

University of Groningen

## Mutational and biochemical analysis of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase enzymes

Meng, Xiangfeng

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Meng, X. (2015). *Mutational and biochemical analysis of Lactobacillus reuteri glucansucrase enzymes*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# 中文摘要

乳酸菌因其可发酵产生乳酸和其他营养及风味物质而被广泛应用于食品发酵中。乳酸菌产生的胞外多糖具有独特的理化性质和良好的工业应用前景,近年来受到广泛关注。葡聚蔗糖酶以蔗糖为底物合成的 $\alpha$ -葡聚糖是乳酸菌胞外多糖的重要组成部分之一。 $\alpha$ -葡聚糖可以作为生物增稠剂应用在食品工业中,在医用工业领域可以用作血浆扩容剂,也可以作为分离介质应用在科学研究领域。另外,由葡聚蔗糖酶合成的益生低聚糖也有着巨大的市场潜力

葡聚蔗糖酶是糖苷水解酶 70 家族 (GH70) 的主要成员,具有 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状催化结构域。根据受体底物的不同,葡聚蔗糖酶以蔗糖为底物可以催化三种反应,即利用正在延长的葡聚糖链作为受体底物合成多糖,利用低聚糖作为受体底物合成寡糖和利用水分子作为受体底物水解蔗糖为葡萄糖和果糖。虽然葡聚蔗糖酶的催化残基(亲核试剂 D1025,酸/碱催化剂 E1063 和过渡态稳定剂 D1136)高度保守,但是这些酶可以催化合成含有各种糖苷键的 $\alpha$ -葡聚糖。 $\alpha$ -葡聚糖的物理化学性质主要由它们的结构决定,尤其是糖苷键类型,分支程度,大小等。因此特异性合成具有所需物理化学性质的 $\alpha$ -葡聚糖需要对葡聚蔗糖酶的作用机理有充分的理解,这样我们才能够设计酶分子合成我们所需的产物。

首先,本论文探索了多糖合成的过程。我们借助基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS),核磁共振(NMR)以及高效离子色谱 (HPAEC-PAD) 等方法研究了 *Lactobacillus reuteri* 121 葡聚蔗糖酶 glucansucrase A (GTFA) 合成的初始寡糖的结构。结果表明 GTFA 以蔗糖为底物能够合成具有 $(\alpha 1\rightarrow 6)$ 和 $(\alpha 1\rightarrow 4)$ 键交替连接的葡聚寡糖。其次,本论文研究了葡聚蔗糖酶合成特定糖苷键型的结构基础。我们首先利用 *Lactobacillus reuteri* 180 的葡聚蔗糖酶 glucansucrase 180 (GTF180) 的晶体结构鉴定了参与形成受体底物结合位点的氨基酸残基,他们包括来自于结构域 B (Domain B) 的氨基酸残基 (L938, L940, A978 和 L981) 和来自于结构域 A (Domain A) 的氨基酸残基 (D1028, N1029, D1085, R1088 和 N1089)。我们采用半理性突变的方法研究了这些氨基酸残基在葡聚蔗糖酶结构和功能中的关系,葡聚蔗糖酶的产物特异性的机理,特别是决定合成的糖苷键型的因素。研究发现这些氨基酸残基对葡聚蔗糖酶 GTF180 的产物特异性具有决定性作用。在野生型 GTF180 合成的葡聚糖中 $(\alpha 1\rightarrow 6)$ 键和 $(\alpha 1\rightarrow 3)$ 键所占比例分别为 69% 和 31%。突变氨基酸残基 L940 为其他的氨基酸 (G, C, A, S, M, E, F 和 W) 时,合成的葡聚糖中的 $(\alpha 1\rightarrow 6)$ 键的比例显著增加,其中突变体 L940W 不具备合成 $(\alpha 1\rightarrow 3)$ 键的能力,只合成 $(\alpha 1\rightarrow 6)$ 键。氨基酸残基 A978 对于分支键的合成非常重要,突变 A978 为具有大的侧链的氨基酸残基 (L, P, F, Y) 时,合成的葡聚糖中所含的分支点减少;但是当突

变 A978 为具有较小侧链的氨基酸残基 (G, S) 时, 葡聚糖中所含分支点没有很大变化。分子动力学研究表明 A978 所在的受体底物结合位点 II' 的空间位置对于形成分支点非常重要, 具有较大侧链的氨基酸残基会部分阻断受体底物结合到 II' 位点形成分支点。氨基酸残基 D1028 也参与分支点的合成, 当突变 D1028 为具有大的侧链的氨基酸残基 (Y, W) 时, 其葡聚糖含有的分支点减少。在空间结构中, D1028 也位于受体底物结合位点 II' 附近, 但是在与 A978 相反的一侧, 证明其作用机理与 A978 相似。氨基酸残基 L981 参与受体底物结合位点的形成, 同时也参与底物蔗糖结合位点的形成, 突变 L981 为其他氨基酸导致酶的催化活力大大下降。当突变氨基酸残基 N1029 为其他氨基酸残基 (Y, T, G, M, R) 时, 突变体酶的转糖基活力大大下降, 表明其对 GTF180 的转糖基作用相当重要。突变研究表明氨基酸残基 L938 也是产物特异性的决定因子之一, 突变体酶合成的  $\alpha$ -葡聚糖具有不同比例的( $\alpha 1 \rightarrow 6$ )和( $\alpha 1 \rightarrow 3$ )键。当突变氨基酸残基 D1085, R1088 和 N1089 时, 突变体酶分子合成高度分支的新型葡聚糖。此外结构研究表明, 与 GH13 家族的酶相似, GH70 家族的酶具有结构域 A, B 和 C, 但是与 GH13 家族相比, GH70 家族具有两个新的结构域 IV 和 V。在本论文中, 我们研究了结构域 V 的功能, 结果表明结构域 V 可以促进葡聚蔗糖酶 GTF180 的多糖合成。

在本论文中, 我们研究了葡聚蔗糖酶的寡糖和多糖的产物结构, 葡聚蔗糖酶结构和功能之间的关系, 与其产物特异性决定因素。考虑到葡聚蔗糖酶的相似性, 这些残基的重要性可以扩展到其他葡聚糖蔗糖酶, 为研究新型  $\alpha$ -葡聚糖合成提供了新的理论支撑。

