

## 研究报告

# GH42 家族保守氨基酸位点累积突变对 *Geobacillus stearothermophilus* 来源 $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 催化活性的影响

董艺凝<sup>1</sup>, 陈卫<sup>2</sup>, 张灏<sup>2</sup>, 顾海洋<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 陈海琴<sup>\*2</sup>

1 滁州学院生物与食品工程学院, 安徽 滁州 239000

2 江南大学食品学院 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

董艺凝, 陈卫, 张灏, 顾海洋, 刘洋, 陈海琴. GH42 家族保守氨基酸位点累积突变对 *Geobacillus stearothermophilus* 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 催化活性的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2532-2544.

DONG Yining, CHEN Wei, ZHANG Hao, GU Haiyang, LIU Yang, CHEN Haiqin. Cumulative effect of mutations at conserved sites of GH42 family on the catalytic activity of  $\beta$ -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2532-2544.

**摘要:**【背景】 $\beta$ -半乳糖苷酶转糖苷活性弱, 产物低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)易被水解, 致其催化得率普遍较低。【目的】以 GH42 家族 *Geobacillus stearothermophilus* 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 为对象, 探讨家族保守氨基酸位点突变对  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 催化活性的影响。【方法】在单点突变体功能研究基础上, 采用定点突变与化学修饰相结合的方法, 对保守氨基酸位点 E303 与 F341 进行累积突变。【结果】与野生型酶相比, 所构建双点突变体 Ox-E303C/F341S 水解活性降低为 30%; GOS 最大得率由 0.75% 提高到 19.50%。【结论】家族保守氨基酸位点累积突变能够使单点突变体功能得到共同进化, 降低  $\beta$ -半乳糖苷酶水解活性和底物抑制作用, 能够提高其转糖苷催化活性。

**关键词:**  $\beta$ -半乳糖苷酶; 累积突变; 低聚半乳糖; GH42 糖苷水解酶家族; 转糖苷催化活性

资助项目: 国家自然科学基金(31301523, 31171636); 安徽省教育厅重点研究项目(KJ2021A1071, KJ2020A0715); 滁州市科技计划(2021ZD017, 2021GJ011); 高校优秀青年骨干人才项目(gxyq2022100); 滁州学院科研项目(2020qd36, 2022XJZD23, 2022XJZD20)

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (31301523, 31171636), Key Project of Education Commission of Anhui Province (KJ2021A1071, KJ2020A0715), the Chuzhou Science and Technology Project (2021ZD017, 2021GJ011), the Outstanding Young Backbone Talents Project of Universities (gxyq2022100), and the Scientific Research Project of Chuzhou University (2020qd36, 2022XJZD23, 2022XJZD20).

\*Corresponding author. E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-08-17; Accepted: 2022-11-14; Published online: 2023-01-10

## Cumulative effect of mutations at conserved sites of GH42 family on the catalytic activity of $\beta$ -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*

DONG Yining<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>2</sup>, ZHANG Hao<sup>2</sup>, GU Haiyang<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, CHEN Haiqin<sup>\*2</sup>

1 School of Biological Science and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] The weak transglycosidase activity of  $\beta$ -galactosidase and the hydrolyzable property of the product galactooligosaccharides (GOS) results in the low product yield. [Objective] To study the effect of mutations at highly conserved sites of glycoside hydrolase family 42 (GH42) on the catalytic activity of the  $\beta$ -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*. [Methods] On the basis of the functional analyses of single site mutations, the conserved sites E303 and F341 were cumulatively mutated by the combination of site-directed mutagenesis and chemical modification. [Results] The double-site mutant Ox-E303C/F341S was constructed. Compared with the wild-type enzyme, the double mutations reduced the hydrolysis activity to 30% and increased the GOS yield from 0.75% to 19.50%. [Conclusion] The cumulative mutations of conserved sites enable co-evolution of single-site mutant functions. Reducing the hydrolytic activity and substrate inhibition can improve the transglycosidase activity of  $\beta$ -galactosidases. This work provides a reference for the modification and regulation of the transglycosylating activity of GH42  $\beta$ -galactosidases.

**Keywords:**  $\beta$ -galactosidase; cumulative mutation; galactooligosaccharides (GOS); glycoside hydrolase family 42 (GH42); transglycosylating activity

$\beta$ -半乳糖苷酶(EC.3.2.1.23)具有水解和转糖苷两种催化功能,能以乳糖为底物合成低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)<sup>[1]</sup>。GOS是一种重要的功能性低聚糖,主要用于婴幼儿配方食品中代替母乳源低聚糖(human milk oligosaccharides, HMOs),对小肠起到保护屏障及调控益生菌生长作用<sup>[2]</sup>。不同生物来源  $\beta$ -半乳糖苷酶 GOS 合成能力及其分子组成差异较大,并直接影响 GOS 益生元性<sup>[3]</sup>。受水解反应及产物抑制等多种因素制衡,  $\beta$ -半乳糖苷酶催化 GOS 得率普遍处于 20%–50%水平<sup>[4-5]</sup>。我国对 GOS 的研究与应用与发达国家相比起步较晚,

GOS 得率不足 40%,有效成分含量小于 60%<sup>[6-8]</sup>。自 2008 年批准 GOS 作为新资源食品以来,国内具有产业化生产规模的企业数量较少,高纯度 GOS 产品在我国还处于空白阶段。我国 GOS 产业无论是产量还是质量都有待发展。

近 20 年来,针对 GOS 合成开展了持久的研究探索<sup>[9-11]</sup>。例如,2001 年 Hansson 等将 *Pyrococcus furiosus* 来源  $\beta$ -葡萄糖苷酶 Phe426 位点突变为酪氨酸,使 GOS 得率由 40%提高到 45%<sup>[12]</sup>。2009 年,Placier 等首先通过随机突变结合活性筛选的方法获得转糖苷催化活性改良的突变体 R109K;再对 R109 位点进行饱和突变获得转糖

昔催化活性进一步提高的突变体酶 R109W, 在以乳糖作为底物的反应体系中, 其低聚半乳糖得率由 2% 提高到 23%<sup>[13]</sup>。2013 年, Wu 等将 *Sulfolobus solfataricus* 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶分子与已有同源晶体结构进行比对, 预测并针对可能参与 GOS 结合的 Phe441 位点进行定点改造, 成功地将 GOS 得率由 50.9% 提高到 61.7%<sup>[14]</sup>。2019 年, Gao 等采用破坏-1 糖苷结合位点氢键网络与提高催化活性中心疏水性相结合的理性设计策略, 对 *Aspergillus oryzae* 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶 N140 和 W806 位点进行定点突变, 所得双点突变体 N140C/W806F 将 GOS 得率由野生型的 35.7% 提高到 59.8%<sup>[15]</sup>。

已有研究显示, 通过分子改造调控糖苷水解酶转糖苷催化功能, 是提高 GOS 得率的有效技术途径<sup>[16-18]</sup>。本研究前期通过分子结构模拟与底物对接预测了参与 GH42 家族 *Geobacillus stearothermophilus* 来源  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 底物结合的氨基酸位点, 并通过位点改造获得了催化活性改良的突变体酶<sup>[19-20]</sup>。在参与底物结合的氨基酸位点中发现 Phe341 位点突变可以改变 BgaB 对水解产物半乳糖的亲和力, 从而调控半乳糖对酶活的抑制作用, 并以此获得底物抑制作用降低突变体 F341S; 前期研究还获得了亲核催化氨基酸位点 Glu303 的-SOO<sup>-</sup>替换突变体 Ox-E303C, 该突变体提高了 BgaB 转糖苷催化活性。在此研究基础上, 本研究以 Glu303 和 Phe341 氨基酸位点为目标, 探讨位点累积突变对酶催化活性的影响, 以期对 GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶分子调控机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

重组表达所用 *Geobacillus stearothermophilus*

来源  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 *bgaB* (GenBank 登录号为 AAA22262.1, 672 aa) 和 *Escherichia coli* JM109、DH5 $\alpha$  及质粒载体 pKK223-3 均由江南大学食品生物技术中心菌种库(Culture Collection of Food Microorganisms, Jiangnan University CCFM)保存。

#### 1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 用于宿主菌大肠杆菌的培养。在 LB 培养基中加入氨苄青霉素至终浓度为 100.0  $\mu$ g/mL, 用于重组菌的培养和筛选。

TB 培养基(g/L): 蛋白胨 12.00, 酵母提取物 24.00, 甘油 5.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.31, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 16.43, 用于目的蛋白的诱导表达。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶, 大连宝生物工程有限公司; DNA 聚合酶, Toyobo 公司; 限制性内切酶 *Dpn* I, Fermentas 公司; 氨苄青霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; DNA 琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; PCR 产物纯化试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 北京庄盟生物基因科技有限公司; 镍亲和柱(Ni-Chelating column), Qiagen 公司。

PCR 仪, G-STROM 公司; 冷冻离心机, Eppendorf 公司; 核酸电泳仪、凝胶电泳仪和凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 微孔板检测系统, Molecular Devices 公司; 可见分光光度计, 尤尼柯上海仪器有限公司; 超声波破碎仪, Sonics & Materials 公司; 高效液相色谱, 大连依利特分析仪器有限公司; 蒸发光散射检测器(ELSD), 奥泰科技有限公司; Discovery Studio 分子动力学模拟软件, BIOVIA 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GH42 家族 $\beta$ -半乳糖苷酶生物信息分析

GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶氨基酸序列通过

EC 编码(EC 3.2.1.23)在 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 无冗余数据库 (non-redundant database)、UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)和 CAZy 数据库(<http://www.cazy.org/>)中检索获得。BgaB 同源结构 3TTY 于 PDB 数据库获得; 多重序列比对采用 MEGA 11 软件 CLUSTAL 算法完成(<http://www.megasoftware.ent/>)。

结合多重序列及结构比对分析构建 GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶底物结合位点“序列轮廓”(sequence profile)。首先, 以 3TTY 为模板, 利用 Discovery Studio 对 BgaB 分子结构进行同源建模。通过 LibDock 将底物与 BgaB 活性口袋进行分子对接, 并以底物分子为中心, 将参与底物结合氨基酸位点设定在 5Å 范围内。采用多重序列比对分析参与底物结合氨基酸位点在 GH42 家族中的保守情况, 并提交 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>)生成 GH42 家族底物结合氨基酸位点序列 Logo。

### 1.2.2 E303C/F341S 突变体构建

以实验室已构建质粒 pKK223-3-*bgaB-F341S* 为模板, 采用快速全质粒扩增突变法(QuickChange® site-directed mutagenesis protocol)针对 E303 氨基酸位点构建半胱氨酸(Cys)替换的单点突变体, 引物序列设计为 5'-GTCAACCGTTTATTTT GATGTGCCAGGTAACCTCACATGTTAA-3'。

### 1.2.3 野生型及突变体酶的表达与纯化

野生型及突变酶在 *E. coli* JM109 中进行重组表达。挑选重组菌单克隆接种于 5 mL LB 抗性培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养过夜至饱和。将饱和种子液按 1%接种于 200 mL LB 抗性液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  达到 0.6–1.0。加入 1 mmol/L IPTG 于 20 °C 诱导表达过夜后 3 000 r/min 离心 20 min 收集菌体。用磷酸缓冲液(100 mmol/L, pH 7.0)重悬并加入蛋白酶抑制剂(1×Cocktail)后, 冰浴

条件下超声(工作 1 s, 间歇 9 s, 功率 200 W, 总时长 30 min)破壁。将破胞液于 55 °C 热处理 30 min 去除不耐热杂蛋白, 经 12 000 r/min 离心 20 min 收集上清制得粗酶液。粗酶液过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上镍亲和柱。先用 6 倍柱体积 washing buffer (分别含咪唑浓度 20–100 mmol/L)梯度洗脱杂蛋白质, 最后用 4 倍 elution buffer (含 250 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白, 收集洗脱液。用磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0)透析得纯化酶蛋白样品。

### 1.2.4 突变体 Ox-E303C/F341S 制备<sup>[21]</sup>

突变体 E303C/F341S 经不同浓度 KI 处理后, 其 303 位点-SH 侧链被氧化为-SOO<sup>-</sup>, 得到突变体 Ox-E303C/F341S。其氧化反应体系如表 1 所示, 体系合计 100  $\mu$ L, 含 0.25 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5)、10  $\mu$ mol/L Br<sub>2</sub>、0–0.3 mol/L KI。以野生型酶作为对照, 25 °C 氧化反应 30 h。

### 1.2.5 水解活性测定

按 Gist-Bracades 法<sup>[22]</sup>测定水解活性。取 100  $\mu$ L 酶液和 900  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)加入 10 mL 试管中混匀, 加 5.0 mL 邻硝基苯  $\beta$ -D-半乳糖苷(ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactoside, ONPG)为底物, 55 °C 精确反应 10 min 后, 迅速取出置于冰水浴中并加入 2.0 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液终止反应。以空白值为参比, 室温下用分光

表 1 突变体氧化体系

Table 1 Reaction conditions for the mutant oxidation

Items	Volume ( $\mu$ L)	Final concentration ( $\mu$ mol/L)
Enzyme solution	5	3
Phosphate buffer (pH 6.5)	85	250
KI	5	0–300
Br	5	10
Total	100	

25 °C 下反应

Reaction occurs at 25 °C.

光度计(420 nm)测定样品吸光度。酶蛋白含量采用 BCA 法测定<sup>[23]</sup>。按以下公式计算水解活性:

$$U(g) = \frac{E_{420} \times 8}{4.45 \times 10 \times E_w} \quad (1)$$

式中:  $E_{420}$  为 420 nm 处的吸光度值;  $E_w$  为 100  $\mu$ L 所用酶液含酶质量(g); 8 为反应总体积; 10 为反应时间(min); 4.45 为在实验条件下 1  $\mu$ mol-ONP/mL 的吸光度值。

### 1.2.6 反应历程及产物分析

于氧化反应体系(pH 6.5, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, 55  $^{\circ}$ C)中加入 20  $\mu$ L 500 mmol/L 乳糖作为底物, 取不同反应时间混合物于 95  $^{\circ}$ C 加热 5 min 终止反应。将反应混合物梯度稀释后进行高效液相色谱(HPLC)定量分析。色谱柱: TSKgel Amide-80 氨基柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈与水按体积比 70:30 混合; HPLC 条件: 流速 1.0 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样量 15  $\mu$ L; 蒸发光散射检测器: 漂移管温度 45  $^{\circ}$ C;  $N_2$  压力  $3.0 \times 10^5$  Pa。

分别配制浓度为 2、4、6、8、10、12 mmol/L 葡萄糖、半乳糖和乳糖标准溶液, 用进样器精确吸取标准工作液各 15  $\mu$ L 注入液相色谱, 按照上述色谱条件, 记录标准品色谱峰保留时间和峰面积。以葡萄糖、半乳糖和乳糖浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制标准曲线。每隔 10 h 取反应液 15  $\mu$ L 注入液相色谱, 记录 30 min 色谱峰保留时间及峰面积, 根据标准曲线计算乳糖、半乳糖和葡萄糖浓度(mmol/L), 再依摩尔质量换算为质量浓度(mg/L)。GOS 相对产量为最终产物合成浓度占初始乳糖浓度的百分比<sup>[13]</sup>, 计算公示:

$$GOS(\%) = \frac{m_{Lac0} - m_{Gal} - m_{Glc} - m_{Lact}}{m_{Lac0}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $M$  为各组分质量浓度(mg/L);  $m_{Lac0}$  为初始乳糖浓度;  $m_{Lact}$  为终产物中乳糖浓度;  $m_{Gal}$

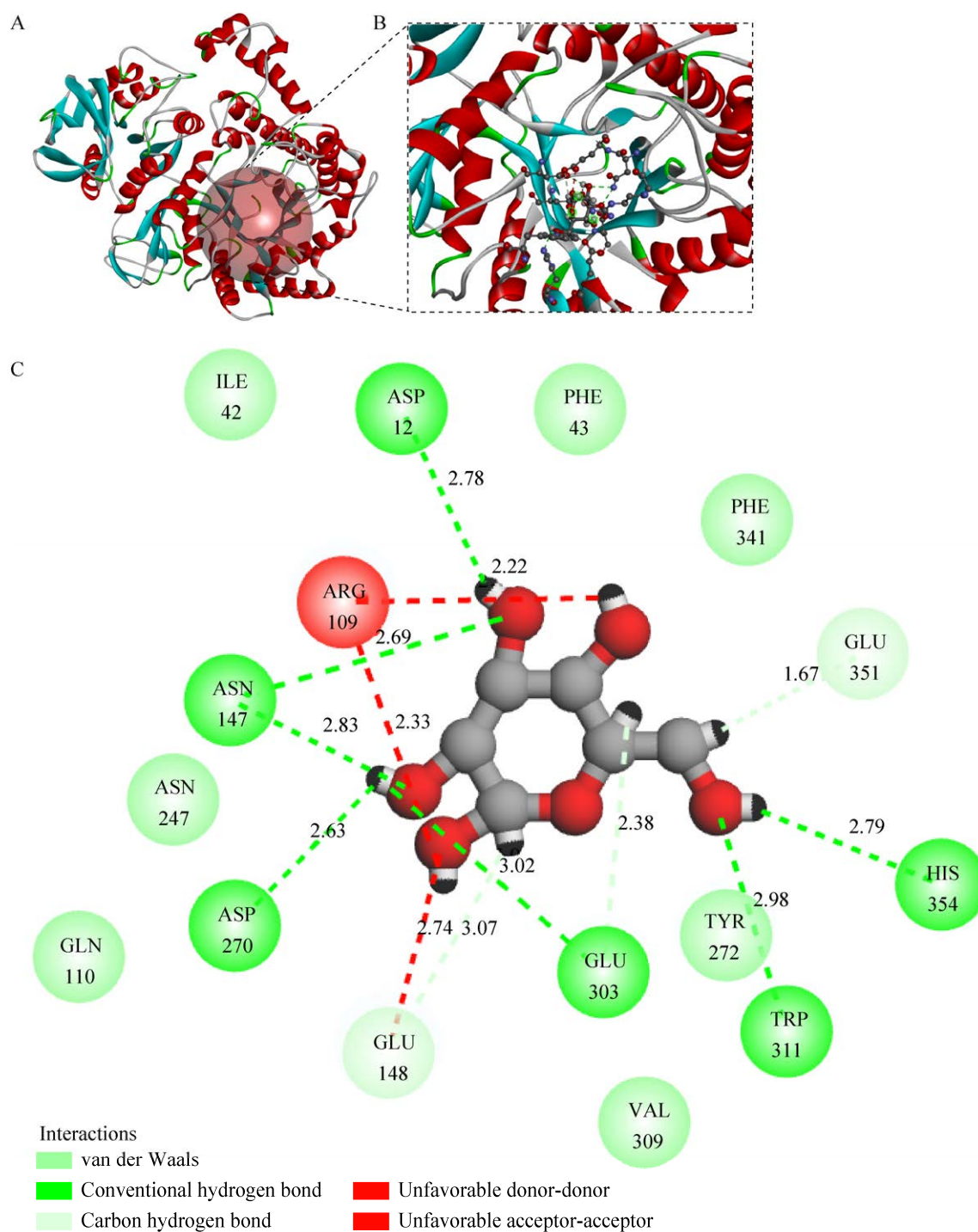
为半乳糖浓度;  $m_{Glc}$  为葡萄糖浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 功能氨基酸位点的选择

$\beta$ -半乳糖苷酶可利用转糖苷活性催化乳糖合成聚合度不等的低聚半乳糖(GOS), 分子式为 Gal-(Gal) $n$ -Glc/Gal ( $n$  为 0-6)<sup>[24-25]</sup>。同时又可利用其水解活性将转糖苷产物 GOS 水解为葡萄糖和半乳糖等。这些水解产物特别是半乳糖的积累对  $\beta$ -半乳糖苷酶活性具有显著抑制作用<sup>[26-27]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶水解活性大于转糖苷活性, 同时又存在底物抑制作用, 导致 GOS 得率普遍较低<sup>[28]</sup>。已有研究显示, 参与底物结合的氨基酸位点对酶催化活性具有调控作用<sup>[15,29-30]</sup>。本研究采用同源建模与底物对接方法对 BgaB 分子中参与半乳糖结合的氨基酸位点进行了预测。如图 1 所示, BgaB 分子采用典型 TIM (distorted triosephosphate isomerase) 催化结构域(图 1A), 参与半乳糖分子结合的氨基酸位点主要分布于 TIM 结构域内(图 1B), 其中通过氢键作用参与半乳糖结合的位点 9 个、非氢键作用结合位点 7 个(图 1C)。

参与底物结合的氨基酸位点中 Phe341 突变可以改变 BgaB 对半乳糖分子的亲和力, 进而调控其对酶活的抑制作用<sup>[31-32]</sup>; 将亲核催化氨基酸位点 Glu303 侧链替换为-SOO<sup>-</sup>可提高 BgaB 转糖苷催化活性<sup>[33]</sup>。在此研究基础上, 本研究对 GH42 家族 2 081 个  $\beta$ -半乳糖苷酶非冗余氨基酸序列进行比对, 分析了参与底物结合氨基酸位点在家族中的进化情况, 结果如图 2 所示。Glu303 为家族内高度保守的氨基酸位点, 保守度 100%; Phe341 为保守氨基酸位点, 保守度为 89%, 表明这 2 个氨基酸位点在进化过程中对 GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶催化活性的形成和保持具有重要作用。本研究以 Glu303 和



**图 1  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 分子结构及半乳糖结合模型** A: BgaB 单体结构及活性中心. B: 半乳糖结合模式. C: 参与半乳糖结合的氨基酸位点

Figure 1 The molecular structure and the galactose binding mode of  $\beta$ -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*. A: Overall structure of the BgaB monomer and the active center. B: The galactose bound in the active center of BgaB. C: A drawing of the surrounding amino acid residues of  $\beta$ -galactosidase BgaB interacting with the galactose molecule.

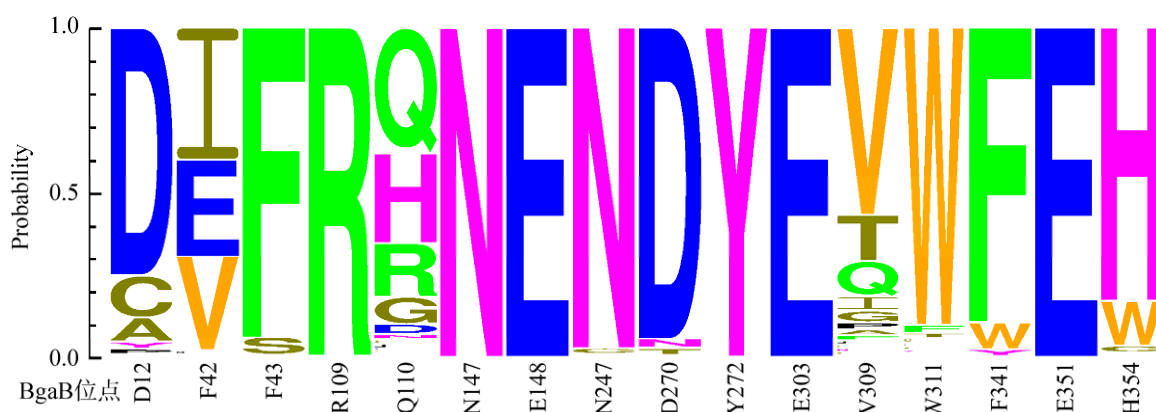


图2 GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶参与底物结合氨基酸位点及其进化保守度

Figure 2 Sequence profile of the substrates binding sites of GH 42 family  $\beta$ -galactosidases and evaluation of the degree of conservation at each site.

Phe341 为研究目标, 探讨这 2 个具有不同调控作用的保守氨基酸位点累积突变对酶催化活性的影响。

## 2.2 Ox-E303C/F341S 突变体的构建

以实验室已构建 BgaB 单点突变体 F341S 为模板, 对其 E303 位点进行 Cys 替换, 获得双点累积突变体 E303C/F341S。对野生型酶及双点累积突变酶进行重组表达并过镍柱纯化。以不同浓度 KI (0–0.3 mol/L) 为氧化剂, 对双点累积突变体 E303C/F341S 中 E303 位点半胱氨酸

侧链进行氧化, 得到  $-SOO^-$  替换双点突变体 (Ox-E303C/F341S)。以野生型酶为对照, KI 浓度对野生型及突变体水解活性影响如图 3A 所示。Ox-E303C/F341S 水解活性随 KI 浓度增大而提高, 当 KI 浓度达到 0.2 mol/L 后其水解活性保持稳定, 相同条件下野生型酶无明显变化。试验结果表明 0.2 mol/L KI 氧化处理所得突变体 Ox-E303C/F341S 水解活性稳定。由图 3B 可知, 相同氧化时间条件下, Ox-E303C/F341S 水解活性始终低于野生型酶。Ox-E303C/F341S 水解活

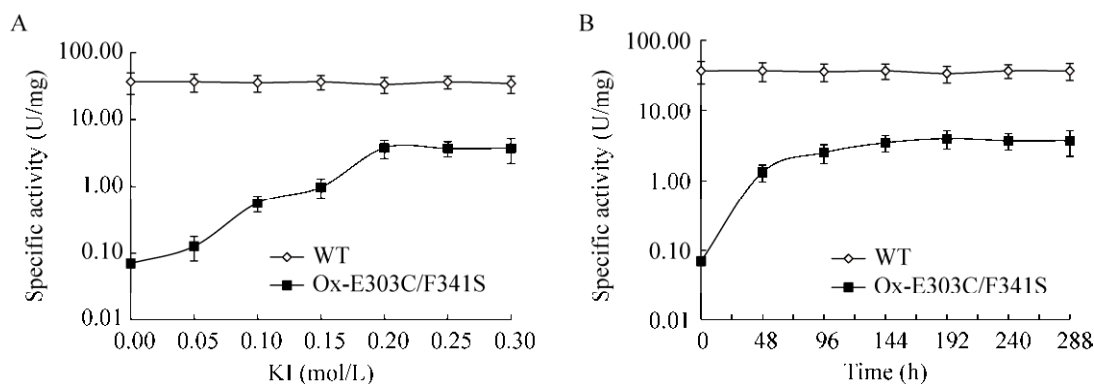


图3 KI 氧化对野生型酶及突变体 E303C/F341S 活性的影响 A: KI 浓度对突变体水解活性的影响。B: 处理时间对突变体水解活性的影响

Figure 3 Potency of inhibition of wild type and E303C/F341S mutant activity via oxidation through KI exposure. A: Effect of KI concentration on enzyme activity. B: Effect of treatment time on enzyme activity.



性随氧化时间延长先增高后趋于平稳, 当处理时间达到 192 h 时水解活性达到最大。而相同条件下, 野生型酶水解活性几乎不受氧化时间影响。由此得最佳氧化处理条件为: KI 浓度为 0.2 mol/L, 氧化反应时间为 192 h。

SDS-PAGE 分析显示野生型及突变体酶均为 70 kDa 单一蛋白条带(图 4)。双点突变体 E303C/F341S 及其氧化修饰体 Ox-E303C/F341S 相较野生型酶、E303C 和 F341S 单点突变体均未发生蛋白大小改变, 结合野生型及突变体酶水解活性分析表明双点突变体重组表达正确。

### 2.3 野生型及突变体酶水解活性分析

以 *o*NPG 为反应底物, 测得野生型酶、单点突变体 F341S、E303C 以及双点累积突变体 E303C/F341S 和 Ox-E303C/F341S 比酶活如表 2 所示。其中, 单点突变体 E303C 比酶活仅为野生型酶的 0.6%。这是由于 E303 为亲核催化氨

表 2 野生型及突变体酶以 *o*NPG 为底物的比酶活  
Table 2 Specific activities of wild-type and mutant enzymes using *o*NPG as substrate

Enzymes	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
Wild-type enzyme	37.20	100
E303C/F341S	0.07	0.20
Ox-E303C/F341S	11.16	30
F341S*	27.90	75
E303C*	0.22	0.60

\*: 本实验室已构建单点突变体

\*: Single-point mutants have been constructed in this laboratory.

基酸位点, 在 GH42 家族进化中高度保守, 对  $\beta$ -半乳糖苷酶催化功能的维持具有关键作用<sup>[34-36]</sup>。这一实验结果也验证了该位点突变会导致水解活性大幅度下降甚至失活; 单点突变体 F341S 比酶活下降为野生型的 75%。前期研究结果表明 F341 位点具有调控半乳糖抑制的作用, 单点突变体 F341S 受半乳糖抑制作用相较野生型酶减弱<sup>[32]</sup>。由此推测, F341S 水解催化活性的降低可能是由于其对半乳糖基识别能力改变所致。双点突变体 E303C/F341S 比酶活低于野生型及单点突变体, 仅为野生型酶的 0.2%, 表明位点 E303 与 F341 的累积突变加剧了水解活性的损失; 而 Ox-E303C/F341S 水解活性为野生型酶的 30%, 表明-SOO<sup>-</sup>侧链替换恢复了部分水解活性。

### 2.4 野生型酶及双点突变体 Ox-E303C/F341S 催化反应历程及产物分析

野生型酶及双点突变体 Ox-E303C/F341S 催化乳糖反应过程中, 各组分含量随反应时间的变化规律如图 5 所示。野生型酶在反应 0-10 h 阶段出现了转糖苷产物 GOS, 最大得率为 0.75%; 在 50 h 反应过程中随着乳糖水解, 产物半乳糖和葡萄糖含量逐渐增大, GOS 在反应时间达到 20 h 时含量降低为 0。表明野生型酶对底物及产物均具有较强水解作用。与野生型酶相

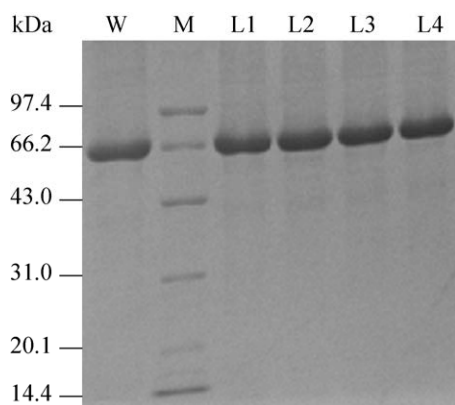


图 4 野生型及突变体酶 SDS-PAGE 分析 M: 标准蛋白分子量; W: 野生型酶; L1: 双点突变体 E303C/F341S; L2: 双点突变体 Ox-E303C/F341S; L3: 单点突变体 E303C; L4: 单点突变体 F341S  
Figure 4 Analysis of the purified wild-type and mutant proteins by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). M: Molecular Marker; W: Wild-type; L1: E303C/F341S mutant; L2: Ox-E303C/F341S mutant; L3: E303C mutant; L4: F341S mutant.



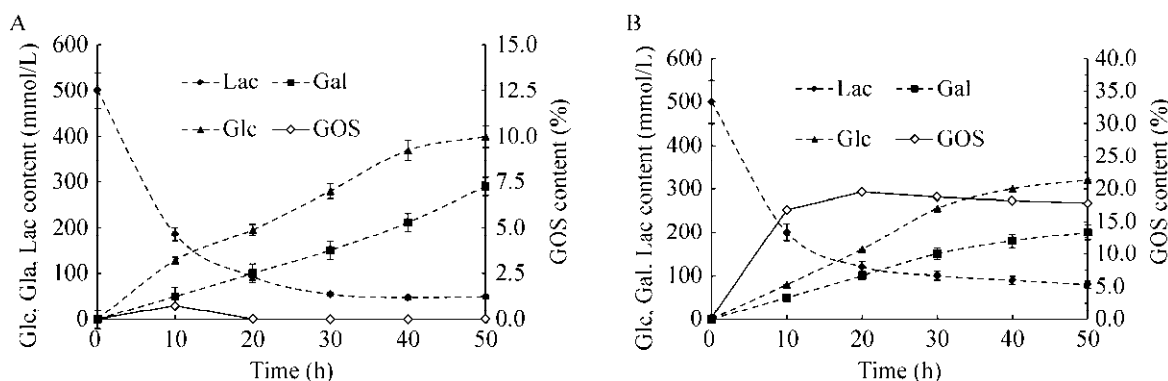


图5 野生型酶及突变体催化乳糖反应 A: 野生型酶催化乳糖反应. B: 双点突变体 Ox-E303C/F341S 催化乳糖反应

Figure 5 Reaction process of lactose conversion and product formation catalyzed by wild-type and mutant enzymes. A: Lactose conversion catalyzed by wild-type enzyme. B: Lactose conversion catalyzed by the mutant Ox-E303C/F341S.

比, 双点突变体 Ox-E303C/F341S 催化乳糖反应过程中水解产物半乳糖及葡萄糖表现出相似的增大趋势; 但相同反应时间下, 双点突变体 Ox-E303C/F341S 催化乳糖的保留浓度高于野生型, 而半乳糖和葡萄糖含量低于野生型, 表明其对乳糖的水解活性降低。反应 20 h 时 GOS 得率达到最大值 19.50%; 在 50 h 反应历程中 GOS 水解率小于 2%。表明双点突变体 Ox-E303C/F341S 相较野生型酶转糖苷催化能力提高, 且对转糖苷产物 GOS 的水解活性降低。这一实验现象与水解活性分析结果一致。

反应终产物 TLC 分析结果如图 6 所示, 野生型酶产物组分主要由乳糖水解后形成的半乳糖和葡萄糖构成; 相同条件下, 双点突变体 Ox-E303C/F341S 反应体系中除含有半乳糖和葡萄糖外, 还有少量乳糖以及分子量大于单糖和双糖的转糖苷产物(GOS)。这些 GOS 产物由 3-4 个不同聚合度的低聚半乳糖构成, 已有研究表明主要是异乳糖、低聚半乳二糖和低聚半乳三糖。对比双点突变体 Ox-E303C/F341S 与单点突变体 Ox-E303C, 相同条件下前者的 GOS 得率明显提高。结合反应历程和 TLC 分析结果

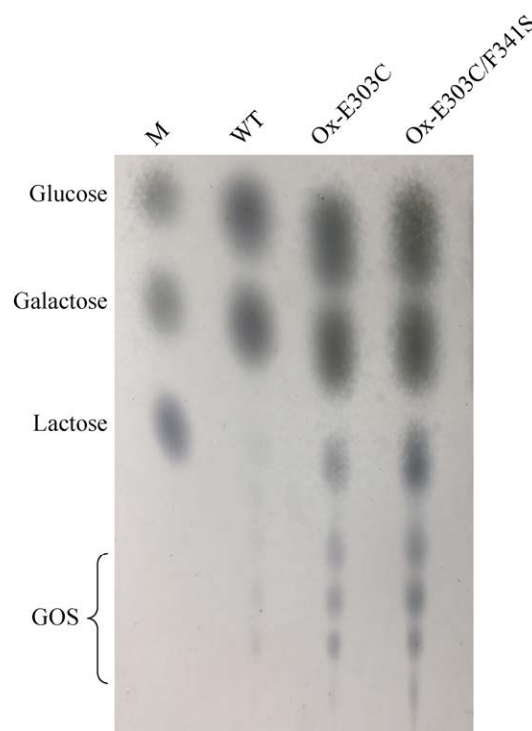


图6 野生型及突变体催化乳糖反应产物的 TLC 分析 M: 标准品; WT: 野生型酶; Ox-E303C: 单点突变体; Ox-E303C/F341S: 双点突变体

Figure 6 TLC analysis of lactose conversion reaction products yield by wild-type and mutant enzymes. M: Standard marker; WT: Wild-type enzyme; Ox-E303C: Single-site mutant; Ox-E303C/F341S: Double-site mutant.

可知,野生型酶在催化反应过程中少量合成的 GOS,随着反应时间延长又被水解为单糖,导致终产物中无 GOS 检出。以上结果表明, Ox-E303C/F341S 相较野生型酶对乳糖的水解活性降低,转糖基活性提高,同时对 GOS 的水解活性减弱,使其在反应过程中得以积累,并在终产物中稳定存在。这也说明对于底物抑制及转糖基活性的累积突变对转糖基活性具有正向促进作用。

### 3 讨论与结论

虽然微生物来源  $\beta$ -半乳糖苷酶被广泛用于 GOS 工业合成,但其底物乳糖并不是自然界中微生物的直接碳源,也不是  $\beta$ -半乳糖苷酶最适作用底物。因此, $\beta$ -半乳糖苷酶尚未进化出与乳糖相适应的转糖基催化活性<sup>[37-38]</sup>。对不同菌属来源  $\beta$ -半乳糖苷酶开展的 GOS 合成研究显示, $\beta$ -半乳糖苷酶转糖基催化活性普遍弱,并在转糖基催化过程中伴随着底物与产物水解反应,导致 GOS 得率低<sup>[6]</sup>。 $\beta$ -半乳糖苷酶按照氨基酸序列相似性分属于糖苷水解酶 GH1、GH2、GH35、GH42、GH50 和 GH59 家族,且同归属于 ClanA 超家族。ClanA 超家族关键催化位点为 2 个谷氨酸残基,分别位于 TIM 桶状结构域“(β/α)<sub>8</sub>”的第 4 和第 7 个 β 片层结构上,且在进化过程中高度保守<sup>[39]</sup>。本研究对 GH42 家族 2 081 条非冗余序列的多重序列比对结果也验证了谷氨酸(E)催化位点的高度保守性(图 2),这也表明其对  $\beta$ -半乳糖苷酶催化活性的形成及分子调控机制研究具有重要价值。前期研究对 BgaB 亲和催化氨基酸 Glu303 残基侧链采用定点突变与化学修饰相结合的方法进行-SOO<sup>-</sup>替换,提高了其转糖基催化能力<sup>[33]</sup>。

从分子结构进化角度来看,位于 TIM 结构域表面维持分子刚性和位于疏水核心区域参与

催化的氨基酸位点也具有高度进化保守性。这也使得 ClanA 超家族  $\beta$ -半乳糖苷酶虽然采用相同蛋白折叠方式,却可于不同环境中进化出多样化的催化特性及底物适应性。例如, GH1 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶以嗜热古细菌来源耐热酶为主; GH2 家族以嗜冷及肠道微生物来源  $\beta$ -半乳糖苷酶为主; GH35 家族多为植物来源  $\beta$ -半乳糖苷酶,其结构及催化活性与微生物来源  $\beta$ -半乳糖又截然不同<sup>[40]</sup>。与其他糖苷水解家族  $\beta$ -半乳糖苷酶擅长利用寡糖为底物的催化特性不同, GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶多来源于嗜极性原核微生物(如嗜热菌、低温菌及嗜盐微生物等)<sup>[25,37]</sup>。其作用底物是与其基因位置比邻的 GH53 家族水解酶先行降解释放出的低聚糖<sup>[41]</sup>。近年研究也表明 GH42 家族嗜极性微生物来源  $\beta$ -半乳糖苷酶具有转糖基催化活性开发潜力<sup>[25,42]</sup>。

本研究对 GH42 家族保守氨基酸位点 E303 和 F341 进行特异性分子改造,所构建双点突变体 Ox-E303C/F341S 与野生型酶相比,降低水解活性的同时提高了 GOS 得率。与 Ox-E303C 单点突变体最大 GOS 得率 11.5%相比,双点突变体 Ox-E303C/F341S 的最大 GOS 得率提高到了 19.5%。前期研究发现,在参与底物结合氨基酸位点中发现 F341 位点突变可以改变 BgaB 对半乳糖的亲合力,调控反应产物半乳糖对酶活的抑制作用<sup>[31-32]</sup>;将亲核催化氨基酸位点 E303 侧链替换为-SOO<sup>-</sup>可提高 BgaB 转糖基催化活性<sup>[33]</sup>。结合本研究结果表明,341 位点对底物的抑制作用与 303 位点转糖基活性调控功能得到累积。从分子结构上分析,将 BgaB341 位点由 Phe 的非极性芳香族侧链替换为 Ser 的极性侧链-CH<sub>2</sub>-OH,并将 Glu303 位点氨基酸残基侧链-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH 替换为-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SOOH,可以改变底物结合氢键网络,影响酶对底物乳糖及产物 GOS 的亲合力。从现有研究结果分

析,改变酶对底物乳糖及产物 GOS 亲和力进而调控反应平衡朝向转糖苷合成方向进行,也是双点突变 Ox-E303C/F341S 转糖苷催化能力提高的重要原因。这一结论与已有针对  $\beta$ -半乳糖苷酶底物氢键结合网络形成及保持型糖苷水解催化机理(retaining glycoside hydrolases)相符<sup>[26-28]</sup>。提高亲核氨基酸残基侧链极性有利于提高转糖苷催化活性,单一保守氨基酸位点突变所产生的催化活性改良能够通过突变组合实现功能进化积累。本研究可为 GH42 家族  $\beta$ -半乳糖苷酶转糖苷催化活性的进一步改造及调控提供参考。

## REFERENCES

- [1] AMBROGI V, BOTTACINI F, SHARRY JM, van BREEN J, O'KEEFE E, WALSH D, SCHOEMAKER B, CAO LQ, KUIPERS B, LINDNER C, JIMENO ML, DOYAGÜEZ EG, HERNANDEZ-HERNANDEZ O, MORENO FJ, SCHOTERMAN M, van SINDEREN D. Bifidobacterial  $\beta$ -galactosidase-mediated production of galacto-oligosaccharides: structural and preliminary functional assessments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 750635.
- [2] WANG G, WANG H, JIN Y, XIAO Z, UMAR YAQOOB M, LIN Y, CHEN H, WANG M. Galactooligosaccharides as a protective agent for intestinal barrier and its regulatory functions for intestinal microbiota[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111003.
- [3] MARÁZ A, KOVÁCS Z, BENJAMINS E, PÁZMÁNDI M. Recent developments in microbial production of high-purity galacto-oligosaccharides[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2022, 38(6): 95.
- [4] HASSAN N, GEIGER B, GANDINI R, PATEL BKC, KITTL R, HALTRICH D, NGUYEN TH, DIVNE C, TAN TC. Engineering a thermostable *Halothermothrix orenii* beta-glucosidase for improved galacto-oligosaccharide synthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(8): 3533-3543.
- [5] GONZALEZ CP, CAGNONI AJ, MARINO KV, FONTANA C, SAENZ-MÉNDEZ P, IRAZOQUI G, GIACOMINI C. Enzymatic synthesis of non-natural trisaccharides and galactosides; Insights of their interaction with galectins as a function of their structure[J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 472: 1-15.
- [6] MOVAHEDPOUR A, AHMADI N, GHALAMFARSA F, GHESMATI Z, KHALIFEH M, MALEKSABET A, SHABANINEJAD Z, TAHERI-ANGANEH M, SAVARDASHTAKI A.  $\beta$ -Galactosidase: from its source and applications to its recombinant form[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021: 1-17.
- [7] MANO MCR, NERI-NUMA IA, DA SILVA JB, PAULINO BN, PESSOA MG, PASTORE GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(1): 17-37.
- [8] YAN YR, GUAN WS, LI XY, GAO KE, XU XX, LIU B, ZHANG W, ZHANG YH.  $\beta$ -galactosidase GALA from *Bacillus circulans* with high transgalactosylation activity[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8908-8919.
- [9] SILVERIO SC, MACEDO EA, TEIXEIRA JA, RODRIGUES LR. New beta-galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 250: 131-139.
- [10] KITTIBUNCHAKUL S, MAISCHBERGER T, DOMIG KJ, KNEIFEL W, NGUYEN HM, HALTRICH D, NGUYEN TH. Fermentability of a novel galacto-oligosaccharide mixture by *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.[J]. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018, 23(12): 3352.
- [11] LEE H, NOBREGA DE MOURA BELL JML, BARILE D. Discovery of novel high-molecular weight oligosaccharides containing N-acetylhexosamine in bovine colostrum whey permeate hydrolyzed with *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(12): 3313-3322.
- [12] HANSSON T, KAPER T, VAN DER OOST J, DE VOS WM, Adlercreutz P. Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of beta-glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 73(3): 203-210.
- [13] PLACIER G, WATZLAWICK H, RABILLER C, MATTES R. Evolved beta-galactosidases from *Geobacillus stearothermophilus* with improved transgalactosylation yield for galacto-oligosaccharide production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6312-6321.
- [14] WU Y, YUAN S, CHEN S, WU D, CHEN J, WU J. Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus* beta-galactosidase[J]. *Food Chemistry*, 2012, 138(2-3): 1588-1595.

- [15] GAO X, WU J, WU D. Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production[J]. Food Chemistry, 2019, 286: 362-367.
- [16] URRUTIA P, BERNAL C, WILSON L, ILLANES A. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: beta-galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 182-193.
- [17] USVALAMPI A, MAAHEIMO H, TOSSAVAINEN O, FREY AD. Enzymatic synthesis of fucose-containing galacto-oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase and identification of novel disaccharide structures[J]. Glycoconjugate Journal, 2018, 35(1): 31-40.
- [18] YU L, O'SULLIVAN DJ. Immobilization of whole cells of *Lactococcus lactis* containing high levels of a hyperthermostable  $\beta$ -galactosidase enzyme in chitosan beads for efficient galacto-oligosaccharide production[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(4): 2974-2983.
- [19] DONG YN, WANG L, GU Q, CHEN HQ, LIU XM, SONG YD, CHEN W, HAGLER AT, ZHANG H, XU J. Optimizing lactose hydrolysis by computer-guided modification of the catalytic site of a wild-type enzyme[J]. Molecular Diversity, 2013, 17(2): 371-382.
- [20] DONG YN, LIU XM, CHEN HQ, XIA Y, ZHANG HP, ZHANG H, CHEN W. Enhancement of the hydrolysis activity of beta-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(3): 1176-1184.
- [21] COCKBURN DW, VANDENENDE C, CLARKE AJ. Modulating the pH-activity profile of cellulase by substitution: replacing the general base catalyst aspartate with cysteinesulfinate in cellulase A from *Cellulomonas fimi*[J]. Biochemistry, 2010, 49(9): 2042-2050.
- [22] ENGELEN AJ, RANDSDORP PH. Determination of neutral lactase activity in industrial enzyme preparations by a colorimetric enzymatic method: collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(1): 112-118.
- [23] OLSON BJSC. Assays for determination of protein concentration[J]. Current Protocols in Pharmacology, 2016, 73: A.3A.1-A.3A.32.
- [24] WANG X, CHEN S, FAN L, LIU H, CHEN S, YE X, LI Z, CUI Z, HUANG Y. Characterization of a halotolerant GH2 family  $\beta$ -galactosidase GalM from *Microvirga* sp. strain MC18[J]. Protein Expression and Purification, 2022, 194: 106074.
- [25] SUN J, YAO C, LI Y, WANG W, HAO J, YU Y. A novel salt-tolerant GH42  $\beta$ -galactosidase with transglycosylation activity from deep-sea metagenome[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(9): 154.
- [26] KITTIBUNCHAKUL S, PHAM ML, TRAN AM, NGUYEN TH. beta-Galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(4): 947.
- [27] GODOY AS, CAMILO CM, KADOWAKI MA, DOS S MUNIZ H, SANTO ME, MURAKAMI MT, NASCIMENTO AS, POLIKARPOV I. Crystal structure of beta1 $\rightarrow$ 6-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* S17: trimeric architecture, molecular determinants of the enzymatic activity and its inhibition by alpha-galactose[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(22): 4097-4112.
- [28] van LEEUWEN SS, KUIPERS BJH, DIJKHUIZEN L, KAMERLING JP. Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide (GOS) products[J]. Carbohydrate Research, 2016, 425: 48-58.
- [29] QIN ZM, LI SF, HUANG X, KONG W, YANG XP, ZHANG SF, CAO LC, LIU YH. Improving galactooligosaccharide synthesis efficiency of beta-galactosidase Bgal1-3 by reshaping the active site with an intelligent hydrophobic amino acid scanning[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(40): 11158-11166.
- [30] KUMAR R, HENRISSAT B, COUTINHO PM. Intrinsic dynamic behavior of enzyme: substrate complexes govern the catalytic action of beta-galactosidases across clan GH-A[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 10346.
- [31] 董艺凝, 陈海琴, 张灏, 陈卫. 嗜热脂肪芽孢杆菌耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶功能位点的累积进化研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(7): 148-153.
- DONG YN, CHEN HQ, ZHANG H, CHEN W. Coevolutionary study on the functionary amino acid residues of *Geobacillus stearothermophilus* thermostable  $\beta$ -galactosidase BgaB[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(7): 148-153 (in Chinese).
- [32] 董艺凝. 耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 分子改造以及突变体性质研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2011.
- DONG YN. Molecular modification and characterization of thermostable  $\beta$ -galactosidase BgaB mutants[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2011 (in

- Chinese).
- [33] 董艺凝, 陈卫, 陈海琴, 赵建新, 陈永泉, 张灏. 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)来源耐热  $\beta$ -半乳糖苷酶 BgaB 转糖苷催化活性改造[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(2): 1-6.
- DONG YN, CHEN W, CHEN HQ, ZHAO JX, CHEN YQ, ZHANG H. Enhances transglycosylation activity of thermostable  $\beta$ -galactosidase BgaB from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(2): 1-6 (in Chinese).
- [34] STRAZZULLI A, COBUCCI-PONZANO B, CARILLO S, BEDINI E, CORSARO MM, POCSFALVI G, WITHERS SG, ROSSI M, MORACCI M. Introducing transgalactosylation activity into a family 42 beta-galactosidase[J]. Glycobiology, 2017, 27(5): 425-437.
- [35] YIN HF, PIJNING T, MENG XF, DIJKHUIZEN L, van LEEUWEN SS. Biochemical characterization of the functional roles of residues in the active site of the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382[J]. Biochemistry, 2017, 56(24): 3109-3118.
- [36] SHAIKH FA, MÜLLEGGGER J, HE SM, WITHERS SG. Identification of the catalytic nucleophile in Family 42 beta-galactosidases by intermediate trapping and peptide mapping: YesZ from *Bacillus subtilis*[J]. FEBS Letters, 2007, 581(13): 2441-2446.
- [37] MANGIAGALLI M, LAPI M, MAIONE S, ORLANDO M, BROCCA S, PESCE A, BARBIROLI A, CAMILLONI C, PUCCIARELLI S, LOTTI M, NARDINI M. The co-existence of cold activity and thermal stability in an antarctic GH42  $\beta$ -galactosidase relies on its hexameric quaternary arrangement[J]. The FEBS Journal, 2021, 288(2): 546-565.
- [38] LIU P, WU JW, LIU JH, OUYANG J. Engineering of a  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus coagulans* to relieve product inhibition and improve hydrolysis performance[J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(10): 10566-10575.
- [39] KUMAR R, HENRISSAT B, COUTINHO PM. Intrinsic dynamic behavior of enzyme: substrate complexes govern the catalytic action of  $\beta$ -galactosidases across clan GH-A. Scientific Reports. 2019, 9(1): 10346.
- [40] KALATHINATHAN P, SAIN A, PULICHERLA K, KODIVERI MUTHUKALIANNAN G. A Review on the various sources of  $\beta$ -galactosidase and its lactose hydrolysis property. Current Microbiology. 2023, 80(4): 122.
- [41] SHIPKOWSKI S, BRENCHELEY JE. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 beta-galactosidases are Arabinogalactan type I oligomer hydrolases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7730-7738.
- [42] THAKUR M, RAI AK, SINGH SP. An acid-tolerant and cold-active  $\beta$ -galactosidase potentially suitable to process milk and whey samples[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(9/10): 3599-3610.