

综述



李春, 清华大学长聘教授, 博士生导师, 国家杰出青年科学基金获得者。长期从事代谢工程与合成生物学、生物催化与酶工程的研究, 聚焦甘草萜烯类和黄酮类天然产物的酶转化与微生物合成、工业菌种智能抗逆分子设计与工程应用。在*Metabolic Eng*、*ACS Synth Biol*、*ACS Catal*、*ACS Energ Lett*、*Nat Commun*、*AIChE J*、*Chem Eng Sci*、*J Biol Chem*、*Appl Environ Microbiol*、*J Phys Chem Lett*等期刊发表论文400余篇, 获授权发明专利40项, 获省部级科技成果奖5项。国务院政府特殊津贴专家, 全国“生物工程学”首席科学传播专家, 获“侯德榜化工科技创新奖”。编著教材和专著11部章, 其中主编的《合成生物学》和《生物工程与技术导论》已成为高校广泛使用的教材。现担任中国生物工程学会合成生物学专委会副主任、中国化工学会生物化工专委会副主任。担任《合成生物学》期刊执行主编, *Front Bioeng Biotech* 副主编, *Synth Systems Biotech*和《化工进展》《催化学报》《过程工程学报》等多个期刊编委。

生物催化天然产物的糖基改构与进展

杨谦¹, 邢登雪¹, 秦磊^{2,3*}, 李春^{1,2,3*}

¹石河子大学化学化工学院/化工绿色过程省部共建国家重点实验室培育基地, 石河子 832003;

²北京理工大学化学与化工学院生物化工研究所/医药分子科学与制剂工信部重点实验室, 北京 100081;

³清华大学化学工程系工业生物催化教育部重点实验室, 北京 100084)

摘要: 糖基改构是一种十分重要且独特的天然产物结构修饰方式, 能有效改善天然产物的水溶性、稳定性及药理活性, 在自然界中由相关的糖基转移酶(glycosyltransferases, GTs)催化完成。植物天然产物的糖基改构主要通过尿苷二磷酸糖基转移酶(uridine diphosphate glycosyltransferases, UGTs)实现, 然而大多数UGTs的催化活性、稳定性、底物特异性、区域选择性较低, 难以满足工业催化要求。本文综述了发生糖基化天然产物的种类及其相关糖基转移酶的分类、挖掘、表征、改造, 为开展提高UGTs催化效率的研究提供参考。

关键词: UDP-糖基转移酶; 天然产物; 糖基化修饰; 生物催化

Research progress of glycosylation modification and biocatalytic natural products

YANG Qian¹, XING Dengxue¹, QIN Lei^{2,3*}, LI Chun^{1,2,3*}

¹School of Chemistry and Chemical Engineering/State Key Laboratory Incubation Base for Green Processing of Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China; ²Key Laboratory of Medical Molecule Science and Pharmaceutics Engineering, Ministry of Industry and Information Technology, Institute of Biochemical Engineering, School of Chemistry

收稿日期: 2024-04-29

基金项目: 国家自然科学基金(22138006, 22108154)

第一作者: E-mail: 547592564@qq.com

*通信作者: 秦磊, E-mail: qinleithu@tsinghua.edu.cn; 李春, E-mail: lichun@tsinghua.edu.cn

and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China;

³Key Laboratory of Industrial Biocatalysis, Ministry of Education, Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Glycosyl modification is a very important and unique natural product structure modification method, which can effectively improve the water solubility, stability, and pharmacological activity of natural products. In nature, it is catalyzed by related glycosyltransferases (GTs). The glycosylation modification of natural plant products is mainly achieved through uridine diphosphate glycosyltransferases (UGTs). However, the catalytic activity, stability, substrate specificity, and regional selectivity of most UGTs are low, making it difficult to meet industrial catalytic requirements. This paper reviews the types of natural products that undergo glycosylation and the classification, excavation, characterization, and modification of related glycosyltransferases, providing reference for research on improving the catalytic efficiency of UGTs.

Key Words: UDP glycosyltransferase; natural product; glycosylation modification; biocatalysis

天然产物是由动物、植物及海洋生物和微生物体内分离出来的次级代谢产物及生物体内源性生理活性化合物^[1]。独特的化学结构使天然产物具有多种独特的药理活性,尤其是植物次级代谢产物,因具有抗凝血、抗疟疾、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗炎等生理活性,而被应用于药品、营养品和化妆品的生产^[2],如黄花蒿茎叶中的青蒿素^[3]、甘草中的甘草酸^[4]、柴胡根中的柴胡皂苷^[5]等。然而,未经修饰的天然产物利用率较低,目前通常利用糖基化、羟基化、甲基化、乙酰化等多种方式来提高天然产物结构的复杂性和多样性。糖基化反应是各种修饰方式中应用最广泛的化学反应,参与了调节激素的动态平衡、外源物质的解毒以及次生代谢物的生物合成和储存等多种功能^[6],可以改变化合物的稳定性、溶解性和生物活性等^[7]。本文综述了生物催化天然产物糖基改构过程中糖基转移酶的挖掘、表征和改造以及糖基化产物的应用。

1 糖基化天然产物的种类与生理作用

天然产物的糖基化修饰通常可以有效改善其理化活性,尤其在改善溶解度和提高稳定性等方面效果显著^[8]。

1.1 糖基化天然产物的种类

植物天然产物以结构分类可分为萜烯类、黄酮类、生物碱和酚酸等^[9]。在植物中,几乎所有主要类别的次级代谢物都可以被糖基化,糖基化修饰

可以促使天然产物化学结构更加丰富。萜烯类化合物是最大的一类天然产物,其中包含大量糖基化天然产物。Zhao等^[10]挖掘到的糖基转移酶UGT91Q2催化橙花叔醇糖基化得到的橙花叔醇糖苷即为一种倍半萜烯类化合物。生物碱是一种天然存在的含氮碱性化合物,番茄中检测到的糖基化产物 α -番茄碱即为甾体类生物碱^[11]。淫羊藿中黄酮醇经糖基化修饰得到结构多样的黄酮醇苷,属于黄酮类化合物^[12]。Hansen等^[13]证明,香兰素醛(vanillin aldehyde, VAN)在体内糖基化形成香兰素-葡萄糖苷(VAN-glu),属于酚酸类化合物。

1.2 糖基化提高水溶性

天然产物如黄酮类化合物、五环三萜类化合物等由于水溶性较差限制了其临床应用。而糖基化修饰是一种提高天然产物溶解度的有效方法。虾青素是一种高价值天然产物,然而虾青素的疏水性导致其生物利用度较低,Chen等^[14]通过表达来自*P. ananatis* ATCC 19321的CrtX构建糖基化虾青素产生菌株AdGLP1-1和AdGLP2-1,成功检测到糖基化虾青素,且水溶性显著提高,从而提高了其生物利用度、光稳定性和生物活性。从芒果中分离的芒果苷是一种天然抗氧化剂,然而溶解性差限制了其应用。为了提高其溶解性,Wu等^[15]使用制备型高效液相色谱法从芒果苷得到来自嗜热副杆菌半乳糖杆菌DSM 18751^T重组麦芽糖淀粉酶(maltogenic amylase, MA)的糖基化产物葡萄糖基- α -(1 $\rightarrow$ 6)-芒果苷和麦芽糖基- α -(1 $\rightarrow$ 6)-芒果苷,其

中麦芽糖基- α -(1 $\rightarrow$ 6)-芒果苷的水溶性比芒果苷高5 500倍。邓代艳等^[16]以齐墩果酸苷元为起始原料对其C₃-OH进行糖基化修饰,以期提高齐墩果酸的水溶性和稳定性,最终合成了3种齐墩果酸糖苷衍生物,水溶性确有所提高。

1.3 糖基化增强药理活性

糖基化可以有效提高天然产物的结构多样性,改善药理活性^[17]。喜树碱源自喜树的果实,是一种生物碱。赵育等^[18]通过糖基化修饰,以喜树碱为底物合成糖基化产物,并进行抗肿瘤研究,发现经修饰的喜树碱糖苷衍生物比原喜树碱的抗肿瘤活性更高。王欢等^[19]以常春藤皂苷元为起始原料进行修饰得到中间体,对中间体进行糖基化修饰得到了3种常春藤糖苷衍生物,均对人膀胱癌细胞有抑制作用,且抑制率较未进行糖基化修饰的中间体增加了3~4倍。

1.4 糖基化提高稳定性

糖基化修饰也常被用来提高天然产物的稳定性。花青素黄酮是一种水溶性天然植物色素,具有抗肿瘤、抗氧化等作用,然而独立的花青素无法在自然界中稳定存在。Farr等^[20]利用大肠埃希菌异源表达的3-O-葡萄糖基转移酶3GT和糖基供体UDP-葡萄糖对花青素的C₃-OH进行糖基化修饰,获得花青素3-O-葡萄糖苷,稳定性比花青素有显著提高。叶黄素是一种具有多种生理功能的天然脂溶性类胡萝卜素,但其水溶性差、稳定性差。Wang等^[21]通过荧光强度和紫外-可见(UV-Vis)吸收光谱、热力学参数、X射线衍射等方式分析了叶黄素与糖基化大豆分离蛋白结合后的稳定性和相互作用机制,得出结论:叶黄素与糖基化大豆分离蛋白的结合提高了叶黄素的水溶性和光热稳定性。

2 糖基转移酶的种类与催化特点

自然界中大多数的糖基化反应是由糖基转移酶(glycosyltransferase, GT)介导的,糖基转移酶作为天然生物催化剂,可以将糖基供体转移至糖基受体形成种类丰富的糖苷化合物。糖基供体和糖基受体为糖基转移酶的两部分底物。常见的糖基供体主要是活化的核苷酸糖和磷酸酯类糖^[22],其中核苷酸糖更常见,包括尿苷二磷酸糖(uridine diphosphate sugar, UDP-sugar)。相较于糖基供

体,糖基受体的类型更加丰富,包括糖类、蛋白质、脂质、核酸、抗生素,以及萜类、黄酮类和类固醇等次级代谢小分子^[23]。

糖基转移酶根据氨基酸序列相似性、形成的糖苷键、结构以及其催化特性的不同有多种分类方式。

2.1 氨基酸序列相似度

碳水化合物活性酶数据库CAZy(<http://www.cazy.org/>)基于蛋白质结构域中的氨基酸序列相似性将碳水化合物活性酶类归入不同蛋白质家族,共分为132个糖基转移酶超家族(GT1-GT135,其中GT36、GT46和GT86被删除)。以UDP-葡萄糖、UDP-鼠李糖、UDP-半乳糖、UDP-葡萄糖醛酸、UDP-木糖等UDP-糖为糖基供体的糖基转移酶称为尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferases, UGTs),属于GT1家族,是GTs家族中最大的家族,与植物关系密切^[24],对天然的糖基化产物生物合成具有重要的意义^[25]。Xu等^[26]从红花中鉴定出的CtOGT1和CtOGT2,对黄酮、二氢查尔酮、异黄酮、黄烷酮和黄烷酮醇等表现出有效的催化活性。

植物UGTs含有一个由44个氨基酸构成的高度保守基序,即植物次生代谢产物保守序列(plant secondary products from glycosyltransferases box, PSPG box)(图1),负责与UDP-糖结合^[27]。

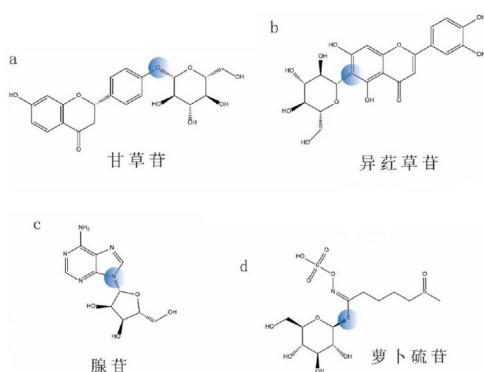
2.2 形成的糖苷键分型

在酶的作用下,受体分子的-C(C-C)/-O(-OH、-COOH)/-N(-NH₂)/-S(-SH)位点可以与供体分子结合,根据受体分子的糖基化位点,糖基转移酶主要分为O-糖基转移酶(OGTs)、C-糖基转移酶(CGTs)、N-糖基转移酶以及S-糖基转移酶等^[28]。

植物源的UGT多催化合成O-糖苷键(图2a)。Chen等^[29]从乌拉尔甘草的转录组数据挖掘了43个O-糖基转移酶(O-GT)的候选基因,通过催化8种天然底物分析鉴定出了11种O-GTs,其中包括异黄酮7-O-GTs、黄酮醇3-O-GTs以及催化黄酮、查尔酮和三萜的混杂O-GTs。这些O-GTs能高效催化合成甘草关键化合物如甘草素、异甘草素、芥子苷和3-O- β -D-葡萄糖醛酸基甘草次酸。同时,这些酶也可以作为生物催化工具以催化合成其他具有生物活性的O-糖苷。Tang等^[30]从桔梗根中发现了一个可催化桔梗苷D两步糖基化反应合成桔梗苷E的O

UGT71A27	-	C	V	G	K	V	I	G	-	W	A	P	Q	V	A	V	L	A	H	K	A	V	G	G	F	V	S	H	C	G	W	N	S	I	L	E	S	V	W	Y	D	M	S	V	A	T	W	P	M	Y	G	E	Q	Q	L	N	A	F	E	M	V	K			
UGT2B17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	Y	K	W	L	P	Q	N	D	L	L	G	H	P	K	T	K	A	F	I	T	H	G	G	T	N	G	I	Y	E	A	I	Y	H	G	I	P	M	V	G	I	P	L	F	A	D	Q	H	D	N	I	A	H	M	K	A
UGT2A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	F	D	W	I	P	Q	N	D	L	L	G	H	P	K	T	K	A	F	I	T	H	G	G	T	N	G	I	Y	E	A	I	Y	H	G	V	P	M	V	G	V	P	M	F	A	D	Q	P	D	N	I	A	H	M	K	A
UGT2B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	Y	K	W	I	P	Q	N	D	L	L	G	H	P	K	T	R	A	F	I	T	H	G	G	A	N	G	I	Y	E	A	I	Y	H	G	I	P	M	V	G	I	P	L	F	A	D	Q	P	D	N	I	A	H	M	K	A
UGT3A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	M	D	W	L	P	Q	I	D	L	L	A	H	P	S	I	R	L	F	V	T	H	G	G	M	N	S	V	M	E	A	V	H	H	G	V	P	M	V	G	I	P	F	F	G	D	Q	P	E	N	M	V	R	V	E	A
UGT2A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	F	N	W	I	P	Q	N	D	L	L	G	H	P	K	T	K	A	F	I	T	H	G	G	T	N	G	I	Y	E	A	I	Y	H	G	V	P	M	V	G	V	P	M	L	G	D	Q	P	H	N	I	A	H	M	E	A
UGT3A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	M	D	W	L	P	Q	T	D	L	L	A	H	P	S	I	R	L	F	V	T	H	G	G	M	N	S	V	M	E	A	V	H	H	G	V	P	M	V	G	I	P	F	F	F	D	Q	P	E	N	M	V	R	V	E	A
UGT19	-	G	R	G	L	L	I	R	G	W	A	P	Q	V	L	I	L	S	H	P	A	I	G	G	F	V	T	H	C	G	W	N	S	T	I	E	G	I	C	S	G	V	P	M	I	T	W	P	L	F	A	E	Q	F	F	N	E	K	L	V	V	Q			
UGT8	-	D	R	G	C	L	V	S	-	W	A	P	Q	L	S	V	L	S	H	P	S	V	A	C	F	I	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	M	G	V	P	M	I	C	W	P	Y	F	A	D	Q	F	L	D	R	T	Y	I	V	E			
UGT7	-	N	N	K	G	F	L	I	R	G	W	A	P	Q	L	M	I	L	S	H	P	S	T	G	G	F	L	S	H	C	G	W	N	S	V	L	E	S	I	S	Q	G	V	P	I	I	G	W	P	I	A	A	E	Q	F	Y	N	S	K	L	L	E	E		
UGT4	-	N	K	G	F	I	I	S	G	W	A	P	Q	K	E	I	L	S	H	P	S	T	G	A	F	L	T	H	C	G	W	S	S	L	M	E	G	M	G	L	G	L	P	L	I	A	L	P	M	Q	L	D	Q	G	L	N	A	R	L	I	A				
UGT5	-	D	R	G	C	L	V	S	-	W	A	P	Q	L	S	V	L	S	H	P	S	I	A	C	F	V	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	M	G	V	P	M	I	C	W	P	Y	F	A	D	Q	F	L	N	C	S	Y	I	A	E			
UGT6	-	Q	R	S	C	F	V	S	-	W	A	P	Q	L	K	V	L	L	H	P	S	V	G	C	Y	L	T	H	C	G	W	N	S	T	I	E	S	I	Y	A	G	V	P	L	V	C	W	P	F	F	A	D	N	H	V	N	R	R	L	L	V	D			
UGT9	-	K	D	E	G	L	I	V	L	G	W	A	P	Q	L	S	I	L	A	H	P	S	T	G	G	F	L	S	H	C	G	W	N	A	V	L	E	T	T	V	M	G	V	P	M	I	A	W	P	L	Y	A	E	Q	H	F	N	A	K	F	V	V	D		
UGT10	-	D	R	G	L	V	V	T	S	W	A	P	Q	I	P	I	L	A	H	P	S	T	G	G	F	L	S	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	H	G	I	P	M	I	A	W	P	I	A	A	E	Q	R	M	N	S	F	I	L	V	N			
UGT72B3	-	E	K	G	M	V	V	S	S	W	A	P	Q	T	K	V	L	A	H	E	A	T	G	G	Y	V	C	H	C	G	W	N	S	T	L	E	T	V	V	H	G	V	P	I	A	W	P	L	F	A	E	Q	K	Q	N	A	V	M	L	S	E				

图1 PSPG保守区



蓝色圈出部分为四种不同糖苷键类型, 分别为: O-糖苷(a)、C-糖苷(b)、N-糖苷(c)、S-糖苷(d)

图2 四种糖苷键类型

糖基转移酶PgGT1, 可以参与皂苷生物合成。Wang等^[31]从黄芩中发现了一种具有高度区域特异性和供体混杂性的3-O-糖基转移酶Sb3GT1 (UGT78B4), 可接受5种糖供体(UDP-Glc/-Gal/-GlcNAc/-Xyl/-Ara), 催化17种黄酮醇的3-O糖基化, 转化率可达98%以上。

C-糖基化是通过C-C键将糖基供体与受体相连(图2b), 由于C-C键比C-O键更稳定, 碳苷黄酮具有更好的生理功能, 对于酶解和胃肠道水解稳定性显著提高。麦德霉素作为吡喃萘醌类抗生素家族中的一种抗肿瘤药物, 具有独特的C-糖基化特征。Cai等^[32]鉴定出一种C-糖基转移酶Med-8, 可以催化麦德霉素的生物合成。Ren等^[33]从石斛兰基因中分离出一种新的C-糖基转移酶, 命名为DcaCGT。DcaCGT除能特异性催化二-C-糖基化外, 还能特异性催化O-糖基化。DcaCGT能催化2-

羟基柚皮素和根皮素生成各自的二-C-糖苷, 并催化芹菜素生成大波斯菊苷。Zhang等^[34]从光果甘草中挖掘到高效的二-C-糖基转移酶GgCGT。GgCGT是第一个同时具有UDP糖和底物的复杂结构的CGT, 并且能有效催化至少6种含氟丙酮基底物的二-C-糖基化, 以及至少27种酚类化合物的单-C-糖基化。

S-糖基转移酶表现出许多生物学作用, 如蛋白质糖基化等^[35]。S-糖苷是O-糖苷的结构类似物(图2d), 但相比O-糖苷而言更耐化学和酶水解等环境^[36-38]。S-糖基转移酶稳定性也更高^[39,40]。来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的S-糖基转移酶UGT74B1能够在体内产生巯基糖苷键, Lafite等^[41]阐明了UGT74B1是硫代葡萄糖苷生物合成的关键酶, 可催化硫代氢脒酸盐的S-糖基化。

N-糖基化主要发生在蛋白质中(图2c), 主要修饰肽和蛋白质的天冬酰胺残基或将糖部分引入天然产物^[42-45]。Gutacker等^[45]报道了一种来自红花的催化多种不同的氮杂环芳香化合物N-糖基化的糖基转移酶UGT71E5, 该酶能够从O-糖苷中高效生成稀有的N-糖苷。Wu等^[46]从糖多孢红霉菌NRRL2338中发现了N-糖基转移酶Sace_3599, 能够催化N-糖基化反应。Kong等^[47]表征了一种来自嗜沫凝聚杆菌的N-糖基转移酶AaNGT, 能够利用不同的糖供体糖基化测试的肽。

除能够特异性催化的糖基转移酶外, 还有一些底物杂泛性较高、具有多种催化功能的糖基转移酶被鉴别出来^[48]。Chaudhary等^[49]通过在大肠杆菌中功能性表达证明了链霉菌中鉴定的糖基转移酶

OleD可以同时催化形成O-、S-和N-糖苷键的糖基转移酶。He等^[50]从药用植物金莲花中鉴定的C-糖基转移酶TcCGT1可以同时催化O-、C-、N-和S-糖基化反应。Inoue等^[51]从靛蓝中鉴定的葡萄糖基转移酶UGT1以相似的速率催化N-、O-或S-糖基化等。

2.3 三维结构特征

根据空间结构,糖基转移酶分为GT-A型、GT-B型和GT-C型折叠^[52]。GT-A和GT-B型折叠为主要构型,其中动物、细菌、真菌和酵母的糖基转移酶包含这两种折叠方式,而植物、病毒只有GT-B型折叠^[53-55]。

GT-A型折叠的特点是含有一个紧密相关的 β 螺旋- α 转角- β 螺旋($\beta/\alpha/\beta$)状罗斯曼(Rossmann)折叠结构域(图3A)。GT-A型还包括DxD基序(Asp-X-Asp)及其变体基序TDD、EDD、DxH等。这些基序通过与二价金属阳离子(如 Mn^{2+} 、 Mg^{2+})的配位结合来识别UDP-糖的磷酸基团,金属离子对于GT-A家族维持催化活性是必不可少的^[53]。曾在 α -Dystroglycan中得到的糖基转移酶LARGE1中鉴定到GT-A型折叠^[56]。

植物源UGT大多以GT-B的方式折叠(图3B)。GT-B型由2个连接松散的Rossmann折叠结构域相对构成。大部分GT-B型在C端结构域具有一个扭曲的 α 螺旋,向外延伸并与N端结构域相互作用^[57-59]。

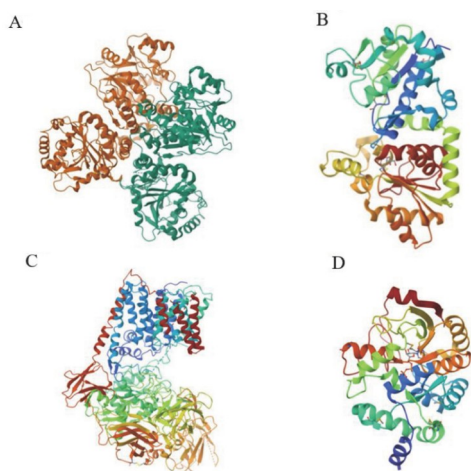
GT-C褶皱将典型GT-A和GT-B褶皱之间的拓朴

元素结合在一起,作为多通道跨膜蛋白,可将碳水化合物或聚糖从磷酸异戊二烯连接的供体底物中转移,同时伴有供体端粒碳的倒置^[60](图3C)。GT-Cs还参与催化产生对细菌、病毒和原生动物的毒力至关重要的细胞外聚糖,使其成为治疗疾病的潜在药物靶点^[61]。除此以外,糖基化的生物药物和疫苗还依赖于由GT-C酶产生并转移到蛋白质中的聚糖^[62]。

除常见的三种折叠外,自然界中还存在一些特殊的糖基转移酶折叠方式。如参与了细菌O-聚糖生物合成的DUF1792结构域具有Rossmann-like核苷酸结合折叠,但与目前已知的GT-A或GT-B以及GT-C折叠的糖基转移酶没有任何序列和结构上的同一性,被命名为GT-D^[63](图3D)。

2.4 催化特性

根据糖基转移酶的催化特性可以将其分为Leloir GTs型和Non-Leloir GTs型糖基转移酶^[64]。Leloir型糖基转移酶的糖基供体通常为活化的核苷酸糖,如尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose, UDP-葡萄糖)等。而Non-Leloir型糖基转移酶的糖基供体则是磷酸脂连接的糖,如蔗糖、淀粉及其水解产物等,相对而言所需的糖供体更廉价^[65]。根据催化机理,可将Leloir型糖基转移酶分为两大类,即构象翻转型GTs及构象保留型GTs(图4),催化机理分别为 S_N2 (inverting)及 S_Ni (retaining),其中构象翻转型的糖基转移酶发生糖基化反应后糖基供体会由 α 型变为 β 型^[66-68],而构象保留型的糖基转移酶发生糖基化反应后糖基供体的构型不会发生改变。Ferreira等^[69]揭示了甘露糖基甘油酸合酶的催化机制即为构象保留型。Albesa-Jové等^[70]报告了来自*Bos taurus*的保留糖基转移酶 α -1,3-半乳糖基转移酶(α 3GalT)的催化机制,为 S_Ni 型反应。构象翻转GTs的反应机理为组氨酸作为酶活



A: GT-A(PDB ID: 7UI6); B: GT-B(PDB ID: 5UX6); C: GT-C(PDB ID: 6WBY); D: GT-D(PDB ID: 4PHS)

图3 不同折叠方式的糖基转移酶

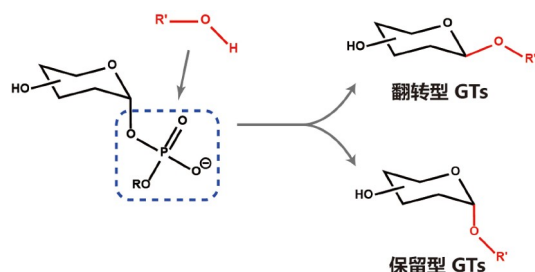


图4 Leloir型糖基转移酶两种不同催化特性

性的一般碱基和催化残基使受体分子的羟基去质子化, 之后受体的去质子化羟基作为亲核基团攻击UDP糖基供体上的异头碳C1, 置换UDP部分并形成 β -糖苷键产物; 附近的保守天冬氨酸残基通过形成氢键与组氨酸相互作用。这两个残基和受体可以形成受体-His-Asp三联体^[71]。Wang等^[72]解析黄芩糖基转移酶UGT71AP2的催化机制为双分子亲核取代反应, His-Asp二联体在催化过程中起关键作用。

3 糖基转移酶的挖掘与表征

挖掘具有新功能的UGTs是推进天然产物糖基改构应用的必要条件, 挖掘具有新功能的UGTs有多种方法。近年来, 测序技术的进步和基因组学的发展促进了天然产物生物合成途径的解析和挖掘具有新功能的酶。

3.1 全基因组序列数据的基因组分析

全基因组序列数据的基因组分析可以为挖掘具有新功能的酶提供多层次的资源。根据植物UGTs含有PSPG box的特征进行全基因组分析可具有针对性地从植物中鉴定出植物UGTs。Ren等^[73]对杨梅的基因组进行分析, 共鉴定出13组152个*MrUGT*基因。Yang等^[74]对烟草中的*UGT*基因进行调查, 鉴定出276个*NtUGT*基因。此外, 还用类似的方法进行了小麦^[75]、马铃薯^[76]、花生^[77]等基因组的UGT鉴定。

3.2 转录组数据分析

全转录组测序(RNAseq)可以提供基因组数据无法获得的特定基因的cDNA序列和组织特异性表达水平, 许多研究通过全转录组测序进行糖基转移酶的鉴定。Wang等^[78]对夹竹桃科植物进行广泛靶向的代谢组学和全长转录组测序, 鉴定出99种UGT, 并将其分为14组。Han等^[79]通过分析积雪草的最新转录组数据, 成功筛选出75种UGT, 经过进一步鉴定得到了可以将特异性催化积雪草酸和羟基积雪草酸糖基化的酶。Jeong等^[80]通过将香菇公开的基因组序列和转录组分析相结合, 鉴定出了一种名为UGT66A1的UDP-糖基转移酶, 可以催化木糖基化。

3.3 蛋白质组学分析

基于质谱(mass spectrometry, MS)的蛋白质组

学可以识别特定生物体、组织或细胞内的所有蛋白质, 在检测灵敏度等方面显示出显著优势。Suliman等^[81]分析了小麦胚乳中的1135种蛋白质, 确定出64种UGT。Yin等^[82]通过获取蛋白质组学和系统发育分析筛选出人参中的50个UGT, 并对其进行分析, 鉴定出人参抵抗逆境胁迫的相关基因。

3.4 功能表征

对UGTs催化功能的表征通常通过底物分析、体外酶促反应、体外检测、酶学性质分析等进行。韩搏云等^[83]从黄芩中挖掘的O-糖基转移酶利用黄芩内源性底物进行功能表征。余璐瑶^[84]从铁皮石斛中筛选到的*DcUGT*则是选择铁皮石斛花中已检测并鉴定的黄酮骨架上的糖苷作为糖供体进行体外酶促反应, 通过对反应产物的定性分析以确定各个酶的功能。蔡鑫博等^[85]从红花中鉴定的糖基转移酶*CtUGT49*也是通过体外酶促反应明确了其具有催化柚皮素查尔酮的功能, 且具有一定的底物杂泛性。Liu等^[86]对甜橙中积聚的O-糖基转移酶进行表征则是通过酶学性质分析进行的。Inoue等^[51]通过体外检测对靛蓝靛果的UDP-糖基转移酶进行表征。

4 糖基转移酶的改造与应用

4.1 糖基转移酶的改造

野生型的糖基转移酶通常由于不稳定、底物特异性较差、区域选择性较差、催化活性较低等问题而难以直接应用于催化糖基化天然产物的合成, 阻碍了其在细胞工厂中的应用。因此需要对目标化合物合成的相关糖基转移酶进行设计和改造以满足实际应用的需求。目前对糖基转移酶的设计与改造的方法主要包括酶分子的理性设计、半理性设计和非理性设计(即定向进化)^[87-89]。

4.1.1 理性设计

糖基转移酶的理性设计首先需要充分了解酶的空间结构和催化机理才能对酶进行理性改造, 通常使用定点突变技术进行改造。理性设计可以通过结构分析等减少实验的盲目性, 提高成功率。如环糊精糖基转移酶(CGTase)可以催化橙皮苷的糖基化, 范婷文等^[90]通过分子动力学进行模拟实验, 通过比较了3种较为典型的环糊精糖基转移酶与底物的对接方式, 通过定点突变对预测到的

CGTase口袋附近的重要位点进行改造,将 γ -CD产物比例提高了3倍。Bi等^[91]通过以蛋白晶体X射线结构作为模板进行CaUGT3的同源建模,筛选出准备进行饱和突变的位点进行突变,得到改造后的酶反应30 min后转化率为野生型的17倍。糖基转移酶UGT74AC2来源于罗汉果,常作为多羟基底物水飞蓟宾及其衍生物靶向区域选择性糖基化反应的催化剂。Li等^[92]通过扩展理性迭代定点诱变构建突变体,大大提高了UGT74AC2的区域选择性。天然产物O-糖苷键的水解敏感性限制了其在治疗中的应用。Härle等^[93]通过计算分析,预测将O-糖基化酶转换为C-糖基转移酶所需的变化指导筛选LanGT2变体,揭示了决定O-与C-糖基化的主要区域。于槌^[94]通过对嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)来源的N-糖基转移酶AaNGT进行分析,将酶的活性架构与糖供体进行分子对接,显著提高了其对UDP-半乳糖的利用率。Huang等^[95]从牛角瓜中发现了UGT74AN2,并通过研究其晶体结构解析催化机制进而确定定点突变位点,突变体对UDP-半乳糖的催化活性提高了11.4倍。

4.1.2 半理性设计

半理性设计的原理类似于理性设计,但可在酶的晶体结构及催化机理尚不明确时通过计算机模拟推测重要氨基酸位点,再利用丙氨酸扫描突变(alanine scanning mutagenesis)、定点饱和突变(site-directed saturation mutagenesis)、迭代饱和突变(iterative saturation mutagenesis)等方法构建不同的突变体文库,从而借助筛选方法得到理想突变体。4- α -糖基转移酶(4-alpha-glucanotransferase, 4 α GT)是一种多功能的糖基转移酶,在淀粉加工领域具有广泛应用。谢静雯等^[96]采用于HotSpot Wizard在线工具在残基所处空间位置选择突变热点,再利用4- α -糖基转移酶水解淀粉产生透明圈的能力对18 000个转化子进行高通量筛选,最终确定了一个对4 α GT活性起关键性作用的位点,对其进行饱和突变,最终获得活性提升的突变体A470F,突变体活性较野生型提升了17%。环糊精葡萄糖基转移酶CGTase可以催化橘皮柑糖基化反应。Chen等^[97]基于侧链尺寸/极性设计了32个CGTase突变体,并筛选出最佳突变体Y217F,酶活性为野生型的6.96倍。Zhang等^[98]以药用植物黄芪为研究对

象,从中发现了一种新颖的环阿屯烷型三萜糖基转移酶AmGT8(UGT73P28),将不同类型的底物分别与蛋白质进行分子对接,找到了4个可能在酶催化过程中起到重要作用的区域,对活性口袋中的4个区域共计10个氨基酸进行迭代突变,获得了分别具有3-O/6-O/2'-O糖基化能力的突变体。从罗汉果中分离到最甜的糖苷——赛门苷I,由于提取困难等因素限制了其作为天然甜味剂的使用。为了得到纯度更高的赛门苷I, Xu等^[99]通过序列对比和同源性建模筛选UGT94-289-2酶中可能负责糖基化的关键残基,突变后进行实验筛选得到酶UGT-M2,可将罗汉果苷III E(MG III E)单糖基化为赛门苷I,进行优化后得到高纯度赛门苷I。Chen等^[100]报道了来自人参的糖基转移酶PgUGT可用于莱鲍迪甘D(Reb D)的生物合成,利用同源建模和基于深度学习的建模构建的三维结构,检测到16个定点变异,确认选择性非催化残基的定点诱变后,构建了包含8个改变残基的突变体Mut8,其活性和热稳定性均得到改善,酶活性比野生型高3.2倍。

4.1.3 定向进化

定向进化不需要深入了解酶分子结构与功能等信息,是一种非理性改造的方法。定向进化过程类似自然界生物进化机制,通过构建随机突变结合定向筛选所需性状的突变体来完成。主要通过易错PCR(epPCR)及高通量筛选等方法挑选出性能改善的酶等。郑婉等^[101]对来源于*Paenibacillus campinasensis*的 β -CGTase进行易错PCR突变,最终筛选出突变体Q280L,突变体的底物亲和性以及底物特异性相较于野生型都得到了显著的提高。新橙皮苷是新橙皮苷二氢查耳酮的重要前体物,由鼠李糖基转移酶Cml,2RhaT催化橙皮素7-O-葡萄糖苷合成。为提高其催化活性, Xue等^[102]使用基于结构的半理性设计和易错PCR的混合策略设计得到突变体49A/50A-Cml,2RhaT,使其对橙皮素7-O-葡萄糖苷的催化效率提高了136倍。

4.2 糖基化提高细胞工厂合成天然产物的效率

蛋白质糖基化修饰对于细胞的正常功能和稳态至关重要,糖基化能够影响蛋白质正确折叠、分泌、亚基的聚合和信号转导等^[103]。构建细胞工厂生物合成天然产物已成为重要的合成方式,在合

成目标产物过程中, 糖基化修饰通过影响蛋白质的稳定性及外排可以提高细胞工厂合成天然产物的效率。除此以外, 部分植物来源的天然产物对底盘细胞具有不良反应, 通过糖基化可以减小毒性, 从而提高细胞工厂合成天然产物的效率^[104]。Liu等^[105]揭示了糖基化对天然产物生物合成酶催化活性的分子调控机制, 发现糖基化修饰的生物合成酶不但易于分泌, 且具有更强更完整的催化功能, 提高了细胞工厂合成天然产物过程中目标产物的获取效率。Hansen等^[13]证明, 通过香兰素醛(vanillin aldehyde, VAN)的简单体内糖基化可以形成香兰素-葡萄糖苷(VAN-glu), 将这种具有微生物毒性的醛转化为无毒形式, 从而大幅提高了香兰素醛的生产效率。

5 总结与展望

天然产物由于独特的化学结构而具有多种独特的药理活性, 尤其是植物的次级代谢产物。由于具有抗凝血、抗疟疾、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗炎等一系列生理活性, 常被用于药品、营养品和化妆品的生产。然而未经修饰的天然产物利用率较低, 糖基改构是一种十分重要且独特的天然产物结构修饰方式, 能有效改善天然产物的水溶性、稳定性及药理活性。天然产物中的糖基改构由糖基转移酶催化完成, 糖基转移酶经过挖掘表征和改造能提高天然产物的稳定性、底物特异性等以满足实际应用需求。

参考文献

- [1] Chen C, Zhang X, Yue M. Spatial multi-omics in medicinal plants: from biosynthesis pathways to industrial applications. *Trends Plant Sci*, 2024, 29(5): 510-513
- [2] 赵千婧, 程瑶, 王佳, 等. 糖基转移酶合成相关糖苷类化合物研究进展. 北京化工大学学报(自然科学版), 2018, 45(5): 92-99
- [3] Huang Y, Yang Y, Liu G, et al. New clinical application prospects of artemisinin and its derivatives: a scoping review. *Infect Dis Poverty*, 2023, 12(1): 115
- [4] Selyutina OY, Polyakov NE. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier-from physicochemical properties to biomedical applications: a modern insight on the ancient drug. *Int J Pharm*, 2019, 559: 271-279
- [5] Chen S, Wang K, Wang H, et al. The therapeutic effects of saikosaponins on depression through the modulation of neuroplasticity: from molecular mechanisms to potential clinical applications. *Pharmacol Res*, 2024, 201: 107090
- [6] Gachon CMM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(11): 542-549
- [7] Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, et al. Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 254-263
- [8] Huang G, Lv M, Hu J, et al. Glycosylation and activities of natural products. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(12): 1013-1016
- [9] 李秋阳, 孙文涛, 秦磊, 等. 天然产物生物合成与微生物制造的挑战. 中国生物工程杂志, 2024, 44(1): 72-87
- [10] Zhao M, Zhang N, Gao T, et al. Sesquiterpene glucosylation mediated by glucosyltransferase UGT91Q2 is involved in the modulation of cold stress tolerance in tea plants. *New Phytol*, 2020, 226(2): 362-372
- [11] Chávez A, Castillo N, López-Tubau JM, et al. Tomato sterol glycosyltransferase 1 silencing unveils a major role of sterol glycosides in plant and fruit development. *Environ Exp Bot*, 2023, 206: 105181
- [12] Yao Y, Gu J, Luo Y, et al. Genome-wide analysis of UGT gene family identified key gene for the biosynthesis of bioactive flavonol glycosides in *epimedium pubescens* maxim. *Synth Syst Biotechnol*, 2022, 7(4): 1095-1107
- [13] Hansen EH, Møller BL, Kock GR, et al. *De novo* biosynthesis of vanillin in fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(9): 2765-2774
- [14] Chen J, Zhang R, Zhang G, et al. Heterologous expression of the plant-derived astaxanthin biosynthesis pathway in *Yarrowia lipolytica* for glycosylated astaxanthin production. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(6): 2943-2951
- [15] Wu JY, Ding HY, Wang TY, et al. Improving aqueous solubility of natural antioxidant mangiferin through glycosylation by maltogenic amylase from *Parageobacillus galactosidarius* DSM 18751. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1817
- [16] 邓代艳, 杨诗雯, 党笑笑, 等. 齐墩果酸糖缀合物的合成与体外抗结肠癌活性研究. 贵州科学, 2020, 38(2): 13-16
- [17] Huang W, Zhang X, Li J, et al. Substrate promiscuity, crystal structure, and application of a plant UDP-

- glycosyltransferase UGT74AN3. *ACS Catal*, 2023, 14 (1): 475-488
- [18] 赵育, 李春霞, 玉坤宇, 等. 几种喜树碱-糖缀合物的合成及其抗肿瘤活性研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2007, 37(5): 733-739
- [19] 王欢, 孙航宇, 洪开文, 等. 新型常春藤糖苷衍生物的合成及体外抗人膀胱癌细胞活性. *合成化学*, 2018, 26(4): 240-244
- [20] Farr JE, Sigurdson GT, Giusti MM. Influence of cyanidin glycosylation patterns on carboxypyranocyanin formation. *Food Chem*, 2018, 259: 261-269
- [21] Wang X, Wang S, Xu D, et al. The effect of glycosylated soy protein isolate on the stability of lutein and their interaction characteristics. *Front Nutr*, 2022, 9: 887064
- [22] Ardèvol A, Rovira C. Reaction mechanisms in carbohydrate-active enzymes: glycoside hydrolases and glycosyltransferases. insights from abinitio quantum mechanics/molecular mechanics dynamic simulations. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(24): 7528-7547
- [23] van der Vorm S, van Hengst JMA, Bakker M, et al. Mapping the relationship between glycosyl acceptor reactivity and glycosylation stereoselectivity. *Angew Chem*, 2018, 130(27): 8372-8376
- [24] 秦晶晶, 孙春玉, 张美萍, 等. 植物UDP-糖基转移酶分类、功能以及进化. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37 (1): 440-450
- [25] Ross J, Li Y, Lim EK, et al. Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol*, 2001, 2(2): reviews3004.1
- [26] Xu X, Xia M, Han Y, et al. Highly promiscuous flavonoid Di-O-glycosyltransferases from *Carthamus tinctorius* L. *Molecules*, 2024, 29(3): 604
- [27] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(9): 380-386
- [28] Lim EK, Ashford DA, Hou B, et al. *Arabidopsis* glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotech Bioeng*, 2004, 87(5): 623-631
- [29] Chen K, Hu Z, Song W, et al. Diversity of o-glycosyltransferases contributes to the biosynthesis of flavonoid and triterpenoid glycosides in *Glycyrrhiza uralensis*. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(8): 1858-1866
- [30] Tang W, Shi J, Liu W, et al. MALDI imaging assisted discovery of a Di-O-glycosyltransferase from platycodon grandiflorum Root. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62(19): e202301309
- [31] Wang Z, Wang S, Xu Z, et al. Highly promiscuous flavonoid 3-O-glycosyltransferase from *Scutellaria baicalensis*. *Org Lett*, 2019, 21(7): 2241-2245
- [32] Cai X, Taguchi T, Wang H, et al. Identification of a C-glycosyltransferase involved in medermycin biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(6): 1059-1069
- [33] Ren Z, Ji X, Jiao Z, et al. Functional analysis of a novel C-glycosyltransferase in the orchid *Dendrobium catenatum*. *Hortic Res*, 2020, 7(1): 111
- [34] Zhang M, Li FD, Li K, et al. Functional characterization and structural basis of an efficient di-c-glycosyltransferase from *Glycyrrhiza glabra*. *J Am Chem Soc*, 2020, 142 (7): 3506-3512
- [35] Lafite P, Daniellou R. Rare and unusual glycosylation of peptides and proteins. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(7): 729-738
- [36] Dere RT, Kumar A, Kumar V, et al. Synthesis of glycosylthiols and reactivity studies. *J Org Chem*, 2011, 76(18): 7539-7545
- [37] Cai L, Meng L, Zeng J, et al. Sequential activation of thioglycosides enables one-pot glycosylation. *Org Chem Front*, 2021, 8(12): 3150-3165
- [38] Driguez H. Thiooligosaccharides as tools for structural biology. *ChemBiochem*, 2001, 2(5): 311-318
- [39] Bundle DR, Rich JR, Jacques S, et al. Thiooligosaccharide conjugate vaccines evoke antibodies specific for native antigens. *Angew Chem*, 2005, 117(47): 7903-7907
- [40] De Leon CA, Levine PM, Craven TW, et al. The sulfur-linked analogue of O-GlcNAc (S-GlcNAc) is an enzymatically stable and reasonable structural surrogate for O-GlcNAc at the peptide and protein levels. *Biochemistry*, 2017, 56(27): 3507-3517
- [41] Lafite P, Marroun S, Coadou G, et al. S-glycosyltransferase UGT74B1 can glycosylate both S- and O-acceptors: mechanistic insights through substrate specificity. *Mol Cat*, 2019, 479: 110631
- [42] Yakovlieva L, Ramirez-Palacios C, Marrink SJ, et al. Semiprocessive hyperglycosylation of adhesin by bacterial protein N-glycosyltransferases. *ACS Chem Biol*, 2021, 16(1): 165-175
- [43] Ahangama Liyanage L, Harris MS, Cook GA. *In vitro* glycosylation of membrane proteins using N-glycosyltransferase. *ACS Omega*, 2021, 6(18): 12133-12142
- [44] Lin L, Kightlinger W, Warfel KF, et al. Using high-throughput experiments to screen N-glycosyltransferases with altered specificities. *ACS Synth Biol*, 2024, 13(4): 1290-1302
- [45] Gutacker F, Schmidt-Bohli YI, Strobel T, et al. Identification and characterization of a novel N- and O-glycosyltransferase from *saccharopolyspora erythraea*. *Molecules*, 2020, 25(15): 3400
- [46] Wu H, Chu Z, Zhang W, et al. Transcriptome-guided target identification of the tetr-like regulator SACE_5754

- and engineered overproduction of erythromycin in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Biol Eng*, 2019, 13(1): 11
- [47] Kong Y, Li J, Hu X, et al. N-glycosyltransferase from *Aggregatibacter aphrophilus* synthesizes glycopeptides with relaxed nucleotide-activated sugar donor selectivity. *Carbohydrate Res*, 2018, 462: 7-12
- [48] Teze D, Coines J, Fredslund F, et al. O-/N-/S-Specificity in glycosyltransferase catalysis: from mechanistic understanding to engineering. *ACS Catal*, 2021, 11(3): 1810-1815
- [49] Chaudhary AK, Hwang IY, Jo YJ, et al. Enzymatic synthesis of amentoflavone glycoside using recombinant oleandomycin glycosyltransferase. *J Industrial Eng Chem*, 2015, 25: 304-307
- [50] He JB, Zhao P, Hu ZM, et al. Molecular and structural characterization of a promiscuous C-glycosyltransferase from *Trollius chinensis*. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58(33): 11513-11520
- [51] Inoue S, Moriya T, Morita R, et al. Characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. *Plant Physiol Biochem*, 2017, 121: 226-233
- [52] Ardiccioni C, Clarke OB, Tomasek D, et al. Structure of the polyisoprenyl-phosphate glycosyltransferase GtrB and insights into the mechanism of catalysis. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 10175
- [53] Ünligil UM, Rini JM. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(5): 510-517
- [54] Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, et al. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology*, 2006, 16(2): 29R-37R
- [55] Breton C, Imberty A. Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9(5): 563-571
- [56] Righino B, Bozzi M, Pirolli D, et al. Identification and modeling of a GT-A fold in the α -dystroglycan glycosylating enzyme LARGE1. *J Chem Inf Model*, 2020, 60(6): 3145-3156
- [57] Rocha J, Cicéron F, de Sanctis D, et al. Structure of *Arabidopsis thaliana* FUT1 reveals a variant of the GT-B class fold and provides insight into xyloglucan fucosylation. *Plant Cell*, 2016, 28(10): 2352-2364
- [58] Lira-Navarrete E, Pallarés MC, Castello F, et al. Protein O-fucosyltransferase 1 undergoes interdomain flexibility in solution. *Molecules*, 2021, 26(8): 2105
- [59] Zabolina OA, Zhang N, Weerts R. Polysaccharide biosynthesis: glycosyltransferases and their complexes. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 625307
- [60] Wild R, Kowal J, Eyring J, et al. Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation. *Science*, 2018, 359(6375): 545-550
- [61] Ng BG, Freeze HH. Perspectives on glycosylation and its congenital disorders. *Trends Genet*, 2018, 34(6): 466-476
- [62] Sjødt M, Brock K, Dobihal G, et al. Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature*, 2018, 556(7699): 118-121
- [63] Zhang H, Zhu F, Yang T, et al. The highly conserved domain of unknown function 1792 has a distinct glycosyltransferase fold. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 4339
- [64] Figueroa CM, Lunn JE, Iglesias AA. Nucleotide-sugar metabolism in plants: the legacy of Luis F. Leloir. *J Exp Bot*, 2021, 72(11): 4053-4067
- [65] Siziya IN, Jung JH, Seo MJ, et al. Whole-cell bioconversion using non-Leloir transglycosylation reactions: a review. *Food Sci Biotechnol*, 2023, 32(6): 749-768
- [66] Nidetzky B, Gutmann A, Zhong C. Leloir glycosyltransferases as biocatalysts for chemical production. *ACS Catal*, 2018, 8(7): 6283-6300
- [67] Guerin ME. Trapping and retaining intermediates in glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 2023, 299(8): 105006
- [68] Mestrom L, Przypis M, Kowalczykiewicz D, et al. Leloir glycosyltransferases in applied biocatalysis: a multidisciplinary approach. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): 5263
- [69] Ferreira P, Fernandes PA, Ramos MJ. The catalytic mechanism of the retaining glycosyltransferase mannosylglycerate synthase. *Chem Eur J*, 2021, 27(56): 13998-14006
- [70] Albasa-Jové D, Sainz-Polo MÁ, Marina A, et al. Structural snapshots of α -1,3-galactosyltransferase with native substrates: insight into the catalytic mechanism of retaining glycosyltransferases. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56(47): 14853-14857
- [71] 方红辉. UDP-葡萄糖基转移酶高效催化肉桂醇糖基化的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022
- [72] Wang Z, Du X, Ye G, et al. Functional characterization, structural basis, and protein engineering of a rare flavonoid 2'-O-glycosyltransferase from *Scutellaria baicalensis*. *Acta Pharm Sin B*, 2024,
- [73] Ren C, Cao Y, Xing M, et al. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferase gene family and identification of members involved in flavonoid glucosylation in Chinese bayberry (*Morella rubra*). *Front Plant Sci*, 2022, 13: 998985
- [74] Yang Q, Zhang Y, Qu X, et al. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferases family and identification of UGT genes involved in abiotic stress and flavonol biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. *BMC Plant Biol*,

- 2023, 23(1): 204
- [75] He Y, Ahmad D, Zhang X, et al. Genome-wide analysis of family-1 UDP glycosyltransferases (UGT) and identification of UGT genes for FHB resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*, 2018, 18(1): 67
- [76] Wu Y, Liu J, Jiao B, et al. Genome-wide analysis of family-1 UDP-glycosyltransferases in potato (*Solanum tuberosum* L.): identification, phylogenetic analysis and determination of response to osmotic stress. *Genes*, 2023, 14(12): 2144
- [77] Ouyang L, Liu Y, Yao R, et al. Genome-wide analysis of UDP-glycosyltransferase gene family and identification of a flavonoid 7-O-UGT (AhUGT75A) enhancing abiotic stress in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol*, 2023, 23(1): 626
- [78] Wang X, Wu L, Zhang W, et al. Multi-omics analysis reveals promiscuous O-glycosyltransferases involved in the diversity of flavonoid glycosides in *Periploca forrestii* (Apocynaceae). *Comput Struct Biotechnol J*, 2024, 23: 1106-1116
- [79] Han X, Zhao J, Chang X, et al. Revisiting the transcriptome data of *Centella asiatica* identified an ester-forming triterpenoid: UDP-glucose 28-O-glycosyltransferase. *Tetrahedron*, 2022, 129: 133136
- [80] Jeong E, Kim W, Son S, et al. Qualitative metabolomics-based characterization of a phenolic UDP-xylosyltransferase with a broad substrate spectrum from *Lentinus brumalis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120(28): e2301007120
- [81] Suliman M, Chateigner-Boutin AL, Francin-Allami M, et al. Identification of glycosyltransferases involved in cell wall synthesis of wheat endosperm. *J Proteomics*, 2013, 78: 508-521
- [82] Yin Q, Han X, Chen J, et al. Identification of specific glycosyltransferases involved in flavonol glucoside biosynthesis in ginseng using integrative metabolite profiles, DIA proteomics, and phylogenetic analysis. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(5): 1714-1726
- [83] 韩搏云, 王子龙, 王双, 等. 黄芩中黄酮O-糖基转移酶的发现及功能表征. *药学学报*, 2021, 56(12): 3345-3352
- [84] 余璐瑶. 催化铁皮石斛花中黄酮苷类活性成分生物合成的糖基转移酶的功能鉴定、酶学表征和机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2023
- [85] 蔡鑫博, 刘楠, 李佳, 等. 红花黄酮类糖基转移酶基因 CtUGT49功能表征及酶学特性分析. *中国中药杂志*, 2023, 48(24): 6624-6634
- [86] Liu X, Lin C, Ma X, et al. Functional characterization of a flavonoid glycosyltransferase in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Front Plant Sci*, 2018, 9: 317010
- [87] 陶大炜, 张颖琦, 赵赛赛. 产环糊精葡萄糖基转移酶的菌株选育及酶分子改造研究进展. *食品与发酵工业*, 2024, 1-13
- [88] 徐珍珍. 人参UDP-鼠李糖基转移酶的优化改造与应用[D]. 郑州: 河南大学, 2022
- [89] 郭芳, 张良, 冯旭东, 等. 植物源UDP-糖基转移酶及其分子改造. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(9): 78-91
- [90] 范婷文, 范耿文, 侯艾琦, 等. 基于分子动力学模拟的高 γ -环糊精专一性环糊精糖基转移酶理性改造. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4172-4181
- [91] Bi H, Qu G, Wang S, et al. Biosynthesis of a rosavin natural product in *Escherichia coli* by glycosyltransferase rational design and artificial pathway construction. *Metab Eng*, 2022, 69: 15-25
- [92] Li J, Qu G, Shang N, et al. Near-perfect control of the regioselective glucosylation enabled by rational design of glycosyltransferases. *Green Synthesis Catal*, 2021, 2 (1): 45-53
- [93] Härle J, Günther S, Lauinger B, et al. Rational design of an aryl-C-glycoside catalyst from a natural product O-glycosyltransferase. *Chem Biol*, 2011, 18(4): 520-530
- [94] 于越. N-糖基转移酶的理性设计及功能验证[D]. 济南: 山东师范大学, 2023
- [95] Huang W, He Y, Jiang R, et al. Functional and structural dissection of a plant steroid 3-O-glycosyltransferase facilitated the engineering enhancement of sugar donor promiscuity. *ACS Catal*, 2022, 12(5): 2927-2937
- [96] 谢静雯, 李超慧, 韦猛, 等. 半理性设计提升4- α -糖基转移酶歧化活性并应用于工业生产. *食品与发酵工业*, 2024, 1-11
- [97] Chen H, Liu Y, Ren X, et al. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase through a size/polarity guided triple-code strategy with enhanced α -glycosyl hesperidin synthesis ability. *Appl Environ Microbiol*, 2022, 88 (17): e01027-22
- [98] Zhang M, Yi Y, Gao BH, et al. Functional characterization and protein engineering of a triterpene 3-/6-/2'-O-glycosyltransferase reveal a conserved residue critical for the regioselectivity. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61(8): e202113587
- [99] Xu Y, Liu S, Bian L, et al. Engineering of a UDP-glycosyltransferase for the efficient whole-cell biosynthesis of siamenoside I in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(5): 1601-1609
- [100] Chen M, Song F, Qin Y, et al. Improving thermostability and catalytic activity of glycosyltransferase from panax ginseng by semi-rational design for rebaudioside D synthesis. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 884898
- [101] 郑婉, 刘振杨, 郑金珠, 等. 易错PCR技术改造 β -环糊精葡萄糖基转移酶的催化特性. *现代食品科技*, 2023, 39

- (5): 25-31
- [102] Xue Q, Su X, Yu W, et al. Efficient production of neohesperidin enabled by protein engineering of rhamnosyltransferase Cm1,2RhaT. *ACS Sustain Chem Eng*, 2024, 12(5): 1960-1972
- [103] Eichler J. Protein glycosylation. *Curr Biol*, 2019, 29(7): R229-R231
- [104] Wang P, Wei W, Ye W, et al. Synthesizing ginsenoside Rh2 in *Saccharomyces cerevisiae* cell factory at high-efficiency. *Cell Discov*, 2019, 5(1): 5
- [105] Liu J, Lu J, Zhang C, et al. Tandem intermolecular [4+2] cycloadditions are catalysed by glycosylated enzymes for natural product biosynthesis. *Nat Chem*, 2023, 15(8): 1083-1090