

β -半乳糖苷酶的研究现状与进展

董艺凝¹, 陈海琴^{*2}, 张灏², 陈卫²

(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, 江苏 无锡 214122)

摘要: β -半乳糖苷酶是一种重要的食用生物催化剂, 具有催化 β -1,4 糖苷键水解和转糖苷作用, 并被广泛应用于乳糖水解及低聚半乳糖合成。作为糖苷水解酶家族的重要成员, β -半乳糖苷酶在理论与应用方面均积累了丰富的研究成果。作者从酶的家族分布、催化机制形成、分子结构分析及特殊酶学性质发掘等方面对 β -半乳糖苷酶的研究现状进行综述, 以期对 β -半乳糖苷酶催化调控的深入探索与应用开发提供参考。

关键词: β -半乳糖苷酶; 糖苷水解酶家族; 催化机制; 结构研究

中图分类号: Q 555.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)04-0337-07

Research Status and Progress on β -Galactosidase

DONG Yining¹, CHEN Haiqin^{*2}, ZHANG Hao², CHEN Wei²

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: β -Galactosidase is an important food biocatalyst, which possesses transglycosylation and hydrolysis of β -1,4 glycoside bonds. These catalytic have been widely used in galacto-oligosaccharides production and lactose hydrolysis. As an important member of glycoside hydrolase family, it has accumulated rich results on research of theory and application of β -galactosidase. In this paper, it is reviewed from perspectives of theory and application, including distribution of β -galactosidase in glycoside hydrolase family, theory of catalytic mechanism, progress on structure research, and development of specific functional. This article is intended to provide reference for further research on the catalytic mechanism regulation and the application development of β -galactosidase.

Keywords: β -galactosidase, glycoside hydrolase family, catalytic mechanism, structure research

收稿日期: 2016-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171636); 国家自然科学基金青年基金项目(31301523); 安徽省自然科学基金项目(1708085MC72)。

作者简介: 董艺凝(1980—), 女, 吉林延边人, 工学博士, 副教授, 主要从事酶的功能进化与产物合成研究。

E-mail: dong_yining@163.com

* 通信作者: 陈海琴(1978—), 女, 浙江桐乡人, 工学博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究。E-mail: haiqinchen@jiangnan.edu.cn

引用本文: 董艺凝, 陈海琴, 张灏, 等. β -半乳糖苷酶的研究现状与进展[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 337-343.

β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)全称为 β -D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β -D-galactoside galactohydrolase, EC3.2.1.23),具有催化乳糖水解和转糖苷两种功能^[1]。特别是利用其转糖苷作用合成低聚半乳糖(Galacto-oligosaccharides, GOS),已逐渐成为近年来功能性低聚糖开发与技术应用的新热点^[2]。与其他人们较为熟知的功能性低聚糖,如低聚果糖(Fructo-oligosaccharide, FOS)和低聚异麦芽糖(Isomatto-oligosaccharide, IMO)等相比,低聚半乳糖是唯一能够被人体全部肠道益生菌利用的真正益生元。特别是母乳中所含低聚半乳糖(Human milk oligosaccharides, HMO)是形成婴儿初期肠道益生菌类型的关键因子。由于母乳来源的低聚半乳糖(HMO)结构复杂且数量有限,因此通过酶法合成GOS已成为HMO的主要替代品。目前的全球消费量在20 000 t/年左右,并以每年10%~20%的比例增长^[3]。

但是, β -半乳糖苷酶普遍转糖苷活性低,并且由于底物水解反应的同时存在,导致产物往往包括多样化糖苷聚合度及糖苷键构成类型,并最终限制了GOS合成量和纯度。我国对 β -半乳糖苷酶催化合成GOS的研究起步相对较晚,目前生产中所需 β -半乳糖苷酶的来源仍以进口为主^[4-5]。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仅限于少数几家企业,如广东江门量子高科生物工程有限公司与广东云浮市新金山生物科技有限公司。而高纯度GOS产品的生产在我国还处于空白阶段。如何改造并调控 β -半乳糖苷酶的催化反应以解决GOS合成产量及优化产物分子结构是目前 β -半乳糖苷酶功能开发与应用的共性技术问题。

针对行业技术发展现状,只有对 β -半乳糖苷酶催化机理及产物形成机制开展深入的研究探索,才能有望从反应调控与功能优化角度有效解决GOS产业发展的关键技术问题。作者针对近十年相关研究过程中所积累下的大量酶学、结构学及生物信息学数据成果,从 β -半乳糖苷酶的分类、催化机制理论、结构及特殊催化功能开发几个方面对 β -半乳糖苷酶的理论与应用研究现状与进展进行综述,以期对 β -半乳糖苷酶催化机理的深入研究与功能调控提供参考。

1 β -半乳糖苷酶家族分化及催化机制形成

酶的分子改造与功能开发需要有深入的催化机理研究和丰富的基因进化信息作为基础。1991年,Henrissat第一次根据氨基酸序列相似性对糖苷水解酶进行分类^[6],到目前为止,已由最初的35个家族发展成135个,分属于14个(GH-A~GH-N)糖苷水解酶超家族(<http://www.cazy.org/>)。基于氨基酸序列相似性进行分类的方法可以使不同底物特异性的糖苷水解酶聚类为同一家族,如GH-1, GH-13, GH-16家族都含有不同底物特异性的成员。同样,具有相同底物特异性的糖苷水解酶也可能分属于不同的家族,如纤维素酶就分属于11个不同的家族。但对于 β -半乳糖苷酶家族分布及其催化机制的形成特点目前尚无系统的分析与总结。

1.1 β -半乳糖苷酶家族分化

β -半乳糖苷酶可以水解 β -1,4-糖苷键,属糖苷水解酶类(Glycoside Hydrolases, GH),并在进化过程中演变成多样的底物特异性。依据蛋白质序列相似分类, β -半乳糖苷酶分别属于糖苷水解酶家族GH-1, GH-2, GH-35和GH-42,并在这些家族分布中显现出不同的催化及结构特征。如, GH-1, GH-2和GH-35家族除了 β -半乳糖苷酶还包括其它糖苷水解酶类,只有GH-42家族所有成员都为 β -半乳糖苷酶,而GH-2家族的 β -半乳糖苷酶通常在糖苷水解和转糖苷两方面都表现出较高的活性。还有研究表明, GH-1, GH-2, GH-5, GH-10, GH-17, GH-30, GH-35, GH-39以及GH-42家族是由共同的祖先分子进化而来^[7-8]。虽然,不同家族的糖苷水解酶的数量、酶学特征差别很大,但其催化构象及机制在进化过程中是却是严格保守的。

1.2 β -半乳糖苷酶的催化机制研究

糖苷水解酶有两种经典的催化机制由Koshland在多年前提出并一直沿用至今,包括保持型(Retaining)机制和反转型(Inverting)机制。这一理论主要基于糖苷水解酶在催化过程中会出现两种不同的立体化学产物,即产物的异头碳构象与供体底物的相同或不同。保持型糖苷水解酶遵循两步反应的双替换机制(two-step double-displacement mechanism),包括糖基-酶复合物过渡态的形成和水解,每步反应均通过酸碱催化完成(如图1(a))。

这个过程需要两个含羧基的关键氨基酸参与,一个作为亲核基团攻击底物异头碳形成糖基-酶复合物;另一个羧基基团作为酸碱催化剂,在第一步反应中使羰基氧质子化,第二步反应中催化脱去一分子水。反转型糖苷水解酶采用的是直接替换机制,活性位点为两个含羧基氨基酸。一个羧基作为碱性基团攻击水分子,另一个羧基通过广义的酸催化断裂糖苷键。催化反应通过一个类似氧代碳正离子过渡态实现(如图1(b))。作为质子供体的羧基氨基酸

位置在两种催化机制中保持一致,均位于能够与糖苷氢键结合的距离范围内。但两种催化机制碱性催化基团的位置有所差别,其中保持型糖苷水解酶碱性基团与糖基异头碳的位置非常接近;而反转型催化机制中,因必须容纳一个水分子在碱性基团与糖基之间,使这一距离增大。这种差别造成两种机制中关键催化残基间距的不同,保持型催化机制两个催化残基距离约为 $5.5 \times 10^{-10} \text{ m}$, 反转型催化机制中两者距离约为 $9.5 \times 10^{-10} \text{ m}$ [10]。

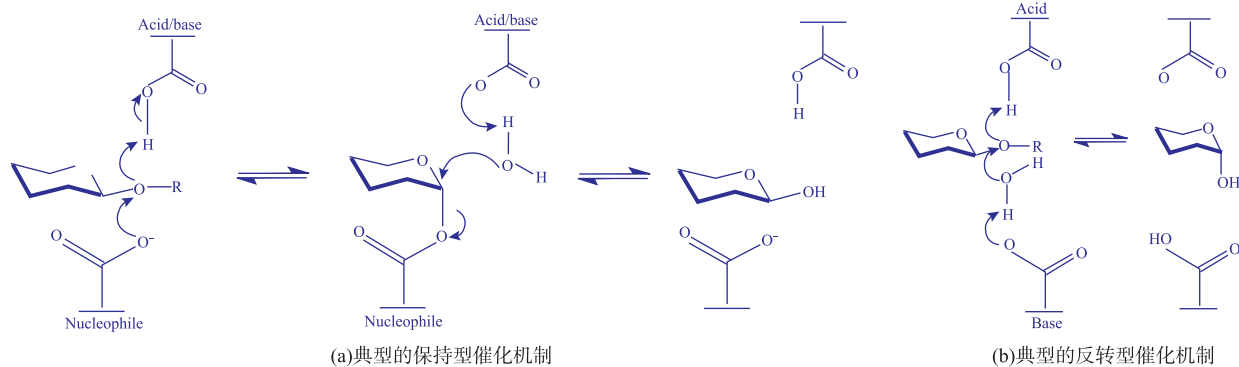


图1 糖苷水解酶催化机制

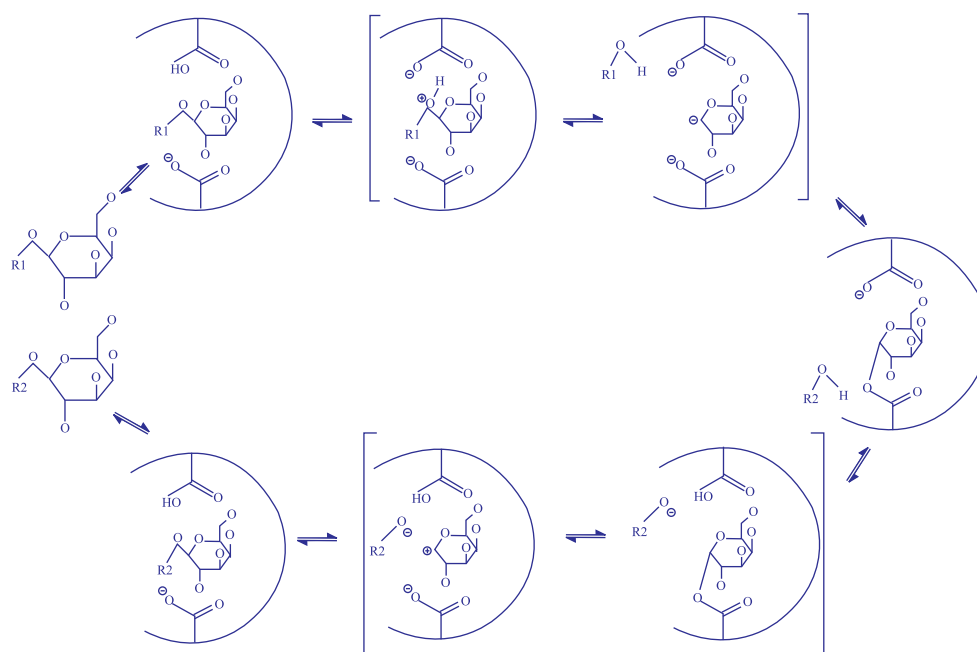
Fig. 1 Glycosidases mechanisms

糖苷水解酶家族的结构特征并不直接决定酶的立体化学催化特性,很多超家族中都同时具有保持型和反转型糖苷水解酶。但同一家族的水解酶往往具有相同的催化机制。目前,普遍认为 β -半乳糖苷酶采用的是保持型水解机制。催化过程如图2所示。首先,底物分子需要与酶分子对接。当底物是乳糖时,糖基部分为半乳糖基,配糖体为葡糖基(如图2中 R_1 所代表)。 β -半乳糖苷酶具有高度底物专一性,要求底物的半乳糖基必须与多糖部分以 β -糖苷键连接。但对糖苷配基的要求不是很严格,因此 R_1 所表示的配糖体部分甚至可以是低聚糖,此时反应得到的产物即为低聚半乳糖(GOS)。早期研究表明 β -半乳糖苷酶的结构特征对底物与酶的活性位点结合非常重要,研究报道主要集中在氢键、离子键及芳香族氨基酸侧链对底物结合的影响等方面[11-12]。近年来研究发现,酶与底物结合模式,特别是结合位点氨基酸的类型与侧链性质对催化活性影响显著[13-15]。其次,当底物对接到酶活性位点后,即与酶分子以共价键结合。随即半乳糖基再被转移到亲核受体上。在这步反应中,反应会根据受体的不同而发生分歧。当半乳糖基受体为水分子(即图中 $R_2=$

H),反应释放出半乳糖。在此情况下,乳糖或低聚糖所发生的就是水解反应,二糖或多糖被降解;当受体为另一个多糖时,反应就会朝向低聚半乳糖(GOS)合成的方向进行,这种情况下发生的就是转糖苷反应。目前所有关于转糖苷机制的研究报道,都是基于对糖苷水解反应做出的推测。尚不清楚当受体不同时(比如糖类或水), β -半乳糖苷酶的水解活性是否发生改变。但是,不同 β -半乳糖苷酶对水和糖类的选择特异性有差别,即使催化作用相同,不同酶的催化能力及产物(水解及转糖苷产物)组成均不相同[16-17]。也有研究表明, β -半乳糖苷酶的底物特异性与活性位点氨基酸模块(motif)有关[18]。

2 微生物来源 β -半乳糖苷酶的催化特性及研究概况

许多生物自身可以合成 β -半乳糖苷酶,包括微生物、植物及动物细胞[2]。这些不同来源的 β -半乳糖苷酶在酶学特征上存在较大差异,只有对其酶学特性有所认识和比较,才能更好的开发适合工业应用的生物催化剂。通过家族间 β -半乳糖苷酶来源的比较分析发现,微生物来源 β -半乳糖苷酶的数量最



R_1 表示底物的糖苷配基; R_2 代表半乳糖基受体。

图 2 β -半乳糖苷酶反应机制^[11]

Fig. 2 Reaction mechanism for β -galactosidase

为丰富。因此,作者总结并分析了主要微生物来源 β -半乳糖苷酶的催化特性及其在基因工程方面的研究进展。

2.1 β -半乳糖苷酶的微生物来源

目前,被广泛应用于工业生产的是来自霉菌(*Aspergillus* spp.)和克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces* spp.)的 β -半乳糖苷酶。这两种微生物可以较容易的通过培养获得可观的生产能力及产量。且霉菌和乳酸克鲁维酵母来源产物被公认为具有食品安全性(GRAS),这一点对食品消费至关重要^[19]。霉菌来源 β -半乳糖苷酶是胞外酶,最适 pH 在酸性范围内(2.5~5.4),最适作用温度最高可达 50 °C,主要被应用于水解酸性 pH 条件的乳清^[20]。相反,克鲁维酵母菌属来源 β -半乳糖苷酶是胞内酶,乳糖需要先通过透性酶转运进入酵母细胞内再被水解代谢^[21]。酵母来源的 β -半乳糖苷酶最适作用 pH 接近中性(6.0~7.0),因而有比较广泛的应用,尤其用于牛乳及乳清中乳糖的水解。商业化 β -半乳糖苷酶主要包括乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)(根据目前的分类还包括 *Kluyveromyces fragilis* 和 *Saccharomyces fragilis* 及其变形体 *Candida pseudotropicalis*);霉菌属有黑曲霉(*Aspergillus*

niger)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。另外,大肠杆菌(*Escherichia coli*)来源 β -半乳糖苷酶作为模式酶,研究最为广泛并被商业化生产,但因其不属于食品安全级产物(GRAS),而被主要用于生化分析领域。除此之外,已实现商业化上产的还有杆菌属(*Bacillus* sp.)来源的 β -半乳糖苷酶。

2.2 β -半乳糖苷酶的基因工程研究现状

除了在自然界不断发掘具有新特性的酶,对于一些在来源微生物中表达量较低的 β -半乳糖苷酶,可以通过 DNA 重组技术对其进行外源表达以提高产量,从而扩展其应用范围及在工业生产中的经济利用价值。同时,现代分子生物技术结合生物工程策略对酶的生产优化与功能改造,形成了具有经济、技术效益的酶生产体系。目前,针对 β -半乳糖苷酶的生物工程改造主要包括酶的重组表达、转糖苷活性调控、胞外分泌改造及底物抑制作用优化等几个方面^[22-25]。近年来,快速发展的晶体结构研究与数据积累也为 β -半乳糖苷酶的功能改造奠定了基础。作者将微生物来源的 β -半乳糖苷酶晶体结构数据汇总如表 1。截止 2000 年, β -半乳糖苷还仅有 8 个酶晶体结构报道^[26]。但时间发展到 2010~2015 期间,研究报道迅速累积到 103 例道。目前, β -半乳糖苷酶的晶体结构已经达到 190 个,但用于食品工业生

产中的 β -半乳糖苷酶还没有结构数据的研究报道。相对于快速开发的食品用 β -半乳糖苷酶,其结构机制方面的研究明显不足。

表 1 β -半乳糖苷酶晶体结构在蛋白质数据库中的收录汇总
Table 1 β -Galactosidases with crystal structures deposited in the Protein Data Bank

	分类	数目/个
按微生物来源	<i>Escherichia coli</i>	59
	<i>Homo sapiens</i>	38
	<i>Mus musculus</i>	12
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	11
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
	<i>Trichoderma reesei</i>	6
	<i>Bacteroides fragilis</i>	4
	Other	50
按蛋白质结构	多聚体 (Homomer)	125
	单体 (Monomer)	56
	杂聚体 (Heteromer)	5

3 耐热 β -半乳糖苷酶的应用优势

β -半乳糖苷酶虽然已经实现商品化,但是其应用仍受到热稳定及产物抑制等问题的限制。因此,开发不同来源、具有特殊催化功能的 β -半乳糖苷酶一直是工业化生产的一项需求。目前 β -半乳糖苷酶开发的主要方向包括:一是酵母和细菌来源的耐热 β -半乳糖苷酶及具有低温活性的酶;二是乳酸菌(包括 *lactococci*, *streptococci* 和 *lactobacilli*)及双歧杆菌等被认定为食用安全微生物来源的食品级 β -半乳糖苷酶,以应用于功能性食品的开发。特别是耐热 β -半乳糖苷酶一直在乳品生产领域备受关注。由于高温反应条件具有独特的生产应用优势,包括提高底物溶解度,获得较高的乳糖初浓度;降低水解产物对酶活的抑制作用;增大反应速率;进而延长生产过程中酶的半衰期;降低微生物污染的风险等。因此,相对于常温及低温 β -半乳糖苷酶,耐热 β -半乳糖苷酶具有更强的适应性。

目前,以嗜热原核微生物及其耐热酶的研究最为系统。有关耐热 β -半乳糖苷酶的来源及性质已有大量研究报道^[20,27-29]。耐热 β -半乳糖苷酶多来源硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*),以及一些高温菌和中温细菌,如耐热嫌气菌、栖热菌、嗜热菌和古细菌等。其中,嗜热细菌是耐热 β -半乳糖苷酶的一个重要来源,嗜

热细菌生长温度一般在 55~65 °C, 酶最适温度 55~70 °C。如嗜热链球菌、嗜热脂肪芽孢杆菌等^[30]。表 2 列举了几种不同微生物来源的耐热 β -半乳糖苷酶及酶学性质。另外,真菌中霉菌乳糖酶也具有较高作用温度,但酵母菌来源耐热酶尚未见报道。通过对不同微生物来源的 β -半乳糖苷酶进行比较,可以发现耐热 β -半乳糖苷酶在不同的温度、pH 及化学条件下均表现出较高的稳定性^[30-31]。

表 2 不同微生物来源耐热 β -半乳糖苷酶的酶学性质
Table 2 Enzyme properties of thermostable β -galactosidase from different microorganisms

来源	最适温度/°C	最适 pH	参考文献
<i>Thermus</i> sp.	70	6.5	Ohtsu et al. (1998)
<i>Psychrotrophic Arthrobacter</i>	50	6.6	Gutshall et al. (1995)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	50	6.0	Hinz et al. (2004)
<i>Alicyclobacillus cidocaldarius</i>	70	5.8-6.0	Yuan et al. (2008)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	67	4.0	Biswas et al. (2003)
<i>Bacillus coagulans</i>	65	6.0-7.0	Batr et al. (2002)
<i>Pyrococcus woesei</i>	85	6.6	Wanarska et al. (2005)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	65	6.5	Pisani et al. (1990)
<i>Deinococcus geothermalis</i>	60	6.5	Lee et al. (2010)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	7.0	Chen et al. (2008)
<i>Rhizomucor</i> sp	60	4.5	Shaikh et al. (1999)
<i>Thermotoga maritima</i>	80	5.5	Katrolia et al. (2011)

4 展望

作为重要的糖苷水解酶,针对 β -半乳糖苷酶的研究多年来集中于两个领域,一是新酶源的开发^[32];二是 β -半乳糖苷酶催化活性的分子调控^[33-35]。围绕这两个研究方向,作者重点综述和分析了 3 个相关问题,包括 β -半乳糖苷酶家族分化及催化理论形成、酶源的开发与应用、特殊酶学性质表征以及分子结构的研究进展。新酶源的开发虽然可以为工业生产及人体需求提供具有特殊适应性的酶(比如耐热酶等),但是由于 β -半乳糖苷酶催化机制中存在产物水解与转糖苷合成的动态平衡以及底物抑制等因素,限制了酶的催化效率(包括水解催化及转

糖苷催化两个方面),也制约了 β -半乳糖苷酶的实际应用。因此,实现 β -半乳糖苷酶从理论研究到生产应用的转化还需要依靠有效的分子调控。与 β -半乳糖苷酶新酶源的开发相比,基于“结构-功能”关系的分子调控研究相对滞后。根据CAZy(Carbohydrate-Active Enzymes,CAZymes)数据库统计,到目前为止已有酶学性质表征的 β -半乳糖苷酶达到240个以上,而具有晶体结构数据的酶尚不足

20个。这种酶学特性研究数据相对丰富,而结构数据不足的研究现状一定程度制约了对 β -半乳糖苷酶催化活性调控的研究进展。因此,如何将已有丰富的酶学性质数据资源与不断积累的分子结构与功能信息相结合,深入研究催化机理与调控机制,最终实现 β -半乳糖苷酶催化效率的有效调控,是 β -半乳糖苷酶研究领域具有生命力的探索方向。

参考文献:

- [1] MAKSIMAINEN M, PAAVILAINEN S, HAKULINEN N, et al. Structural analysis, enzymatic characterization, and catalytic mechanisms of beta-galactosidase from *Bacillus circulans* sp. alkalophilus[J]. **FEBS J**, 2012, 279(10): 1788-1798.
- [2] INTANON M, ARREOLA N H, PHAM W, et al. Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk[J]. **FEMS Microbiol Lett**, 2014, 353(2): 89-97.
- [3] DUARTE P M T, MARIA do Pilar F. Goncalves, Jos'e A. Teixeira, et al. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics[J]. **Compr Rev Food Sci**, 2010, 9: 438-454.
- [4] CHEN Jian, LIU Long, DU Guocheng. Current status and prospects of enzyme preparation industry in China[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1): 1-7. (in Chinese)
- [5] SUN Changwen, ZHOU Qingtao, WANG Chao, et al. Galactooligosaccharide overview and principle of functional effects analysis[J]. **Shandong Food Fermentation**, 2015, 3: 53-56. (in Chinese)
- [6] TORRONEN A, KUBICEK C P, HENRISSAT B. Amino acid sequence similarities between low molecular weight endo-1, 4-beta-xylanases and family H cellulases revealed by clustering analysis[J]. **FEBS Letter**, 1993, 321(2-3): 135-139.
- [7] AXE J M, YEZDIMER E M, O'ROURKE K F, et al. Amino acid networks in a (beta/alpha)(8) barrel enzyme change during catalytic turnover[J]. **J Am Chem Soc**, 2014, 136(19): 6818-6821.
- [8] VIJAYABASKAR M S, VVSHVESHWARA S. Insights into the fold organization of TIM barrel from interaction energy based structure networks[J]. **PLoS Comput Biol**, 2012, 8(5): e1002505.
- [9] AARON G, GEOFF W, ANDREW R, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose [J]. **Food Chemistry**, 2010, 121(2): 307-318.
- [10] 董艺凝. 耐热 β -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, 2011.
- [11] JUERS D H, HEIGHTMAN T D, VASELLA A, et al. A structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ) beta-galactosidase[J]. **Biochemistry**, 2001, 40(49): 14781-14794.
- [12] NERINCKX W, DESMET T, CLAEYSSSENS M. A hydrophobic platform as a mechanistically relevant transition state stabilising factor appears to be present in the active centre of all glycoside hydrolases[J]. **FEBS Letter**, 2003, 538(1-3): 1-7.
- [13] DONG Y N, LIU X M, CHEN H Q, et al. Enhancement of the hydrolysis activity of beta-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* by saturation mutagenesis[J]. **J Dairy Sci**, 2011, 94(3): 1176-1184.
- [14] DONG Y N, WANG L, GU Q, et al. Optimizing lactose hydrolysis by computer-guided modification of the catalytic site of a wild-type enzyme[J]. **Mol Divers**, 2013, 17(2): 371-382.
- [15] DONG Y N, CHEN H Q, SUN Y H, et al. A differentially conserved residue (Ile42) of GH42 beta-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus* BgaB is involved in both catalysis and thermostability[J]. **J Dairy Sci**, 2015, 98(4): 2268-2276.
- [16] SATHYA TA, KHAN M. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry [J]. **J Food Sci**, 2014, 79(11): R2149-2156.
- [17] VERA C, GUERRERO C, ILLANES A. Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations[J]. **Carbohydr Res**, 2011, 346(6): 745-752.
- [18] VIBORG A H, KATAYAMA T, ABOU H M, et al. Distinct substrate specificities of three glycoside hydrolase family 42

- beta-galactosidases from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697[J]. **Glycobiology**, 2014, 24(2):208-216.
- [19] DUTRA R M, GENNARI A, VOLPATO G, et al. Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial beta-galactosidases [J]. **Enzyme Res**, 2015, 2015:1-7.
- [20] DONG Q, YAN X, ZHENG M, et al. Characterization of an extremely thermostable but cold-adaptive beta-galactosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* for use as a recombinant aggregation for batch lactose degradation at high temperature[J]. **J Biosci Bioeng**, 2014, 117(6):706-710.
- [21] DOMINGUES L, GUIMARAES P M, OLIVEIRA C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation[J]. **Bioeng Bugs**, 2010, 1(3):164-171.
- [22] MAHDIAN S M, KARIMI E, TANIPOUR M H, et al. Expression of a functional cold active beta-galactosidase from *Planococcus* sp-L4 in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expr Purif**, 2015, (Epub ahead of print)
- [23] WU Y, YUAN S, CHEN S, et al. Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus* beta-galactosidase[J]. **Food Chem**, 2012, 138(2-3):1588-1595.
- [24] WANG G, XIA Y, GU Z, et al. A new potential secretion pathway for recombinant proteins in *Bacillus subtilis* [J]. **Microb Cell Fact**, 2015, 14(1):179.
- [25] FAN Q H, PICKENS J B, STRIEGLER S, et al. Illuminating the binding interactions of galactonoamides during the inhibition of beta-galactosidase (*E. coli*)[J]. **Bioorg Med Chem**, 2016, 24(4):6610671.
- [26] GOSLING A, STEVENS G W, BARBER A R, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose[J]. **Food Chemistry**, 2010, 121:3180.
- [27] MATPAN B F, STOUGAARD P, GUVEN K, et al. Cloning, purification and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Bacillus licheniformis* strain KG9[J]. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, 2015, 61(3):71-78.
- [28] ZHANG X, LI H, LI C J, et al. Metagenomic approach for the isolation of a thermostable beta-galactosidase with high tolerance of galactose and glucose from soil samples of Turpan Basin[J]. **BMC Microbiol**, 2013, 13:237.
- [29] SEN S, RAY L, CHATTOPADHYAY P. Production, purification, immobilization, and characterization of a thermostable beta-galactosidase from *Aspergillus alliaceus*[J]. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012, 167(7):1938-1953.
- [30] DONG Yining, CHEN Haiqin, LIU Xiaoming, et al. Research progress in thermostable beta-galactosidases [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(1):384-387. (in Chinese)
- [31] ZEUNER B, NYFFENEGGER C, MIKKELSEN J D, et al. Thermostable beta-galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides[J]. **N Biotechnol**, 2016, 33(3):355-360.
- [32] PARK A R, OH D K. Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current state and perspectives[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 85(5):1279-1286.
- [33] FAN Q H, CLAUNCH K A, STRIEGLER S. Structure-activity relationship of highly potent galactonoamide inhibitors toward beta-galactosidase (*Aspergillus oryzae*)[J]. **J Med Chem**, 2014, 57(21):8999-9009.
- [34] EDA M, MATSUMOTO T, ISHIMARU M, et al. Structural and functional analysis of tomato beta-galactosidase 4: insight into the substrate specificity of the fruit softening-related enzyme[J]. **Plant J**, 2016. (Epub ahead of print)
- [35] LAMSAL B P. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides [J]. **J Sci Food Agric**, 2012, 92(10):2020-2028.