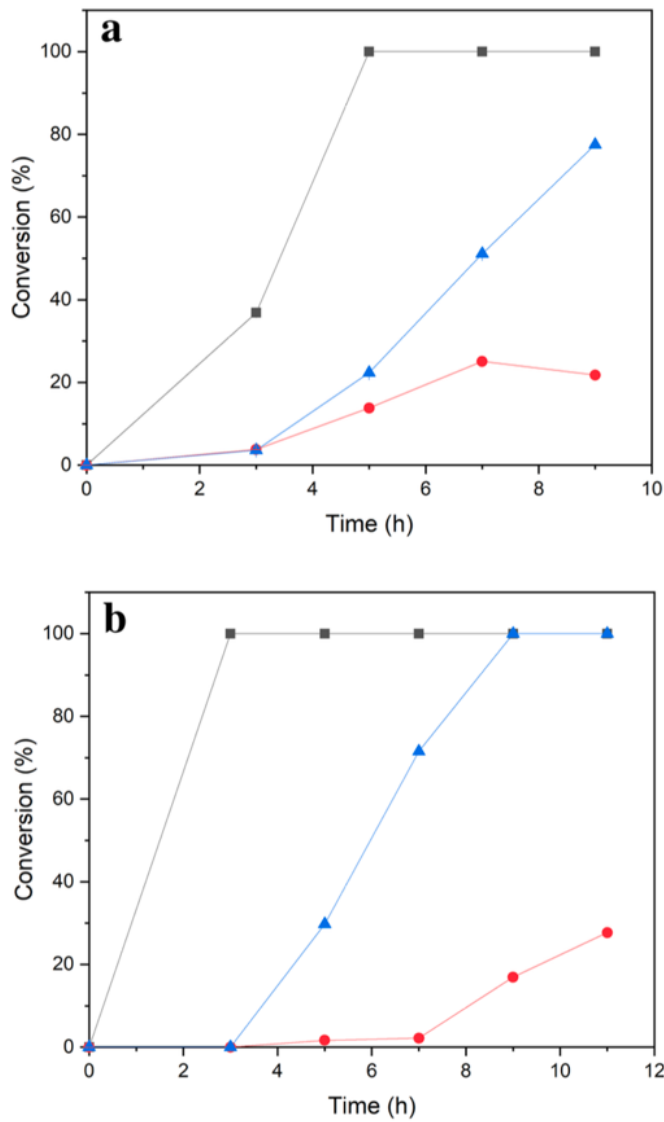
3 **Figure 3.** Effect of different inducers on recombinant *E. coli* growth expression.
 4 Commercial lactose (filled black square), lactose 2 g/L (whey) (filled red circle),
 5 lactose 4 g/L (whey) (filled blue triangle), and lactose 8 g/L (whey) (filled inverted
 6 green triangle) (Color figure online)

7

(Souza *et al.*,2021)

8

1



2

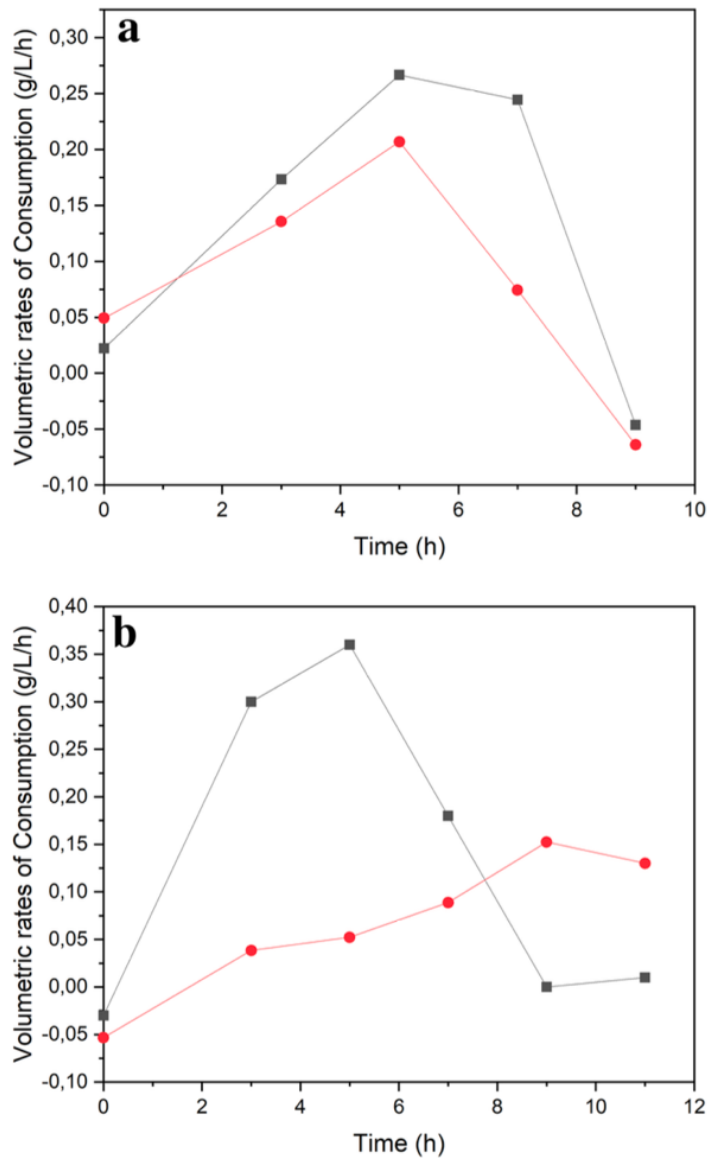
3 **Figure 4.** Substrate uptake (conversion) during rL-AI production using auto-induction
 4 method with pure lactose: glucose (filled black square), glycerol (filled red circle), and
 5 lactose (2 g/L) (filled blue triangle). Commercial lactose (a) or residual whey lactose
 6 (b) were used as inducers (Color figure online)

7

(Souza *et al.*,2021)

8

1



2

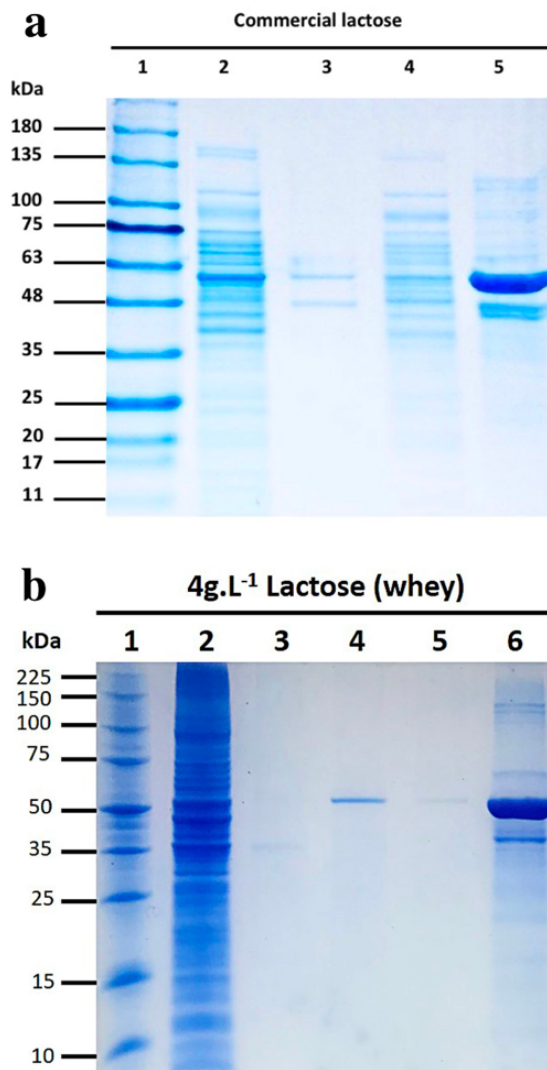
3 **Figure 5.** Volumetric rates of consumption of substrates: lactose (filled black square)
 4 and (filled red circle) glycerol. a Commercial lactose and b residual whey lactose
 5 (Color figure online)

6

(Souza *et al.*,2021)

7

1



2

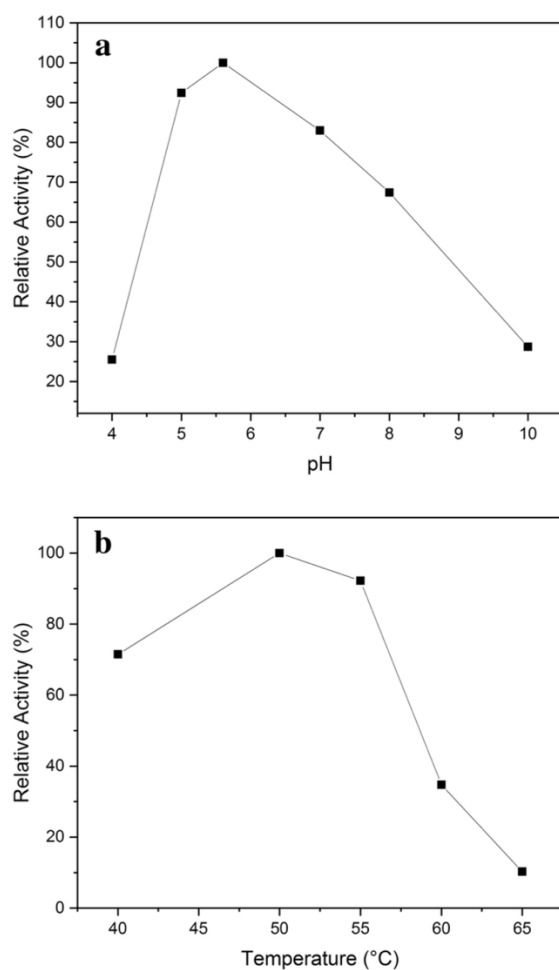
3 **Figure 6.** SDS–PAGE profile of the protein fractions from l-arabinose isomerase
 4 extracts produced by auto-induction after each purification step.

5 a Commercial lactose: 1 Molecular weight standards. 2 Fraction not retained in the
 6 Ni²⁺-sepharose column (auto-induction). 3, 4 Washings (auto-induction). 5 Purified
 7 enzyme (auto-induction).

8 b Residual whey lactose: 1 Molecular weight standards. 2 Enzyme extract. 3 Fraction
 9 not retained in the Ni²⁺-Sephadex column (whey). 4, 5 Washings. 6 Purified enzyme

10 (Souza *et al*,2021)

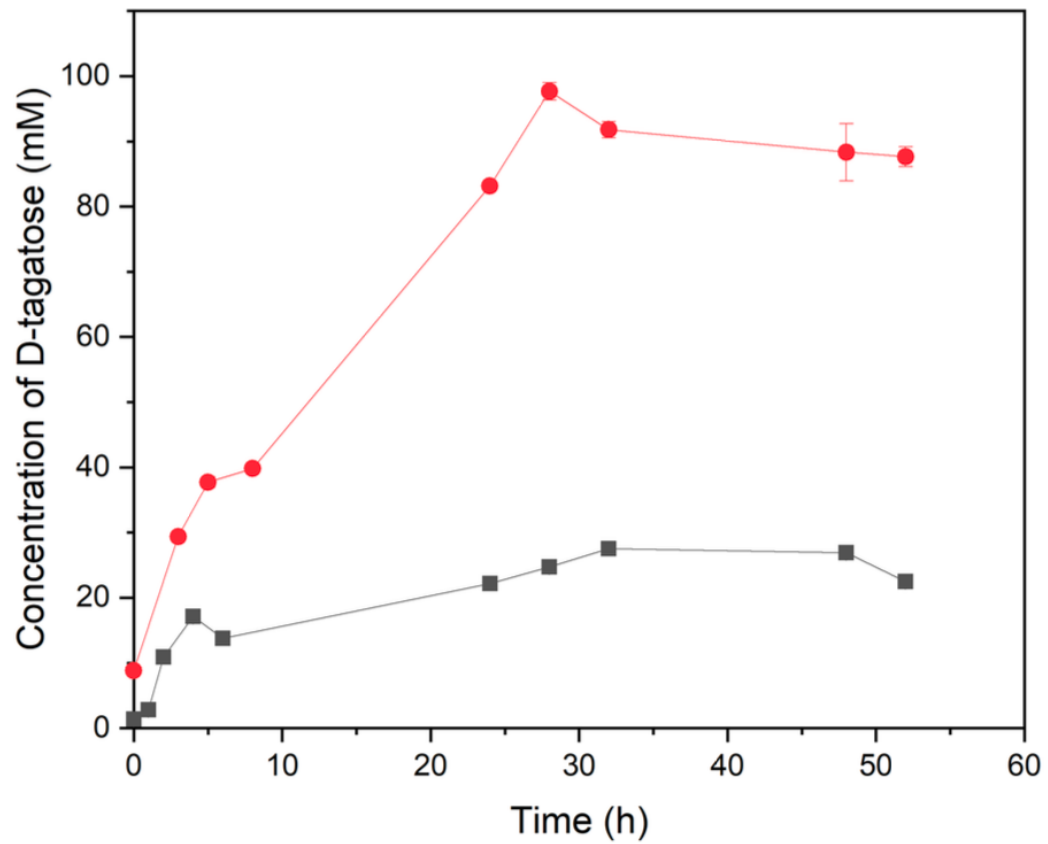
11



1
2 **Figure 7.** a Effect of pH on enzymatic activity. Residual activity was measured under
3 standard conditions (50 °C, 60 min). The activity at the optimal pH was defined as
4 100% (3.5 ± 0 U/mL).
5 b Influence of temperature on catalytic activity. Activity measured at pH 5.6, after 60
6 min of reaction. The best enzymatic activity was defined as 100% (3.0 ± 0 U/mL)
7 (Souza *et al.*,2021)

8

1



2

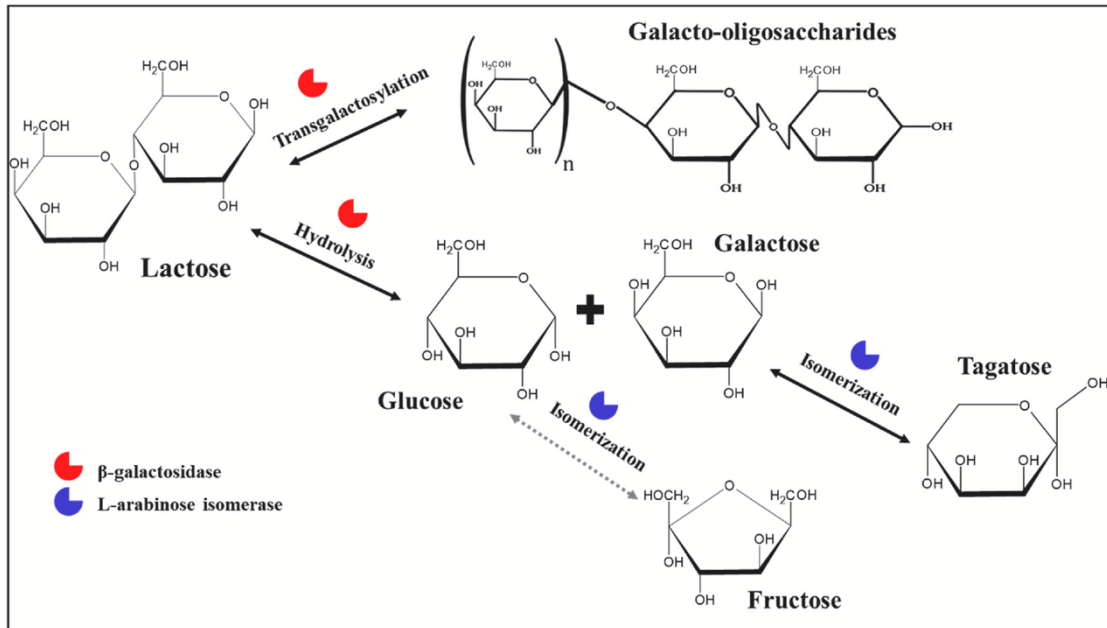
3 **Figure 8.** Concentration of D-tagatose produced as a function of the reaction time using
 4 (filled red circle) 500 mM D-galactose and (filled black square) 164 mM D-galactose
 5 final concentrations (Color figure online)

6

(Souza *et al.*,2021)

7

1



2

3 **Figure 9.** Scheme of the one-pot production of tagatose using L-arabinose isomerase
 4 from *Thermotoga maritima* and β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*.

5

(Aburto *et al*,2024)

6

1 **Table 3.** Parameters for the one-pot tagatose production.

Parameters	Description	Equation
Lactose conversion (X_{Lac})	Percentage of initial lactose which is hydrolyzed at the end of the one-pot synthesis of tagatose. Lac(i) is the initial lactose concentration and Lac is the lactose concentration remaining after reaction.	$X_{Lac} = \frac{Lac(i) - Lac}{Lac(i)} \cdot 100$
Tagatose yield (Y_{TAG})	Percentage of initial lactose converted to tagatose. M_{Tag} is the total mass of tagatose produced in the one-pot reaction and $M_{Lac(i)}$ is the initial mass of lactose.	$Y_{Tag} = \frac{M_{Tag}}{M_{Lac(i)}} \cdot 100$
Galacto-oligosaccharides yield (Y_{GOS})	Percentage of initial lactose converted to GOS. M_{GOS} is the total mass of GOS produced in the one-pot reaction and $M_{Lac(i)}$ is the initial mass of lactose.	$Y_{GOS} = \frac{M_{GOS}}{M_{Lac(i)}} \cdot 100$
Specific productivity of tagatose (π_{Tag})	Mass of tagatose produced (M_{Tag}) per unit of time (t) and unit of total mass of biocatalyst (β -gal plus L-Al) (M_P).	$\pi_{Tag} = \frac{M_{Tag}}{M_P \cdot t}$
Sugar ratio ($R_{Tag/Gal}$)	Tagatose to galactose mass ratio at the end of reaction.	$R_{Tag/Gal} = \frac{M_{Tag}}{M_{Gal}}$
Turnover number (TON)	Ratio of mass of tagatose produced at the end of reaction (M_{Tag}) and total mass of biocatalyst (M_P).	$TON = \frac{M_{Tag}}{M_P}$

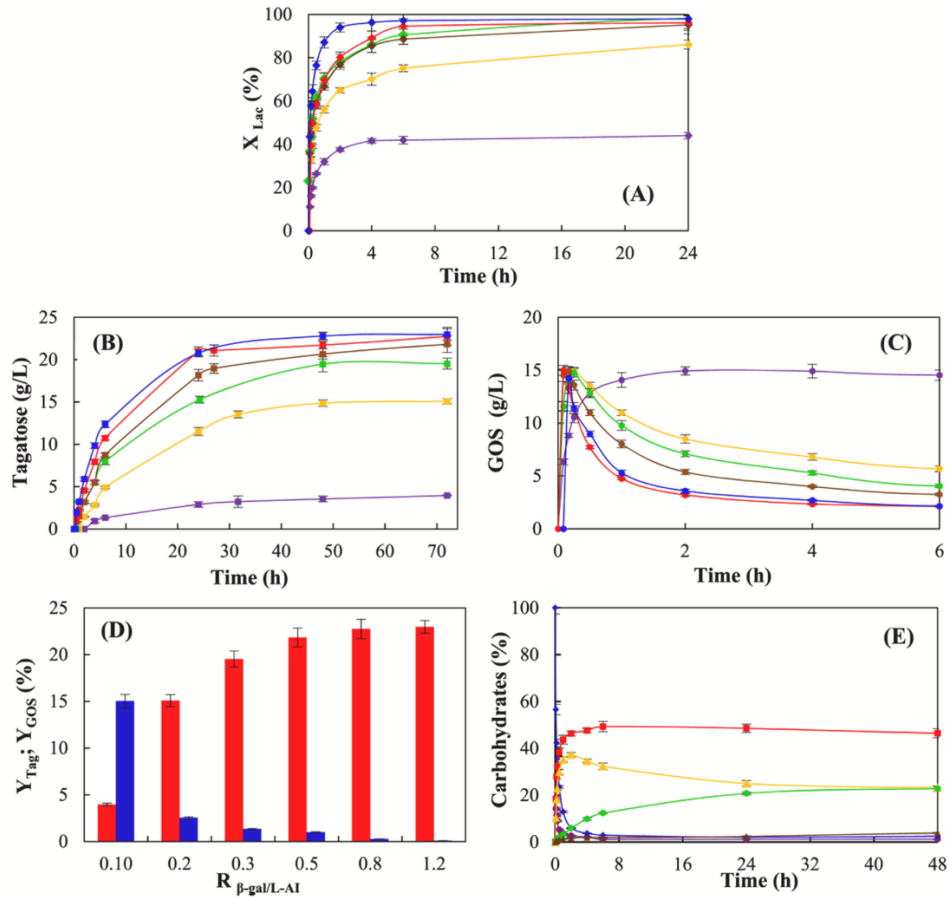
2

3

(Aburto *et al*,2024)

4

1



2

3 **Figure 10.** Effect of the ratio of enzymes ($R_{\beta\text{-gal/L-AI}}$ 0.1–1.2) on the one-pot

4 production of tagatose using 100 g/L of lactose, 100 mmol/L Tris-HCl buffer H 7.0,

5 1 mmol/L MnCl_2 and 60 °C. Figure 10A: Time course of lactose conversion (X_{Lac}) at6 0.1(●); 0.2(●); 0.3(●); 0.5(●); 0.8(●); 1.2(●) $R_{\beta\text{-gal/L-AI}}$. Figure 10B: Time course of7 tagatose production at 0.1(●); 0.2(●); 0.3(●); 0.5(●); 0.8(●); 1.2(●) $R_{\beta\text{-gal/L-AI}}$. Figure8 10C: Time course of GOS production at 0.1(●); 0.2(●); 0.3(●); 0.5(●); 0.8(●); 1.2(●) $R_{\beta\text{-gal/L-AI}}$. Figure9 10D: Y_{TAG} (bar ●) and Y_{GOS} (bar ●). Figure 10E: Carbohydrates10 composition where (●) lactose; (●) glucose; (●) tagatose; (●) galactose (●) fructose and
11 (●) GOS.

12

(Aburto *et al*,2024)

13

1 **Table 4.** Values of parameters obtained in the one-pot tagatose production.

$R_{\beta\text{-gal/L-}}$ Al(mg prot/mg prot)	Lactose(g/L)	Temperature(°C)	Specific productivity of tagatose (π_{Tag}) ^a			Ratio Sugars($R_{\text{Tag/Gal}}$) ^b			Turnover number (TON) ^c		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0.1	100	60	0.13	0.08	0.06	0.46	0.6	0.67	3.09	3.78	4.21
0.2			0.46	0.30	0.20	0.45	0.29	0.29	11.0	14.2	14.4
0.3			0.53	0.34	0.23	0.14	0.15	0.14	12.9	16.4	16.4
0.5			0.56	0.32	0.23	0.14	0.13	0.13	13.5	15.4	16.3
0.8			0.53	0.28	0.19	0.14	0.13	0.13	12.8	13.3	13.9
1.2			0.43	0.24	0.16	0.83	0.98	0.99	10.4	11.4	11.4
1.2	100	60	0.43	0.24	0.16	0.83	0.98	0.99	10.4	11.4	11.4
	200		0.77	0.44	0.31	0.64	0.67	0.68	18.5	21.2	22.3
	300		1.06	0.66	0.49	0.57	0.69	0.8	25.5	31.8	35.3
	400		1.33	0.84	0.62	0.51	0.67	0.76	31.8	40.8	44.7
	500		1.34	1.08	0.76	0.40	0.68	0.78	32.3	52.1	54.5
1.2	100	40	0.23	0.15	0.11	0.30	0.43	0.50	5.4	7.1	8.1
		50	0.35	0.21	0.14	0.57	0.76	0.86	8.28	10	9.7
		60	0.43	0.24	0.16	0.83	0.98	0.99	10.4	11.4	11.4

2

3 ^a π_{Tag} : mmol Tag/(g prot·h).

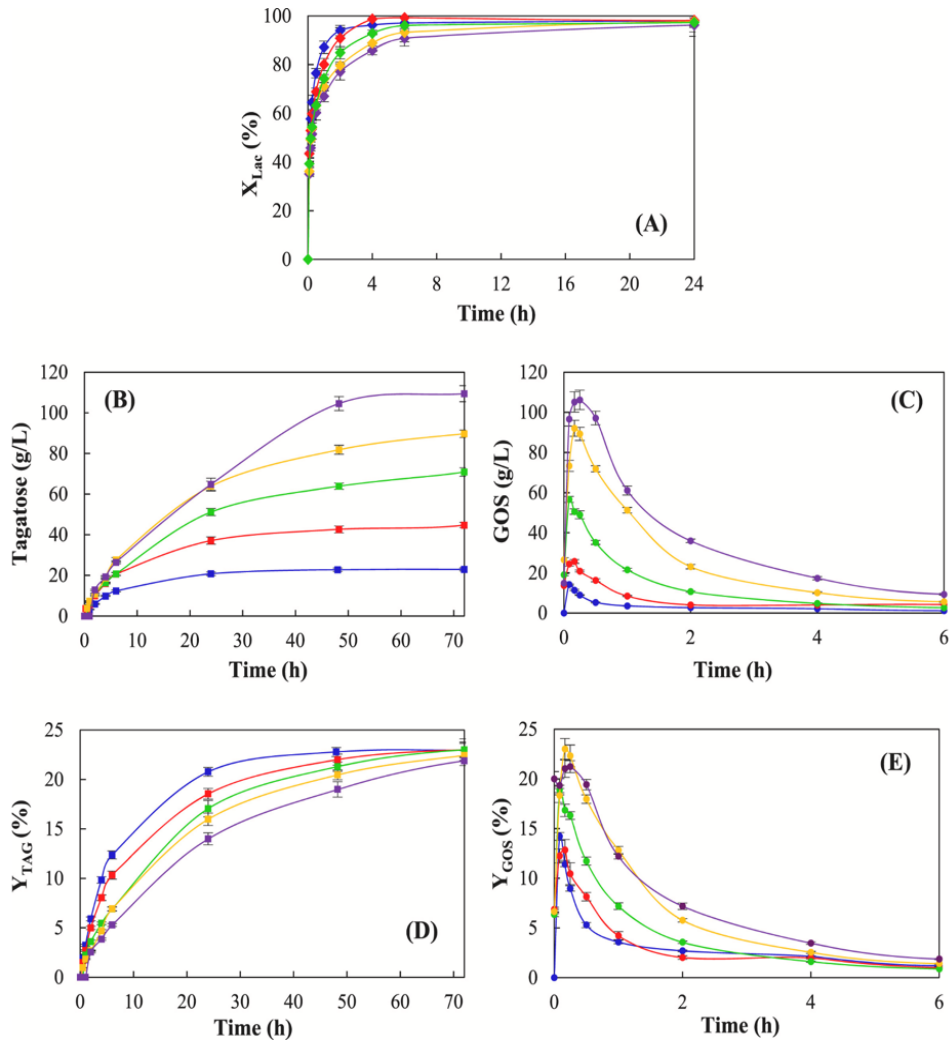
4 ^b $R_{\text{Tag/Gal}}$: mmol Tag/mmol Gal.

5 ^c TON: mmol Tag/g prot.

6 (Aburto *et al*,2024)

7

1



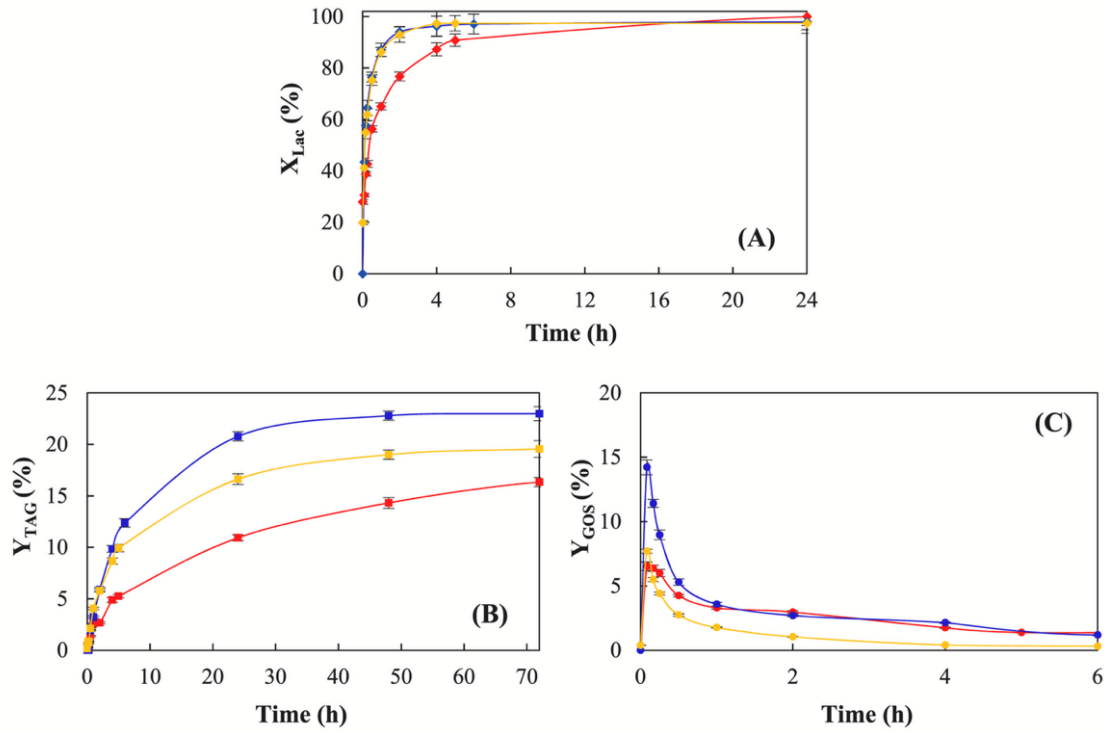
2

3 **Figure 11.** Effect of the initial lactose concentration on the one-pot production of
4 tagatose using R β -gal/L-AI 1.2, 100 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0, 1 mmol/L
5 MnCl₂ and 60 °C. Figure 11A: Time course of lactose conversion (X_{Lac}) at 100 (◆);
6 200 (◆); 300 (◆); 400 (◆); 500 (◆) lactose (g/L). Figure 11B: Time course of tagatose
7 production at 100 (■); 200 (■); 300 (■); 400 (■); 500 (■) lactose (g/L). Figure 11C:
8 Time course of GOS production at 100 (●); 200 (●); 300 (●); 400 (●); 500 (●) lactose
9 (g/L). Figure 11D: Tagatose yield (%) at 100 (■); 200 (■); 300 (■); 400 (■); 500 (■)
10 lactose (g/L). Figure 11E: GOS yield (%) at 100 (●); 200 (●); 300 (●); 400 (●); 500 (●)
11 lactose (g/L).

12

(Aburto *et al*,2024)

13



1

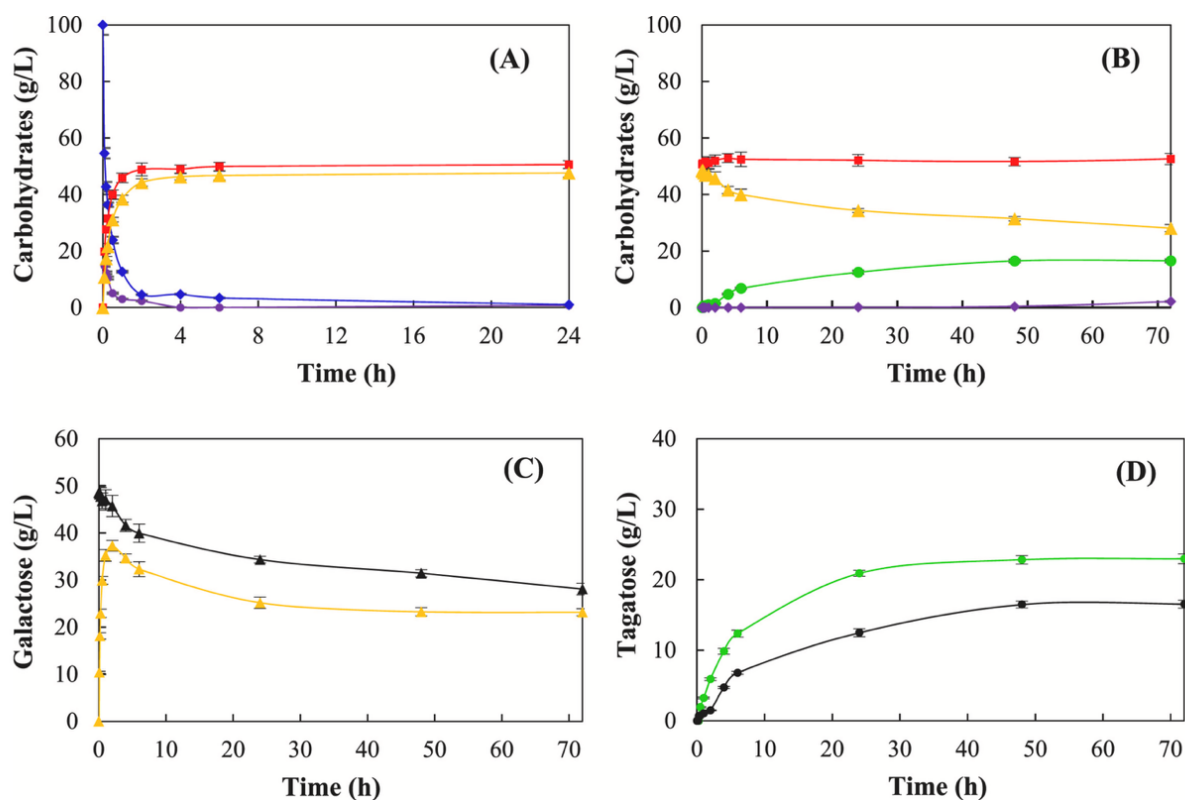
2 **Figure 12.** Effect of the operational temperature on the one-pot production of tagatose
3 using lactose (100 g/L), R β -gal/L-AI 1.2, Tris-HCl buffer (100 mmol/L) pH 7.0 and
4 1 mmol/L MnCl₂. Figure 12A: Time course of lactose conversion (X_{Lac}) at 40 (♦); 50
5 (◆) and 60 (●) (°C). Figure 12B: Tagatose yield (%) at 40 (■); 50 (□) and 60 (■)
6 (°C). Figure 12C: GOS yield (%) at 40 (●); 50 (●) and 60 (●) (°C).

7

(Aburto *et al.*,2024)

8

1



2

3 **Figure 13.** Comparison of the two-step sequential and one-pot production of
4 tagatose. Figure 13A: Hydrolysis reaction with β -gal from *A. oryzae* with 100 g/L of
5 lactose in 100 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.0, at 60 °C, (♦): lactose; (■): glucose; (▲):
6 galactose; (●): GOS. Figure 13B: Isomerization reaction with L-AI from *T.*
7 *maritima* using the hydrolysate at 60 °C, (■): glucose; (▲): galactose; (●): tagatose; (♦)
8 fructose. Figure 13C: Comparison of galactose consumption in sequential (▲) and one-
9 pot reaction (▲). Figure 13D: Comparison of galactose isomerization into tagatose in
10 sequential (●) and one-pot reaction (●).

11

(Aburto *et al*,2024)

12

Table 5. Comparison of the values of parameters obtained in the two-step sequential and one-pot production of tagatose.

	$Y_{\text{Tag}}^{\text{a}}$			$\pi_{\text{Tag}}^{\text{b}}$			$R_{\text{Tag/Gal}}^{\text{c}}$			TON^{d}		
Time (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
One-pot	20.9	22.8	23.0	0.43	0.24	0.16	0.83	0.98	0.99	10.4	11.4	11.4
Sequential	11.9	15.4	16.5	0.25	0.16	0.11	0.36	0.52	0.59	5.9	7.7	8.3

^a Tagatose yield (Y_{Tag}): (%).

^b Specific productivity of tagatose (π_{Tag}): mmol Tag/(g prot·h).

^c Sugars Ratio ($R_{\text{Tag/Gal}}$): mmol Tag/mmol Gal.

^d Turnover number (TON): mmol Tag/g prot.

(Aburto *et al*,2024)