



## 专论与综述

## $\beta$ -木糖苷酶的生物活性物质转化功能研究进展

李娜<sup>1</sup> 张蕊<sup>1,2,3</sup> 黄遵锡<sup>1,2,3</sup> 周峻沛<sup>\*1,2,3</sup>

1 云南师范大学生命科学学院 云南 昆明 650500

2 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500

3 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500

**摘要:**  $\beta$ -木糖苷酶是木聚糖酶系的一种酶, 其功能主要是降解半纤维素中最常见及含量最高的组分——木聚糖。近些年, 研究人员发现一些微生物来源的  $\beta$ -木糖苷酶具有生物活性物质转化功能, 可通过转糖基作用形成带有木糖基的生物活性物质, 也可通过水解作用将带有木糖基的物质, 如三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$ 、黄芪甲苷 IV (astragaloside IV, ASI)、7-木糖-10-去乙酰紫杉醇(7-xylosyl-10-deacetyltaxol, XDT)和花青素转化为生物活性物质, 因此, 这些  $\beta$ -木糖苷酶在食品和医药等领域具有巨大的潜在应用价值。此外, 研究人员揭示了  $\beta$ -木糖苷酶在生物活性物质转化功能方面的一些机制。本文主要介绍了  $\beta$ -木糖苷酶的生物活性物质转化功能、酶来源、家族分类、转化机制及应用, 以为  $\beta$ -木糖苷酶的进一步开发利用提供参考。

**关键词:**  $\beta$ -木糖苷酶, 生物活性物质, 转糖基, 转化机制

## Research progress in bioactive substances transformation by $\beta$ -xylosidases

LI Na<sup>1</sup> ZHANG Rui<sup>1,2,3</sup> HUANG Zun-Xi<sup>1,2,3</sup> ZHOU Jun-Pei<sup>\*1,2,3</sup>

1 School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China

2 Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China

3 Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China

**Abstract:**  $\beta$ -xylosidases are the members of xylanases. Their functions have been recognized to degrade xylan that is the most common hemicellulosic polysaccharide. In recent years, some microbial  $\beta$ -xylosidases show the function of bioactive substances transformation, including transxylosylation and dexylosylation of xylosylated substances such as notoginsenosides  $R_1$  and  $R_2$ , astragaloside IV, 7-xylosyl-10-deacetylpaclitaxel and anthocyanins to produce bioactive substances. These  $\beta$ -xylosidases

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31960459); Key Research Foundation of Yunnan Province (2020–2023: 24); Yunnan Ten Thousand Talents Plan Young & Elite Talents Project (YNWR-QNBJ-2018-383); Youth Scholar Training Program of National Southwest Associated University of Yunnan Normal University (01200205020516036)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-871-65920830; E-mail: zhoujunpei\_yn@126.com

**Received:** 08-03-2020; **Accepted:** 07-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

**基金项目:** 国家自然科学基金(31960459); 云南省基础研究计划重点项目(2020–2023: 24); 云南省万人计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2018-383); 云南师范大学联大青年学者培养计划(01200205020516036)

**\*通信作者:** Tel: 0871-65920830; E-mail: zhoujunpei\_yn@126.com

**收稿日期:** 2020-03-08; **接受日期:** 2020-05-07; **网络首发日期:** 2020-06-04

have huge potential applications in food, pharmaceutical and many other industries. Furthermore, some mechanisms involved in bioactive substances transformation by  $\beta$ -xylosidases have been revealed. This review mainly introduces the bioactive substances transformation functions, sources, family classification, transformation mechanisms and applications of  $\beta$ -xylosidases. The aim of the review is to provide useful information for the further development and utilization of  $\beta$ -xylosidases.

**Keywords:**  $\beta$ -xylosidase, Bioactive substance, Transglycosylation, Transformation mechanism

$\beta$ -木糖苷酶属于糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH), 是主要的木聚糖降解酶之一, 可应用到食品、饲料、造纸和能源等领域。除了降解低聚木糖和对硝基苯基- $\beta$ -D-木糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside, pNPX)外, 很多  $\beta$ -木糖苷酶还能降解对硝基苯基- $\alpha$ -L-阿拉伯吡喃糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside, pNPA)、对硝基苯基- $\alpha$ -L-阿拉伯呋喃糖苷(4-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, pNPAf), 以及对硝基苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷(4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, pNPG)。目前, 已报道的  $\beta$ -木糖苷酶有 100 余个, 其来源于细菌、真菌、放线菌、宏基因组及高等植物, 分布在糖苷水解酶第 1、3、5、28、30、39、43、51、52、54、116 和 120 家族中。近些年, 研究人员克隆和表达了越来越多的木糖苷酶基因, 从中发现了一些具有生物活性物质转化功能的  $\beta$ -木糖苷酶。

$\beta$ -木糖苷酶的生物活性物质转化功能包括两方面: (1) 一些  $\beta$ -木糖苷酶具有转糖基功能, 可将木糖基转移到醇类、糖类和其他受体的基团上, 分别形成烷基木糖、木寡糖或异质寡糖和其他木糖糖基化的物质, 这些木糖糖基化的产物具有表面活性剂、抗微生物、抗氧化和神经保护等作用, 在食品、医药和化妆品等领域具有潜在的应用价值<sup>[1-3]</sup>; (2) 一些  $\beta$ -木糖苷酶具有特殊的水解功能, 可以切除三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  及 ASI、XDT、花青素上的木糖基团, 分别形成人参皂苷  $R_{g1}$  和  $R_{h1}$ 、10-去乙酰紫杉醇(10-deacetylpaclitaxel, DT)、环黄芪醇(cycloastragenol, CA)和花色素, 这些去除了木糖基的产物具有重要的生物活性, 比如抗癌、抗炎、抗氧化和提高记忆等<sup>[4-5]</sup>。与化学和物

理合成方法相比, 这种酶催化的方法在生物活性物质的转化上具有高效性、立体选择性和环保性等优势<sup>[6]</sup>。

## 1 $\beta$ -木糖苷酶的转糖基功能

如表 1 所示, 在 GH3、GH5、GH39、GH43、GH52 和 GH54 家族中发现了具有转糖基活性的  $\beta$ -木糖苷酶, 且 GH3 和 GH39 家族中具有转糖基活性的  $\beta$ -木糖苷酶较多。这些  $\beta$ -木糖苷酶皆来源于微生物, 且主要来源于细菌。

糖苷水解酶催化的反应实质是 2 个关键氨基酸参与的酸碱催化反应。具有转糖基活性的糖苷水解酶通常采用保留型催化机制, 与反转型催化机制相比, 保留型催化机制的水解过程具有以下几个特点: (1) 相距较近的质子供体(酸性氨基酸)和亲核试剂(碱性氨基酸)导致底物和水分子不能同时进入酶的活性中心; (2) 质子供体首先攻击底物糖苷键中的氧原子, 促使糖苷键断裂, 而后亲核试剂攻击糖基异头碳形成一个底物-酶中间体, 接着质子供体协助水分子进攻糖基碳正离子完成双取代反应, 在转糖基过程中, 糖苷配基与水分子竞争结合到底物-酶中间体上, 并与中间体进一步作用形成糖基化物质, 因此, 转糖基和水解反应是两个相互可逆的过程<sup>[21-22]</sup>。反转型催化机制不能形成过渡态中间体, 但是在 GH43 家族(反转型催化机制)中也发现了具有转糖基活性的  $\beta$ -木糖苷酶<sup>[15-16]</sup>, 其机制有待深入研究。

简单地说,  $\beta$ -木糖苷酶催化的转糖基过程是供体和受体结合的过程。供体有 pNPX、木二糖( $X_2$ )和木寡糖(xylooligosaccharide, XOS), 这些供体作为底物可被  $\beta$ -木糖苷酶水解生成木糖基团。受体,

表 1  $\beta$ -木糖苷酶的转糖基功能  
Table 1 Transxylosylation function of  $\beta$ -xylosidases

家族	来源	名称	供体	受体	产物	转化率
Family	Source	Enzyme name	Donor	Receptor	Product	Conversion rate (receptor: rate)
GH3 (Fungus)	<i>Humicola insolens</i> Y1 <sup>[7]</sup>	Xyl3A	pNPX	pNPX	pNPX <sub>2</sub> ; X <sub>2</sub>	NR
	<i>Neurospora crassa</i> ST A <sup>[8]</sup>	NR	X <sub>2</sub> /X <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> /X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub> /X <sub>4</sub>	NR
	<i>Talaromyces amestolkiae</i> <sup>[1-2]</sup>	rBxTW1	XOS/pNPX	XOS/pNPX/Phenols/ Alcohols/Sugars	XOS, xylosylated phenols, new oligosaccharides, etc.	Sugars: <70%, Alcohols: >70%, Phenols: <30%
GH3	<i>Cellulomonas bogoriensis</i> <sup>[9]</sup>	CbXyl3A	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	XOS	NR
GH5	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <sup>[10]</sup>	rPcXyl5	pNPX	Alcohols	Alkyl xylosides	NR
GH39 (Bacteria)	<i>Bacillus halodurans</i> C-125 <sup>[11]</sup>	XylBH39	pNPX/XOS	Alcohols	Alkyl xylosides	
	<i>Sphingomonas</i> sp. <sup>[12-13]</sup>	JB13GH39	pNPX	Alcohols/Sugars	Alkyl xylosides, new oligosaccharides	NR
	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> B6A-RI <sup>[14]</sup>	NR	pNPX/X <sub>2</sub>	pNPX/X/X <sub>2</sub>	XOS	30%
GH43	<i>Thermobifida fusca</i> TM51 <sup>[15-16]</sup>	TfBXyl43	X <sub>2</sub> /pNPX	pAP-1-S-Xyl	pAP-1-S-X <sub>2</sub>	<3.2%
GH52 (Bacteria)	<i>Aeromonas caviae</i> ME-1 <sup>[17]</sup>	XysB	XOS	XOS	XOS	NR
	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> <sup>[18]</sup>	XsidB	pNPX	Alcohols	Alkyl xylosides	NR
GH54	<i>Trichoderma koningii</i> G-39 <sup>[19]</sup>	Abf	pNPX	Alcohols	Alkyl xylosides	30%
NR	<i>T. saccharolyticum</i> JW/SL-YS485 <sup>[20]</sup>	XylC	pNPX	Alcohols	Alkyl xylosides	NR

注：NR：未报道；X<sub>3</sub>：木三糖；X<sub>4</sub>：木四糖；pAP-1-S-Xyl：对氨基硫苯基- $\beta$ -D-吡喃木糖苷；XOS：木寡糖。  
Note: NR: Not reported; X<sub>3</sub>: Xylotriose; X<sub>4</sub>: Xylotetraose; pAP-1-S-Xyl: p-aminothiophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside; XOS: Xylooligosaccharide.

即取代水分子与底物-酶中间体结合的糖苷配基，可以是不同链长的醇类、糖类和酚类等， $\beta$ -木糖苷酶对不同受体的转糖基有不同的特点。

1.1 醇类受体

在  $\beta$ -木糖苷酶转糖基作用中，醇类是常用的受体。如图 1 所示，供体的木糖基团和受体醇类(甲醇、乙醇和丙醇等)通过  $\beta$ -木糖苷酶的催化作用结合形成烷基糖苷，烷基糖苷具有表面活性剂和抗微生物的作用<sup>[3]</sup>。值得注意的是，大多数  $\beta$ -木糖苷酶对醇类受体的转糖基效率随着受体碳链的增加而减小，这与酶活性位点上的疏水性氨基酸有关，也可能是因为小分子的醇更容易进入到酶的

催化部位<sup>[2,11,18]</sup>。另外，Muzard 等<sup>[11,23]</sup>推测短碳链醇类的羟基与酶活性位点之间的互斥作用较弱，而长碳链醇类由于疏水作用和空间位阻不容易接近酶活性位点。Ochs 等<sup>[24]</sup>研究了来源于 *B. halodurans* 的  $\beta$ -木糖苷酶 BhXyl39 结合位点中的空间位阻和极性对醇类受体的转糖基效率的影响，发现 284 位的酪氨酸(Y284)可以结合供体并将其传达至受体，而 F116 和 F167 涉及到醇类受体的传递。Nieto-Domínguez 等<sup>[2]</sup>发现 BxTW1 对正丙醇和正丁醇受体的转糖基效率分别高于异丙醇和异丁醇，因此推测醇类受体中的伯醇基更容易发生转糖基反应。

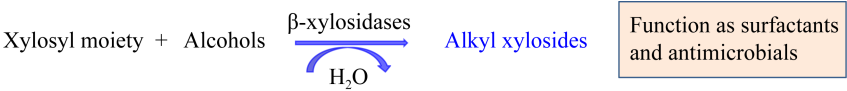


图 1  $\beta$ -木糖苷酶以醇类为受体的转糖基作用  
Figure 1 The transxylosylation of  $\beta$ -xylosidases with alcohols as receptors

## 1.2 糖类受体

在  $\beta$ -木糖苷酶的转糖基过程中, 常见的糖类受体有葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、木二糖和木三糖。在  $\beta$ -木糖苷酶的催化作用下, 这些糖类受体分别与木糖基结合形成新的寡糖, 如葡萄糖-木糖(图 2), 这些新的寡糖可能具有益生元的作用。Nieto-Domínguez 等<sup>[2]</sup>发现 BxTW1 对受体葡萄糖、甘露糖和半乳糖的转糖基效率依次降低, 且转糖基反应均发生在这些醛糖受体的伯醇羟基上, 原因可能是: D-葡萄糖 C<sub>6</sub> 位的伯醇羟基与其他几个羟基不在一个中心轴上, D-甘露糖的伯醇羟基与 C<sub>2</sub> 位的羟基在同一中心轴位置, D-半乳糖的伯醇羟基与 C<sub>4</sub> 位的羟基在同一中心轴位置且相距较近, 即当伯醇羟基与其他羟基在同一中心轴位置或者相距较近时会降低转糖基效率。Nieto-Domínguez 等<sup>[2]</sup>还发现木二糖和木三糖可以同时作为供体和受体, BxTW1 对这两个受体的转糖基效率似乎和木寡糖的降解效率成互补关系; 同时还发现木二糖和木三糖的浓度在 0–80 mmol/L 之间时, 转糖基效率随着底物浓度升高而升高, 浓度在 20–80 mmol/L 之间时, 相同浓度木二糖的转糖基效率高于木三糖。

## 1.3 酚类受体

羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT)是具有抗炎和神经保护作用的酚类物质, 还可以预防心血管疾病、癌症和其他慢性疾病<sup>[25–29]</sup>。天然 HT 的生物利用度弱、易被分解, 糖基化后的 HT 具有更强的

生物利用度、稳定性、抗氧化性、溶解度和生物安全性(图 3)<sup>[1]</sup>。其他具有抗氧化作用的酚类有对苯二酚(hydroquinone, HQ)和邻苯二酚等, 其中 HQ 能够抑制酪氨酸酶, 使皮肤产生美白的效果, 但其对人体具有伤害作用<sup>[1,30–31]</sup>。HQ 被木糖糖基化后, 对人体的伤害作用降低, 但仍具有抑制酪氨酸酶的作用<sup>[30–31]</sup>。邻苯二酚是很多药物, 如治疗支气管哮喘、高血压、帕金森和心肌梗死等疾病的药物的母核结构, 木糖糖基化的邻苯二酚具有更高的生物活性<sup>[32–34]</sup>。Nieto-Domínguez 等<sup>[1]</sup>研究发现  $\beta$ -木糖苷酶 BxTW1 对 HT 和 HQ 受体具有转糖基作用, 但是对邻苯二酚受体却无转糖基作用; 他们同时发现当反应体系中供体木二糖和受体 HT 的浓度分别为 350 mmol/L 和 300 mmol/L 时, 转化率达到最高(26.6%), 而 HT 的浓度低于或高于 300 mmol/L 时转化率均降低; 在相同的反应时间内, 当反应体系中木二糖和 HQ 的浓度分别为 160 mmol/L 和 110 mmol/L 时转化率达到最高(4.7%), 低于或高于上述浓度时转化率均降低。此外, BxTW1 对 HT 的转糖基效率明显高于 HQ, 通过 NMR 和 MS 对产物进行分析后, 进一步发现 BxTW1 对受体伯醇基的糖基化具有偏好性<sup>[1]</sup>。

Jain 等<sup>[18]</sup>研究了  $\beta$ -木糖苷酶 XsidB 利用醇类和糖类作为受体的转糖基过程中供体(pNPX)浓度对转化率的影响: 当 pNPX 浓度达到 50 mmol/L 时才能检测到转糖基产物, 浓度为 70 mmol/L 时转化率最高。

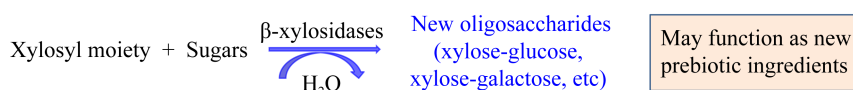


图 2  $\beta$ -木糖苷酶以糖类为受体的转糖基作用

Figure 2 The transxylosylation of  $\beta$ -xylosidases with sugars as receptors

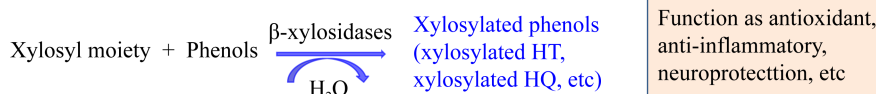


图 3  $\beta$ -木糖苷酶以酚类为受体的转糖基作用

Figure 3 The transxylosylation of  $\beta$ -xylosidases with phenols as receptors

综上所述, 转糖基过程是供体和受体同时存在的复杂的双取代反应, 其复杂性主要体现在: (1) 该反应过程是可逆的; (2) 反应体系中供体、受体及产物的浓度等因素影响反应进行的方向, 从而影响转糖基效率; (3) 不同的酶有不同的水解和转糖基活性。目前, 尚无文献报道如何改造木糖苷酶以提高其转糖基效率。从保留型催化机制的角度分析, 可以用其他反应介质替代水溶液来减少甚至除去反应体系中的水分子, 这有利于糖基配体与中间体结合, 从而提高转糖基效率; 从受体选择的角度分析,  $\beta$ -木糖苷酶对醇类、糖类和酚类的转糖基效率依次降低, 这与受体的结构和羟基位置有关, 因而可对受体进行基团的修饰以提高转糖基效率; 从  $\beta$ -木糖苷酶的催化特性和结构特性入手, 深入研究酶与底物的亲和、释放

等过程中影响转糖基效率的关键氨基酸、相互作用力(氢键、Cation- $\pi$  等)、局部结构摆动等, 从而指导  $\beta$ -木糖苷酶的改造, 提高转糖基效率; 另外, 通过定向进化也可提高转糖基效率。

## 2 $\beta$ -木糖苷酶对木糖糖基化物质的转化功能

$\beta$ -木糖苷酶不仅能通过转糖基作用使某些物质木糖糖基化, 还能切除某些天然物质上的木糖基团, 从而生成具有生物活性的物质。这些带有木糖基团的天然物质有三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  及 XDT、ASI、花青素等。

### 2.1 三七皂苷 $R_1$ 和 $R_2$ 的转化

皂苷上的糖基被糖苷水解酶切除后可生成稀有皂苷, 稀有皂苷具有重要的生物活性。如图 4 所

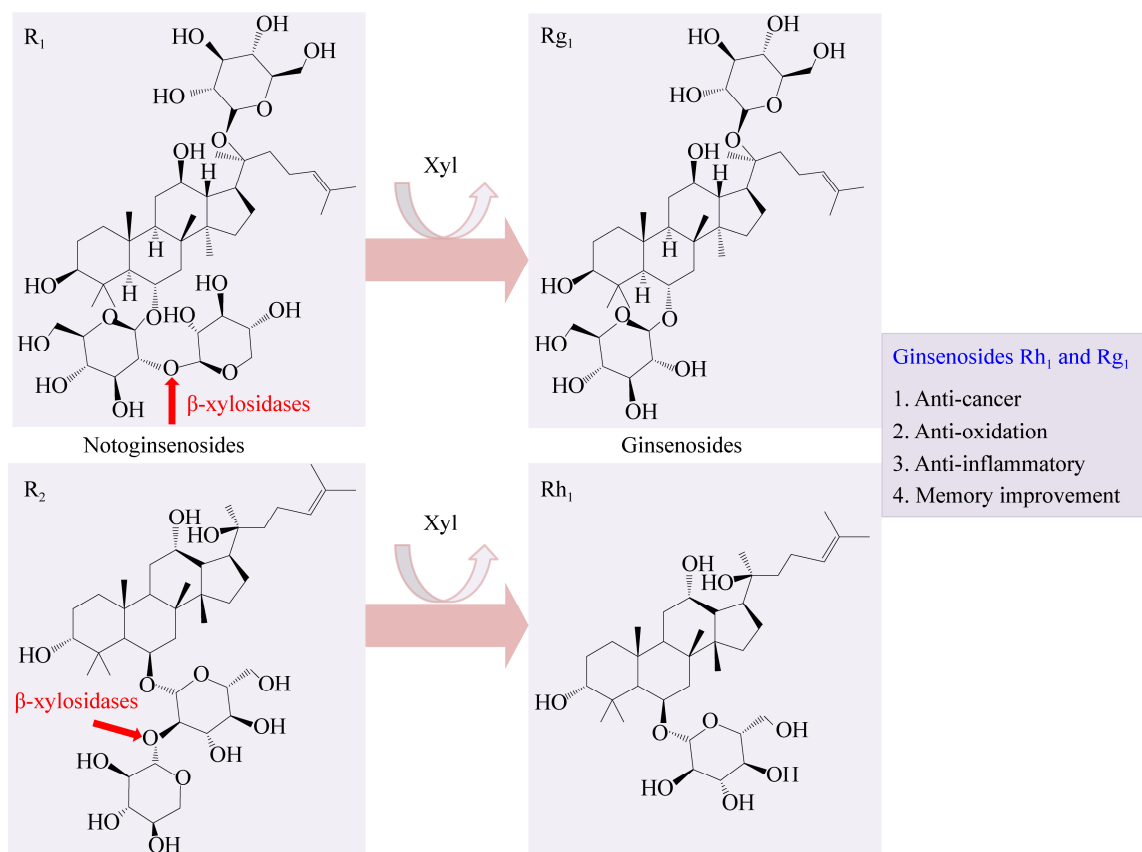


图 4  $\beta$ -木糖苷酶将三七皂苷转化为人参皂苷

Figure 4 The transformation of notoginsenosides by  $\beta$ -xylosidases to produce ginsenosides

示,三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  上的  $C_6$  位连接一个葡萄糖基,葡萄糖基又通过  $\beta$ -1,2-糖苷键连接一个木糖基, $\beta$ -木糖苷酶能切割  $\beta$ -1,2-糖苷键使三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  分别转化为人参皂苷  $R_{g1}$  和  $R_{h1}$ ;人参皂苷  $R_{g1}$  和  $R_{h1}$  具有抗癌、抗氧化、抗炎和增强记忆的功能<sup>[13,35]</sup>。目前报道的具有转化三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  的  $\beta$ -木糖苷酶均在 GH39 家族中,分别来源于 *T. thermosaccharolyticum*、*Sphingomonas* sp.、*D. thermophilum* 的 TtGH39<sup>[35]</sup>、JB13GH39<sup>[13]</sup>、Xln-DT<sup>[36]</sup>对三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  的转化率均大于 90% (表 2)。本实验室通过序列比对、分子对接及突变验证等方法揭示了 GH39  $\beta$ -木糖苷酶转化三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  (切割  $\beta$ -1,2-糖苷键)涉及的保守位点,并通过系统发育树分析进一步提出:其他具有  $\beta$ -1,4-木糖苷酶活性的 GH39  $\beta$ -木糖苷酶均具有切割  $\beta$ -1,2-糖苷键的功能<sup>[13]</sup>。

不同皂苷上的糖基种类和位置不同,降解这些糖基化的皂苷需要不同催化功能的糖苷水解酶,根据催化功能可以对这些酶进行系统分类<sup>[44]</sup>。例如,葡萄糖基可在多个位置上对人参皂苷糖基化,降解这些葡萄糖基化的人参皂苷需要不同的葡萄糖基水解酶,国际酶学委员会 (enzyme

commission of IUB, EC)将这些葡萄糖基水解酶归类于 EC 3.2.1.191–195 中。本实验室提出:降解三七皂苷  $R_1$  和  $R_2$  的 GH39  $\beta$ -木糖苷酶应该被归类于新的 EC 子类中<sup>[13]</sup>。

2.2 黄芪甲苷 IV 的转化

从黄芪中提取的黄芪甲苷 IV (ASI)的含量远比环黄芪醇(cycloastragenol, CA)的含量高,但是 CA 的抗衰老作用更有效<sup>[36]</sup>。如图 5 所示,ASI 上  $C_3$  位的木糖基和  $C_6$  位的葡萄糖基分别被  $\beta$ -木糖苷酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶切除后生成 CA<sup>[36]</sup>。 $\beta$ -木糖苷酶转化 ASI 的相关报道很少,目前仅 Li 等<sup>[36]</sup>报道来源于 *D. thermophilum* 的 GH39  $\beta$ -木糖苷酶 Xln-DT 能切除 ASI 上的木糖基,其转化率高达 88.9% (表 2)。

2.3 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的转化

目前,药用紫杉醇主要从红豆杉中提取,但其在红豆杉中的含量约为 0.02%,而其类似物 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇含量约为 0.5%,常被作为废弃物处理<sup>[45]</sup>。如图 6 所示,XDT 上  $C_7$  位的木糖基被切除后形成 DT,DT 进一步被酰化后形成紫杉醇<sup>[45]</sup>。目前,具有 XDT 转化功能的  $\beta$ -木糖苷酶均存在于 GH3 家族中,其转化率均在 90%以上(表 2)。其中 Cheng 等<sup>[37]</sup>对来源于 *L. edodes* 的

表 2  $\beta$ -木糖苷酶对木糖基底物的转化  
Table 2 Transformation of xylosyl substances by xylosidases

家族	来源	名称	底物	产物	转化率
Family	Source	Enzyme name	Substrate	Product	Conversion rate (%)
GH3	<i>Lentinula edodes</i> <sup>[37]</sup>	LXYL-P1-1	XDT	DT	NR
GH3	<i>Lentinula edodes</i> <sup>[37]</sup>	LXYL-P1-2	XDT	DT	100
GH3	<i>Dictyoglomus turgidum</i> <sup>[38]</sup>	Dt-Xyl3	XDT	DT	98
NR	<i>Enterobacter</i> sp. CGMCC2487 <sup>[39]</sup>	NR	XDT	DT	92
NR	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> F16 <sup>[40]</sup>	NR	XDT	DT	>98
GH3	<i>Brunfelsia calycina</i> <sup>[41]</sup>	BcXyl	Anthocyanins	Anthocyanidins	NR
GH3	<i>Candida molischiana</i> <sup>[42]</sup>	BGLN	Anthocyanins	Anthocyanidins	NR
GH3	<i>Bjerkandera adusta</i> <sup>[43]</sup>	BadGluc	Anthocyanins	Anthocyanidins	NR
GH39	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> <sup>[35]</sup>	TtGH39	Notoginsenosides $R_1$ and $R_2$	Ginsenosides $R_{g1}$ and $R_{h1}$	100
GH39	<i>Sphingomonas</i> sp. <sup>[13]</sup>	JB13GH39	Notoginsenosides $R_1$ and $R_2$	Ginsenosides $R_{g1}$ and $R_{h1}$	$R_1$ : 100; $R_2$ : 90.3
GH39	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> <sup>[36]</sup>	Xln-DT	Notoginsenosides $R_1$ and astragaloside IV	Ginsenosides $R_{g1}$ and cycloastragenol	$R_1$ : 100; IV: 88.9

注: NR: 未报道。  
Note: NR: Not reported.



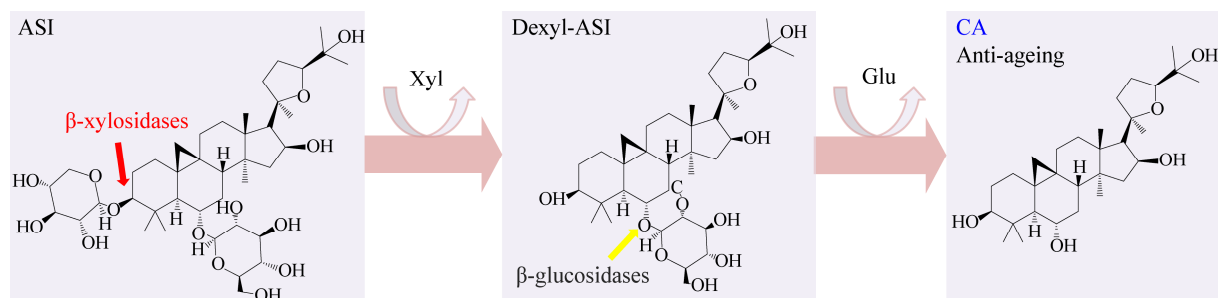


图5  $\beta$ -木糖苷酶将黄芪甲苷 IV(ASI)转化为环黄芪醇(CA)

Figure 5 The transformation of ASI by  $\beta$ -xylosidases to produce CA

注：黄色箭头代表  $\beta$ -葡萄糖苷酶进一步切除葡萄糖基后形成 CA。

Note: Yellow arrow indicates that  $\beta$ -glucosidases work together with  $\beta$ -xylosidases to form the end product CA.

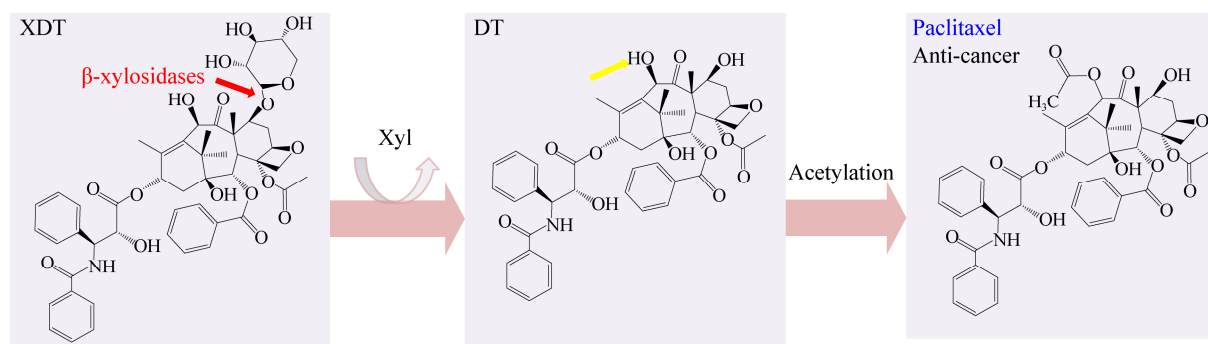


图6  $\beta$ -木糖苷酶将 XDT 转化为紫杉醇

Figure 6 The transformation of XDT by  $\beta$ -xylosidases to produce paclitaxel

注：黄色箭头代表乙酰化酶进一步酰化后形成紫杉醇。

Note: Yellow arrow indicates that  $\beta$ -xylosidases work together with acetylases to form the end product paclitaxel.

LXYL-P1-1 和 LXYL-P1-2 的相关结构特点进行了进一步研究：LXYL-P1-1 的 2 个单点突变体 I368T (表示 368 位的异亮氨酸突变为苏氨酸，以下表述与此类似)和 I368E 对 XDT 的转化活性升高，双点突变体 V91S/I368E 和 A72T/V91S 的转化活性高于单点突变体 I368E，表明 I368 是转化 XDT 的关键氨基酸，同时 I368、V91 和 A72 在转化过程中存在相互作用；LXYL-P1-2 突变体 T368E 的转化活性升高，同样证明 T368 是 LXYL-P1-2 中转化 XDT 的关键氨基酸。Yang 等<sup>[46]</sup>得到 LXYL-P1-2 和底物 XDT 复合物晶体，经序列比对和结构分析，发现 A381-P382 是 LXYL-P1-2 中区别于其他大部分同家族(GH3)  $\beta$ -木糖苷酶的特殊序列，该序列与 DT 的结合有关；含 A381-P382 位点的 Loop 结构

(379–383) 和另外 4 个 Loop 结构 (220–232、324–328、446–450 和 529–530) 共同形成了与 DT 结合的口袋；另外，LXYL-P1-2 中和底物结合的部位与紫杉醇作用的微管蛋白具有相似的结构特点，因此，进一步揭示 LXYL-P1-2 的结构特点可以为紫杉醇新型药物载体的开发提供参考。

## 2.4 花青素的转化

花青素(anthocyanins)是植物中负责颜色变化的主要物质，是黄酮类化合物，母核结构为 2-苯基苯并吡喃(图 7)，被称为花色元；母核结构上的  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  是不同的取代基，从而形成了 250 余种花青素<sup>[47]</sup>。 $R_3$ 、 $R_4$  可以被糖基取代(包括木糖基团)<sup>[48]</sup>。花青素可作为食物色素添加剂，具有营养价值和抗氧化作用<sup>[47-48]</sup>。通过糖苷水解酶

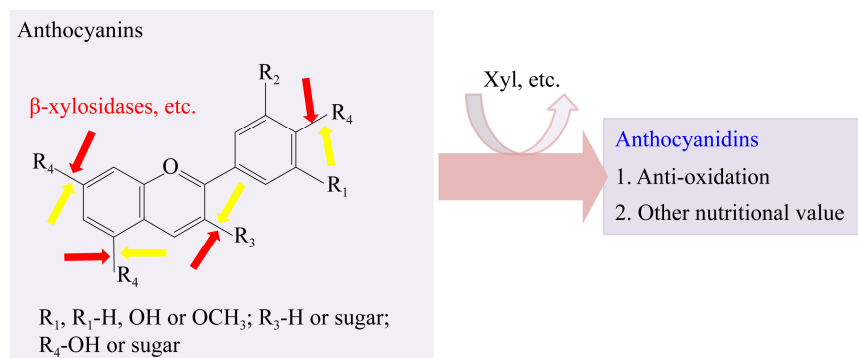


图 7  $\beta$ -木糖苷酶将花青素转化为花色素

Figure 7 The transformation of anthocyanins by  $\beta$ -xylosidases to produce anthocyanidins

注: 黄色箭头代表其他糖苷水解酶切割其他糖基。

Note: Yellow arrows indicate that other glycosidases cleave other sugar groups to form anthocyanidins.

的水解作用, 可去除花青素中的糖基, 生成能更有效地发挥生物活性作用的花色素<sup>[41]</sup> (图 7)。有些  $\beta$ -木糖苷酶能去除花青素中的木糖基<sup>[41-43]</sup>, 目前已报道具有此功能的  $\beta$ -木糖苷酶均存在于 GH3 中, 但此类  $\beta$ -木糖苷酶的结构特性还有待进一步研究(表 2)。

### 3 总结与展望

与化学和物理方法相比, 酶法往往具有特异性强、条件温和、环保、可控和可持续等优点, 因此, 利用木糖苷酶获得烷基糖苷、新型寡糖、木糖化酚类、稀有皂苷、紫杉醇、环黄芪醇和花色素等生物活性物质, 具有重要的研究和应用价值。近年报道了一些具有生物活性物质转化功能的  $\beta$ -木糖苷酶, 其中具有转糖基功能的  $\beta$ -木糖苷酶存在于 GH3、GH5、GH39、GH43、GH52 和 GH54 家族中, 具有转化三七皂苷 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub>、XDT、ASI 和花青素的  $\beta$ -木糖苷酶存在于 GH3 和 GH39 家族中, 但是, 具有生物活性物质转化功能的  $\beta$ -木糖苷酶和能被  $\beta$ -木糖苷酶转化的天然物质以及转化产物的应用还有待进一步研究。另外, 已有研究揭示了个别  $\beta$ -木糖苷酶在生物活性物质转化中涉及到的基本机制、保守氨基酸位点和一些结构特性, 为后续的研究奠定了基础。但要实现这些  $\beta$ -木糖苷酶的工业化应用, 还需要对酶的转化机制、关键氨基酸和结

构特性进行更深入的研究, 同时对酶的高效表达、发酵、固定化及其他下游工程进行研究, 解决底物特异性、产物抑制、转糖基过程中的反应趋向性、酶的产量、酶的重复利用等问题, 最终提高生物活性物质转化的效率并降低成本。

### REFERENCES

- [1] Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, Peñalver P, et al. Enzymatic synthesis of a novel neuroprotective hydroxytyrosyl glycoside[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(48): 10526-10533
- [2] Nieto-Domínguez M, de Eugenio LI, Barriuso J, et al. Novel pH-stable glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: an enzyme displaying regioselective transxylosylation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(18): 6380-6392
- [3] Smulek W, Kaczorek E, Hricovíniová Z. Alkyl xylosides: physico-chemical properties and influence on environmental bacteria cells[J]. Journal of Surfactants and Detergents, 2017, 20(6): 1269-1279
- [4] Kim JH, Yi YS, Kim MY, et al. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases[J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(4): 435-443
- [5] Liu WC, Gong T, Zhu P. Advances in exploring alternative Taxol sources[J]. RSC Advances, 2016, 6(54): 48800-48809
- [6] Brusa C, Muzard M, Rémond C, et al.  $\beta$ -Xylopyranosides: synthesis and applications[J]. RSC Advances, 2015, 5(110): 91026-91055
- [7] Xia W, Shi PJ, Xu XX, et al. High level expression of a novel family 3 neutral  $\beta$ -xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117578



- [8] Kirikyali N, Connerton IF. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa*  $\beta$ -xylosidase in *Pichia pastoris*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 57: 63-68
- [9] Hou J. Gene cloning, expression and characterization of three glycoside hydrolases from *Cellulomonas bogoriensis*[D]. Changchun: Master's Thesis of Northeast Normal University, 2018 (in Chinese)  
侯晶. *Cellulomonas bogoriensis* 的三种糖苷水解酶的基因克隆、异源重组表达及酶学性质研究[D]. 长春: 东北师范大学硕士学位论文, 2018
- [10] Huy ND, Le Nguyen C, Seo J, et al. Putative endoglucanase PcGH5 from *Phanerochaete chrysosporium* is a  $\beta$ -xylosidase that cleaves xylans in synergistic action with endo-xylanase[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2015, 119(4): 416-420
- [11] Muzard M, Aubry N, Plantier-Royon R, et al. Evaluation of the transglycosylation activities of a GH 39  $\beta$ -D-xylosidase for the synthesis of xylose-based glycosides[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 58(1/4): 1-5
- [12] Li N, Han XW, Xu SJ, et al. Glycoside hydrolase family 39  $\beta$ -xylosidase of *Sphingomonas* showing salt/ethanol/trypsin tolerance, low-pH/low-temperature activity, and transxylosylation activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(36): 9465-9472
- [13] Zhang R, Li N, Xu SJ, et al. Glycoside hydrolase family 39  $\beta$ -xylosidases exhibit  $\beta$ -1, 2-xylosidase activity for transformation of notoginsenosides: a new EC subclass[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(11): 3220-3228
- [14] Armand S, Vieille C, Gey C, et al. Stereochemical course and reaction products of the action of  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI[J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 236(2): 706-713
- [15] Fekete CA, Kiss L. A new approach in the active site investigation of an inverting  $\beta$ -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51[J]. The Protein Journal, 2013, 32(2): 97-105
- [16] Fekete CA, Kiss L. Purification and characterization of a recombinant  $\beta$ -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51[J]. The Protein Journal, 2012, 31(8): 641-650
- [17] Suzuki T, Kitagawa E, Sakakibara F, et al. Cloning, expression, and characterization of a family 52  $\beta$ -xylosidase gene (*xysB*) of a multiple-xylanase-producing bacterium, *Aeromonas caviae* ME-1[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2001, 65(3): 487-494
- [18] Jain I, Kumar V, Satyanarayana T. Applicability of recombinant  $\beta$ -xylosidase from the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* in synthesizing alkylxylosides[J]. Bioresource Technology, 2014, 170: 462-469
- [19] Wan CF, Chen CT, Li YK, et al. Expression, purification and characterization of a bifunctional  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/ $\beta$ -D-xylosidase from *Trichoderma koningii* G-39[J]. Journal of the Chinese Chemical Society, 2007, 54(1): 109-116
- [20] Shao WL, Xue YM, Wu AL, et al. Characterization of a novel  $\beta$ -xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(3): 719-726
- [21] Li ZF, Gu ZB, Du GC, et al. Structural characteristics and catalytic mechanisms of cyclodextrin glycosyltransferase[J]. China Biotechnology, 2010, 30(6): 144-150 (in Chinese)  
李兆丰, 顾正彪, 堵国成, 等. 环糊精葡萄糖基转移酶的结构特征与催化机理[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(6): 144-150
- [22] Chen HC, Yang SS, Xu AJ, et al. Insight into the glycosylation and hydrolysis kinetics of  $\alpha$ -glucosidase in the synthesis of glycosides[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(23/24): 9423-9432
- [23] Kurakake M, Fujii T, Yata M, et al. Characteristics of transxylosylation by  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, 1726(3): 272-279
- [24] Ochs M, Belloy N, Dauchez M, et al. Role of hydrophobic residues in the aglycone binding subsite of a GH39  $\beta$ -xylosidase in alkyl xylosides synthesis[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 96: 21-26
- [25] Richard N, Arnold S, Hoeller U, et al. Hydroxytyrosol is the major anti-inflammatory compound in aqueous olive extracts and impairs cytokine and chemokine production in macrophages[J]. Planta Medica, 2011, 77(17): 1890-1897
- [26] Vlacheski F, Young M, Tsiani E. Antidiabetic effects of hydroxytyrosol: *in vitro* and *in vivo* evidence[J]. Antioxidants, 2019, 8(6): 188
- [27] Peyrol J, Riva C, Amiot MJ. Hydroxytyrosol in the prevention of the metabolic syndrome and related disorders[J]. Nutrients, 2017, 9(3): 306
- [28] de Las Hazas MCL, Piñol C, Macia A, et al. Hydroxytyrosol and the colonic metabolites derived from virgin olive oil intake induce cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(31): 6467-6476
- [29] Gorzynek-Debicka M, Przychodzen P, Cappello F, et al. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(3): 686
- [30] Dreher F, Draelos ZD, Gold MH, et al. Efficacy of hydroquinone-free skin-lightening cream for photoaging[J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2013, 12(1): 12-17
- [31] Chiku K, Dohi H, Saito A, et al. Enzymatic synthesis of 4-hydroxyphenyl  $\beta$ -D-oligoxylsides and their notable tyrosinase inhibitory activity[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(5): 1123-1128
- [32] Sedó J, Saiz-Poseu J, Busqué F, et al. Catechol-based biomimetic functional materials[J]. Advanced Materials, 2013, 25(5): 653-701

- [33] Lee WG, Chan AH, Spasov KA, et al. Design, conformation, and crystallography of 2-naphthyl phenyl ethers as potent anti-HIV agents[J]. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2016, 7(12): 1156-1160
- [34] Kumar M, Rawat P, Rahuja N, et al. Antihyperglycemic activity of phenylpropanoyl esters of catechol glycoside and its dimers from *Dodecadenia grandiflora*[J]. Phytochemistry, 2009, 70(11/12): 1448-1455
- [35] Shin KC, Seo MJ, Oh DK. Characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and its application to the production of ginsenosides R<sub>g1</sub> and Rh<sub>1</sub> from notoginsenosides R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub>[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(11): 2275-2281
- [36] Li Q, Wu T, Qi ZP, et al. Characterization of a novel thermostable and xylose-tolerant GH 39  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus thermophilum*[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 29
- [37] Cheng HL, Zhao RY, Chen TJ, et al. Cloning and characterization of the glycoside hydrolases that remove xylosyl groups from 7- $\beta$ -xylosyl-10-deacetyltaxol and its analogues[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12(8): 2236-2248
- [38] Li Q, Jiang YJ, Tong XY, et al. Cloning and characterization of the  $\beta$ -xylosidase from *Dictyoglomus turgidum* for high efficient biotransformation of 10-deacetyl-7-xylosltaxol[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94: 103357
- [39] Wang K, Wang TT, Li JH, et al. Microbial hydrolysis of 7-xylosyl-10-deacetyltaxol to 10-deacetyltaxol[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(3/4): 250-255
- [40] Dou TY, Luan HW, Liu XB, et al. Enzymatic hydrolysis of 7-xylosyltaxanes by an extracellular xylosidase from *Cellulosimicrobium cellulans*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(9): 1905-1910
- [41] Dong BY, Luo HH, Liu B, et al. BcXyl, a  $\beta$ -xylosidase isolated from *Brunfelsia calycina* flowers with anthocyanin- $\beta$ -glycosidase activity[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): 1423
- [42] Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- $\beta$ -glucosidase in a wine yeast strain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 354-360
- [43] Behrens CJ, Krahe NK, Linke D, et al. BadGluc, a  $\beta$ -glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(9): 1391-1401
- [44] Shin KC, Oh DK. Classification of glycosidases that hydrolyze the specific positions and types of sugar moieties in ginsenosides[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2016, 36(6): 1036-1049
- [45] Li BJ, Wang H, Gong T, et al. Improving 10-deacetylbaccatin III-10- $\beta$ -O-acetyltransferase catalytic fitness for Taxol production[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 15544
- [46] Yang L, Chen TJ, Wang F, et al. Structures of  $\beta$ -glycosidase LXYL-P1-2 reveals the product binding state of GH3 family and a specific pocket for Taxol recognition[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 22
- [47] Wallace TC, Giusti MM. Anthocyanins[J]. Advances in Nutrition, 2015, 6(5): 620-622
- [48] Fang J. Bioavailability of anthocyanins[J]. Drug Metabolism Reviews, 2014, 46(4): 508-520