

嗜热糖苷酶与酶催化糖化合物合成研究进展*

The Thermostable Glycosidase and Enzymatic Synthesis of Glycoconjugates: Current State and Perspectives

杨静文¹, 孔繁思¹, 栾霞², 高仁钧^{1**}

YANG Jingwen¹, KONG Fansi¹, LUAN Xia², GAO Renjun¹

(1. 吉林大学生命科学学院, 分子酶学工程教育部重点实验室, 吉林长春 130012; 2. 国家粮食局科学研究院, 北京 100037)

(1. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, the Ministry of Education, School of Life Science, Jilin University, Changchun, Jilin, 130012, China; 2. Academy of State Administration of Grain, Beijing, 100037, China)

摘要: 本文对近年来关于嗜热糖苷酶的研究进行了全面的论述, 包括嗜热糖苷酶基因的克隆与表达的现状以及在酶法合成糖苷类化合物方面的应用, 对比分析了目前提高转糖苷效率的方法, 如定点突变、合理设计溶液体系、微波辐射等。在糖苷类化合物的水解与合成的工业生产中, 嗜热糖苷酶以其良好的热稳定性可望成为一类高效、稳定的工具酶。

关键词: 糖苷酶 克隆 表达 糖苷 合成 突变 离子液体 微波辐射

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2017)01-0054-07

Abstract: In this paper, the progress of thermostable glycosidases in recent years has been summarized in detail, including the current state of cloning and expression of glycosidases and applications in enzymatic synthesis of glycosidic compounds. The methods of improving the efficiency of transglycosylation, such as site directed mutagenesis, rational design of solution system and microwave radiation, have also been comparatively analyzed. With the high thermostability, thermostable glycosidases are expected to be a highly efficient and stable tool enzyme in the industrial production of glycoside compounds for hydrolysis and synthesis.

Key words: glycosidase, clone, expression, glycoside, synthesis, site-directed mutagenesis, ionic liquid, microwave radiation

0 引言

最适生长温度在 40℃ 以上的微生物称作嗜热微生物, 包括细菌、古细菌和真菌 3 大类, 其中以古细菌

来源的较多, 而真菌较少。嗜热酶一般指从嗜热微生物中分离得到的一类热稳定性酶。酶作为有活性的大分子在应用过程中常受环境影响而表现出不稳定、失活等情况, 尤其在高温、强酸、强碱等极端条件下。与常温酶相比, 嗜热酶具有众多优势, 因此近年来受到越来越多研究者的关注^[1]。近年来, 关于嗜热酶的性质和应用屡见报道, 其中研究的热点包括用量占世界酶制剂总量 30% 的淀粉酶, 木聚糖酶, 蛋白水解酶以及 DNA 聚合酶等。

糖苷酶又称为糖基水解酶, 是一类水解 O-、N- 和 S- 连接糖苷键的酶, 由于在催化反应的过程中不

收稿日期: 2016-12-15

作者简介: 杨静文(1988—), 女, 博士生, 主要从事嗜热糖苷酶的表达、改造和应用研究。

* 国家“863”高科技项目(2013AA102104)资助。

** 通信作者: 高仁钧(1973—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事嗜热酶改造和应用研究, E-mail: gaorj@jlu.edu.cn。

需要任何辅因子或辅酶,因此它们是真正意义上的水解酶。糖苷是糖的半缩醛羟基上的氢被配基取代,进而失去一分子水或其它小分子化合物而形成的化合物,普遍存在于自然界,在生物体内发挥着重要的作用,如植物的生长,果实成熟时散发的气味等。许多糖苷化合物因具有药用价值而引起人们的关注,如人参皂苷,熊果苷等。目前主要通过生物提取、化学合成和酶法合成 3 种方法来获得糖苷化合物^[2]。通常糖苷在天然产物中含量很低,且提取过程复杂,从而限制其大规模生产,而化学合成法不仅需要繁琐的保护/去保护步骤,且反应条件剧烈,最终产率较低,同时对环境易造成污染。酶法合成糖苷类化合物反应条件温和,糖基化反应一步即可实现,不仅避免了多步的保护/去保护步骤,且具有立体选择性高、副反应少和对环境友好等优点,因此,酶催化制备糖苷技术日益受到重视。糖基转移酶和糖苷酶在酶法合成糖苷化合物的过程中起着重要作用。糖基转移酶在催化合成反应时需要以活化的核苷磷酸糖作为糖基供体,但核苷磷酸糖价格昂贵,在很大程度上限制了其在大规模生产糖苷化合物中的应用。糖苷酶可以非活化的糖作为糖基供体,因此被广泛用于各类糖苷化合物的合成^[3]。

1 嗜热糖苷酶基因的克隆与表达现状

随着克隆表达技术日趋成熟,大量的嗜热糖苷酶

表 1 嗜热糖苷酶性质的比较

Table 1 Comparison of properties of thermostable glycosidase

类别 Category	菌种 Strain	酶 Enzyme	表达宿主 Host	最适温度 Optimum temperature (°C)	最适 pH 值 Optimum pH	分子量 Molecular mass(kDa)	参考文献 Reference
Achaebacteria	<i>Thermotoga maritima</i>	β -galactosidase	<i>E. coli</i>	80	5.3	120/240	[6]
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	β -glucosidase	<i>P. furiosus</i>	102~105	5.0	58/230	[5]
	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	α -glucosidase	<i>E. coli</i>	80	5.0~6.0	82/409	[7]
	<i>Thermotoga naphthophilum</i>	β -galactosidase	<i>E. coli</i>	90	6.8	70	[8]
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	β -glucosidase	<i>E. coli</i>	95	5.0~7.0	52	[9]
Bacteria	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	β -galactosidase	<i>S. rectivirgula</i>	55	7.2	145	[10]
	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	β -glucosidase	<i>E. coli</i>	90	7.0	51.8/114.4	[11]
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	α -galactosidase	<i>T. lanuginosus</i>	65	5.0~5.5	93	[12]
Fungus	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	β -mannosidase	<i>T. aurantiacus</i>	76	2.5~3.0	99.9	[13]
	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	β -galactosidase	<i>S. elviae</i>	85	4.5~5.0	86/170	[4]

已被克隆出来,并在大肠杆菌或酵母中进行异源表达。微生物以其丰富的多样性、较高的活力成为糖苷酶最主要的来源。表 1 列出了部分近年来克隆表达出的嗜热糖苷酶基因。到目前为止,嗜热糖苷酶克隆基因与表达的研究主要集中于嗜热古细菌,然而,来源于嗜热真菌的糖苷酶也屡见报道,在细菌方面,主要来源于芽胞杆菌。

因 β -葡萄糖苷酶和 β -半乳糖苷酶在工业生产中的应用价值较高,多数研究集中在对这两类酶的筛选上。古细菌生长条件极端,如高温、厌氧等,这在实验室条件下很难达到,因此,古细菌来源的糖苷酶多数以大肠杆菌进行异源表达。而对于嗜热真菌来说,培养温度常在 30~55°C 左右,且不需要厌氧条件,在实验室条件下易于培养,因此,很多研究者常用真菌自身来进行糖苷酶的表达,但与大肠杆菌相比,培养时间较长^[4]。从最适反应 pH 值上来看,除嗜酸和嗜碱等微生物来源的酶除外,多数糖苷酶的最适反应 pH 值为 5.0~8.0。酶的热稳定性是酶催化反应要考虑的一个重要因素。嗜热古细菌由于自身生长温度比较高,所产糖苷酶的稳定性和整体要比细菌和真菌所产的糖苷酶的稳定性好。目前,热稳定性最好的糖苷酶是来自于 *Pyrococcus furiosus* 的 β -葡萄糖苷酶,在 100°C 和 110°C 的半衰期分别为 85 h 和 13 h^[5]。

2 嗜热糖苷酶在酶法合成糖化合物中的应用

酶法合成糖化合物的研究日趋成熟,到目前为止,利用糖苷酶合成糖苷化合物的种类也非常丰富,如寡糖、脂肪醇和芳香醇的糖基化,也有酚类,生物碱及多肽的糖基化等^[14]。随着一些新型嗜热糖苷酶出现,嗜热糖苷酶在酶法合成糖苷化合物方面的应用也逐渐增多。

2.1 功能性低聚糖的合成

功能性低聚糖是一种益生元,它们不能被人体内的酶所分解,从而可被肠道内的乳酸菌和双歧杆菌所利用,促进肠道健康,现已广泛用于日本和西方等发达国家的食品当中,如低聚半乳糖、低聚果糖和乳果糖等。低聚糖的合成一般用糖苷酶的转糖苷活力进行合成,以二糖为糖基供体,单糖或寡糖为糖基受体。与常温酶相比,使用嗜热酶催化合成低聚糖不但可以增加反应底物的溶解度,而且可以防止反应过程中微

表 2 嗜热糖苷酶合成功能性低聚糖现状

Table 2 Synthesis of oligosaccharides by thermostable glycosidase

菌种 Strain	酶 Enzyme	产物 Product	底物 Substrate (W/V)	反应温度 Reaction temperature (°C)	产量 Yield(%)	时间 Time (h)	参考文献 Reference
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	β -galactosidase	Galactooligo-saccharides	20% lactose	60	39	24	[4]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	β -galactosidase	Lactulose	40% lactose 20% fructose	80	12.5	6	[17]
<i>Thermogoga maritima</i>	β -galactosidase	Galactooligo-saccharides	50% lactose	80	18	6	[18]
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	β -galactosidase	Galactooligo-saccharides	60% lactose	80	52.5	56	[15]

2.2 烷基糖苷的合成

烷基糖苷是一种新型非离子表面活性剂,刺激性小,且可生物降解,在医药、食品及化妆品等领域都有较高的应用价值。烷基糖苷常用葡萄糖为原料,所用醇的碳链长度一般为 8~18。由于烷基糖苷的合成要在醇/水双相或单相反应体系中进行,这需要酶耐有机溶剂的稳定性要好,且随着醇链长度的增加,反应体系的粘度上升,使反应进程缓慢,这使得糖苷酶在合成烷基糖苷时用的醇链长度不能过长,多数在 12 以下。Zou 等^[11]用逆水解的方法以 *Dictyoglomus thermophilum* 的 β -葡萄糖苷酶合成辛基-葡萄糖苷,在 50°C 时,反应达到平衡需要 7 d,当反应温度上升到 70°C 时,反应达到平衡所需的时间缩短到 3 d,且反应起始速率明显上升。García-Garibay 等^[19]对比超嗜热 β -糖苷酶和大肠杆菌 β -半乳糖苷酶分别在 90°C 和 37°C 下进行庚基-半乳糖苷的合成,发现乳糖在 37°C 下的溶解性不高,且酶在庚

生物污染。用嗜热糖苷酶合成低聚糖的简要概况如表 2。目前功能性低聚糖合成主要用 β -半乳糖酶,每年在奶酪加工过程中会有大量废弃的乳清,其中含有大量的乳糖,这些废弃的乳清可以成为低聚半乳糖生产的来源,既节约资源,又避免对环境造成危害。低聚糖的产量主要由起始的底物浓度和酶源决定,一般来讲,随着起始底物浓度的增加,产量也随之上升,但底物浓度不一定与产量成直接对应的关系,因为不同来源的糖苷酶合成低聚糖的能力不同。其中 *Sulfolobus solfataricus* 的 β -半乳糖苷酶产低聚半乳糖的产量最高,可达 315 g/L,但需较长的反应时间^[15]。乳糖在水中的溶解度较低,因此较高的反应温度可以提高乳糖在反应体系中的溶解度。Reuter 等^[16]用不同来源的 β -半乳糖苷酶进行低聚半乳糖的合成,证明 *S. solfataricus* 来源的酶的产量明显高于其他来源的酶。

醇/水单相体系中的稳定性差,当用超嗜热糖苷酶进行反应时,反应初速率比原来高出 3.4 倍,乳糖溶解度提高。反应还发现乳糖水解后的葡萄糖和半乳糖可直接与庚醇进行逆水解反应。Turner 等^[20]用 *Thermotoga neapolitana* β -葡萄糖苷酶进行己基和辛基-葡萄糖苷的合成,合成与水解的比率高达 5.1,在烷基糖苷合成方面有很广的应用前景。目前,嗜热糖苷酶在烷基糖苷合成方面的研究还处于初级阶段,用于烷基糖苷合成的嗜热糖苷酶比较少,或醇链长度在 8 以下。

2.3 L-抗坏血酸的糖基化

L-抗坏血酸是一种重要的化学品,在食品和膳食补充剂中具有广泛的应用。然而,L-抗坏血酸非常易于降解,因此限制了其应用范围^[21]。在 L-抗坏血酸的羟基上进行修饰(例如糖基化或磷酸化),能够有效地稳定 L-抗坏血酸。抗坏血酸糖苷可广泛应用于化妆品,食品和保健品领域。Toyoda-one 等^[22]试图通

过化学方法合成抗坏血酸糖苷,但发现程序太复杂,不适合大规模生产。目前,抗坏血酸糖苷的生产方法主要是生物合成法(表3)。通过生物转化生产抗坏血酸糖苷是由日本林原公司生物化学实验室和冈山大学药理学系联合发现的。该反应由具有 α -环糊精和L-抗坏血酸为底物,环麦芽糖糊精葡聚糖转移酶催化,抗坏血酸糖苷的纯度可达到97%^[23]。到目前为止,已经有数种酶可用于抗坏血酸糖苷生产,其中, α -葡糖苷酶和环糊精葡萄糖基转移酶是常用的两种催化剂。

环糊精葡萄糖基转移酶由于具有较高的底物特异性,被认为是大规模生产抗坏血酸糖苷的最佳酶^[24], α -和 β -环糊精通常用作糖基供体。但是,在环

表3 糖苷酶合成抗坏血酸糖苷

Table 3 Synthesis of Glucopyranosyl-L-ascorbic acid by glycosidase

菌种 Strain	酶 Enzyme	底物 Substrate	温度 Temperature(°C)	产量 Yield	时间 Time	参考文献 Reference
<i>Aspergillus niger</i>	α -glucoside	Maltose, L-ascorbic acid	50	—	5 h	[21]
<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	α -cyclodextrin glucano-transferase	300 g/L α -cyclodextrin 250 g/L L-ascorbic acid	50	143 g/L	4 h	[26]
<i>Arthrobacter globiformis</i> A19	α -isomaltosyl glucosaccharide-forming enzyme	5% (W/V) Maltopentaose, 5% (W/V) L-ascorbic acid	50	24.3%	48 h	[27]

2.4 其它糖化化合物的合成

近年来,有些嗜热糖苷酶可用于生物活性糖苷化化合物的合成。如熊果苷,广泛用于化妆品产品当中,是一种酪氨酸酶抑制剂,具有美白的功效^[28]。Seo等^[7]用来自于*Thermoplasma acidophilum*的 α -葡糖苷酶作为催化剂,以麦芽糖为糖苷供体,在80°C条件下合成了两种 α -熊果苷。同样, Park等^[9]以纤维二糖为糖苷供体,用*Thermotoga neapolitana* β -葡萄糖苷酶合成了3种熊果苷。Alcaro等^[29]用来自于*Sulfolobus sulfataricus*的 β -糖苷酶将双二乙氨基芬酮酯进行糖基化,不仅增强了其抗HSV-2活性和干扰素活性,还降低了这类物质对细胞的毒性。

3 提高糖苷酶转糖苷效率的方法

3.1 糖苷酶的定点突变

在过去的十几年中,由于糖苷酶出色的立体选择性,酶催化反应用于构建糖苷键已经被证明是非常有效的合成糖苷化化合物的方法^[30]。催化合成糖苷化化合物的糖苷水解酶的用途往往受到水解和转糖苷反应之间的竞争的限制。

为了克服糖苷酶在转糖基反应中的限制因素,许

糊精葡萄糖基转移酶催化下,有许多抗坏血酸多糖与抗坏血酸糖苷一起产生,因此需要用葡糖淀粉酶做进一步处理。Prousoontorn等^[25]使用氧化铝作为载体的固定化的环糊精葡萄糖基转移酶合成抗坏血酸糖苷,产率为2.92%。Gudimichi等^[26]使用商品化的来源于热厌氧杆菌的环糊精葡萄糖基转移酶转糖基合成抗坏血酸糖苷,产量高达143 g/L,这是目前所有研究中获得的最大产量。应用于合成抗坏血酸糖苷的嗜热糖苷酶(高于60°C)较少,虽然高温会加速L-抗坏血酸的降解,但是由于某些嗜热酶具有较快的转糖苷速率而大大缩短反应时间,并提高产率,因此,嗜热糖苷酶用于合成抗坏血酸糖苷有较好的应用前景。

多研究集中在对酶的活性位点区域进行定点突变,以提高反应速率。通过突变其催化亲核残基为非亲核残基而使酶的水解活性失活。这些酶具有高活性,能够接受活化的糖基供体从而催化对受体分子的转糖基反应^[31]。与天然糖苷酶相比,工程酶在催化合成的速率和产量上都有所提高。第一个糖基化酶在1998年由Mackenzie报道^[32],同天然糖苷酶一样,糖基化酶也有保留和翻转两种机制。另一种类型的糖基化酶是巯基乙醇转移酶工程酶,其中突变的残基是酸/碱羧基,而不是如先前所述的糖基化酶中的亲核残基。在这种情况下,使用良好的离去基团底物(如二硝基苯酚),有利于催化过程的糖基-酶中间体的形成^[33]。

3.2 离子液体在糖苷合成中的应用

离子液体在近年来作为用于化学和生物催化有机合成的一类新的“绿色”溶剂而受到很多关注^[34]。离子液体是一类在环境温度下为液态的盐,通常是极性和非挥发性的。与许多其他不具有环境友好性和危险性的有机溶剂不同,离子液体具有可忽略不计的蒸气压并且不易燃的优点。大多数研究使用与水混溶或不混溶的1,3-二烷基咪唑盐,例如

[MMIm]、[MeSO₄]、[BMI]和[PF₆]等。从常规溶剂转换为离子液体能够增加底物溶解度,使催化剂能在活性、稳定性和选择性方面得到显著改善,还可以提高催化剂可再循环性和产物回收率。目前,离子液体应用于酶催化已经取得了一些成果^[34]。然而使用糖苷酶在离子液体中合成糖苷化合物的研究很少,抑制水解的能力和与极性反应物的相溶性使得离子液体可以成为糖基化过程中非常理想的溶剂^[35]。Ferdjani等^[36]比较了不同糖苷酶在离子液体中的稳定性后得出结论,高度热稳定性的糖苷酶适合选用水溶性离子液体作为绿色溶剂用于生物催化反应。

为了抑制糖苷酶的水解反应活力,可以通过使用有机溶剂或使用冷冻缓冲液的方法降低水活度。然而,大多数与水不混溶的溶剂不能溶解糖类,而水混溶性溶剂如DMSO和DMF虽然溶解糖类,但当浓度高于20%时会使糖苷酶失活。与普通溶剂相比,离子液体具有广泛可调的性质,如疏水性、极性和与其他溶剂的混溶性,使其可以应用于各种化学反应,包括糖基化反应。Forsyth等^[37]研究发现阳离子尾基在溶解乳糖中发挥重要作用。Liu等^[38]的研究表明,含有二烷基咪唑鎓阳离子和二氰胺阴离子的离子液体是糖类的良好溶剂。Yang等^[39]使用来自于*Thermotoga naphthophila*的嗜热 β -半乳糖苷酶在仅有2.5%离子液体Ammoeng 102作为共溶剂的条件下催化合成不同碳链长度(C₄-C₁₄)的烷基半乳糖苷,产量最高可提高2.37倍,研究发现离子液体Ammoeng 102不仅可以抑制 β -半乳糖苷酶的水解活力,还能在高温下(95℃)对酶起到保护作用。离子液体还可以通过改变反应体系的极性增加糖类的溶解度,因此为合理设计糖基化反应体系提供了多种新的机会。

3.3 微波辐射在糖生物学中的应用

微波辐射以环保,减少浪费和缩短反应时间的优势现已被广泛应用于合成化学反应。在生物催化中,微波辐射主要用于增强酶的活性和选择性^[40]。微波辐射可以引起有些酶的酶活性的下降甚至完全丧失,因此,相较于中低温酶,嗜热酶由于具有较好的稳定性而更适用于微波辐射反应,中温酶可以通过酶固定化或使用离子液体从而克服酶在微波加热下稳定性差的问题。

Yang等^[41]在微波辐射控温75℃条件下使用嗜热 β -半乳糖苷酶转糖苷作用合成烷基糖苷,3.5 h即可达到反应平衡,与传统加热相比,微波辐射法可提高产率11倍。Jaitak等^[42]使用来源于芽孢杆菌的 β -环糊精葡聚糖转移酶糖基化甜菊苷,该酶在微波

下表现出高转糖苷速率,催化合成仅产生两种类型糖基化甜菊苷的产物,仅1 min即可完成反应,两种产物的产率分别是66%和24%。该方法节省了很多时间和能量,从商业角度来看,具有生产不含苦味的改性甜菊糖苷的潜力。

微波辐射相对于传统加热条件,酶催化有机合成的选择性大大提高,反应时间明显缩短,酶催化效果更好,对糖苷化合物的合成具有重要意义。

4 展望

嗜热糖苷酶作为糖苷化合物合成的一类工具酶,将在酶法催化和糖生物学的研究中占有重要地位。随着克隆表达技术的成熟,新酶的筛选不再是难题,相信随着越来越多嗜热菌的发现,新的嗜热糖苷酶品种会越来越丰富。嗜热糖苷酶在低聚糖方面的应用相对于烷基糖苷的合成要成熟很多,现阶段合成烷基糖苷的研究以一元醇居多,二元和三元醇的糖基化研究较少。嗜热糖苷酶在高温,低水活度的有机介质中的稳定性比常温酶要好,而恰恰在这种条件下的有机介质中产率可能会有所提高。在合成烷基糖苷的应用中,嗜热糖苷酶具有巨大潜力。关于合成生物活性物质的嗜热糖苷酶的研究数量不多,相信在不久的将来,寻找这些生物活性物质并建立起高温反应体系是许多研究嗜热糖苷酶学者的另一目标。国内外相关研究证明,嗜热糖苷酶作为一种新型催化剂,有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 王柏婧,冯雁,王师钰,等.嗜热酶的特性及其应用[J].微生物学报,2002,42(2):259-262.
WANG B J, FENG Y, WANG S Y, et al. Characteristics and application of thermophilic enzymes[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 259-262.
- [2] 许建和.生物催化工程[M].上海:华东理工大学出版社,2008:404.
XU J H. Biocatalysis engineering[M]. Shanghai: East China University of Science Technology Press, 2008: 404.
- [3] BLAŽEK J, JANSÁ P, BASZCZYŃSKI O, et al. An enzymatic glycosylation of nucleoside analogues using β -galactosidase from *Escherichia coli* [J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2012, 20(9): 3111-3118.
- [4] ONISHI N, TANAKA T. Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing β -galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(11): 4026-4030.

- [5] KENGEN S W M, LUSINK E J, STAMS A J M, et al. Purification and characterization of an extremely thermostable β -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 213(1):305-312.
- [6] GABELSBERGER J, LIEBL W, SCHLEIFER K H. Cloning and characterization of β -galactoside and β -glucoside hydrolysing enzymes of *Thermotoga maritima* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 109(2/3):131-137.
- [7] SEO S H, CHOI K H, HWANG S, et al. Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum* α -glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 72(3/4):305-312.
- [8] KONG F S, WANG Y Q, CAO S G, et al. Cloning, purification and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RUK-10 [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(5):775-782.
- [9] PARK T H, CHOI K W, PARK C S, et al. Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69(4):411-422.
- [10] NAKAO M, HARADA M, KODAMA Y, et al. Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 40(5):657-663.
- [11] ZOU Z Z, YU H L, LI C X, et al. A new thermostable β -glucosidase mined from *Dictyoglomus thermophilum*: Properties and performance in octyl glucoside synthesis at high temperatures [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 118:425-430.
- [12] REZESSY-SZABÓ J M, NGUYEN Q D, HOSCHKE-Á, et al. A novel thermostable α -galactosidase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* CBS 395. 62/b: Purification and characterization [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2007, 1770(1):55-62.
- [13] GOMES J, TERLER K, KRATZER R, et al. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: Isolation, partial purification and characterization of the enzyme [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4):969-975.
- [14] 郁惠蕾, 许建和, 林国强. 糖苷水解酶在糖苷合成中的应用概况 [J]. *有机化学*, 2006, 26(8):1052-1058.
YU H L, XU J H, LIN G Q. Application of glycosidase to glycoside synthesis [J]. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2006, 26(8):1052-1058.
- [15] PARK H Y, KIM H J, LEE J K, et al. Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2008, 24(8):1553-1558.
- [16] REUTER S, NYGAARD A R, ZIMMERMANN W. β -Galactooligosaccharide synthesis with β -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae*, and *Escherichia coli* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(6):509-516.
- [17] KIM Y S, PARK C S, OH D K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2009, 39(4):903-908.
- [18] JIE S, PARK N H, OH D K. Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21(1):759-764.
- [19] GARCÍA-GARIBAY M, LÓPEZ-MUNGUÍA A, BARZANA E. Alcoholysis and reverse hydrolysis reactions in organic one-phase system with a hyperthermophilic β -glycosidase [J]. *Biothecnology and Bioengineering*, 2000, 69(6):627-632.
- [20] TURNER P, SVENSSON D, ADLERCREUTZ P, et al. A novel variant of *Thermotoga neapolitana* β -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 130(1):67-74.
- [21] YAMAMOTO I, MUTO N, NAGATA E, et al. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1990, 1035(1):44-50.
- [22] TOYODA-ONO Y, MAEDA M, NAKAO M, et al. 2-O-(β -D-Glucopyranosyl) ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from *Lycium* fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(7):2092-2096.
- [23] AGA H, YONEYAMA M, SAKAI S, et al. Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucoamylase from *Bacillus stearothermophilus* [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(7):1751-1756.
- [24] TANAKA M, MUTO N, YAMAMOTO I. Characterization of *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucoamylase in ascorbic acid 2-O- α -glucoside formation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1991, 1078(2):127-132.
- [25] PROUSOONTORN M H, PANTATAN S. Production

- of 2-*O*- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid from ascorbic acid and β -cyclodextrin using immobilized cyclodextrin glycosyltransferase[J]. *J Incl Phenom Macro Chem*, 2007, 57(1/2/3/4):39-46.
- [26] GUDIMINCHI R K, TOWNS A, VARALWAR S, et al. Enhanced synthesis of 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid from α -cyclodextrin by a highly disproportionating CGTase[J]. *ACS Catal*, 2016, 6(3):1606-1615.
- [27] MUKAI K, TSUSAKI K, KUBOTA M, et al. Process for producing 2-*O*- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid: US, EP1553186A1[P]. 2005-07-13.
- [28] LIU C Q, DENG L, ZHANG P, et al. Efficient production of α -arbutin by whole-cell biocatalysis using immobilized hydroquinone as a glucosyl acceptor [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 91: 1-7.
- [29] ALCARO S, ARENA A, DI BELLA R, et al. Biocatalysed synthesis of β -*O*-glucosides from 9-fluorenon-2-carbohydroxyesters. Part 3: IFN-inducing and anti-HSV-2 properties [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(10):3371-3378.
- [30] HANSON S, BEST M, BRYAN M C, et al. Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(12):656-663.
- [31] FAIJES M, PLANAS A. *In vitro* synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases [J]. *Carbohydr Res*, 2007, 342(12/13):1581-1594.
- [32] MACKENZIE L F, WANG Q P, WARREN R A J, et al. Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(22):5583-5584.
- [33] WITCZAK Z J. Thio sugars: Biological relevance as potential new therapeutics[J]. *Curr Med Chem*, 1999, 6(2):165-178.
- [34] KRAGL U, ECKSTEIN M, KAFTZIK N. Enzyme catalysis in ionic liquids[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6):565-571.
- [35] VAN RANTWIJK F, WOUDEBERG-VAN OOSTEROM M, SHELDON R A. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides[J]. *J Mol Catal B Enzym*, 1999, 6(6):511-532.
- [36] FERDJANI S, IONITA M, ROY B, et al. Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(6):1215-1219.
- [37] FORSYTH S A, MACFARLANE D R. 1-Alkyl-3-methylbenzotriazolium salts: Ionic solvents and electrolytes[J]. *J Mater Chem*, 2003, 13(10):2451-2456.
- [38] LIU Q B, JANSSEN M H A, VAN RANTWIJK F, et al. Room-temperature ionic liquids that dissolve carbohydrates in high concentrations[J]. *Green Chem*, 2005, 7(1):39-42.
- [39] YANG J W, PÉREZ B, ANANKANBIL S, et al. Enhanced synthesis of alkyl galactopyranoside by *Thermotoga naphthophila* β -galactosidase catalyzed transglycosylation: Kinetic insight of a functionalized ionic liquid-mediated system[J]. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2017, 5(2):2006-2014.
- [40] YOUNG D D, NICHOLS J, KELLY R M, et al. Microwave activation of enzymatic catalysis[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(31):10048-10049.
- [41] YANG J W, CHEN X C, YU D H, et al. Microwave-assisted synthesis of butyl galactopyranoside catalyzed by β -galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(1):53-58.
- [42] JAITAK V, KAUL V K, BANDNA, et al. Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(9):1415-1420.

(责任编辑:陆雁)