

◆特邀专稿◆

β-木糖苷酶的研究进展*

梁 蒙, 林 宇, 黄日波, 杜丽琴**

(广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

摘要:β-木糖苷酶是木聚糖水解酶系中的重要一员, 可以和木聚糖酶协同水解木聚糖, 被认为是木聚糖水解的关键酶之一。近年来, 研究人员发现除水解木聚糖外, β-木糖苷酶还可以水解含有木糖基的化合物, 如 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇、部分人参皂苷和三七皂苷等, 产生具有生物活性的物质。此外, 部分微生物来源的 β-木糖苷酶还具有转糖苷功能, 可以将供体的木糖基转移到糖类或者醇类的受体上, 形成新的糖苷类化合物。本文对 β-木糖苷酶的酶学性质、结构、催化机制、功能、分子改造等方面的相关研究进行综述, 并对 β-木糖苷酶未来在菌种筛选、底物利用及结构研究方面进行展望, 以期后续 β-木糖苷酶的研究提供参考。

关键词:β-木糖苷酶 木聚糖 酶学性质 转糖苷功能 分子改造

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2022)01-0001-10

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20220421.009

β-木糖苷酶是木聚糖降解的关键酶之一, 在半纤维素底物的转化过程中具有十分重要的作用, 可以广泛应用于食品、饲料、造纸和能源等行业。β-木糖苷酶对 4-硝基苯基-β-D-吡喃木糖苷(4-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*NPX) 具有高度的底物特异性。此外, 研究发现有少数 β-木糖苷酶对 4-硝基苯基-α-L-阿拉伯吡喃糖苷(4-nitrophenyl-α-L-arabinopyranoside, *p*NPA) 或 4-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷(4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *p*NPG) 也具有一定的水解活力^[1]。这些双功能或者多功能的 β-木糖苷酶, 在底物识别以及木质纤维素资源转化方面都

具有十分重要的应用潜力。β-木糖苷酶来源十分广泛, 当前以细菌和真菌类来源的 β-木糖苷酶报道最多。近年来, 研究人员通过基因工程手段克隆和表达许多不同微生物来源的 β-木糖苷酶基因, 并从中发现一些具有转糖苷功能或者水解功能的 β-木糖苷酶。

β-木糖苷酶的转糖苷功能是通过将供体如 *p*NPX 或者木二糖的木糖基转移到单糖、木寡糖和一些短链醇类的受体上, 形成长链木寡糖和烷基木糖等含有木糖基的糖苷类化合物, 这些糖基化的糖苷类化合物具有益生元、抗微生物、表面活性剂等作用, 在食品、医疗和化妆品领域具有潜在的应用价值。而 β-木

收稿日期: 2021-12-30

* 广西科学研究与技术开发计划自治区主席科技基金项目(17290-03)资助。

【作者简介】

梁 蒙(1992-), 男, 在读博士研究生, 主要从事分子酶学研究。

【**通信作者】

杜丽琴(1975-), 女, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: duliqin@gxu.cn。

【引用本文】

梁蒙, 林宇, 黄日波, 等. β-木糖苷酶的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2022, 38(1): 1-10.

LIANG M, LIN Y, HUANG R B, et al. Research Progress of β-xylosidase [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2022, 38(1): 1-10.

糖苷酶的水解功能比较丰富,一方面,它可以和内切木聚糖酶协同水解木聚糖,内切木聚糖酶随机作用于木聚糖内部的糖苷键,产生短链木寡糖,而 β -木糖苷酶随后作用于这些短链木寡糖并产生大量的木糖,木糖被工业化酵母利用后可以产生具有高附加值的木糖醇和乙醇;另一方面, β -木糖苷酶还可以水解含有木糖基的化合物,如7-木糖-10-去乙酰紫杉醇、人参皂苷和三七皂苷等,产生在治疗癌症方面具有重要作用的生物活性物质。基于其功能的多样性, β -木糖苷酶在农业、工业、医药和环保方面已得到广泛应用,但总体还没有达到大规模应用的程度,主要原因在于酶自身性质的不足,如不稳定性、活力低和耐受性差等。因此,可通过分子改造技术定向地改造 β -木糖苷酶,提升其性能,从而满足各行各业的需求。当前,越来越多家族的 β -木糖苷酶晶体结构陆续得到解析,这对于加深人们对 β -木糖苷酶结构方面的了解和后续分子改造研究都具有十分重要的意义。

1 β -木糖苷酶的分类

迄今为止,碳水化合物活性酶(CAZy)数据库已经划分172个糖基水解酶(Glycoside Hydrolases, GH)家族,基于保守型氨基酸序列的相似性,将 β -木糖苷酶划分为GH1、GH2、GH3、GH11、GH30、GH39、GH43、GH51、GH52、GH54、GH116和GH120家族,其中各家族的信息如表1所示。目前大部分报道的细菌和真菌来源的 β -木糖苷酶主要集中在GH3、GH39、GH43和GH52家族,其中,细菌来源的 β -木糖苷酶主要集中在GH39、GH43和GH52家族,而真菌来源的 β -木糖苷酶主要集中在GH3和GH43家族^[2-4],丝状真菌来源的 β -木糖苷酶主要集中在GH3家族。

表1 β -木糖苷酶家族在CAZy数据库中的分类

Table 1 β -xylosidase family classification in CAZy database

家族 Family	宗族 Clan	机制 Mechanism	三维结构 3D structure	亲核试剂 Nucleophile	质子供体 Proton donor
GH1	GH-A	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Glu	Glu
GH2	GH-A	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Glu	Glu
GH3	-	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Asp	Glu
GH11	GH-C	Retaining	β -jelly roll	Glu	Glu
GH30	GH-A	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Glu	Glu

续表

Continued table

家族 Family	宗族 Clan	机制 Mechanism	三维结构 3D structure	亲核试剂 Nucleophile	质子供体 Proton donor
GH39	GH-A	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Glu	Glu
GH43	GH-F	Inverting	5-fold β -propeller	Asp	Glu
GH51	GH-A	Retaining	$(\beta/\alpha)_8$ barrel	Glu	Glu
GH52	GH-O	Retaining	$(\alpha/\alpha)_6$ barrel	Glu	Asp
GH54	-	Retaining	β -jelly roll	-	-
GH116	GH-O	Retaining	$(\alpha/\alpha)_6$ barrel	Glu	Asp
GH120	-	Retaining	Parallel β -helix	Asp	Glu

注:“-”表示未报道

Note:“-” indicates not reported

2 β -木糖苷酶的性质

β -木糖苷酶来源广泛且性质各异, β -木糖苷酶的最适pH值为5.0-7.0,真菌类 β -木糖苷酶的最适pH偏弱酸性(表2)。 β -木糖苷酶的最适反应温度一般在40-60 $^{\circ}\text{C}$,嗜热且热稳定性良好的 β -木糖苷酶也引起研究者的关注。Rizzatti等^[5]从*Aspergillus phoenicis*的发酵液中分离到一种具有热稳定性的 β -木糖苷酶,该酶的最适反应温度为75 $^{\circ}\text{C}$ 。此外,Shi等^[6]从嗜热菌*Thermotoga thermarum*中分离到一种 β -木糖苷酶,该酶的最适反应温度为95 $^{\circ}\text{C}$,并且在85 $^{\circ}\text{C}$ 以下都具有较好的热稳定性。 β -木糖苷酶的热稳定性在酶的储存和工业化处理方面具有明显的优势。底物特异性方面, β -木糖苷酶对pNPX具有高度的底物特异性,同时对pNPA也具有一定的催化活性。木糖耐受性是影响 β -木糖苷酶商业化应用的一个重要因素,GH3家族中 β -木糖苷酶的木糖耐受性偏低,其 K_i 值为2-20 mmol/L,而GH39和GH43家族中的 β -木糖苷酶具有较高的木糖耐受性,其 K_i 值为40-200 mmol/L,这些高耐受性木糖的 β -木糖苷酶可以更好地水解木寡糖,有利于 β -木糖苷酶和木聚糖酶发挥出更好的协同作用。

3 β -木糖苷酶的蛋白结构

目前, β -木糖苷酶的酶学性质已得到大量表征,但是关于 β -木糖苷酶结构方面的研究仍比较欠缺,只有来源于GH39、GH43、GH52和GH120家族的 β -木糖苷酶的晶体结构得到解析,其结构如图1所示,对应蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB)

表 2 不同来源的 β -木糖苷酶的性质Table 2 Properties of β -xylosidase from different sources

菌株 Strain	家族 Family	分子量 (kDa) Molecular mass (kDa)	最适温 度(°C) Optimum tempera- ture (°C)	最适 pH 值 Optimum pH value	热稳定性 Thermo- stability	底物特异性 Substrate specificity	K_i 值 (mmol/L) K_i value (mmol/L)	参考 文献 Reference
<i>Geobacillus</i> sp. WSUCF1	GH39	58	70	6.5	70°C, 1 d	p NPX	210	[7]
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	GH39	-	47	6.5	45°C, 10 min	p NPX, p NPA	200	[8]
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> TSAA1	GH52	63	60	7.0	70°C, 3 h	p NPX	-	[9]
<i>Thermobifida fusca</i> TM51	GH43	61.6	50	6.0	70°C, 7.4 min	p NPX	-	[10]
Rumen metagenome	GH43	42	40	6.5-7.5	45°C, 10 min	p NPX, p NPA	76	[11]
<i>Thermobifida halotolerans</i> YIM90462T	GH43	61.5	55	4.0-7.0	60°C, 6 h	p NPX, p NPA	43.8	[12]
<i>Massilia</i> sp. RBM26	GH43	66	50	6.5	50°C, 1 h	p NPX, p NPA	500	[13]
<i>Humicola grisea</i>	GH43	37	50	7.0	50°C, 12 h	p NPX, p NPA	603	[14]
<i>Aspergillus niger</i> ADH-11	GH3	120.48	65	4.0	75°C, 1 h	p NPX, p NPG	12	[15]
<i>Humicola insolens</i> Y1	GH3	85	60	6.0	60°C, 1 h	p NPX, p NPA	29	[16]
<i>Aspergillus nidulans</i>	GH3	180	50	5.0	50°C, 4 h	p NPX	25	[17]
<i>Neurospora crassa</i>	GH3	81.8	50	5.0	-	p NPX	1.72	[18]

注:“-”表示未报道

Note:“-” indicates not reported

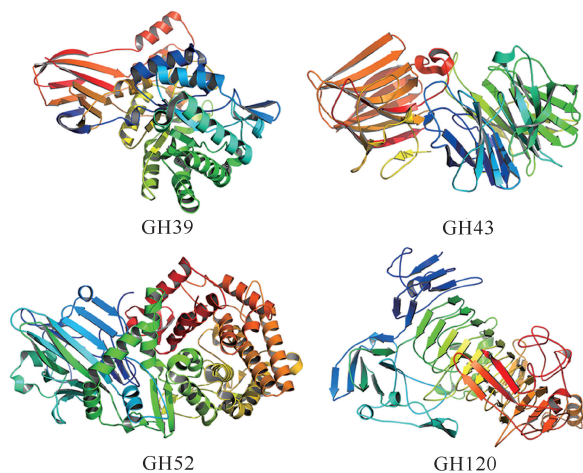
图 1 不同家族来源的 β -木糖苷酶的蛋白质晶体结构

Fig. 1 Crystal structure of β -xylosidase from different GH family

中的编号分别为 4EKJ、5Z5H、4C1P 和 3VSV, 不同 GH 家族的 β -木糖苷酶在结构上存在一定的差异性。

GH39 家族被归类为 GH-A 宗族, 该宗族中的酶都有一个 $(\beta/\alpha)_8$ 桶装结构域, 并且由两个保守的羧酸残基分别作为亲核试剂和质子供体。由于这两个残基分别位于第 4 个和第 7 个 β -折叠上, 因此也被称作“4/7 超家族”^[19]。来源于 GH39 家族的 β -木糖苷酶蛋白质的四级结构具有多样性, 含有单聚体、三聚体、四聚体和八聚体等多种类型的聚合体。GH43 属

于 GH-F 宗族, 该家族中 β -木糖苷酶都有一个由 5 片桨叶组成的 β -螺旋桨核心结构域^[20]。此外, 在该家族已经报道的 β -木糖苷酶中, 还具有一个 α/β 三明治结构域^[21], 两个结构域在底物催化上共同发挥作用。GH43 家族中的 β -木糖苷酶的四级结构种类丰富, 主要包含单聚体、二聚体和四聚体 3 种类型。与 GH39 和 GH43 家族相比, 关于 GH52 和 GH120 家族的 β -木糖苷酶的晶体结构报道相对较少。GH52 家族中 β -木糖苷酶的第一种晶体结构 (PDB: 4C1P) 在 2014 年被 Espina 等^[22] 所报道, 它的三级结构是由 N 端折叠形成的 β -三明治结构域和 C 端的 $(\alpha/\alpha)_6$ 桶状结构域所组成, 其四级结构是一种单聚体。此外, GH52 家族中还有一种来源于 *Bacillus* sp. 的 β -木糖苷酶的结构被报道^[23]。而 GH120 家族中仅有来源于 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL - YS485 的 β -木糖苷酶的晶体结构 (PDB: 3VSV) 被报道^[24]。

4 β -木糖苷酶的催化机制

随着对 β -木糖苷酶的深入研究, 其催化作用机制也相对明确。 β -木糖苷酶催化反应的实质是亲核试剂和质子供体参与的酸碱催化反应。迄今为止, β -木糖苷酶的作用机制分为保留型和反转型两种类型。反转型的 β -木糖苷酶通过一步单取代机制使产物的

异头碳构象完全反转,由原来的 β 型转变为 α 型。而保留型的 β -木糖苷酶通过糖基化和去糖基化两步双取代机制参与催化,产物的异头碳构象不发生变化。目前已发现的 β -木糖苷酶,只有GH43家族的 β -木糖苷酶属于反转型机制,而分布相对集中的GH3、GH39、GH52家族的 β -木糖苷酶均属于保留型。研究人员发现,保留型的 β -木糖苷酶可以催化水解和转糖苷两种反应的进行,而反转型的 β -木糖苷酶在催化水解反应上更具有优势^[25]。 β -木糖苷酶催化的水解反应和转糖苷反应,其区别在于去糖基化过程中进入活性中心的是水分子还是底物分子,如果进入活性中心的是水分子则发生的是水解反应,反之则是转糖苷反应。因此,水解反应和转糖苷反应是两个可逆的过程^[26]。

5 β -木糖苷酶的功能研究

5.1 β -木糖苷酶转糖苷功能的研究

β -木糖苷酶可以催化糖苷键的合成,在供体和受体的参与下,可以产生在食品、医药、化工等领域具有应用潜力的糖苷化合物。木二糖、木寡糖和

NPX是最常见的供体,而受体主要为糖类和醇类化合物,供体和受体的变化都会对转糖苷反应产生显著的影响。

目前,关于 β -木糖苷酶转糖苷反应的报道中,常见的糖类受体主要是一些单糖(如木糖、葡萄糖、甘露糖和阿拉伯糖等)和木寡糖(木二糖和木三糖)。二糖类受体(蔗糖和麦芽糖)的报道较少且转糖苷效率普遍低下。Kurakake等^[27]发现 β -木糖苷酶Xaw1以木二糖作为供体和受体,经过转糖苷反应后能产生木三糖、木四糖和木五糖,且受体浓度对水解效率和转糖苷效率具有显著的影响,当受体浓度较低时水解效率较高,随着受体浓度的增加,水解效率下降而转糖苷效率逐渐升高。此外,在 β -木糖苷酶的转糖苷反应中,醇类也是常见的受体,通过将

NPX或者木二糖中的木糖残基转移到醇类受体上,可以生成一些烷基糖苷类化合物,这些糖基化的糖苷化合物具有良好的抗微生物和表面活性剂作用^[28]。醇类碳链的长度会影响 β -木糖苷酶对醇类的转糖苷效率,随着醇类碳链长度的增加,转糖苷的效率会呈明显下降的趋势,这可能与小分子醇类更容易进入酶的活性中心有关。Muzard等^[29]发现, β -木糖苷酶XylBH39以木三糖和木寡糖稀释液为供体,以不同长度碳链(C1-C8)的醇类为受体的转糖苷反应中,碳链长度在C1-C5内

的醇类适合为受体,而碳链长度超过C5的醇类不适合为受体,并且还推断对短链醇的偏好性可能与酶活性中心存在疏水性氨基酸有关。 β -木糖苷酶的转糖苷反应中,除糖类和醇类外,部分酚类化合物^[30]和烷基糖苷类化合物^[31,32]也可作为受体。此外,Boer等^[33]发现, β -木糖苷酶rhGBA以4-甲基伞形酮- β -D-木糖苷为供体,分别以荧光和中性的胆固醇为受体,都有转糖苷产物的产生。

5.2 β -木糖苷酶水解功能的研究

除催化糖苷键的合成外, β -木糖苷酶还可以催化糖苷键的水解。自然界中许多化合物都含有 β -木糖苷键,利用 β -木糖苷酶的水解功能对糖苷化合物进行转化,可以获得具有更高生物活性或高附加值的物质。目前,已报道的含有 β -木糖苷键的化合物主要有木聚糖、7-木糖-10-去乙酰紫杉醇、部分人参皂苷和三七皂苷等。

木聚糖主要分为硬木木聚糖和软木木聚糖,其骨架是由多个木糖基通过 β -1,4糖苷键相连而成,侧链含有乙酰基、阿拉伯糖基、葡萄糖醛酸等多个取代基团^[34,35]。由于结构复杂,其完全被水解需要包括木聚糖酶和 β -木糖苷酶在内的多种木聚糖水解酶的参与。其中,木聚糖酶随机作用于木聚糖内部的糖苷键,产生短链的木寡糖,而 β -木糖苷酶随后作用于这些木寡糖的非还原性末端释放出大量的木糖。 β -木糖苷酶对木寡糖的水解减弱了木寡糖本身对木聚糖酶的反馈抑制作用,有利于木聚糖酶对木聚糖的彻底水解。目前对木聚糖水解的研究主要分为两个方面,一方面是通过木聚糖酶的单独水解作用,从而获得一些具有益生元作用的木寡糖^[36-39];另一方面是通过木聚糖酶、 β -木糖苷酶以及阿拉伯呋喃糖苷酶等多种木聚糖水解酶的协同水解作用,产生木糖和阿拉伯糖^[40-43]。此外,随着研究的深入,目前也有较多关于 β -木糖苷酶可以单独水解木聚糖的报道^[44-46],并且水解木聚糖的类型也比较丰富。Herrmann等^[47]发现一个来源于*Trichoderma reesei* RUT C-30的 β -木糖苷酶,该酶除了可以水解聚合度为2-7的木寡糖外,还可以水解山毛榉木聚糖和4-O-甲基-葡萄糖醛酸木聚糖。Michelin等^[48]从*Aspergillus ochraceus*中得到一个胞外的 β -木糖苷酶,该酶可以单独水解桦木木聚糖、落叶松木聚糖、燕麦木聚糖和桉树木聚糖。Zanphorlin等^[49]发现,将一个假定的 β -木糖苷酶的247位氨基酸Lys突变为Ser后,该酶同时具有 β -木糖苷酶和木聚糖酶的活性。但这些报道的 β -木糖苷

酶水解木聚糖的活力比较微弱,而且尚未有结构相关的文献来解释其机理,有待学者们进一步研究。

β -木糖苷酶在水解 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇方面作用显著,通过移除其 C7 位的木糖基团可以生成具有高药用价值的紫杉醇的药物中间体 10-去乙酰紫杉醇,后者可以进一步酰化得到紫杉醇。紫杉醇主要从天然红豆杉中提取,但在红豆杉中的含量极低,而其衍生物 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的含量却是紫杉醇的 50 倍左右。因此, β -木糖苷酶对于 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的水解作用在生物酶法合成紫杉醇的过程中占有十分重要的地位。目前已有多篇关于 β -木糖苷酶水解底物 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的报道,当底物浓度在 1 g/L 时,中间产物 10-去乙酰紫杉醇的转化率为 92% - 98%^[50-52]。Cheng 等^[53]发现, β -木糖苷酶 LXYL-P1-2 在 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇的底物浓度为 0.625 g/L 时转化率能达到 100%,当底物浓度提高到 10 g/L 时,转化率也能达到 85.6%。

β -木糖苷酶在水解人参皂苷方面也具有十分重要的作用,通过移除人参皂苷中含有的木糖基团,可以将其转化成具有药用价值的稀有人参皂苷。目前已报道的含有木糖基团的人参皂苷主要包括两种类型,一种是原人参二醇(PPD)类型的人参皂苷 Ra1、Ra2、Ra3、Rb3,另一种是原人参三醇(PPT)类型的三七皂苷 R1 和 R2。Shin 等^[54]发现,来源于 *Bifidobacterium breve* K-110 的 β -木糖苷酶可以水解人参皂苷 Ra1 和 Ra2 含有的木糖基团,将其分别转化为人参皂苷 Rb2 和 Rc。而 Zhang 等^[55]利用来源于 *Thermotoga petrophila* DSM 13995 的 β -木糖苷酶 Tpexyl3 和一个热稳定的 β -葡萄糖苷酶 Tpebg3 将人参皂苷 Rb2 和 Rc 转化为人参皂苷 20(S)-Rg3,这种稀有皂苷对肺癌、结肠癌、卵巢癌等多种癌症的癌细胞具有抑制和抗转移作用。此外,三七皂苷 R1 和 R2 分别含有一个木糖基,以 β -1,2-糖苷键与葡萄糖基相连,通过 β -木糖苷酶的水解作用可以将其分别转化为人参皂苷 Rg₁ 和 Rh₁,这两种皂苷都具有抗炎、抗氧化和预防癌症的作用^[56,57]。目前已有超过 180 种人参皂苷被鉴定出来,不同种类的人参皂苷含有糖苷键的种类、数量和位置都有所不同,常见的糖苷键主要由 β -木糖苷键、 β -葡萄糖苷键、 α -阿拉伯呋喃糖苷键等组成,因此 β -木糖苷酶对人参皂苷的水解,也需要包括 β -葡萄糖苷酶和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶等在内的多种酶的参与和协同。

6 β -木糖苷酶的分子改造

β -木糖苷酶在自然界中的存在十分广泛,常见于细菌和真菌类微生物。目前报道的多数细菌和真菌类的 β -木糖苷酶都来源于温和的环境,不能满足农业和工业催化过程中所需要的多种条件。酶的分子改造主要是通过定向进化、理性设计和半理性设计的手段来实现,改造后的酶分子性能通常得到极大的改善。因此,通过对其定向地进行分子改造,从而获得在酶活力、木糖耐受性和稳定性方面更具优势且满足工艺需求的 β -木糖苷酶已成为一种常规的手段。

酶活力是 β -木糖苷酶理化性质中的一个重要参数,与底物的催化效率密切相关。酶活力的提高可以极大地减少酶量的使用和反应所需的时间,这对于节约工业生产中所需要的成本具有十分重要的意义。因此,通过分子改造对 β -木糖苷酶进行突变,从而提高其酶活力是当前研究的热点之一。李琦等^[58]从嗜热菌 *Dictyoglomus thermophilum* 中克隆并异源表达了 β -木糖苷酶 Xln-DT,通过定点突变在 202 位氨基酸处引入苯丙氨酸 PHE 和亮氨酸 LEU,获得突变体 Xln-DT-202PHE 和突变体 Xln-DT-202LEU,其酶活力比原来分别提高 3.28 倍和 2.97 倍。Hartanti 等^[59]将来源于 *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 的 β -木糖苷酶 GbtXyl43A 的 121 位 Asp 分别突变成 Val、Asn 和 Glu,结果发现 Asp121 突变为 Val121 和 Asn121 后,这两个突变体的最适 pH 值比原来提高 3.0 个单位,并且在 40℃ 时,所有突变体的酶活力都得到极大的提高。

热稳定性是 β -木糖苷酶理化性质中的另一个重要参数,对于酶的贮存和工业化的应用都具有十分重要的意义。传统筛选方法得到的 β -木糖苷酶热稳定性相对较差,不能满足工业生产的需求。近年来,研究人员发现对 β -木糖苷酶中某些重要的氨基酸进行突变改造后,其原有的热稳定性得到极大的改善。Dehnavi 等^[60]对 β -木糖苷酶 SXA 进行定点突变获得两个突变体 C101V 和 C286V,结果发现这两个突变体在 55℃ 和 60℃ 时的热稳定性显著增加。Singh 等^[61]利用 DNA 改组技术对 β -木糖苷酶 XylBH43 进行突变,得到热稳定性明显改善的突变体 R45K、M69P、L186Y 和 L186K,尤其以突变体 L186K 的热稳定性改善最明显,其 $K_{1/2}^{0.5}$ 值增加 8.1。

此外,对 β -木糖苷酶进行分子改造在揭示水解及转糖苷过程中参与催化的关键氨基酸方面具有十分

重要的作用。Huang 等^[62]将来源于 *Geobacillus stearothermophilus* 的 β -木糖苷酶 GSxyn 的 509 位酪氨酸突变为谷氨酸后, β -木糖苷酶 GSxyn 同时具有 β -木糖苷酶和外切木聚糖酶的活性。Ochs 等^[63]对 β -木糖苷酶 BhXyl39 参与以 *p*NPX 为供体、辛醇为受体的转糖苷反应中的关键氨基酸进行研究, 通过定点突变将 F166、F167 和 Y284 分别突变为(A166 和 S166)(A167 和 S167)(A284 和 S284), 结果发现 Y284 在识别和结合 *p*NPX 的过程中具有重要的作用, F166 突变为 A166 后减小了辛醇进入受体结合位点中的空间位阻, 进而促进了突变体 A166 对辛醇转糖苷反应的进行。

酶分子在生物进化过程中远未达到完美的程度, 通过分子改造技术, 使 β -木糖苷酶原有的性能得到显著的改善, 获得大量具有优异性能的 β -木糖苷酶, 极大地丰富了农业和工业化用酶的选择。

7 展望

近年来, 随着对木聚糖水解酶系的深入研究, 关于 β -木糖苷酶的筛选及其转化半纤维素类木聚糖的研究也取得较大的进展。当前, 对于 β -木糖苷酶的研究主要集中在 β -木糖苷酶的筛选、分子克隆与表达、酶学性质表征以及协同木聚糖酶转化利用半纤维素类木聚糖等方面。酶活力、热稳定性和木糖耐受性是影响 β -木糖苷酶工业化应用的重要因素, 而目前报道的细菌和真菌来源的 β -木糖苷酶在这些方面各有优劣, 极大地限制了 β -木糖苷酶的进一步开发和利用。此外, 当前并没有高通量筛选 β -木糖苷酶的有效方法, 因此筛选一些酶活力高、木糖耐受性和热稳定性好的 β -木糖苷酶仍是一个长期且艰巨的任务。

β -木糖苷酶是木聚糖水解的关键酶之一, 对于木聚糖水解, 当前的研究主要集中在 β -木糖苷酶和木聚糖酶两者协同作用的方面, 而关于它们和 α -阿拉伯呋喃糖苷酶以及阿魏酸酯酶之间协同作用的研究还很欠缺。目前已发现一些具有 α -阿拉伯呋喃糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活力的双功能或者多功能的 β -木糖苷酶, 打破了 β -木糖苷酶对底物高度特异性的传统认知, 但其作用机制还有待进一步研究。此外, β -木糖苷酶在生物活性物质转化方面的研究也很欠缺, 当前报道的可以被 β -木糖苷酶转化成具有生物活性物质的底物相对较少, 主要包括 7-木糖-10-去乙酰紫杉醇、部分人参皂苷和三七皂苷类化合物, 后续可以利用一些化学数据库如 ZINC (<https://zinc.docking.org/>) 和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 去筛选含有木糖基的化合物, 进而将其转化成具有生物活性或者高附加值的物质。

目前已有较多关于 β -木糖苷酶理化性质和功能研究方面的报道, 但是关于其蛋白质结构方面的研究仍较少, 只有部分 GH39、GH43、GH52 和 GH120 家族的 β -木糖苷酶蛋白质晶体结构得到解析, 而对于 β -木糖苷酶分布比较集中的 GH3 家族, 目前还没有关于该家族蛋白质结构方面的报道。因此, 后续可以加大对 β -木糖苷酶蛋白质结构方面的研究, 通过基因工程和蛋白质工程技术对 β -木糖苷酶蛋白质结构进行定向改造, 进而获得一些具有优良性能或者工业应用潜力的 β -木糖苷酶。

参考文献

- [1] ZHOU J, BAO L, CHANG L, et al. Beta-xylosidase activity of a GH3 glucosidase/xylosidase from *yak rumen* metagenome promotes the enzymatic degradation of hemicellulosic xylans [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 54(2): 79-87.
- [2] SMAALI I, REMOND C, ODONOHUE M J, et al. Expression in *Escherichia coli* and characterization of β -xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(3): 582-590.
- [3] FAÚNDEZ C, PÉREZ R, RAVANAL M C, et al. *Penicillium purpurogenum* produces a novel, acidic, GH3 beta-xylosidase: Heterologous expression and characterization of the enzyme [J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 482: 107738. DOI: 10.1016/j.carres.2019.06.017.
- [4] TONG X Y, QI Z P, ZHENG D Y, et al. High-level expression of a novel multifunctional GH3 family β -xylosidase/ α -arabinosidase/ β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum* in *Escherichia coli* [J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 111: 104906. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104906.
- [5] RIZZATTI A C S, JORGE J A, TERENCEZ H F, et al. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis* [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 26(3): 156-160.
- [6] SHI H, LI X, GU H X, et al. Biochemical properties of a novel thermostable and highly xylose-tolerant β -xylosidase/ α -arabinosidase from *Thermotoga thermarum* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 27. DOI: 10.1186/1754-6834-6-27.

- [7] BHALLA A, BISCHOFF K M, SANI R K. Highly thermostable GH39 β -xylosidase from a *Geobacillus* sp. strain WSUCF1 [J]. BMC Biotechnology, 2014, 14:963. DOI: 10.1186/s12896-014-0106-8.
- [8] WAGSCHAL K, FRANQUI-ESPIET D, LEE C C, et al. Cloning, expression and characterization of a glycoside hydrolase family 39 xylosidase from *Bacillus halodurans* C-125 [J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2008, 146(1/3):69-78.
- [9] ANAND A, KUMAR V, SATYANARAYANA T. Characteristics of thermostable endoxylanase and β -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues [J]. Extremophiles, 2013, 17(8):357-366.
- [10] FEKETE C A, KISS L. Purification and characterization of a recombinant β -D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51 [J]. Protein Journal, 2012, 31(8):641-650.
- [11] ZHOU J G, BAO L, CHANG L, et al. Biochemical and kinetic characterization of GH43 β -D-xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase and GH30 α -L-arabinofuranosidase/ β -D-xylosidase from *rumen metagenome* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39(1):143-152.
- [12] YIN Y R, XIAN W D, HAN M X, et al. Expression and characterisation of a pH and salt tolerant, thermostable and xylose tolerant recombinant GH43 β -xylosidase from *Thermobifida halotolerans* YIM90462T for promoting hemicellulose degradation [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2019, 112(3):339-350.
- [13] XU B, DAI L M, ZHANG W H, et al. Characterization of a novel salt-, xylose- and alkali-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -L-arabinofuranosidase from the gut bacterial genome [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019, 128(4):429-437.
- [14] CINTRA L C, FERNANDES A G, DE OLIVEIRA I C M, et al. Characterization of a recombinant xylose tolerant β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105(Pt1):262-271.
- [15] PATEL H, KUMAR A K, SHAH A. Purification and characterization of novel bi-functional GH3 family β -xylosidase/ β -glucosidase from *Aspergillus niger* ADH-11 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109:1260-1269.
- [16] XIA W, SHI P J, XU X X, et al. High level expression of a novel family 3 neutral β -xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose [J]. Plos One, 2015, 10(2):e0117578. DOI: 10.1371/journal.pone.0117578.
- [17] KUMAR S, RAMÓN D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1996, 235(2/3):287-293.
- [18] KIRIKYALI N, CONNERTON I F. Heterologous expression and kinetic characterisation of *Neurospora crassa* β -xylosidase in *Pichia pastoris* [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2014, 57:63-68.
- [19] JENKINS J, LEGGIO L L, HARRIS G, et al. β -glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold β/α architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven [J]. FEBS Letters, 1995, 362(3):281-285.
- [20] ROHMAN A, DIJKSTRA B W, PUSPANINGSIH N N T. β -xylosidases: Structural diversity, catalytic mechanism, and inhibition by monosaccharides [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22):5524. DOI:10.3390/ijms20225524.
- [21] ONTAÑÓN O M, GHIO S, DE VILLEGAS R M D, et al. EcXyl43 β -xylosidase: Molecular modeling, activity on natural and artificial substrates, and synergism with xylanases for lignocellulose deconstruction [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2018, 102(16):6959-6971.
- [22] ESPINA G, ELEY K, POMPIDOR G, et al. A novel β -xylosidase structure from *Geobacillus thermoglucosidasius*: The first crystal structure of a glycoside hydrolase family GH52 enzyme reveals unpredicted similarity to other glycoside hydrolase folds [J]. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2014, 70(Pt5):1366-1374.
- [23] TERAMOTO K, TSUTSUI S, SATO T, et al. Substrate specificities of GH8, GH39, and GH52 β -xylosidases from *Bacillus halodurans* C-125 toward substituted xylooligosaccharides [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(4):1042-1055.
- [24] LIU W T, SUN Y, KO T P, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel GH120 β -xylosidase (XylC) from *Thermoanaerobact*

- erium saccharolyticum* JW/SL-YS485 [J]. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2012, 68(F68): 914-916.
- [25] BOSETTO A, JUSTO P I, ZANARDI B, et al. Research progress concerning fungal and bacterial β -xylosidases [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(4): 766-795.
- [26] 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.
- [27] KURAKAKE M, FUJII T, YATA M, et al. Characteristics of transxylosylation by β -xylosidase from *Aspergillus awamori* K4 [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2005, 1726(3): 272-279.
- [28] 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.
- [29] MUZARD M, AUBRY N, PLANTIER-ROYON R, et al. Evaluation of the transglycosylation activities of a GH39 β -D-xylosidase for the synthesis of xylose-based glycosides [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 58(1/4): 1-5.
- [30] NIETO-DOMÍNGUEZ M, DE EUGENIO L I, PEÑALVER P, et al. Enzymatic synthesis of a novel neuroprotective hydroxytyrosyl glycoside [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017, 65(48): 10526-10533.
- [31] KURAKAKE M, ITO Y, KOMAKI T. Synthesis of sugar fatty acid esters using a β -xylosidase from *Aspergillus awamori* for transxylosylation [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(12): 2453-2456.
- [32] ARMAND S, VIEILLE C, GEY C, et al. Stereochemical course and reaction products of the action of β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* strain B6A-RI [J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 236(2): 706-713.
- [33] BOER D E, MIRZAIAN M, FEERRAZ M J, et al. Human glucocerebrosidase mediates formation of xylosyl-cholesterol by β -xylosidase and transxylosidase reactions [J]. Journal of Lipid Research, 2021, 62(12): 100018. DOI: 10.1194/jlr.RA120001043.
- [34] TELEMAN A, TENKANEN M, JACOBS A, et al. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono) xylan isolated from birch and beech [J]. Carbohydrate Research, 2002, 337(4): 373-377.
- [35] HETTRICH K, FISCHER S, SCHRÖDER N, et al. Derivatization and characterization of xylan from oat spelts [J]. Macromolecular Symposia, 2005, 232(1): 37-48.
- [36] CHRISTAKOPOULOS P, KATAPODIS P, KALOGERIS E, et al. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxy-lanases [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 31(4/5): 171-175.
- [37] CHAPLA D, PANDIT P, SHAH A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics [J]. Bioresource Technology, 2012, 115: 215-221.
- [38] AI Z L, JIANG Z Q, LI L T, et al. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(8): 2707-2714.
- [39] LINARES-PASTÉN J A, ARONSSON A, KARLSSON E N. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass [J]. Current Protein and Peptide Science, 2018, 19(1): 48-67.
- [40] YANG X Z, SHI P J, HUANG H Q, et al. Two xylose-tolerant GH43 bifunctional β -xylosidase/ α -arabinosidases and one GH11 xylanase from *Humicola insolens* and their synergy in the degradation of xylan [J]. Food Chemistry, 2014, 148: 381-387.
- [41] QING Q, WYMAN C E. Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover [J]. Biotechnology for Biofuels, 2011, 4(1): 18. DOI: 10.1186/1754-6834-4-18.
- [42] TERRASAN C R F, TROBO-MASEDA L, MORENO-PÉREZ S, et al. Co-immobilization and stabilization of xylanase, β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium janczewskii* for arabinoxylan hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2016, 51(5): 614-623.
- [43] HUANG D, LIU J, QI Y F, et al. Synergistic hydrolysis of xylan using novel xylanases, β -xylosidases, and an α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(15): 6023-6037.
- [44] PURWANI N N, DARMOKOESOEMO H, PUSPANSIH N N T. Hydrolysis of corncob xylan using β -xylosidase GbtXyl43B from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 containing carbohydrate binding module (CBM) [J]. Procedia Chemistry, 2016, 18: 75-81.

- [45] WAKIYAMA M, YOSHIHARA K, HAYASHI S, et al. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(4): 398-404.
- [46] DE CARVALHO D R, CARLI S, MELEIRO L P, et al. A halotolerant bifunctional beta-xylosidase/alpha-l-arabinofuranosidase from *Colletotrichum graminicola*: Purification and biochemical characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 114: 741-750.
- [47] HERRMANN M C, VRSANSKA M, JURICKOVA M, et al. The β -D-xylosidase of *Trichoderma reesei* is a multifunctional β -D-xylan xylohydrolase [J]. Biochemical Journal, 1997, 321(Pt2): 375-381.
- [48] MICHELIN M, PEIXOTO-NOGUEIRA S C, SILVA T M, et al. A novel xylan degrading beta-D-xylosidase: Purification and biochemical characterization [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(11): 3179-3186.
- [49] ZANPHORLIN L M, DE MORAIS M A B, DIOGO J A, et al. Structure-guided design combined with evolutionary diversity led to the discovery of the xylose-releasing exo-xylanase activity in the glycoside hydrolase family 43 [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(4): 734-744.
- [50] DOU T Y, LUAN H W, LIU X B, et al. Enzymatic hydrolysis of 7-xylosyltaxanes by an extracellular xylosidase from *Cellulosimicrobium cellulans* [J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(9): 1905-1910.
- [51] WANG K, WANG T T, LI J H, 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.
- [52] LI Q, JIANG Y J, TONG X Y, et al. Cloning and characterization of the β -xylosidase from *Dictyoglomus turgidum* for high efficient biotransformation of 10-deacetyl-7-xylosltaxol [J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 94(7): 103357. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103357.
- [53] CHENG H L, ZHAO R Y, CHEN T J, et al. Cloning and characterization of the glycoside hydrolases that remove xylosyl groups from 7- β -xylosyl-10-deacetyltaxol and its analogues [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2013, 12(8): 2236-2248.
- [54] SHIN H Y, LEE J H, LEE J Y, et al. Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing β -D-xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(8): 1170-1173.
- [55] ZHANG S S, XIE J C, ZHAO L G, et al. Cloning, over-expression and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermotoga petrophila* and cooperated transformation of ginsenoside extract to ginsenoside 20 (S)-Rg3 with a β -glucosidase [J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 85: 159-167.
- [56] ZHANG R, LI N, XU S J, et al. Glycoside hydrolase family 39 β -xylosidases exhibit β -1,2-xylosidase activity for transformation of notoginsenosides: A new EC subclass [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(11): 3220-3228.
- [57] SHIN K C, SEO M J, OH D K. Characterization of β -xylosidase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and its application to the production of ginsenosides Rg₁ and Rh₁ from notoginsenosides R₁ and R₂ [J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(11): 2275-2281.
- [58] 李琦, 童欣怡, 姜云鹏, 等. 定点突变提高 β -木糖苷酶 Xln-DT 的酶活 [J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(2): 41-48.
- [59] HARTANTI L, ROHMAN A, SUWANDI A, et al. Mutation analysis of the pKa modulator residue in β -D-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08: Activity adaptation to alkaline and high-temperature conditions [J]. Procedia Chemistry, 2016, 18: 39-48.
- [60] DEHNAVI E, MOEINI S, AKBARZADEH A, et al. Improvement of *Selenomonas ruminantium* β -xylosidase thermal stability by replacing buried free cysteines via site directed mutagenesis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 352-358.
- [61] SINGH S K, HENG C, BRAKER J D, et al. Directed evolution of GH43 β -xylosidase XylBH43 thermal stability and L186 saturation mutagenesis [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(3): 489-498.
- [62] HUANG Z Q, LIU X S, ZHANG S W, et al. GH52 xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*: Characterization and introduction of xylanase activity by site-directed mutagenesis of Tyr509 [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(1): 65-74.
- [63] OCHS M, BELLOY N, DAUCHEZ M, et al. Role of hydrophobic residues in the aglycone binding subsite of a GH39 β -xylosidase in alkyl xylosides synthesis [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 96: 21-26.

Research Progress of β -xylosidase

LIANG Meng, LIN Yu, HUANG Ribo, DU Liqin

(College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

Abstract: β -xylosidase is an important member of the xylan hydrolase system, which can synergistically hydrolyze xylan with xylanase, and is considered to be one of the key enzymes for xylan hydrolysis. In recent years, researchers have found that in addition to hydrolyzing xylan, β -xylosidase can also hydrolyze other compounds containing xylosyl groups, such as 7-xylose-10-deacetylpaclitaxel, some ginsenosides and notoginsenosides to produce some bioactive substances. In addition, some microbial-derived β -xylosidase also has the transglycosidic function, which can transfer the xylose group of the donor to the acceptor of sugars or alcohols to form new glycoside compounds. In this article, the related research progress on the enzymatic properties, structure, catalytic mechanism, function, and molecular modification of β -xylosidase were reviewed, and the future development of β -xylosidase in bacterial strain screening, substrate utilization and structure research were prospected, so as to provide a reference for the subsequent research on β -xylosidase.

Key words: β -xylosidase; xylan; enzyme property; transglycosidic function; molecular modification

责任编辑:唐淑芬



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxxkx.ijournal.cn/gxxkxyxb/ch>