

University of Groningen

Biochemical characterization of β -galactosidases and engineering of their product specificity

Yin, Huifang

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:

2017

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

Citation for published version (APA):

Yin, H. (2017). *Biochemical characterization of β -galactosidases and engineering of their product specificity*. [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

低聚半乳糖是由不同的半乳糖单元还原端连接一个葡萄糖或半乳糖分子构成的，聚合度一般为二到十个单位。因为它们与母乳中的寡聚糖有类似的益生元功能，低聚半乳糖已经被广泛添加到婴幼儿奶粉和食品中。 β -半乳糖苷酶在高浓度的乳糖作为底物时可以催化转糖基反应生成低聚半乳糖，受到了广泛的关注和研究。不同的 β -半乳糖苷酶产生的低聚半乳糖在成分、结构、聚合度、以及连接键型上存在很大差异。目前对 β -半乳糖苷酶产物特异性的结构基础还不清楚。本论文利用基于结构的半理性突变并结合对产物结构的详细解析研究了 β -半乳糖苷酶的产物结构及其产物特异性的结构基础。

我们首先研究对比了三种在工业上应用广泛的 β -半乳糖苷酶催化产生的低聚半乳糖的产量和成分，它们分别来源于 *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* 和 *Aspergillus oryzae*。研究结果表明，来源于 *Bacillus circulans* 的 β -半乳糖苷酶生产低聚半乳糖的产量最高，而且低聚半乳糖的结构也最丰富。我们从来源于 *B. circulans*, *K. lactis* 和 *A. oryzae* 的 β -半乳糖苷酶产生的产物中分别分离鉴定了 21、12 和 11 种不同的低聚半乳糖结构。来源于 *B. circulans* 的 β -半乳糖苷酶产生的低聚半乳糖主要键型包括(β 1 \rightarrow 4)、(β 1 \rightarrow 2)、(β 1 \rightarrow 3)和(β 1 \rightarrow 6)。其中，(β 1 \rightarrow 4)是产物中最丰富的键型。来源于 *K. lactis* 和 *A. oryzae* 的 β -半乳糖苷酶产物中(β 1 \rightarrow 6)是最主要的键型。对于三种 β -半乳糖苷酶主要产物的动态跟踪表明，低聚半乳糖的成分主要取决于酶的来源和反应时间。同时，我们用 ^{13}C 标记的半乳糖和葡萄糖探索了它们对酶反应过程的影响。结果表明，对于来源于 *B. circulans* 和 *K. lactis* β -半乳糖苷酶，水解反应产生的半乳糖和葡萄糖都作为受体底物参与了转糖基酶反应，生成了还原端不为乳糖的寡糖产物。对来源于 *A. oryzae* 的 β -半乳糖苷酶来说，葡萄糖参与了反应，而半乳糖是转糖基反应的抑制剂。

其次我们以来源于 *Bacillus circulans* 的 β -半乳糖苷酶为研究对象选取了位于活性中心的氨基酸残基并进行了定点突变，并且研究和解析了突变体所产生的低聚半乳糖，以阐明其产物特异性的结构基础。研究结果表明位于活性中心的 Arg484 对于低聚半乳糖的键型有着非常关键的作用。饱和突变表明所有在该位点的突变都改变了产物的键型，从而产生了含有不同组分的低聚半乳糖产物。NMR 分析表明，这种产物的主要键型是(β 1 \rightarrow 3)和(β 1 \rightarrow 4)，而野生型 β -半乳糖苷酶主要产物是(β 1 \rightarrow 4)键型。我们通过核磁共振 (NMR)、高效离子色谱 (HPAEC-PAD) 和基质辅助激光解析电离飞

行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 鉴定了 10 种全新的低聚半乳糖结构, 从而使低聚半乳糖的结构数据库从 60 种扩大到了 70 种。这也是首次报道利用酶分子改造的方法改变 β -半乳糖苷酶的产物特异性。同时, 我们研究了处于活性位点中心的其他 8 个氨基酸残基(Arg185, Asp481, Lys487, Tyr511, Trp570, Trp593, Glu601, and Phe616)的作用。氨基酸残基 Arg185 和 Glu601 位于-1 位点, 在 GH2 家族的 β -半乳糖苷酶中高度保守。对于酶活起关键作用, 推测参与了底物的结合和定位。氨基酸残基 Tyr511 与临近的亲核试剂 Glu532 有氢键作用, 推测有协助催化的作用。氨基酸残基 Trp570, Trp593 和 Phe616 在活性位点形成了疏水口袋, 影响底物结合的位点。氨基酸残基 Lys487 和 Asp481 位于+1 位点, 能够影响底物和酶的结合方式, 从而改变产物的组成和键型。

最后我们比较了 β -半乳糖苷酶用乳糖和乳果糖两种不同底物所产生的产物在结构上的差异性。以乳果糖作为底物, *B. circulans* β -半乳糖苷酶野生型和 R484H 突变体的可以催化合成低聚半乳果糖。我们总共鉴定了 8 种低聚半乳果糖结构, 其中 5 种是首次报道。双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentium* 和 *Bifidobacterium breve*) 能利用低聚半乳果糖并且生长状况良好。表明新合成的低聚半乳果糖作为益生元有很大的应用前景。

