



人体肠道菌群来源碳水化合物活性酶 (CAZYmes) 研究进展*

张浩雯** 曹 浩** 王钰璐*** 辛凤姣***

(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

摘要 肠道菌群是人体重要的代谢“器官”, 对人体的健康和疾病起着至关重要的作用. 肠道菌群参与人体消化、免疫、神经系统调节机能的分子机理是特异性物质代谢通路在微生物与人体之间的协同耦合. 酶是代谢通路中参与物质转化的基本功能单元, 深入理解肠道菌群编码酶的分子催化机理将为以肠道菌群(或肠道酶)作为靶点的精准营养/医疗干预研究提供重要理论依据. 特异性底物酶解研究表明, 肠道菌群编码的酶系统不仅包含全部已知的碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZYmes)类, 同时蕴含诸多潜在的新型CAZYmes. 本文阐述CAZYmes的分类原则及催化机理, 并主要从结构生物学方面综述人体肠道菌群来源的新型CAZYmes.

关键词 肠道菌群, 糖苷水解酶, 糖苷转移酶, 多糖裂解酶, 碳水化合物酯酶, 辅助氧化还原酶

中图分类号 Q55, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0059

人体微生物主要聚集在口腔、皮肤和肠道中, 其中人体的肠道中蕴含着数量丰富、种类繁多的微生物群落, 约占人体微生物总数的80%^[1]. 肠道菌群是人体最主要和最复杂的微生态系统, 被喻为人类的“第二大脑”. 人体肠道菌群以细菌为主, 一个正常成年人肠道内的细菌约有30属1 000多种^[2], 主要由厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)及放线菌门(Actinobacteria)四个门类组成, 其中拟杆菌门和厚壁菌门为优势菌群, 在维持人体健康中起重要作用^[3-4]. 人体肠道菌群可通过参与宿主体内碳水化合物、蛋白质和脂肪等物质的代谢影响宿主的消化、免疫和神经系统^[5]. 人体只能直接消化日常饮食所摄入碳水化合物中的某些淀粉及单糖, 剩余的复杂多糖可转运到大肠中被肠道菌群利用^[6]. 因此, 人体肠道菌群对于代谢不可直接被人体消化吸收的碳水化合物至关重要.

复杂的膳食多糖可作为人体肠道菌群的主要碳源, 控制这些多糖组装和分解的碳水化合物活性酶(carbohydrate active enzymes, CAZYmes)则参与肠道菌群对膳食多糖的代谢及利用, 协助人体消化

系统降解碳水化合物. CAZY数据库(<http://www.cazy.org/>)将CAZYmes分为5类, 即糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、糖苷转移酶(glycosyltransferases, GTs)、多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs). 研究表明, 人体肠道菌群基因组不仅编码大量纤维素和半纤维素等常见的人体不可直接利用的碳水化合物水解酶系, 随着分子生物学、结构生物学和酶学技术的不断发展, 具有独特催化特性和结构特性的新型CAZYmes也从人体肠道菌群中被相继发现^[7]. 本文将分类阐释5类CAZYmes的催化机理, 综述人体肠道菌群来源的新型CAZYmes, 旨在为深入理解肠道菌群和

* 国家自然科学基金(31801475)和中国博士后科学基金(2018M630230)资助项目.

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

辛凤姣. Tel: 010-62815873, E-mail: 2002hongzhi30@163.com

王钰璐. Tel: 010-62893472, E-mail: wnewyx@163.com

收稿日期: 2020-03-10, 接受日期: 2020-06-10

人体之间的耦合关系，为基于人体肠道菌群的新酶挖掘提供理论支撑。

1 糖苷水解酶

1.1 糖苷水解酶的定义及催化机制

糖苷水解酶催化糖苷键的水解，产生糖半缩醛或半缩酮以及相应的游离糖苷配基（图1a）。根据糖苷水解酶在糖链末端或中间裂解底物的特性不同，可将其分为内切型和外切型酶；根据反应机制不同，可将其分为保留型（retaining）和反转型（inverting）酶；根据作用于底物化学键不同，可将其分为催化O-、N-和S-糖苷键水解的酶。

在大多数情况下，糖苷键的水解是在糖苷水解酶的两个分别承担质子供体（酸催化基团）和亲核基团（碱催化基团）的羧基氨基酸（通常为Glu和

Asp）催化下完成^[8]。反转型催化机制是伴随水解产物异头碳构象反转的糖苷水解作用，通常通过一步单取代反应实现。质子供体先为底物糖苷键上的氧原子提供一个质子，而后亲核基团使活性中心的水分子解离产生羟基，并与糖基的碳正离子结合从而打开糖苷键^[9]（图1b）。保留型催化机制则通过形成共价糖基酶中间体的两步双取代反应实现（图1c），该反应过程分为糖基化和去糖基化两步。糖基化步骤中，质子供体为底物糖苷键上的氧原子提供一个质子使糖苷键断裂，亲核基团攻击糖基的异头碳并形成稳定的中间体。去糖基化步骤中，质子供体协助进入活性中心的水分子进攻糖基的碳正离子，完成糖基取代^[10]。在这两种机制中，行使催化功能的两个关键氨基酸的位置有所差别。在反转型机制中，由于活性中心必需容纳一个水分子

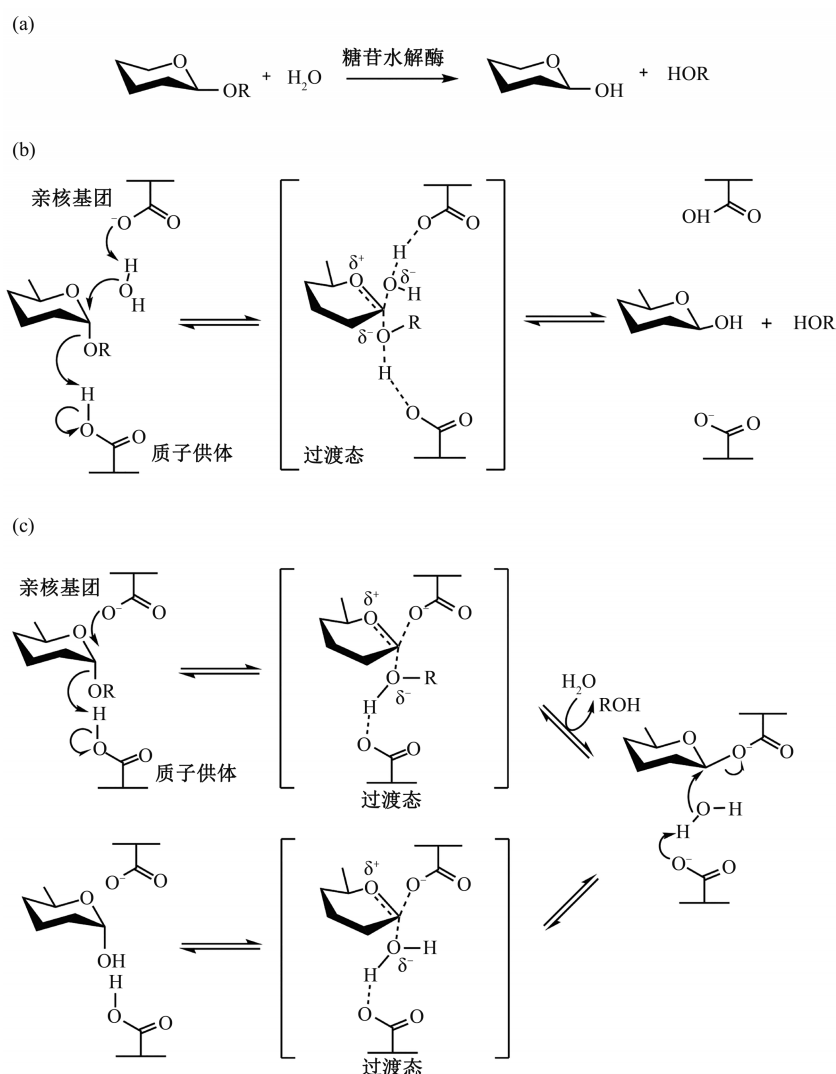


Fig. 1 Catalytic mechanism of glycoside hydrolase

图1 糖苷水解酶催化机制

(a) 糖苷水解酶催化示意图。(b) 反转型催化机制。(c) 保留型催化机制。

参与催化反应, 亲核基团与质子供体氨基酸的距离往往较保留型机制要远。

1.2 人体肠道菌群来源的新型糖苷水解酶

饮食中的果胶可被人体肠道菌中编码的糖苷水解酶协同降解。人结肠拟杆菌通过其多糖利用位点 (polysaccharide utilization loci, PULs) 编码的不同糖苷水解酶协同降解复杂的 I 型鼠李半乳糖醛酸聚糖 (rhamnogalacturonan-I, RG-I)。Luis 等^[11-12] 从肠道拟杆菌中鉴定到了 30 余种 GH 家族酶, 其中从多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 和卵形拟杆菌 (*Bacteroides ovatus*) 中鉴定了两个新的 GH146 和 GH147 家族。GH146 家族的 BT0349 是一个 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶, 可从阿拉伯低聚糖中释放 β -L-阿拉伯糖, 结构 (PDB ID: 5OPJ) 显示其具有 GH127 家族的结构特征和催化机制, 然而 BT0349 包含一个位于活性位点上方的 β 三明治型结构域, 在 GH127 家族中并不存在。GH147 家族的 BACOVA_05493 是一个位于细胞表面的外切 β -半乳糖苷酶, 对于 *B. ovatus* 在半乳聚糖上的生长和利用十分关键。值得注意的是, 迄今为止所有报道的 PULs 上编码位于细胞表面的酶均为内切作用酶, 表明 GH147 家族的独特性, 它的催化机制亟待深入研究。作者提出, 不同的拟杆菌属通过肠道内不同的营养生态位靶向作用于半乳聚糖, 协同降解果胶 RG-I。Ndeh 等^[13] 发现 *B. thetaiotaomicron* 可利用已知结构最复杂的果胶多糖——II 型鼠李半乳糖醛酸聚糖 (rhamnogalacturonan-II, RG-II)。研究挖掘得到了 3 个 PULs 上的 40 余种酶参与 RG-II 降解, 包括 7 个新 GH 家族: GH140 家族的内切洋芹糖苷酶 (BT1012)、GH143 家族的 2-酮-3-脱氧-D-羟庚酸 (2-keto-3-deoxy-D-lyxo-heptulosaric acid, DHA) 水解酶 (BT1020 的 N 端结构域)、GH142 和 GH137 家族的两种 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (分别为 BT1020 的 C 端和 BT0996 的 N 端结构域)、GH139 家族的 α -2-O-甲基-L-岩藻糖苷酶 (BT0984)、GH141 家族的 α -L-岩藻糖苷酶 (BT1002) 和 GH138 家族的 α -半乳糖醛酸酶 (BT0997)。该研究还报道了 3 个在已知 GH 家族中具有新活性的酶: GH127 家族的 α -L-槭汁酸水解酶 (BT1003)、GH2 家族的两个成员 β -D-葡萄糖醛酸酶 (BT0992) 和 α -阿拉伯吡喃糖苷酶 (BT0983)。BT1003 的结构 (PDB ID: 5MQO) 显示该酶的催化机制与其他 GH127 家族成员不同, GH127 家族在前人的研究中仅具有阿拉伯呋喃糖苷酶活性。

BT1003 的酸催化基团 Gln 替代了阿拉伯呋喃糖苷酶中的 Glu, 无法为催化反应提供质子, 在没有合适的碱催化基团的情况下, 推测底物的羧酸执行碱催化功能, 参与糖苷键的断裂。此外, 研究还报道了三个多结构域双功能水解酶 BT0996、BT1013 和 BT1020。BT0996 具有 β -D-葡萄糖醛酸酶活性和 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性, 可分别作用于 RG-II A 链中 D-葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA)- β -1,4-L-岩藻糖 (fucose, Fuc) 苷键和 B 链中 L-阿拉伯呋喃糖 (arabinofuranose, Ara)- β -2,1-L-鼠李糖 (rhamnose, Rha) 苷键; BT1013 具有鼠李糖苷酶活性和 3-脱氧-D-甘露糖辛酸 (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid, KDO) 水解酶活性, 分别作用于 C 链中相邻的 L-Rha- α -1,5-D-KDO 糖苷键和 D-KDO- α -2,3-D-GlcA 糖苷键; BT1020 具有 DHA 水解酶活性和 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶活性, 可分别作用于 D 链上相邻的 D-DHA- β -2,3-D-半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalA) 糖苷键和 L-Ara- β -1,5-D-DHA 糖苷键。BT1020 的晶体结构 (PDB ID: 5MQR) 已经解析, 包含 4 个结构域: 由 5 个 β 片层构成的螺旋桨型 DHA 水解酶结构域 (图 2b), 中间为 β 三明治型折叠结构域 1 和 2 (图 2a), 及 $(\alpha/\alpha)_6$ 折叠桶型 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶结构域 (图 2c)。其中 DHA 水解酶结构域中 Tyr372 和 Glu99 分别发挥亲核基团和质子供体的功能, β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶结构域活性位点中的一对羧酸残基 Tyr702 和 Glu695 起主要催化功能, 但具体的双底物识别、协同催化机制仍不清楚, 亟待进行结构生物学及酶动力学等深入研究。随后, Labourel 等^[14] 首次解析了 GH138 家族酶的三维结构并阐明了其作用机制, BT0997 通过双取代保留机制作用于 RG-II A 链中的 D-GalA- α -1,2-L-Rha 糖苷键, 并保留异构化构型, 它的活性依赖于另一个通过 β -1,3 糖苷键与 L-Rha 相连的 D-GalA 侧链。序列比对及定点突变研究显示, 保守的 Arg332 和 Arg521 在 BT0997 特异性底物识别及催化过程中起到关键作用。这类研究明确了人体肠道菌群中的多糖代谢网络, 探索了人体肠道菌群降解和利用果胶的分子机制, 有助于益生菌和益生元相关产品的开发, 对提高人体健康水平具有重要意义。

GH97 家族是一个同时包含反转型和保留型糖苷水解酶的独特 GH 家族, Kitamura 等^[15] 解析了 *B. thetaiotaomicron* 来源的一种反转型 α -葡萄糖苷水解酶 BtGH97a (SusB) 的晶体结构 (PDB ID:

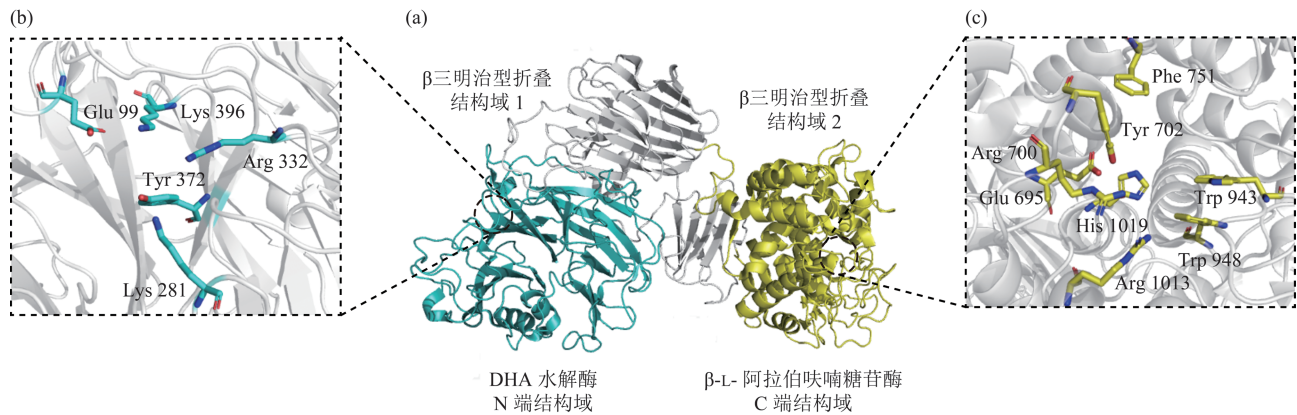


Fig. 2 Crystal structure of double-domain bifunctional hydrolase (BT1020)

图2 双结构域双功能水解酶 (BT1020) 晶体结构

(a) BT1020的结构以飘带图展示.DHA水解酶催化结构域和 β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶催化结构域分别以青色和黄色展示,中间的连接区域采取两个 β 三明治型折叠构象,以灰色展示.(b) DHA水解酶结构域催化关键氨基酸(青色棒状).(c) β -L-阿拉伯呋喃糖苷酶结构域催化关键氨基酸(黄色棒状).

2D73), 结构(图 3a)显示,在其催化中心(β/α)₈折叠桶 $\beta 3$ 和 $\beta 5$ 上的Glu439、Glu508作为碱催化基团, $\beta 6$ 上的Glu532作为质子供体发挥催化功能.Okuyama等^[16]随后从相同菌株中鉴定了一个*Bt*GH97a (SusB)同源蛋白BT1871,其属于保留型GH97b家族,晶体结构(图 3b, PDB ID: 3A24)等研究发现,其 $\beta 3$ 和 $\beta 5$ 上没有保守的Glu,在相应位置起亲核催化作用的是 $\beta 4$ 上的Asp415.作者进而总结了反转型和保留型GH97酶的催化特

征:反转型GH97酶在 $\beta 3$ 和 $\beta 5$ 的末端通常具有碱催化基团,而保留型GH97酶在 $\beta 4$ 末端具有保守的Asp亲核基团.Shin等^[17]从*B. thetaiotaomicron*鉴定了一种新型保留型的 α -半乳糖苷酶BT3294,与BT1871具有相同的催化特征,能够特异性水解较短的 α -半乳糖基寡糖,如蜜二糖和棉子糖,但不可水解如瓜尔豆胶或槐豆胶等 α -半乳糖基多糖.该酶在工业上可用于高效水解豆浆中的棉子糖家族低聚糖,进而减轻因其造成的胃胀等其他肠道疾病,对

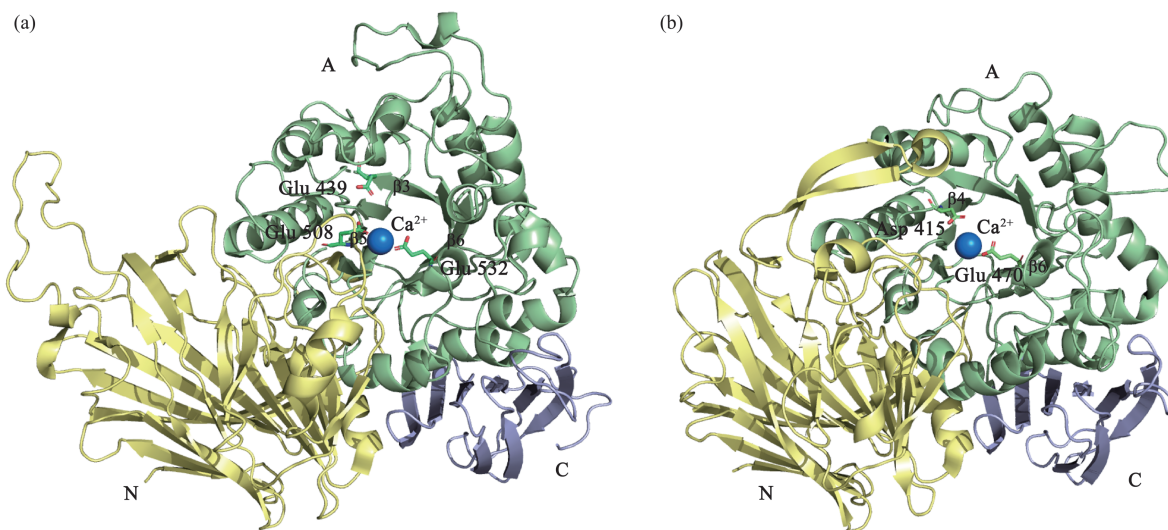


Fig. 3 Crystal structure of α -Glucosidase (*Bt*GH97a) and α -Galactosidase (*Bt*GH97b)

图3 α -葡萄糖苷水解酶 (*Bt*GH97a) 和 α -半乳糖苷酶 (*Bt*GH97b) 晶体结构

*Bt*GH97a和*Bt*GH97b的结构以飘带图展示,其中N端、C端和A端结构域分别以浅黄色、浅紫色和果绿色展示, Ca^{2+} 展示为蓝色球形.(a) *Bt*GH97a活性中心 $\beta 3$ 、 $\beta 5$ 和 $\beta 6$ 上的关键氨基酸Glu439、Glu508和Glu532(绿色棒状).(b) *Bt*GH97b活性中心 $\beta 4$ 、 $\beta 6$ 上的关键氨基酸Asp415、Glu470(绿色棒状).

改善肠胃消化吸收及人体健康有着重要作用. Kikuchi 等^[18]从 *B. thetaiotaomicron* 中挖掘获得了一种 α -半乳糖苷酶 (BT3664) 和一种 β -L-吡喃阿拉伯糖苷酶/ α -D-吡喃半乳糖苷酶 (BT3661). 通过进化树分析, 将这两种酶归为 GH97c 亚家族, 其中 BT3661 是 GH97 家族中第一个双功能水解酶. BT3661 具有保留型 GH97 酶中保守的 Asp 残基, 而没有反转型 GH97 酶的 HHET 和 HE 基序, 是一种保留型糖苷水解酶. 为阐明其双底物识别与催化机制, 作者解析了 BT3661 的晶体结构 (PDB ID: 5XFM), 并与同来源、单功能 α -半乳糖苷酶 BT1871 进行了比较. 结果显示, 与 GH97 家族其他成员类似, BT3661 也具有三个结构域: β 三明治型折叠构成的 N 端结构域 (结构域 N) 和 C 端结构域 (结构域 C), 及位于中间的由 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶构成的催化结构域 (结构域 A). BT3661 与 BT1871 的结构整体比较相似, 其中 BT1871 通过 Glu351 来稳定底物 α -半乳糖基的羟基 C6, 且 Glu351 的侧链会与结构域 N 中 β -发夹上的 His245 形成氢键; 但 BT3661 是通过 Asn338 来稳定 C6, 且对应的 β -发夹位置为催化结构域 A 中的 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 3, 此外 Gln378 与 Asn338 和 C6 羟基都很接近. 无论是 BT1871 中的 β -发夹还是 BT3661 中的 $\beta \rightarrow \alpha$ loop 3 在保留型 GH97 家族中的保守性都很低, 且关键氨基酸组合 Glu351-His245 (BT1871) 和 Asn338-Gln378 (BT3661) 也非常少见. 为进一步明确其双底物识别特异性, 作者进行了定点突变研究, 结果显示: BT1871 和 BT3661 中的关键差异位点, 即底物结合区域的 Asn338 侧链长度及其与周围氨基酸之间的范德华相互作用是影响其双底物水解特性的决定因素. 较长的侧链阻止了 α -半乳糖苷的结合, 而较短的侧链在底物结合口袋内产生了额外的空间来容纳 α -半乳糖苷的 6-CH₂OH, 但对阿拉伯糖苷酶的催化效率影响较小. 此外, 将 Asn338 突变成 Ala, 降低其电性进而破坏其与周围氨基酸或者底物的相互作用, 会显著降低阿拉伯糖苷酶活性但提高 α -半乳糖苷酶活性. 据此, 作者推测在与 BT3661 具有 50%~80% 序列同源性的 UniRef50_F9 D4D2 基因簇中, 与 Asn338 等同的位置上大约 1/3 为 Asn, 这些酶可能均为双功能酶; 而 1/3 为 Ala, 可能均为单功能 α -半乳糖苷酶.

Rogowski 等^[19]报道了 *B. ovatus* 中两个 PULs 编码的 19 个酶基因, 在木聚糖代谢过程中发挥了重要的作用, 其中包括两个具有新型酶催化功能的

成员: BACOVA_03433 和 BACOVA_03438. BACOVA_03433 是一个位于细胞表面的内切木聚糖酶, 属于 GH98 家族, 过去的研究表明该家族仅包含内切- β -D-半乳糖苷酶. 该酶发挥功能需要水解的木糖基上同时具有 O2 位的 L-阿拉伯呋喃糖基和 O3 位的 D-木糖基修饰. BACOVA_03438 是一个位于细胞周质的半乳糖苷酶, 属于 GH95 家族, 过去的研究表明该家族的酶仅具有 α -L-岩藻糖苷酶活性. 结构分析 (PDB ID: 4UFC) 显示 BACOVA_03438 具有 $(\alpha/\alpha)_6$ 螺旋桶型结构域, N 端和 C 端分别包含一个 β 三明治型结构域. 该酶采取了单取代反转型催化机制, 高度保守的 Glu501 作为酸催化基团, 而不具有在 GH 家族中常见的羧酸氨基酸 (Asp 和 Glu) 作为碱催化基团. 与 GH95 家族的同源蛋白 α -L-岩藻糖苷酶 AfcA 的催化机制类似, 由两个 Asn 激活的位于活性中心水分子对底物岩藻糖进行亲核攻击, 行使碱催化基团的功能. 此外, 在底物结合位点上的单个氨基酸差异 (BACOVA_03438 中的 Thr370 取代了 AfcA 中的 His419) 可能是影响其底物特异性的关键因素. 该研究阐明了人体肠道菌群对不同形式复杂木聚糖降解的分子机制, 对基于营养策略调控肠道微生物群落的结构以促进人体健康具有重要的意义. Armstrong 等^[20]报道了人体肠道萨利尔斯氏拟杆菌 (*Bacteroides salyersiae*) 来源的 GH164 家族成员 Bs164 的生化特征和晶体结构, Bs164 (PDB ID: 6T5O) 由 3 个结构域组成: $(\beta/\alpha)_8$ 折叠桶型结构域、一个三聚体结构域和一个 β 三明治型折叠结构域. 活性中心的 Glu297 和 Glu160 分别作为亲核基团和酸/碱催化基团作用于 β -甘露糖苷键, 该酶仅具有 β -甘露糖酶活性而无 α -甘露糖酶活性. 此发现进一步加深了我们对共生微生物获取营养物质的机理的认识.

李彬春等^[21]发现来源于 *B. thetaiotaomicron* 同一个基因座上的两个同属 GH78 家族的 α -L-鼠李糖苷酶基因 (*BtRha78D*、*BtRha78E*). 序列分析显示, 这两个酶分属不同亚家族, 氨基酸序列组成和长度差异较大 (其中 *BtRha78* 含有 1 152 个氨基酸, 是迄今为止发现的分子质量最大的鼠李糖苷酶), 与已发现的细菌源 GH78 家族 α -L-鼠李糖苷酶的序列一致性较低 (<35%) 且进化关系较远. 酶学性质表征显示二者最适催化 pH 均偏酸性, 最适催化温度均为 50°C, 均可以高效水解对硝基苯酚- α -L-鼠李糖苷 (*p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside, *pNPR*), 且对底物具有较高的亲和力 (*BtRha78D*

和 *BtRha78E* 的 K_m 值分别为 0.14 mmol/L 和 0.44 mmol/L)。然而两个酶对不同浓度有机溶剂的耐受度不同,在相同 pH 值下的不同种类缓冲溶液中催化活力也不尽相同.研究认为一个基因座同时编码两个酶学性质存在部分差异的 α -L-鼠李糖苷酶基因,有利于宿主在不同环境条件下协同参与对于含 α -L-鼠李糖基底物的代谢.

Munoz-Munoz 等^[22]从 *B. thetaiotaomicron* 鉴定了 α -L-鼠李糖苷酶 BT3686,属于新的 GH145 家族. BT3686 可通过双取代保留型机制特异性水解阿拉伯半乳聚糖蛋白 (arabinogalactan proteins, AGPs) 中的 L-Rha- α -1, 4-D-GlcA 糖苷键. 结构分析 (图 4, PDB ID: 5MUL) 显示 BT3686 采取了 GH-A 型 β 螺旋桨型构象,活性位点位于酶的后表面 (位于前表面). 此外, BT3686 并不具有 GH 家族行使催化功能的羧酸残基对,而是 GH145 家族中一个并不保守的 His 作为唯一的催化氨基酸 (亲核基团),底物 D-GlcA 基团的羧酸具有酸/碱催化基团的作用. 该研究扩展了我们对 GH 家族催化机制的认识,为研究复杂 AGPs 的结构特征及相关 AGPs 低聚糖衍生品的开发奠定了理论基础.

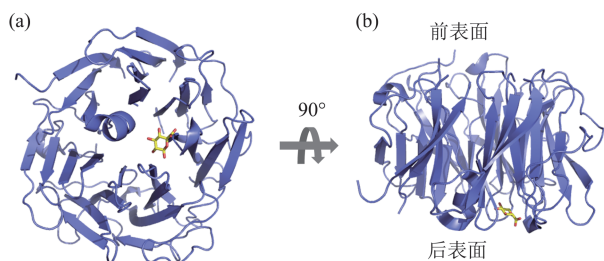


Fig. 4 Crystal structure of α -L-Rhamnosidase (BT3686)

图4 α -L-鼠李糖苷酶 (BT3686) 晶体结构

(a) BT3686 的整体结构以飘带图展示,活性中心处结合的底物 D-半乳糖醛酸展示为黄色棒状. (b) 将 BT3686 水平翻转 90°, 其整体结构及前、后表面示意图以飘带图展示.

唾液酸广泛存在于黏蛋白的糖链中,唾液酸酶可从各种复杂碳水化合物中水解释放游离的唾液酸,目前从肠道微生物中已发现多种唾液酸酶. Ashida 等^[23-25]从肠道两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 中鉴定了两个外切 α -唾液酸酶 SiaBb1 和 SiaBb2,两者均能水解来自唾液

酸聚糖的 α -2, 6-/ α -2, 3-唾液酸. 此外, GH33 家族的 SiaBb1 含有 SGNH 水解酶结构域,具有唾液酸-O-乙酰酯酶活性,是第一个具有酯酶活性的双功能唾液酸酶. 该研究为后续进一步研究双歧杆菌唾液酸酶的功能及其与宿主的相互作用机制奠定了基础,也为靶向于胃肠道黏蛋白的益生菌开发提供了新的思路.

2 糖基转移酶

2.1 糖基转移酶的定义及催化机制

糖基转移酶能催化特定的糖和受体之间形成糖苷键. 典型的糖基转移酶可利用各种活化的糖磷酸盐作为糖基供体,催化活化的糖基转移到亲核受体 (通常为醇) 上,糖基转移的产物可以是 O-、N-、S-或 C-糖苷,该糖苷可以是单糖、寡糖或多糖的一部分. 与糖苷水解酶类似,糖基转移酶催化糖基转移到亲核受体,在异头中心处形成反转构型 (例如 NDP- α -糖到 β -糖苷) 和保留构型 (例如 NDP- α -糖到 α -糖苷). 糖基转移酶也分为反转型和保留型两种不同的催化机制 (图 5a)^[26].

反转型糖基化采取酶催化的单取代机制 (图 5b)^[27]. 在糖基转移酶的催化活性氨基酸侧链 (如 Asp、Glu 或 His) 的帮助下形成氧代羰基离子过渡态,催化碱基从受体的 -OH 基团中得到一个质子,使受体对糖供体的异头碳 C1 进行亲核攻击,在糖基供体和受体之间形成一个糖苷键. 研究表明随着质子的转移,亲核攻击和糖苷键的断裂几乎是同时发生的. 在一些糖基转移酶中,为了平衡 His 去质子化产生的正电性,His 会和 Asp 形成氢键. 对于大部分糖基转移酶来说,需要通过一个二价金属阳离子 (如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+}) 来稳定磷酸基团中的负电性^[28-29].

保留型糖基化的催化机制目前仍存在多种观点,其中双取代机制和 S_Ni 机制 (substitution nucleophilic internal) 认可度较高^[30-33]. 双取代反应机制认为首先糖基的 C1 通过反向转移结合到糖基转移酶的适当部位上,然后再转移到受体上, C1 恢复到其原始构象,反应形成共价糖基-酶中间体 (图 5c)^[30-31, 34]. 在 S_Ni 机制中,受体的羟基作为亲核基团进攻糖基的异头碳 C1 原子,与此同时糖基离开供体,反应过程中形成碳正离子过渡态,保护糖基转移酶的反应中心,使其免受反向的亲核攻击,保持 C1 构型 (图 5d)^[33, 35-36].

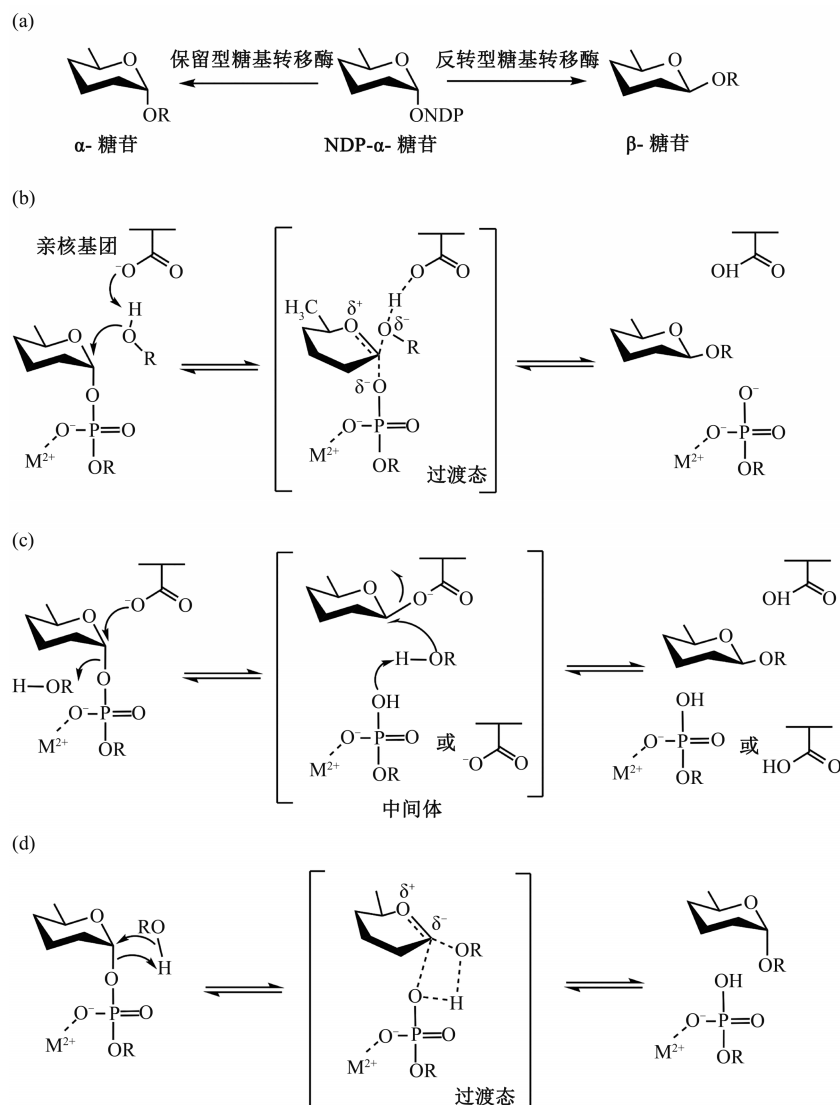


Fig. 5 Catalytic mechanism of glycosyltransferases

图5 糖基转移酶催化机制

(a) 糖基转移酶催化机制示意图. (b) 反转型催化机制. (c) 保留型双取代催化机制. (d) 保留型 S_Ni 催化机制.

2.2 肠道菌群来源的新型糖基转移酶

空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 是造成细菌性食源性胃肠炎的主要原因之一. Bokhari 等^[37]报道了 *C. jejuni* 来源的糖基转移酶 PglB, 可通过自身起催化作用的 WWDYG 基序在其 DYNQS 序列的 Asn534 位点实现自糖基化, 并在介导许多周质蛋白的糖基化中起着至关重要的作用. PglB 的这种自糖基化能力可以介导 *C. jejuni* 定殖于肠道上皮细胞, 有助于该细菌抵御食物和人体肠道中的各种环境生态位. 此外, PglB 的自糖基化对于新型偶联疫苗的开发和疾病诊断也具有重要意义. Houliston 等^[38]表达获得了来自 *C. jejuni* 的 α-1, 4-

半乳糖基转移酶 (α-1, 4-galactosyltransferase, CgtD) 和 β-1, 3-*N*-乙酰半乳糖胺基转移酶 (β-1, 3-*N*-acetylgalactosaminyltransferase, CgtE). CgtD 属于 GT8 家族, CgtE 属于 GT2 家族. 研究证实 CgtD 可催化对硝基苯基乳糖 (*p*-nitrophenyl-Lactose, *p*NP-Lac) 生成球三糖类似物 (*p*-nitrophenyl-globotriose, *p*NP-Gb3), CgtE 可进一步催化 *p*NP-Gb3 合成球四糖类似物 (*p*-nitrophenyl-globotetraose, *p*NP-Gb4). 进而, *p*NP-Gb4 可作为前体在 α-1, 3-*N*-乙酰半乳糖胺基转移酶 *Pm*1138 的催化下生成福斯曼抗原衍生物 (*p*-nitrophenyl-Forssman antigen, *p*NP-Fa). 上述酶的应用可提高

在化学酶法合成工艺中福斯曼抗原及前体的纯度和产量,具有可观的应用前景.

人类共生菌和病原体 GT6 家族可催化合成细菌表面组织血型抗原,有助于人体产生针对非自身组织血型的抗体. Pham 等^[39-40]指出人体肠道中 *B. ovatus* 来源的糖基转移酶 *BoGT6a* 采用了保留型的 S_Ni 机制,催化 *N*-乙酰半乳糖胺 (*N*-Acetylgalactosamine, GalNAc) 将尿苷二磷酸盐-*N*-乙酰半乳糖胺 (UDP-GalNAc) 转移到 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyl-lactose, FAL) 和类似的产物,从而产生类似 A 型抗原的产物^[39]. 结构解析与序列比对发现,该酶缺乏金属离子依赖性的 DXD 基序,取而代之的是 NXN 基序,可在不存在二价金属离子的情况下发挥催化功能. 此外,该研究组进一步解析了 *BoGT6a* (PDB ID: 4AYL) 及其与受体 FAL 复合物 (PDB ID: 4CJC)、*BoGT6a* 突变体 (Glu192 Gln) 与供体 UDP-GalNAc 复合物 (PDB ID: 4AYJ) 晶体结构^[40]. 结构分析 (图 6) 显示,UDP-GalNAc 和 FAL 的结合位点位于蛋白质表面的一个结合口袋中,被类似帽子的蛋白 C 端区域覆盖. 供体的磷酸根与 Asn95 的相互作用可以替代金属离子的功能,同时,位于 C 端的碱性氨基酸

Lys231 也取代了金属离子稳定 UDP 基团的作用. 与 Apo 结构比较, *BoGT6a* 结合供体与受体复合体的结构中采取了更为封闭的构象. *BoGT6a* 采取了顺序机制结合底物,供体先于受体结合. 作者认为 DXD 基序和 NXN 基序是区分 GT6 家族是否依赖金属离子催化的重要因素.

Ost 等^[41]从小肠莫氏耶尔森氏菌 (*Yersinia mollaretii*) 中鉴定了两种新型糖基转移酶 YGT 和 ADP-核糖基转移酶 YART,此两种酶与艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 分泌的糖基化毒素 (large clostridial glucosylating toxins, CGTs) 高度相关,而 *C. difficile* 是引起抗生素相关性小肠结肠炎的主要因素. 这两种酶都包含 CGTs 典型的 N 端 GT 结构域、半胱氨酸蛋白酶结构域、易位结构域和 C 端受体结合区域. YGT 的 GT 结构域 (PDB ID: 6RTH) 整体呈现球形结构,可以分为两部分: N 端呈现典型的 GT-A 构型,与其他同源毒素蛋白具有高度相似性; C 端包含一个紧密反向平行的五螺旋束,在已报道的同源结构中尚未发现. 作者通过解析与底物 UDP 复合体的结构 (图 7, PDB ID: 6RTG),确定了一个独特的 K^+ 结合位点, K^+ 与 DXD 基序中的 Asp213 侧链直接结合 (此位点还可与 Mn^{2+} 结合),同时 K^+ 与底物和盖环区域有直接相互作用, K^+ 的结合可能通过影响电荷平衡及稳定底物结合来提高糖基转移酶活性. 该研究阐明了梭菌及相关毒素蛋白 K^+ 依赖的糖基转移酶活性提高机制,为深入探讨其结构与功能关系奠定了基础.

Dong 等^[42]利用基因挖掘策略,鉴定了痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*) 来源的 GT4 家族 α -葡萄糖基转移酶 WfgE. 基于氨基酸序列分析表明, WfgE 包含一个推定的反转型 GT4 酶保守的 GT-B 型折叠结构域,且无 DXD 基序,其 1,2-GlcT 活性不依赖于二价金属离子. WfgE 可通过作用于 α -1,2-糖苷键催化 Glc 从 UDP-Glc 转移到天然底物类似物十一碳烯酚焦磷酸脂质 (GlcGlcNAc-PP-U),参与大肠杆菌 O152 的 O-抗原五糖 (O-repeating unit, RU) 的第三步生物合成. 研究显示,该酶具有灵活的供体底物特异性,可特异性利用 UDP-Glc 和 UDP-Gal 作为供体,并对以 β -Glc 和 Gal 为末端的受体具有特异性. 该研究为理解 O 抗原特异性在致病性细菌中的重要作用、细菌 α 2-GlcT 的作用机制和大肠杆菌 O152 抗原合成途径提供了理论依据.

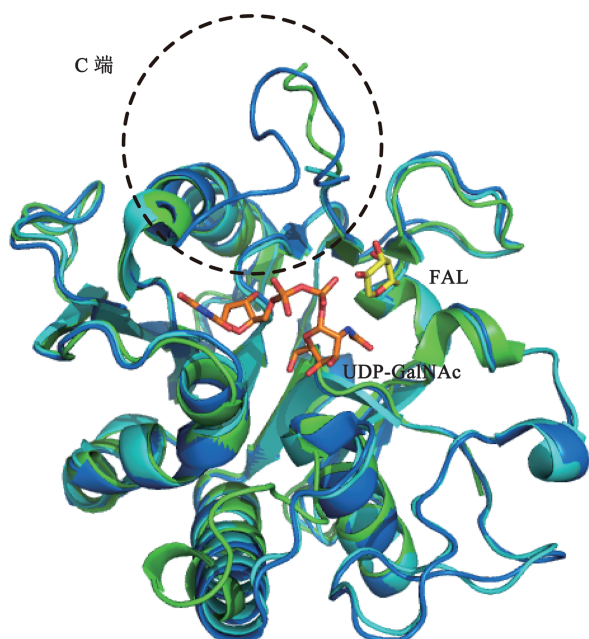


Fig. 6 Comparison of crystal structures of *BoGT6a* bound to different ligands

图6 *BoGT6a*结合不同配体的晶体结构比对

Apo-*BoGT6a* (绿色)、FAL-*BoGT6a* 复合物 (蓝色) 和 UDP-GalNAc-*BoGT6a* (Glu192Gln) 复合物 (青色) 的结构比对以飘带图展示. 在结合位点处展示出供体 UDP-GalNAc (橙色棒状), 受体 FAL (黄色棒状).

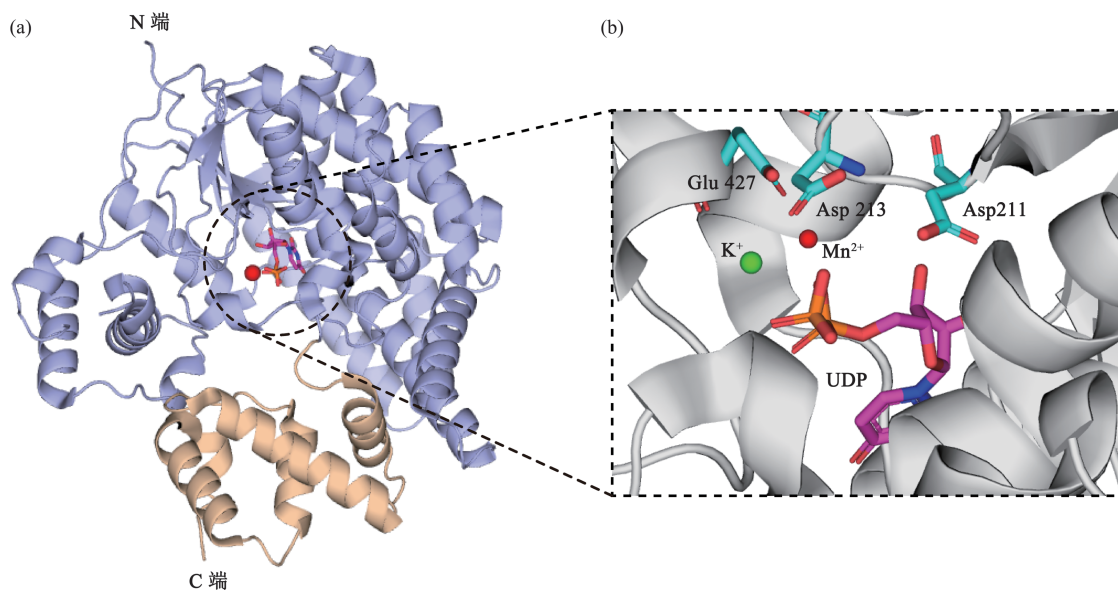


Fig. 7 Crystal structure of Glycosyltransferases (YGT)

图7 糖基转移酶 (YGT) 的晶体结构

(a) YGT的结构以飘带图展示, 其中N末端和C末端分别以浅紫色和小麦色展示. (b) 活性中心处与底物UDP (粉红色棒状) 相互作用的K⁺ (绿色球形) 结合位点, Mn²⁺展示为红色球形, 关键氨基酸展示为青色棒状.

3 多糖裂解酶

3.1 多糖裂解酶的定义及催化机制

多糖裂解酶采取 β -消除机制而非水解作用, 将含糖醛酸的多糖链裂解为不饱和己烯糖醛酸残基和新的还原端的酶^[43]. 以多聚半乳糖醛酸为例 (图8), PLs催化底物分解不需要水分子参与, 其通过对C4位C—O键的消除性裂解在非还原端生成己烯糖醛酸残基; 而GHs则通过水分子的参与裂解1,4-糖苷键, 使C4位羟基基团保留在新的非还原端 (图1).

PLs分为顺式消除机制 (图8a) 和反式消除机制 (图8c)^[43]. 对于两种催化机制, 均需阳离子参与 (Ca²⁺或带正电荷的氨基酸侧链), 起到协同催化 and 电荷稳定作用. 在裂解底物分子链的过程中, 邻近羰基的C5位质子被碱性氨基酸侧链消除, 进而通过酸催化基团提供质子供给促进糖苷氧的分离. 由于催化过程消除了C4位不对称中心, 因此基于顺式/反式消除机制催化的葡萄糖或半乳糖基底物生成的产物在本质上是相同的, 即己烯糖醛酸.

3.2 肠道菌群来源的新型多糖裂解酶

糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 是人

体肠道 *B. thetaiotaomicron* 的优先利用碳源. 按单糖组成、糖苷键类型以及硫酸基的数目和位置可分为5个主要类别: 硫酸乙酰肝素 (HS) 和肝素 (Hep)、硫酸软骨素 (CS)、硫酸皮肤素 (DS)、硫酸角质素 (KS) 和透明质酸 (HA), 其中HA不含有硫酸基. Cartmell 等^[44]报道了 *B. thetaiotaomicron* 中位于一个PUL上的Hep和HS裂解酶: BT4657、BT4662、BT4675和BT4652. 其中, BT4662是属于PL12家族的细胞表面裂解酶, 针对长链HS/Hep的降解具有关键作用; BT4657也属于PL12家族, 可特异性针对低度/无硫酸化HS/Hep的裂解; BT4675属于PL13家族, 对高度硫酸化的HS/Hep具有特异性; BT4652属于PL15家族, 对硫酸化及非硫酸化HS/Hep均具有广泛的特异性. BT4657、BT4675和BT4652均存在于细胞周质, 在代谢硫酸化GAGs的过程中, BT4675和BT4657分别优先作用于GAGs的高度硫酸化和低度/无硫酸化区域, 将GAGs内切裂解为仅可被BT4652外切裂解的寡糖分子. 不同底物特异性多糖裂解酶的协同作用使 *B. thetaiotaomicron* 能够将硫酸化GAGs降解为二糖, 进而在硫酸酯酶和糖苷水解酶的作用下降解为可以被细胞利用的糖分子. 该课题组^[45]随后报道了 *B. thetaiotaomicron* 中降解

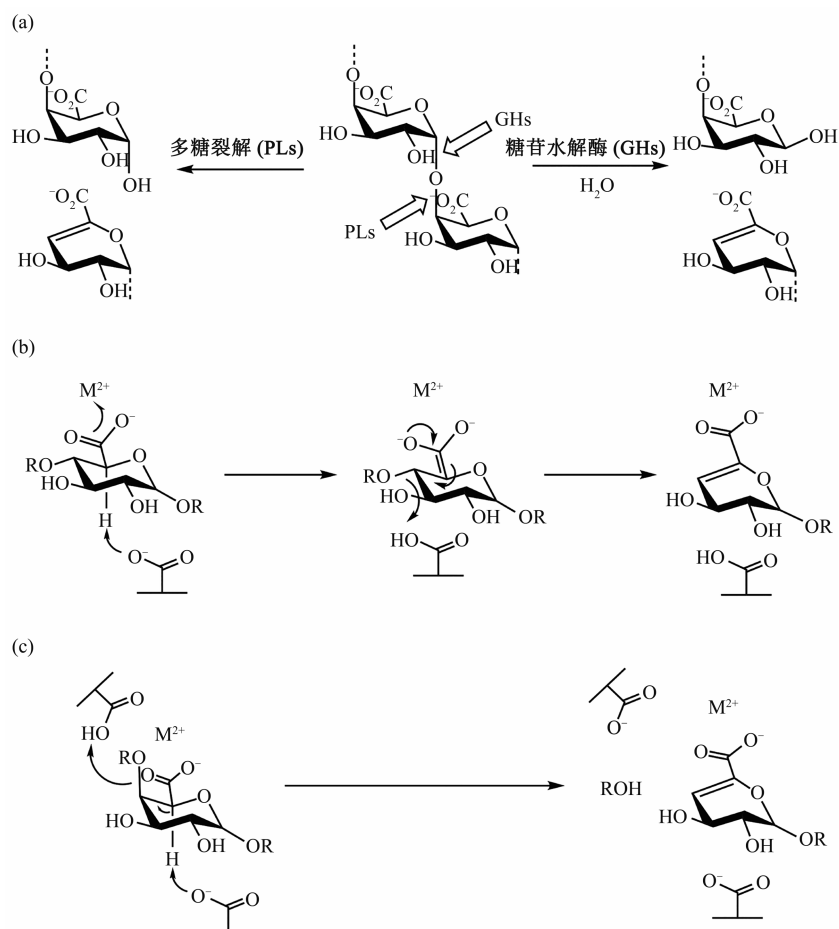


Fig. 8 Catalytic mechanism of polysaccharide lyases

图8 多糖裂解酶催化机制

(a) PL和GH催化机制示意图. (b) 顺式消除机制. (c) 反式消除机制.

其他几种GAGs复合物CS-A、CS-C、DS和HA的PLs: BT3324、BT3350、BT3328和BT4410. 其中, BT3328是PL29家族的表面内切裂解酶, 对CS-A、CS-C和HA均具有较高的酶活性; BT3324和BT3350分别是PL8家族的外切和内切周质裂解酶, 二者对4种底物具有广泛的特异性; BT4410是PL31家族的周质裂解酶, 仅对HA具有活性. BT3350与BT3324和BT4410协同作用, 将GAGs分解代谢为二糖. 以上研究对于探究人体肠道对硫酸化复杂多糖的消化降解和相关药物的开发提供了理论依据. Stender等^[46]从肠道解纤维素拟杆菌(*Bacteroides cellulosilyticus*)中挖掘到了一个PL6家族的内切海藻酸盐裂解酶*BcelPL6*, 该酶可从海藻酸盐和多聚 β -1, 4-D-甘露糖醛酸(poly- β -D-mannuronic acid, polyM)释放聚合度为2~7的不

饱和寡糖, 然后进一步降解为二糖和三糖. 与其他PL6酶不同, *BcelPL6*对聚 α -L-古洛糖醛酸(poly- α -L-guluronic acid, polyG)、 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸聚合物(alternating or random β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid polymer, polyMG)及乙酰化的polyM的活性极低, 但polyG可将*BcelPL6*对藻酸盐的活性提升7倍. 晶体结构(图7)显示, *BcelPL6*(PDB ID: 6QPS)的催化结构域呈现为“十步”天冬酰胺阶梯状 β 螺旋构象, 活性中心由Lys249、Arg270、His271组成, 保守的His271仅在*BcelPL6*的催化活性中起关键作用, 而在同源蛋白中的作用微乎其微. 结构比对显示, *BcelPL6*具有相对开放的活性中心, 这种差异是决定其底物特异性的关键因素. 该研究解析了人体肠道菌来源的第一个PL6家族海藻酸盐裂解酶的晶

体结构并表征了底物选择性等酶学特征, 拓展了对海藻酸裂解酶的认知, 也为阐明人体代谢海藻酸盐

的分子机制提供了新的方向.

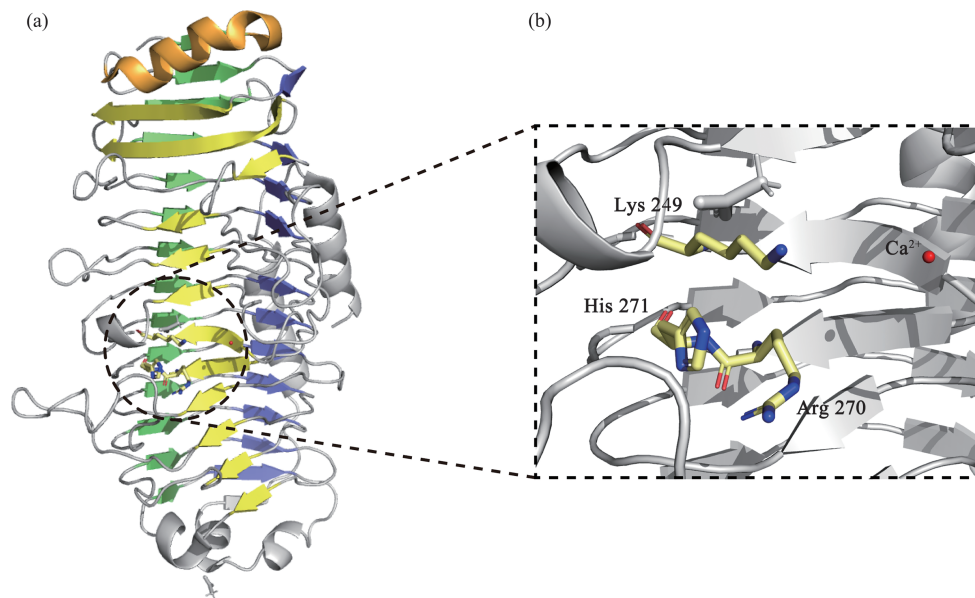


Fig. 9 Crystal structure of alginate lyase (*BcelPL6*)

图9 海藻酸盐裂解酶 (*BcelPL6*) 晶体结构

(a) *BcelPL6*的“十步”天冬酰胺阶梯状 β 螺旋构象以飘带图展示. (b) *BcelPL6*活性位点区关键催化氨基酸 (黄色棒状), 钙离子以红色球形展示.

Luis 等^[11]报道了 *B. thetaiotaomicron* 中位于 PUL_{RG-I} 鼠李半乳糖醛酸聚糖裂解酶 BT4170, 属于 PL9 家族, 以前认为该家族仅含有聚半乳糖醛酸裂解酶. BT4170 位于细胞表面, 可作用于 RG-I 主链裂解产生不饱和多糖, 对于 *B. thetaiotaomicron* 的果胶利用至关重要. 结构比对显示, BT4170 (PDB ID: 5OLR) 具有在 PL9 家族中高度保守的碱催化基团 Lys285 与 Ca^{2+} 结合位点, 并且该酶具有仅存在于聚半乳糖醛酸裂解酶中的、对其催化活性十分关键的第二个 Ca^{2+} 结合位点. 与其他 PL9 家族的酶相比, BT4170 在离活性位点较远的底物识别残基保守性较低, 是其底物特异性区别于传统 PL 家族酶的主要因素.

Munoz-Munoz 等^[47]从 *B. thetaiotaomicron*、*B. cellulosilyticus* 和 芬氏拟杆菌 (*Bacteroides finegoldii*) 中鉴定到了 3 个多糖裂解酶 BT0263、BACCELL_00875 和 BACFIN_07013, 属于新的 PL27 家族. 该家族是外切作用酶, 可水解位于 AGPs 侧链末端的 L-Rha- α -1,4-D-GlcA 糖苷键, 释放出游离的鼠李糖. 与另两个酶相比, BT0263 的 N 端缺少约 200 个氨基酸, 该片段对于 BT0263 的酶

活性并不影响, 猜测其可能起到稳定结构的作用. 仅获得的 BACCELL_00875 (PDB ID: 5NO8) 的结构显示, 其 N 端 27~336 包含两个 β 三明治型结构域; C 端 337~694 显示为 $(\alpha/\alpha)_6$ 桶型构象, 活性位点位于桶型结构中心一个很深的口袋中, 由一个活性环封闭口袋, 该活性环的构象由一对 Arg-Glu 盐桥和四个芳香族氨基酸形成的疏水相互作用稳定. PL27 家族裂解酶采取 β -消除机制, 绝大多数以 Tyr (少数以 His) 作为酸/碱催化基团. 该研究展示了如何以复杂多糖为底物来发现肠道微生物系统中的新家族碳水化合物酶, 为阐明人体肠道的 AGPs 代谢的分子机制提供了新的见解, 有助于以益生菌和益生元为基础的新型食品/饮食方案的开发.

4 碳水化合物酯酶

4.1 碳水化合物酯酶的定义及催化机制

碳水化合物酯酶是通过催化酯键的水解反应脱除碳水化合物分子 O 或 N 酰化修饰的酶^[48]. 常见的 CE 催化机制是丝氨酸亲核攻击反应, 类似于经典脂肪酶和丝氨酸蛋白酶的作用^[49]. 该机制通过

催化三联体 (Ser-His-Asp) 间的质子传递使 Ser 的负电氧原子攻击底物羰基碳原子, 从而打开 C=O 键形成四面体过渡态, 后在水分子参与下完成水解过程 (图 10a)。

部分 CEs 家族成员的催化机制为 Zn^{2+} 或 Co^{2+} 等

金属离子催化的脱乙酰化反应^[48]。如 CE4 家族乙酰木聚糖酯酶 (AcXEs), 二价金属 Co^{2+} 与 Asp 和 His 残基配位承担催化碱的作用, 进而激活水分子作为亲核基团攻击底物酯键 (图 10b)。

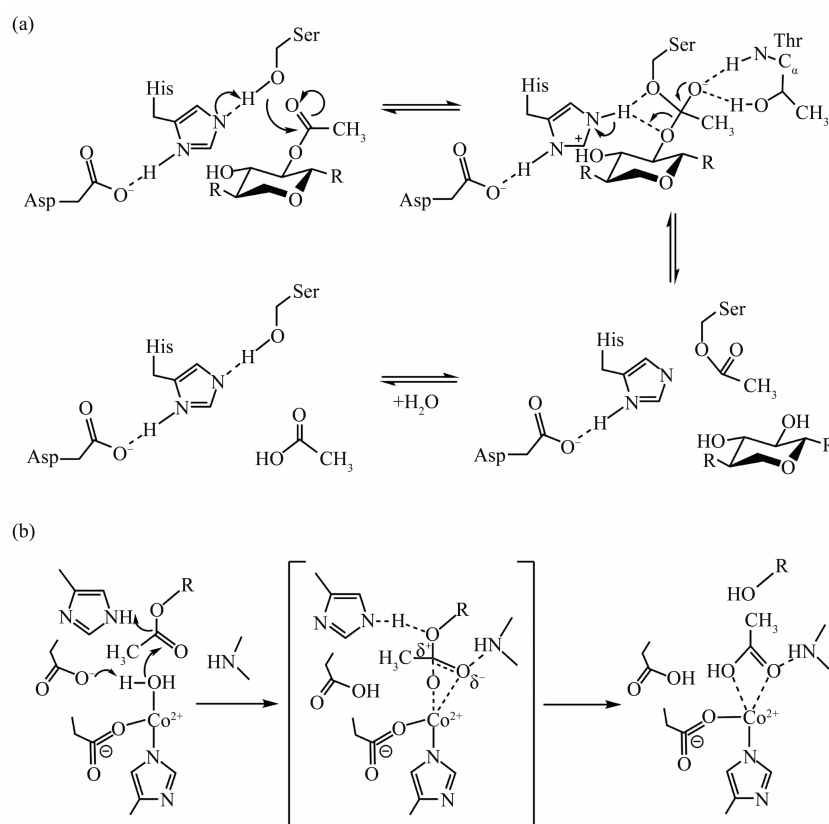


Fig. 10 Catalytic mechanism of carbohydrate esterases

图10 碳水化合物酯酶催化机制

(a) 三联体催化 (Ser-His-Asp) 机制. (b) 金属离子催化 (Co^{2+}) 机制.

4.2 肠道菌群来源的新型碳水化合物酯酶

β -甘露聚糖广泛存在于人类和动物饮食中, 是加工食品中增稠剂和稳定剂的主要成分. 从 β -甘露聚糖上去除乙酰基是肠道菌有效利用这种聚糖作为碳源的关键步骤. Michalak 等^[50]研究了来自肠道厚壁菌门中罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia intestinalis*) 的两种碳水化合物酯酶 *RiCE2* 和 *RiCE17*. *RiCE17* 特异性去除寡糖中甘露糖残基上的 2-O-乙酰化, 而 *RiCE2* 对 3-O-、4-O- 和 6-O-乙酰基均具有活性, *RiCE2* 的活性依赖于 *RiCE17* 的脱 2-O-乙酰化能力, 二者可协同作用, 共同使复杂的半乳糖甘露聚糖 (galactoglucomannan, GGM) 去乙酰化. *RiCE17* 与已表征酯酶的序列同源性较低 (<20%), 且与传

统的 CE2 家族不同, 其 SGNH 结构域位于 N 端, 而 C 端结构域的活性难以通过 InterProScan 预测, 表明其是一个特殊的酯酶. 结构 (*RiCE17*, PDB ID: 6HFZ; *RiCE17*-甘露五糖复合物, PDB ID: 6HH9) 显示, *RiCE17* 具有独特的两结构域 (图 11): N 端的 SGNH 水解酶折叠结构域和 C 端的 β 三明治型 CBM35 结构域. CBM35 在 SGNH 结构域的活性位点上形成了一个盖子区, 参与了底物的识别结合. CBM35 和 SGNH 结构域上的氨基酸与底物甘露五糖形成特定的相互作用使 C2-OH 靠近亲核中心 Ser41 和氧离子洞, 这解释了 *RiCE17* 的特异性脱 2-O-乙酰化作用机制. 该研究为理解肠道厚壁菌门在膳食纤维利用中的重要作用提供了新的认识.

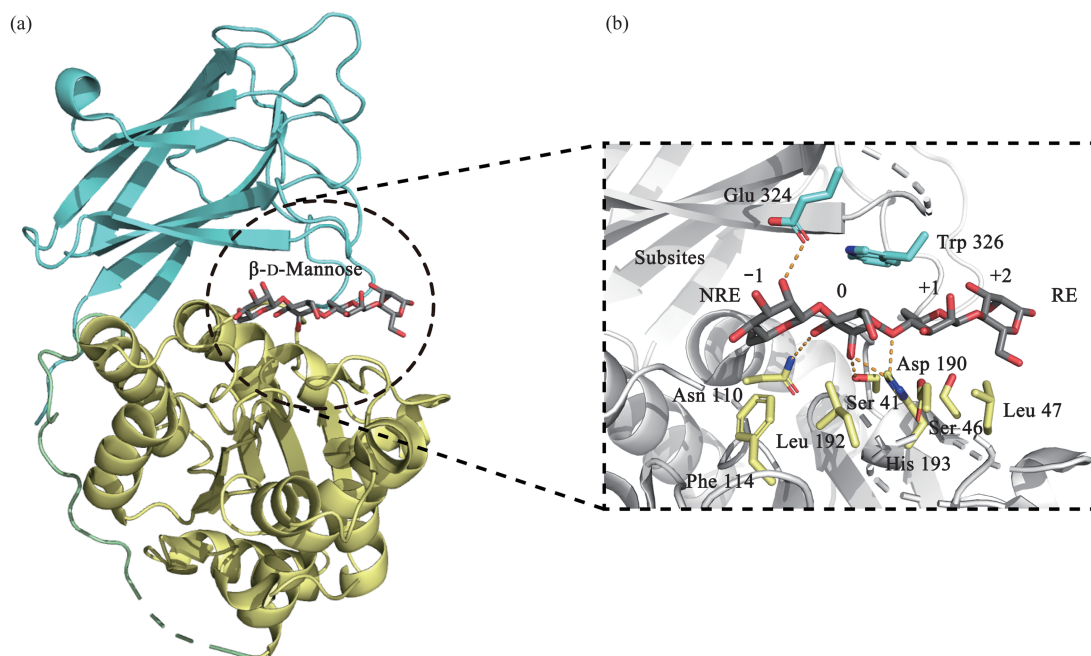


Fig. 11 Crystal structure of acetylesterase (*RiCE17*)

图11 乙酰酯酶 (*RiCE17*) 晶体结构

(a) *RiCE17* 的结构以飘带图展示, SGNH催化结构域(黄色)通过一段连接区域(绿色)连接到CBM35结构域(青色), 活性中心处结合的底物 β -D-甘露糖展示为洋红色棒状。(b) 几个带电/极性氨基酸与甘露五糖形成氢键相互作用(橙色虚线), 非还原端(NRE)、还原端(RE)及亚位点(-1、0、+1和+2)标记在甘露糖周围。

Boraston 等^[51]报道了来自人类小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)的CE8家族A型果胶甲酯酶 $YeCE8$, 该酶可以催化果胶中甲酯化GalA的去甲基化和脱甲酯化反应。晶体结构研究显示^[48, 51], $YeCE8$ (PDB ID: 3UW0)具有A型果胶甲酯酶保守的右旋 β 螺旋折叠构象, 其活性中心位于蛋白质表面的一个裂缝中(图12a), 相对开放的裂缝使其对底物的甲基化位点具有更好的可及性, 对于较大聚合度的底物具有催化作用。 $YeCE8$ 的催化三联体由严格保守的Gln176、Asp177和Asp199构成(图12b), Asp177作为亲核基团与底物分子的氧原子(O6)位于合理的氢键距离范围内, 是其发挥催化活性的分子基础, 肠道中果胶甲酯酶的存在也暗示了果胶的代谢对于人体健康的重要作用。

Wefers 等^[53]报道了结肠细菌小肠拟杆菌(*Bacteroides intestinalis*)来源的两种酯酶 $BiFae1A$ 、 $BiFae1B$, 两种酶均可作用于阿拉伯木聚糖侧链上的阿魏酸酯键, 水解释放阿魏酸。相比于乙酰化底物, 两酶均对阿魏酸酯化的底物有更高的选择性, 且能够将多种阿魏酰阿拉伯木聚糖/低

聚糖完全去酯化。生化分析及结构研究(图13)显示, $BiFae1A$ (PDB ID: 5VOL)仅含有一个CE1结构域, 相比其他同源蛋白质结构, 其活性中心还含有一个柔性的环状结构, 该柔性环区域覆盖了活性位点, 存在很大的结构可变性, 可能对底物具有更好的可及性。 $BiFae1B$ 包含两个CE1结构域(CE1A、CE1B), 此外推测还含有其他糖苷酶活性区域。该酶的晶体结构尚未被解析, 序列分析显示, 这两个结构域与同源蛋白质的序列一致性均较低, 且没有对应于类似结构中柔性环等区域的序列。在 $BiFae1B$ CE1A和CE1B结构域活性位点附近中均具有额外的非保守插入片段, 这些片段可能会影响底物结合口袋的大小。此外, 两种酶与底物的相互作用均比较弱, 这可能是其具有广谱底物催化作用的分子基础。肠道中阿魏酸酯酶的存在可促进其对阿拉伯木聚糖侧链阿魏酸的降解, 进而影响对膳食纤维的利用, 对营养物质代谢和人体健康保持具有重要意义。

Martim 等^[54]在大肠杆菌中重组表达了两个来自肠杆菌属分散泛菌(*Pantoea dispersa*)的新型乙酰酯酶Est-1和Est-2, 二者的序列同源性较低。酶

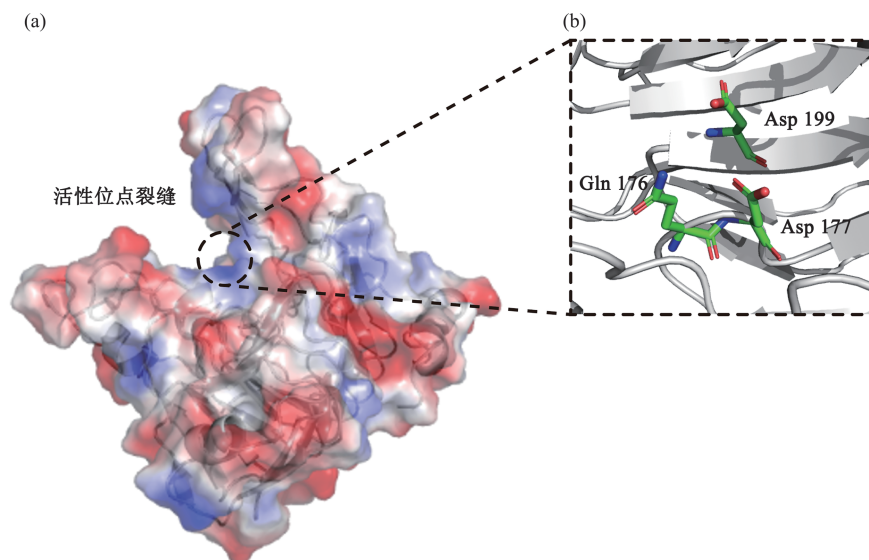


Fig. 12 Crystal structure of pectin methylesterase (YeCE8)

图12 果胶甲酯酶 (YeCE8) 晶体结构

(a) 图中显示 YeCE8 的三维结构，表面静电势分布使用 APBS 和 PDB2PQR 计算分析^[52] (蓝色为正电性，红色为负电性)。 (b) 绿色棍状模型展示催化三联体氨基酸。

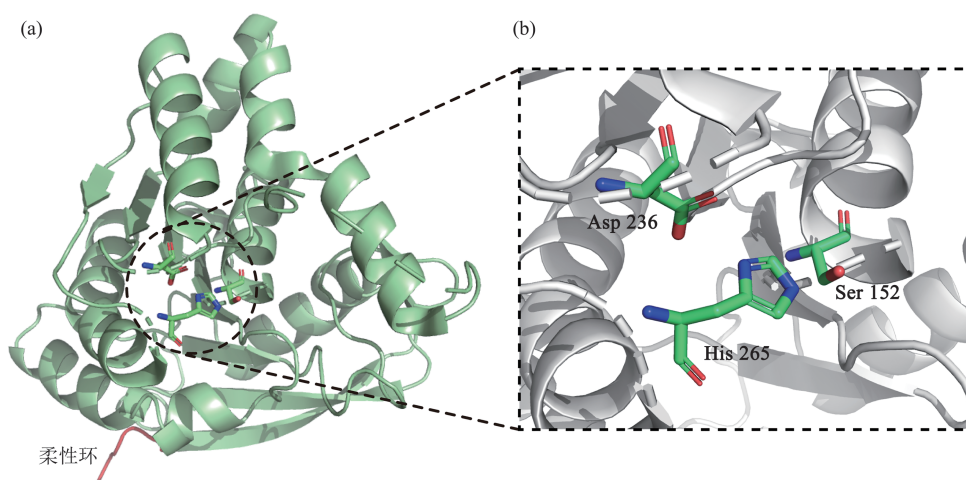


Fig. 13 Crystal structure of feruloyl esterase (BiFae1A)

图13 阿魏酸酯酶 (BiFae1A) 晶体结构

(a) BiFae1A 的结构以飘带图展示，柔性环区域突出显示为红色。 (b) 阿魏酸酯酶催化结构域关键催化三联体氨基酸 (绿色棒状)。

学分析显示，Est-1 和 Est-2 的最适温度分别为 40°C 和 50°C，最适 pH 均为 7.0，均对对硝基苯基乙酸酯 (*p*-nitrophenyl acetate, *p*NPA) 具有很高的酶催化活力 (k_{cat}/K_m 值分别为 $2.92 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 $8.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)。二者可使果胶和木聚糖脱乙酰化，并对果胶具有更高的催化活性。

Kmezic 等^[55] 研究了肠道 *B. ovatus* 来源的双功

能酯酶 BACOVA_03435，其包含两个不同的碳水化合物酯酶结构域：N 端的 CE6 结构域具有乙酰木聚糖酯酶活性，C 端的 CE1 结构域表现为阿魏酸酯酶活性。研究表明，CE1 结构域对木寡糖 (xylose, XO) 的产生几乎不发挥任何作用，CE6 结构域的脱乙酰作用可促进 Xyn11A 将从底物中释放的三糖和四糖部分进一步水解为低聚合度的 XO，BoCE6-

CE1 两个催化结构域之间能够协同作用显著增强木聚糖酶 Xyn11A 对玉米芯和山毛榉中木聚糖的水解, 分别将水解效率有效提高 75% 和 10 倍, 该研究首次证明了同一条多肽链上不同 CE 催化结构域之间的协同作用. 此类双功能酶是改善生物质有效降解的重要工具, 为纸浆和造纸、饲料和食品工业等多种生物物质的高效转化和应用提供了思路.

5 辅助氧化还原酶

5.1 辅助氧化还原酶的定义

辅助氧化还原酶是协同碳水化合物活性酶降解

底物的氧化还原酶, 目前被分为 10 个家族, 其中 AA1、AA3 和 AA5 还包含不同的亚家族^[56]. 辅助氧化还原酶具有不同的催化机制特异性, 其催化过程通常伴有金属离子参与, 如漆酶的催化过程^[57-58]伴有 Cu^{2+} 参与, 利用 Cu^{2+} 特有的氧化还原能力氧化酚类和芳香类化合物, 同时将分子氧还原成水 (图 14a); 木质素过氧化物酶的催化过程^[58]伴有 Fe^{2+} 参与, 利用过氧化氢以及其他有机过氧化物催化 C-C 键和醚键的氧化裂解 (图 14b); 锰过氧化物酶的催化过程^[58-59]伴有 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 共同参与, 形成稳定的氧化还原电势进而氧化酚类和有机酸 (图 14c).

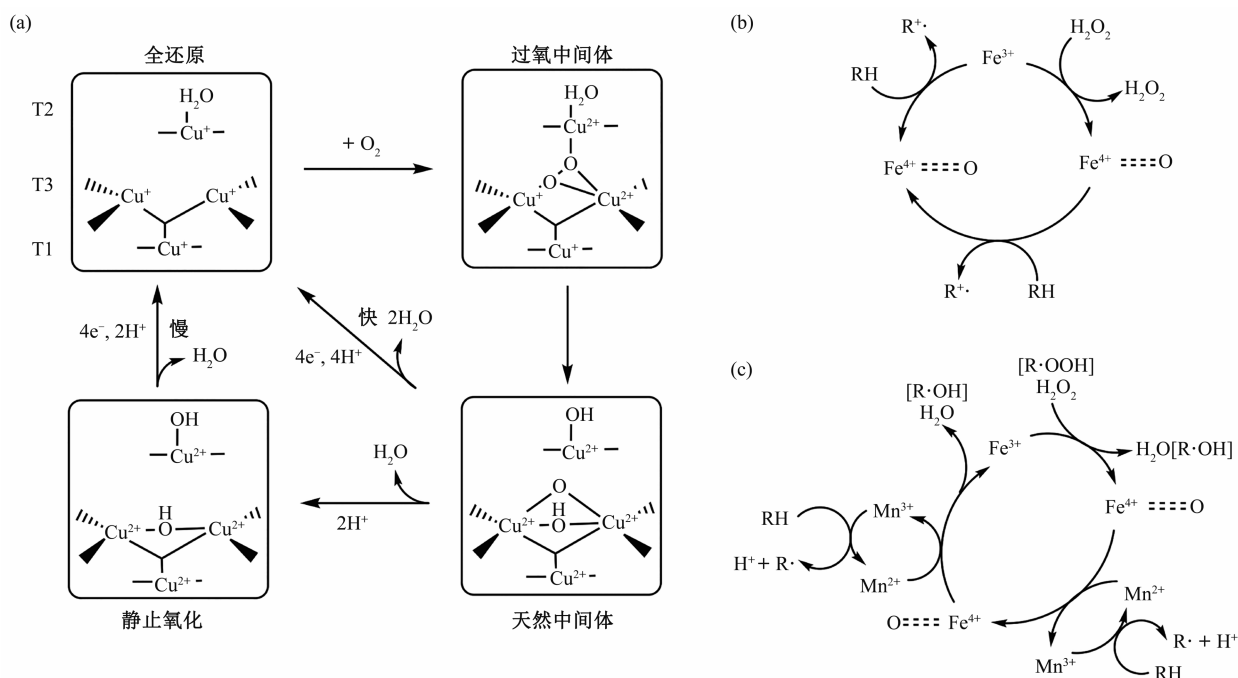


Fig. 14 Catalytic mechanism of auxiliary activities

图14 辅助氧化还原酶催化机制

(a) 典型漆酶催化机制. (b) 典型木质素过氧化物酶催化机制. (c) 典型锰过氧化物酶催化机制.

5.2 肠道菌群来源的新型辅助氧化还原酶

Mishra 等^[60]证实 *B. thetaiotaomicron* 来源的 4 种过氧化物酶 (rubrerythrin 1、rubrerythrin 2、AhpCF、catalase E) 在体内的协同催化功能. 具体表现为, 在厌氧条件下, rubrerythrin 1 和 2 具有显著活力; 在空气暴露条件下, rubrerythrin 1 和 2 迅速失去活力, 而 AhpCF 和 catalase E 则由于向细胞中通入大量溶解氧从而诱导产生足够的 NADH, 使之仍然能够承担过氧化物酶功能. AhpCF 是

NADH 依赖型过氧化物酶, 其可高效降解低浓度双氧水; catalase E 则可以快速降解高浓度双氧水. 目前尚未见肠道微生物来源过氧化物酶直接参与碳水化合物降解的研究报道, 然而分析预测肠道微生物来源多糖利用基因座可见大量潜在的辅助氧化还原酶编码存在.

6 展 望

目前, 针对人体肠道微生物来源 CAZymes 的

挖掘表达, 催化特性表征和催化机制解析等工作已取得卓有成效的研究进展. 其中, 以植物果胶中RG-II和硫酸乙酰肝素水解酶系为代表的酶系发现, 为体外降解利用生物质提供了新的工具; 以福斯曼糖脂合成酶系为代表的酶功能挖掘, 为体外高效合成高纯度医药材料提供了新的思路; 以 β -L-吡喃阿拉伯糖苷酶/ α -D-吡喃半乳糖苷酶(BT3661)双功能水解酶和新型果胶甲酯酶(YeCE8)为代表的酶结构解析, 为传统酶家族的认知提供了理论补充. 随着研究的逐渐深入, 越来越多的新型CAZymes不断被发现. 然而, 已解析人体肠道菌群来源的CAZymes与已解析的人体肠道菌群基因组数据间仍存在巨大的数量差异, 人体肠道菌群将作为最富有潜力的微生物资源库用于新酶和好酶的挖掘. 近期, 基于三代全长转录组测序技术和生物信息数据挖掘技术, 以多糖利用基因座为对象的CAZymes基因聚类测绘和协同功能分析极大地推动了人体肠道菌群编码酶的高效挖掘和性质表征研究. 在未来的研究工作中, 进一步结合人体肠道菌群宏基因组、宏蛋白质组学等多组学联合研究, 挖掘肠道菌群编码的全酶系、建立肠道酶库, 将为我国乃至世界范围内的肠道酶研究奠定基础. 肠道菌群作为连接食品和人体之间的重要桥梁, 其实现对底物分解及对宿主代谢调控的本质是其基因组所编码酶的特异性催化. 因此, 针对不同食品组分(碳水化合物类、蛋白质类及脂类等)乃至其他底物, 明确肠道菌群中特异性响应的菌种和酶; 进而联合酶动力学、结构生物学与生物信息学等研究方法, 阐明不同酶的基本酶学性质、底物识别和催化机制、多酶之间的协作机制等, 系统解析肠道菌群对食品组分的分子转化机制具有重要的研究意义. 此外, 基于以上研究, 将关键酶拟合于物质代谢通路的关键节点, 绘制中国人体肠道菌群酶解特异食品组分(碳水化合物类、蛋白质类及脂类等)的关系图谱, 将为指导靶向作用于肠道酶的精准营养/医疗调控及新酶开发提供科学依据. 综上所述, 广泛挖掘肠道菌群编码酶系并精准把握酶的分子转化机制, 建立基于肠道酶的精准营养/医疗体系具有更加特异、精准的核心优势, 将成为一个全新的、更有潜力的发展方向.

参 考 文 献

- [1] 李佳帅, 唐强, 朱路文, 等. 肠道菌群功能及其与运动的相关性研究进展. 中国康复理论与实践, 2018, **24**(12): 64-67
- [2] Li J S, Tang Q, Zhu L W, *et al.* Chinese Rehabilitation Theory and Practice, 2018, **24**(12): 64-67
- [3] 赵玉爽, 郑松柏. 肠道菌群演替及其影响因素研究进展. 实用老年医学, 2018, **32**(5): 403-407
- [4] Zhao Y S, Zheng S B. Practical Geriatrics, 2018, **32**(5): 403-407
- [5] 翟齐啸, 田丰伟, 王刚, 等. 肠道微生物与人体健康的研究进展. 食品科学, 2013, **34**(15): 337-341
- [6] Zhai Q X, Tian F W, Wang G, *et al.* Food Science, 2013, **34**(15): 337-341
- [7] Seo Y S, Lee H B, Kim Y, *et al.* Dietary carbohydrate constituents related to gut dysbiosis and health. Microorganisms, 2020, **8**(3): 427
- [8] Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. The FEBS Journal, 2020, **287**(5): 833-855
- [9] Cockburn D W, Koropatkin N M. Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. Journal of Molecular Biology, 2016, **428**(16): 3230-3252
- [10] Luis A S, Martens E C. Interrogating gut bacterial genomes for discovery of novel carbohydrate degrading enzymes. Current Opinion in Chemical Biology, 2018, **47**: 126-133
- [11] Koshland D E, Jr. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. Biological Reviews, 2008, **28**(4): 416-436
- [12] McCarter J D, Stephen Withers G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Current Opinion in Structural Biology, 1994, **4**(6): 885-892
- [13] McIntosh L P, Hand G, Johnson P E, *et al.* The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a ¹³C-NMR study of bacillus circulans xylanase. Biochemistry, 1996, **35**(31): 9958-9966
- [14] Luis A S, Briggs J, Zhang X, *et al.* Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides. Nature Microbiology, 2018, **3**(2): 210-219
- [15] Ndeh D, Gilbert H J. Biochemistry of complex glycan depolymerisation by the human gut microbiota. FEMS Microbiology Reviews, 2018, **42**(2): 146-164
- [16] Ndeh D, Rogowski A, Cartmell A, *et al.* Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. Nature, 2017, **544**(7648): 65-70
- [17] Labourel A, Baslé A, Munoz-Munoz J, *et al.* Structural and functional analyses of glycoside hydrolase 138 enzymes targeting chain A galacturonic acid in the complex pectin rhamnogalacturonan II. Journal of Biological Chemistry, 2019, **294**(19): 7711-7721
- [18] Kitamura M, Okuyama M, Tanzawa F, *et al.* Structural and functional analysis of a glycoside hydrolase family 97 enzyme from Bacteroides thetaiotaomicron. The Journal of biological chemistry, 2008, **283**(52): 36328-36337
- [19] Okuyama M, Kitamura M, Hondoh H, *et al.* Catalytic mechanism of retaining α -galactosidase belonging to glycoside hydrolase family 97. Journal of Molecular Biology, 2009, **392**(5): 1232-1241
- [20] Shin Y J, Woo S H, Jeong H M, *et al.* Characterization of novel α -

- galactosidase in glycohydrolase family 97 from *Bacteroides thetaiotaomicron* and its immobilization for industrial application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 152: 727-734
- [18] Kikuchi A, Okuyama M, Kato K, *et al.* A novel glycoside hydrolase family 97 enzyme: Bifunctional beta-l-arabinopyranosidase/alpha-galactosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biochimie*, 2017, 142: 41-50
- [19] Rogowski A, Briggs J A, Mortimer J C, *et al.* Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nature Communications*, 2015, 6: 7481-7481
- [20] Armstrong Z, Davies G J. Structure and function of Bs164 beta-mannosidase from *Bacteroides salyersiae* the founding member of glycoside hydrolase family GH164. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, **295**(13): 4316-4326
- [21] 李彬春, 吉亚茹, 李艳琴, *et al.* 多形拟杆菌 α -L-鼠李糖苷酶序列分析与酶学性质. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, **33**(4): 391-399
- Li B C, Ji Y R, Li Y Q, *et al.* *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, **33**(4): 391-399
- [22] Munoz-Munoz J, Cartmell A, Terrapon N, *et al.* Unusual active site location and catalytic apparatus in a glycoside hydrolase family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(19): 4936-4941
- [23] Ashida H, Tanigawa K, Kiyohara M, *et al.* Bifunctional properties and characterization of a novel sialidase with esterase activity from *Bifidobacterium bifidum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, **82**(11): 2030-2039
- [24] Katoh T, Ojima M N, Sakanaka M, *et al.* Enzymatic adaptation of *bifidobacterium bifidum* to host glycans, viewed from glycoside hydrolyases and carbohydrate-binding modules. *Microorganisms*, 2020, **8**(4): 481
- [25] Kiyohara M, Tanigawa K, Chaiwangsri T, *et al.* An α -sialidase from *bifidobacteria* involved in the degradation of sialyloligosaccharides in human milk and intestinal glycoconjugates. *Glycobiology*, 2010, **21**(4): 437-447
- [26] 刘凡. 多样性导向糖基转移酶的结构生物学研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2017
- Liu F. *Structural biology research of diversity-oriented glycosyltransferases*[D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2017
- [27] Lairson L L, Henrissat B, Davies G J, *et al.* Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77: 521-555
- [28] Krupička M, Tvaroška I. Hybrid quantum mechanical/molecular mechanical investigation of the β -1, 4-galactosyltransferase-I mechanism. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2009, **113**(32): 11314-11319
- [29] Kozmon S, Tvaroška I. Catalytic mechanism of glycosyltransferases: hybrid quantum mechanical/molecular mechanical study of the inverting N-acetylglucosaminyltransferase I. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**(51): 16921-16927
- [30] Soya N, Fang Y, Palcic M M, *et al.* Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2011, **21**(5): 547-552
- [31] Rojas-Cervellera V, Ardevol A, Boero M, *et al.* Formation of a covalent glycosyl-enzyme species in a retaining glycosyltransferase. *Chemistry*, 2013, **19**(42): 14018-14023
- [32] Tvaroška I. Atomistic insight into the catalytic mechanism of glycosyltransferases by combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods. *Carbohydrate Research*, 2015, 403: 38-47
- [33] Lee S S, Hong S Y, Errey J C, *et al.* Mechanistic evidence for a front-side, S_Ni-type reaction in a retaining glycosyltransferase. *Nature Chemical Biology*, 2011, **7**(9): 631-638
- [34] Monegal A, Planas A. Chemical rescue of α 3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**(50): 16030-16031
- [35] Errey J C, Lee S S, Gibson R P, *et al.* Mechanistic insight into enzymatic glycosyl transfer with retention of configuration through analysis of glycomimetic inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**(7): 1234-1237
- [36] Gómez H, Polyak I, Thiel W, *et al.* Retaining glycosyltransferase mechanism studied by QM/MM methods: lipopolysaccharyl- α -1, 4-galactosyltransferase C transfers α -galactose via an oxocarbenium ion-like transition state. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**(10): 4743-4752
- [37] Bokhari H, Maryam A, Shahid R, *et al.* Oligosaccharyltransferase PglB of *Campylobacter jejuni* is a glycoprotein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, **36**(1): 9
- [38] Houliston R S, Bernatchez S, Karwaski M F, *et al.* Complete chemoenzymatic synthesis of the Forssman antigen using novel glycosyltransferases identified in *Campylobacter jejuni* and *Pasteurella multocida*. *Glycobiology*, 2009, **19**(2): 153-159
- [39] Pham T T, Stinson B, Thiagarajan N, *et al.* Structures of complexes of a metal-independent glycosyltransferase GT6 from *Bacteroides ovatus* with UDP-N-acetylgalactosamine (UDP-GalNAc) and its hydrolysis products. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(12): 8041-8050
- [40] Thiagarajan N, Pham T T K, Stinson B, *et al.* Structure of a metal-independent bacterial glycosyltransferase that catalyzes the synthesis of histo-blood group A antigen. *Scientific Reports*, 2012, **2**(1): 940
- [41] Ost G S, Wirth C, Bogdanovic X, *et al.* Inverse control of Rab proteins by Yersinia ADP-ribosyltransferase and glycosyltransferase related to clostridial glucosylating toxins. *Sci Adv*, 2020, **6**(11): eaaz2094
- [42] Dong C, Li D, Wang R, *et al.* Expression, purification, and characterization of a new Glucosyltransferase involved in the third step of O-antigen repeating-unit biosynthesis of *Escherichia coli* O152. *Glycoconjugate Journal*, 2020, **37**(2): 139-149
- [43] Lombard V, Bernard T, Rancurel C, *et al.* A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics.

- Biochemical Journal, 2010, **432**(3): 437-444
- [44] Cartmell A, Lowe E C, Baslé A, *et al.* How members of the human gut microbiota overcome the sulfation problem posed by glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(27): 7037
- [45] Ndeh D, Baslé A, Strahl H, *et al.* Metabolism of multiple glycosaminoglycans by *Bacteroides thetaiotaomicron* is orchestrated by a versatile core genetic locus. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 646
- [46] Stender E G P, Dybdahl Andersen C, Fredslund F, *et al.* Structural and functional aspects of mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, **294**(47): 17915-17930
- [47] Munoz-Munoz J, Cartmell A, Terrapon N, *et al.* An evolutionarily distinct family of polysaccharide lyases removes rhamnose capping of complex arabinogalactan proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(32): 13271-13283
- [48] Nakamura A M, Nascimento A S, Polikarpov I. Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017, **1**(1): 35-51
- [49] Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 2012, **30**(6): 1575-1588
- [50] Michalak L, La Rosa S L, Leivers S, *et al.* A pair of esterases from a commensal gut bacterium remove acetylations from all positions on complex β -mannans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(13): 7122-7130
- [51] Boraston A B, Abbott D W. Structure of a pectin methylesterase from *Yersinia enterocolitica*. *Acta Crystallographica Section F*, 2012, **68**(2): 129-133
- [52] Unni S, Huang Y, Hanson R M, *et al.* Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *Journal of Computational Chemistry*, 2011, **32**(7): 1488-1491
- [53] Wefers D, Cavalcante J J V, Schendel R R, *et al.* Biochemical and structural analyses of two cryptic esterases in *Bacteroides intestinalis* and their synergistic activities with cognate xylanases. *Journal of Molecular Biology*, 2017, **429**(16): 2509-2527
- [54] Martim D B, Barbosa-Tessmann I P. Two novel acetyl esterases from *Pantoea dispersa*: recombinant expression, purification, and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, **189**(3): 834-854
- [55] Kmezik C, Bonzom C, Olsson L, *et al.* Multimodular fused acetyl – feruloyl esterases from soil and gut *Bacteroidetes* improve xylanase depolymerization of recalcitrant biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, **13**(1): 60
- [56] Levasseur A, Drula E, Lombard V, *et al.* Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, **6**(1): 41
- [57] 刘忠川, 王刚刚. 真菌漆酶结构与功能研究进展. *生物物理学报*, 2013, **29**(9): 629-645
- Liu Z C, Wang G G. *Journal of Biophysics*, 2013, **29**(9): 629-645
- [58] 张丽华, 蒋俊峰, 田丽萍, 等. 过氧化物酶催化聚合的应用进展. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2016, **32**(5): 41-45
- Zhang L H, Jiang J F, Tian L P, *et al.* *Journal of Shanxi Datong University (Natural Science Edition)*, 2016, **32**(5): 41-45
- [59] 王娇. 锰过氧化物酶基因在毕赤酵母中的表达及其降解玉米秸秆中木质素能力的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014
- Wang J. Expression of Manganese Peroxidase Gene in *Pichia Yeast* and Its Ability to Degrade Lignin in Maize Straw[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014
- [60] Mishra S, Imlay J A. An anaerobic bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, uses a consortium of enzymes to scavenge hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*, 2013, **90**(6): 1356-1371

Research Progress on Carbohydrate Active Enzymes (CAZymes) Derived From Human Gut Microbiota*

ZHANG Hao-Wen**, CAO Hao**, WANG Yu-Lu***, XIN Feng-Jiao***

(Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract The human gut microbiota is a metabolic organ that plays an essential role in human health and disease. The molecular mechanisms of its involvement in processes such as host food digestion, immunity and brain function are the synergistic coupling of specific metabolic pathways between microorganism and human. Enzymes are the basic functional units that involved in the transformation of substances in the metabolic pathways. An in-depth look into the catalytic mechanisms of the enzymes encoded by human gut microbiota will provide a theoretical framework for exploring the interventions of precision nutrition and medicine targeting the human gut microbiota (or intestinal enzymes). Studies on enzymatic hydrolysis of specific substrates have shown that the human gut microbiota not only encodes all known families of carbohydrate active enzymes (CAZymes), but also contains plenty of the potentially novel CAZymes. This paper describes the principles of classification and catalytic properties of CAZymes, and mainly reviews the research progresses on the crystal structures of novel CAZymes derived from the human gut microbiota.

Key words human gut microbiota, glycoside hydrolases, glycosyltransferases, polysaccharide lyases, carbohydrate esterases, auxiliary activities

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0059

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31801475) and China Postdoctoral Science Foundation (2018M630230).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

XIN Feng-Jiao. Tel: 86-10-62815873, E-mail: 2002hongzhi30@163.com

WANG Yu-Lu. Tel: 86-10-62893472, E-mail: wnewyx@163.com

Received: March 10, 2020 Accepted: June 10, 2020