

文章编号:1673-1689(2008)02-0006-08

酶法合成低聚糖和新糖复合物的研究进展

庄海宁, 金征宇*

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 低聚糖在许多生物学事件中发挥着重要的作用。了解各种低聚糖的生物学功能, 需要大量的已知结构的低聚糖, 但传统的分离纯化方法限制了这种可行性。因此, 采用化学和酶法合成低聚糖越来越成为当今糖生物学和糖生物技术的主流。由于低聚糖通常是以糖复合物的形式与蛋白质或脂类相连接的, 为了解低聚糖分子的生物学功能, 有必要研究合成新糖蛋白、新糖脂等新糖复合物的方法。作者综述了最新的酶法合成低聚糖和新糖复合物的研究进展。

关键词: 酶法合成; 糖苷酶; 糖基转移酶; 低聚糖; 新糖复合物

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Research Prospect of Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Neoglycoconjugates

ZHUANG Hai-ning, JIN Zheng-yu*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Oligosaccharides play important roles in many biological events. Large amount of oligosaccharides with defined structure were required for illustrating the biological functions of these oligosaccharides. These oligosaccharides are of limited availability by traditional purification methods. Chemical and enzymatic syntheses of oligosaccharides are becoming increasingly important in glycobiology and glycotecchnology. Moreover, oligosaccharides often exist as glycoconjugates attached to proteins or lipids. The development of simple and effective methods for neoglycoconjugates synthesis, such as neoglycoprotein is neoglycolipids are necessary for understanding of biological functions of these molecules. The most recent developments in the enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates were summarized in this paper.

Key words: enzymatic synthesis; glycosidase; glycosyltransferase; oligosaccharide; neoglycoconjugate

低聚糖又称寡聚糖或寡糖, 是指 2~10 个单糖通过糖苷键连接而成的直链或支链的一类糖, 可分

为普通低聚糖和功能性低聚糖。糖蛋白、糖脂、蛋白聚糖等糖复合物 (complex carbohydrate) 或糖缀

收稿日期: 2007-05-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20436020); 国家 863 计划项目 (2006AA102333); 国家“十一五”科技计划项目 (2006BAD05A01).

作者简介: 庄海宁 (1980-), 女, 江苏邳州人, 粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生. Email: witwheat@163.com

* 通讯作者: 金征宇 (1960-), 男, 江苏扬州人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事碳水化合物化合物的研究.

Email: zjin@jiangnan.edu.cn

合物(glycoconjugates)作为信息分子,则在细胞黏着、细胞信号、发育分化、免疫细胞成熟活化、生殖受精,以及共生寄生等一系列重要生命过程中,起介导、调节的作用。

低聚糖可以用化学法或酶法来合成。化学法需要严谨的设计,包括保护基团,选择催化剂和反应条件,确定供体离去基团以及受体等。与化学法相比,酶法的糖基化反应通常是在温和的条件下立体选择性地进行的,不需要某些复杂的步骤,如对某些羟基基团的保护或去保护等。用于低聚糖合成的常见酶包括各种糖基转移酶、糖苷水解酶以及

磷酸化酶等,除酶源充足外,主要因为这些酶催化合成低聚糖时的底物原料容易获得。

糖苷酶通过转糖基作用^[1]和缩合作用^[2,3]可以合成低聚糖(图 1)。虽然其立体选择性不强,转化率不如糖基转移酶高,但是糖苷相对便宜,因此可以较容易地获取,从而作为糖基供体。这样,糖苷在合成低聚糖的实际过程中是一个非常有用的工具。例如,归莉琼等利用米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖^[4],王红妹等利用巨大芽孢杆菌转糖基 β -半乳糖苷酶催化生成低聚半乳糖^[5],马莺等利用米曲霉 β -D 吡喃果糖苷酶合成低聚果糖^[6]。

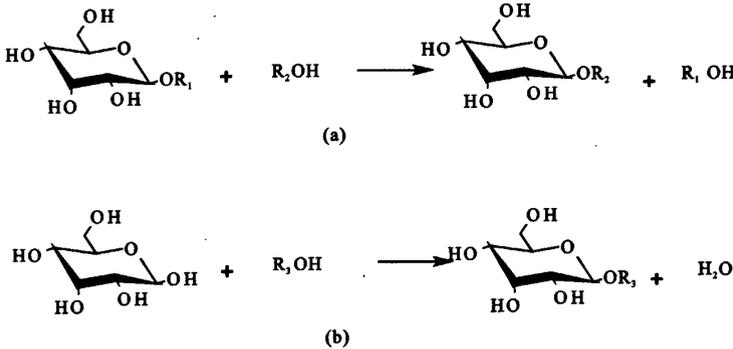


图 1 糖苷酶催化的糖基转移反应和缩合反应

Fig. 1 Glycosidase-Catalyzed Transglycosylation (A) and Condensation (B)

糖基转移酶的作用是高效而专一地把糖基从糖核苷酸供体催化到受体上。但是,酶与糖核苷酸都很昂贵,生成的核苷酸磷酸通常会使得糖基化路径受到十分明显的反馈抑制作用。最近,由于越来越多的基因重组糖基转移酶^[7,8]的获得、糖核苷酸再生系统^[9]以及工程菌^[10]的使用,这些问题得以迅速解决。因此,作为低聚糖合成反应的重要的工具酶,糖基转移酶的研究也是十分重要的,作者对最近有关低聚糖和新糖复合物的一些简单合成方法进行了综述。

1 外切糖苷酶催化的转糖基反应合成硫酸化二糖

许多合成低聚糖的糖苷酶都是外切糖苷酶,它可以将供体分子上一个非还原性末端的单糖残基转移到受体分子上,但是 Takeomi 和 Taichi 发现硫酸化 β -糖苷也可以用作外切糖苷酶发生催化转糖基反应的较好底物。

低聚糖的硫酸化通常发生在糖复合物上,如糖蛋白、糖脂或蛋白聚糖。这些糖复合物在以下生物事件中具有重要作用,如结合选择蛋白,结合层粘连蛋白,迁移神经细胞,黏附细菌和激活巨噬细胞。

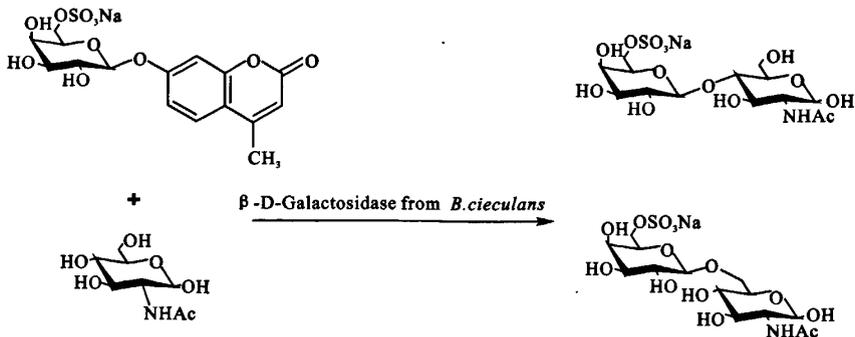
Murata 等人通过 *Bacillus circularis* β -D-半乳

糖苷酶催化 6-硫代半乳糖基化反应可以得到硫代二糖,他们以 4-甲基伞花酰-6-硫代 β -D-半乳糖吡喃糖苷(S6Gal β -4MU)作为供体,该酶使 6-硫代半乳糖残基转移到 GlcNAc 受体上^[11],见图 2(a)。

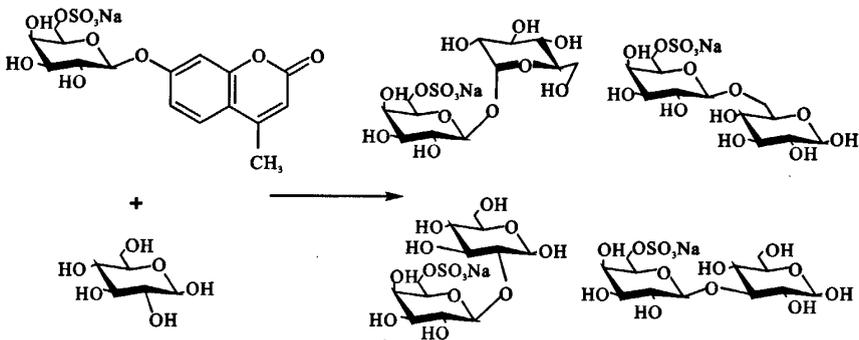
利用 HPAEC-PAD 可以检测到 6'-硫代 N-乙酰乳糖胺(S6Gal β 1-4GlcNAc)和 6'-硫代 N-乙酰异乳糖胺(S6Gal β 1-6GlcNAc)的摩尔比为 1:4。如果受体为 Glc,则主要得到 S6Gal β 1-2Glc,此外还有 S6Gal β -(1-1)- α Glc, S6Gal β 1-3Glc, S6Gal β 1-6Glc 等产物^[11],见图 2(b)。

甲基 α -D-葡萄糖基吡喃糖苷(Glc α -OMe)和甲基 β -D-葡萄糖基吡喃糖苷(Glc β -OMe)也可以作为该酶催化 6-硫代半乳糖基化反应的供体,以得到 41% 的 S6Gal β 1-2Glc α -OMe 和 S6Gal β 1-6Glc α -OMe, 12% 的 S6Gal β 1-3Glc β -OMe 和 S6Gal β 1-6Glc β -OMe。这些结果说明 β -D-半乳糖苷酶所介导的糖基转移反应的立体选择性和有效性主要取决于葡萄糖基受体上异头碳糖苷键的构型。

类似的酶法转化可以生成含 6-硫代 GlcNAc 的二糖。例如, Uzawa 等人利用 6-硫代 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖苷作为供体,利用米曲霉 β -N-乙酰氨基糖苷酶介导的转糖基反应可以合成 6'-硫代二糖^[12]。



(a) 以 4-甲基伞花酰-6-硫代 β -D-半乳糖吡喃糖苷(S6Gal β -4MU)作为供体, GlcNAc 作为受体合成 6'-硫代二糖



(b) 以 4-甲基伞花酰-6-硫代 β -D-半乳糖吡喃糖苷(S6Gal β -4MU)作为供体, Glc 作为受体合成 6'-硫代二糖

图 2 *B. Circulans* 代谢产生的 β -D-半乳糖苷酶

Fig. 2 Synthesis of 6'-Sulfated Disaccharides with β -D-Galactosidase from *B. circulans*

2 内切糖苷酶催化的转糖基反应合成低聚糖

一般而言,在转糖基反应中糖苷酶对于受体底物的羟基而言具有低立体选择性。但是,一些内切聚糖酶,如壳聚糖酶,纤维素酶,木聚糖酶和透明质酸酶在转糖基反应中却可以严格地选择受体上的羟基。例如, Kobayashi 等报道了纤维素酶,一个内切 1,4- β -葡聚糖酶,立体选择性地催化糖苷键形成 β -(1-4)键而得到平均聚合度为 22 的纤维素。而且, Saitoh 等人报道,透明质酸酶(可任意水解透明质酸 GlcNAc 和 GlcA 残基间的 β -(1-4)键)可以将透明质酸上的 GlcA β 1,3GlcNAc 单元转移到吡啶基氮化的透明质酸己糖的非还原性末端的 GlcA 上^[13]。

由 *Escherichia freundii*^[14], *Bacteroides fragilis*^[15] 和 *Flavobacterium keratolyticus*^[16] 得到的内切- β -半乳糖苷酶(EC. 3. 2. 1. 103)能够普遍水解人奶、糖蛋白和糖脂中的碳水化合物基部中的硫酸化和非硫酸化 N-乙酰乳糖胺-重复寡糖单元。因此

内切 β -半乳糖苷酶广泛地应用在分析聚 N-乙酰乳糖胺糖复合物的结构和功能性质中。最近, Takeomi 和 Taichi 发现 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 可以作为 *E. freundii* 内切 β -半乳糖苷酶的最适底物^[17]。因此 Takeomi 和 Taichi 以 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 作为初始底物,以该酶来合成一系列终端为 GlcNAc 的聚-N-乙酰乳糖胺。用该酶催化 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 上的转糖基反应, GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 既作为供体又作为受体,可以将 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 转化为 β -对硝基苯基 GlcNAc β 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,3)₁₋₄Gal β 1,4GlcNAc β -pNP, 见图 3(a)^[18]。

当 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 用作初始底物时, GlcNAc β 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,3)₂Gal β 1,3GlcNAc β -pNP 优先于 GlcNAc β 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,3)₂Gal β 1,4GlcNAc β -pNP 合成,见图 3(b)^[18],这说明 GlcNAc β 1,3(Gal β 1,4GlcNAc β 1,3)₂Gal β 1,3GlcNAc β -pNP 是由该酶直接转移 GlcNAc β 1,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal 到初始底物的

非还原末端的 GlcNAc 残基上得到。这些结果表明该酶不仅可以转移二糖 GlcNAcβ1, 3Gal, 而且也可以转移四糖 GlcNAcβ1, 3Galβ1, 4GlcNAcβ1, 3Gal 到初始底物 GlcNAc 上的 4-OH 上。

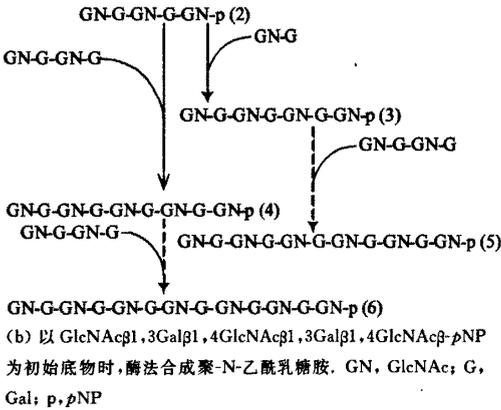
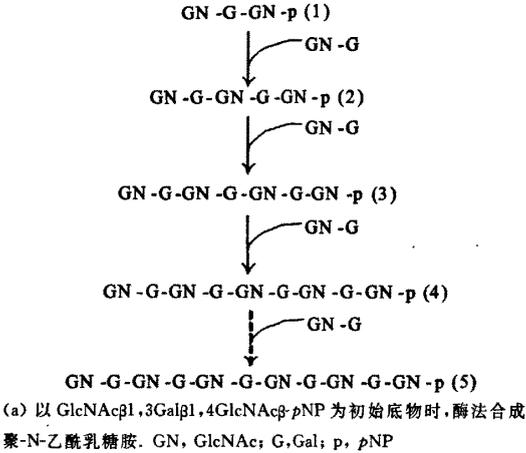


图 3 *E. freundii* 内切 β-半乳糖苷酶转糖基反应的可能机理
Fig. 3 Proposed mechanism of *E. freundii* endo-β-galactosidase-mediated transglycosylation reaction

3 糖苷酶催化合成糖苷的缩合反应

由于反应过程简单, 酶和底物的价格低廉, 可以利用糖苷酶催化的缩合反应合成糖苷。Crout 和 Vic 报道了通过杏仁 β-D-葡萄糖苷酶催化的缩合反应得到烷基和苯基 β-D-葡萄糖吡喃糖苷的高效合成方法。在 50 °C 的条件下, 在 V(乙醇) : V(水) = 90 : 10 的混合溶剂内进行己糖的糖苷缩合反应。在这一体系内, 热动力学平衡向合成方向平移, 不仅是靠浓度作用而且也是由于水的低反应性。糖苷的得率介于 40%~60% 之间^[19]。而且, Crout 等证明该方法对于合成糖苷类物质具有普遍性, 例如 β-半乳糖苷酶, α-半乳糖苷酶以及 β-甘露糖苷酶^[20]。

一般来说, 缩合反应是指一分子单糖与一分子亲核试剂(如一分子乙醇)反应生成一分子糖苷和一分子水。最近, 利用从 *Trichoderma reesei* 中得到的纤维素酶通过缩合反应可以得到不同的二糖糖苷。当高浓度的乳糖与酶在烷醇和少量水的混合溶剂中培养时, 利用酶的缩合反应可以得到 1%~4% 的相应的烷基 β-乳糖苷, 这取决于所添加的是何种乳糖(图 4(a))^[21]。得率倾向于随烷醇链长的增加而降低(图 4(b))。当 3-烷醇和长链烷醇(如 1-癸醇)被用作受体时, 几乎无反应发生。基于所添加的乳糖, 乳糖与甘油之间的缩合反应经高效催化后可以得到 2-O-β-乳糖基甘油和 1-O-β-乳糖基-(R,S)-甘油, 乳糖与甘油以 3 : 7 的摩尔比得到总得率为 20% 的产物(图 4(c))。当 1,3-丙二醇用作配糖体取代甘油时, 该纤维素酶也能催化类似的缩合反应以产生 17% 单-O-乳糖基丙二醇苷。

当 LacNAc 用作配糖体的底物时, 该酶也能催化不同的烷醇与之发生缩合反应而得到相应的烷基 β-N-乙酰氨基乳糖, 但该烷基 N-乙酰氨基乳糖的得率仅为以乳糖做底物时所得产物得率的 1/4。与乳糖和甘油之间的缩合反应形成对比的是, LacNAc 和甘油之间的缩合反应仅得到 1-O-β-N-乙酰乳糖胺基-(R,S)-甘油^[22]。

4 糖合酶催化低聚糖合成

利用蛋白工程生产一种保留有 β-糖苷酶活力的菌株的有效方法得以开发, 该酶中的具有催化活性的亲核基团突变为非亲核的残基。突变的糖苷酶称作“糖合酶”, 该酶消除了水解活性, 可以利用 α-氟糖苷作为底物催化 β-糖苷键的形成。低聚糖产物在反应体系中积聚, 因而可以得到很高的产率。Withers 等首次报道的糖合酶, 即是从 *Agrobacterium sp.* 取得的 β-糖苷酶的 Glu358 被丙氨酸取代后得到的突变酶, β-葡萄糖合酶, 具有高效的低聚糖合成活性, 产率可多达 60% (图 5(a))^[23]。类似的方法可用于开发 β-半乳糖合酶^[24], β-甘露糖合酶^[25], α-葡萄糖合酶^[26]。

该方法不仅可以被应用到外切糖苷酶领域, 而且还可以被扩展应用到内切糖苷酶领域, 如 β-葡聚糖酶^[27], 甘露聚糖酶^[28] 和纤维素酶^[29]。最近, 该方法被应用于合成硫糖苷, 这种糖苷可以抗酶解^[30]。从 *Agrobacterium sp.* 得到的 β-糖苷酶和从 *Cellulomonas fumi* 得到的 β-甘露糖酶的一般酸/碱催化剂在非催化性的活性残基上会发生突变。利用这些被称之为“硫糖苷酶”的突变体, 可以催化得到具

有 S-糖苷键连接的具有二硝基苯基 β-糖苷的低聚糖,其得率在 35%~82%,见图 5(B)。

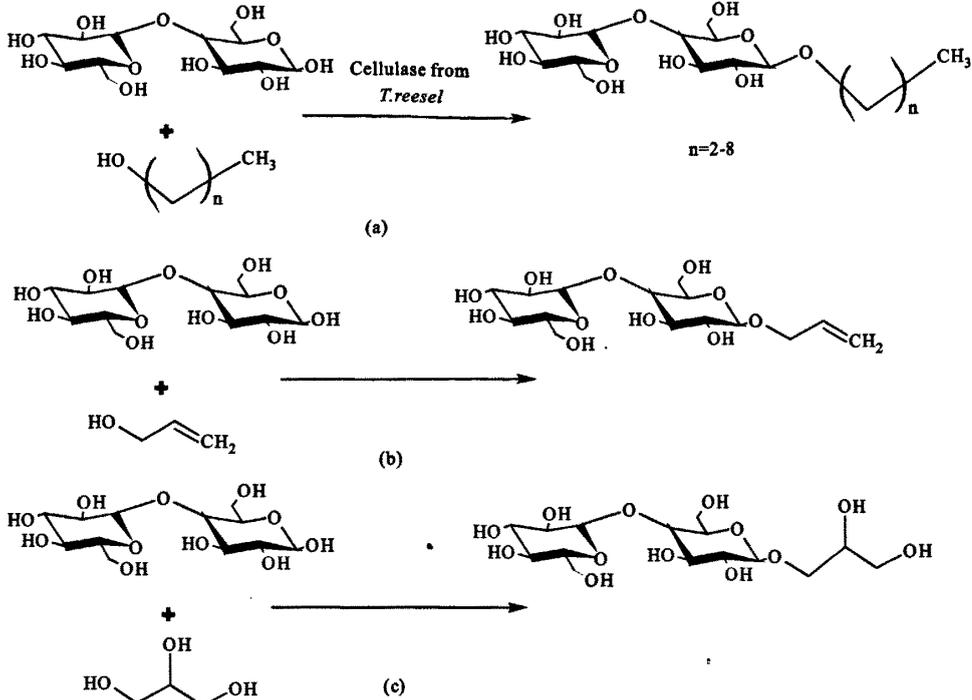
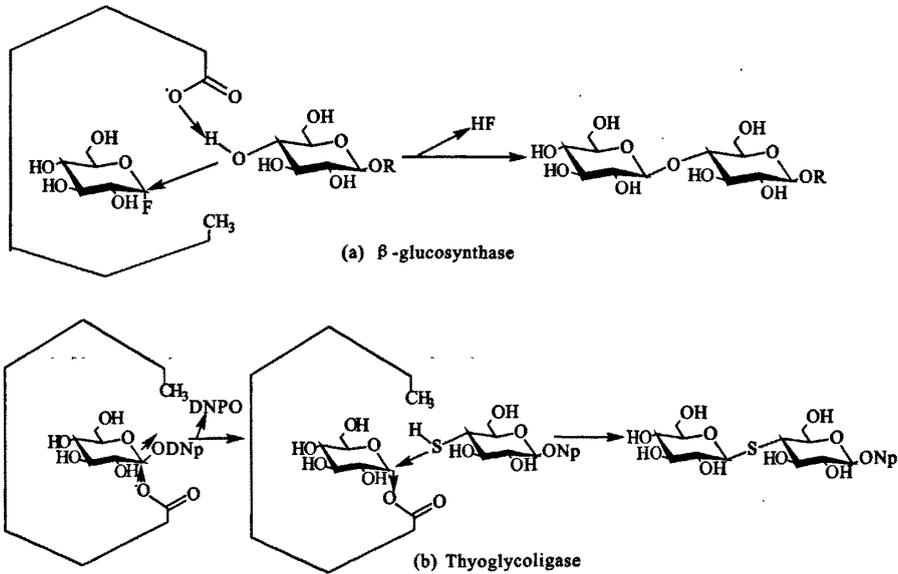


图 4 用 1-烷醇(C2-C8)与从 *T. reesei* 中得到的纤维素酶反应合成 β-乳糖苷(a)、(b) 烷醇、(c) 甘油

Fig. 4 Synthesis of β-Lactosides with Cellulase from *T. reesei* Using (a) 1-Alkanols(C2-C8), (b) Allyl Alcohol and (c) Glycerol



(a) 由非亲核的突变糖苷酶催化的逆糖合酶反应。供体底物为氟糖苷,与正常底物相比,它具有相反的异头碳糖苷键构型^[23]。(b) 由非酸/碱催化突变糖苷酶催化的硫代糖苷酶。供体底物上二硝基苯的良好的离去性能使糖基-酶中间体得以形成。硝基苯(Np)脱氧-糖的较高亲核性使 S-糖苷键最终形成^[30]。

图 5 糖合酶的反应机理

Fig. 5 Reaction Mechanism of Glycosyltransferases

5 利用糖苷酶合成糖肽

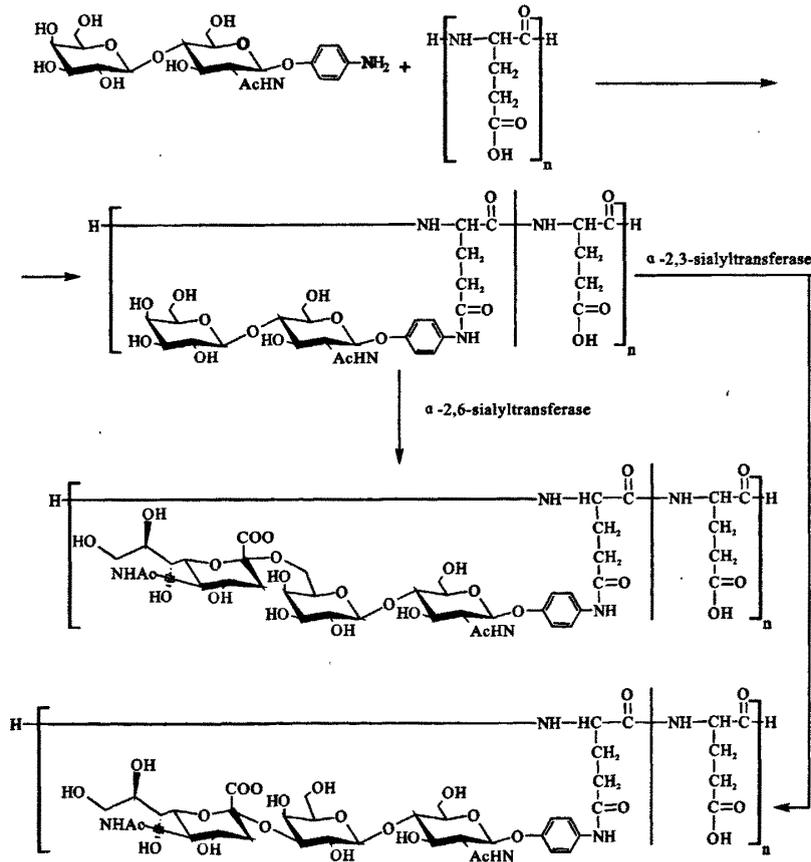
聚糖通常会改变具有黏附特性的蛋白质的基本性质。因此,可以预见,添加聚糖后的天然蛋白质和肽类其溶解性和稳定性均会显著增加。另外,由 *Mucor himealis* 产生的内切-β-N-乙酰己糖胺酶用于将 N-聚糖转移到生物活性肽如鳗鱼降钙素, P 物质肽和 α-交配因子的葡萄糖胺残基上^[31]。此外,来自几内亚猪肝脏的转糖胺酶可以将低聚糖链转移至肽链上。该酶可以催化一种环肽的葡萄糖胺残基与 6-氨基己糖-β-乳糖苷之间的偶联反应,然后由 α-2,3-唾液酸基转移酶对该糖基化肽进行酸化。所得的唾液酸化糖肽对于流感病毒引起的血凝反应具有一定的抑制效应^[32]。类似地,突变型胰岛素,即其中胰岛素 B 链上的 N-末端苯丙氨酸残基变为葡萄糖胺,可以通过连续利用转葡萄糖胺酶和 α-2,6-唾液酸基转移酶转化为唾液酰乳糖基胰岛素^[33]。从小鼠的实验结果可以看出,唾液酸残基的

引入对于维持血液中降血糖活性具有关键作用。

6 化学-酶法合成人工黏蛋白

糖蛋白是蛋白质与糖类的共价复合物,结合于蛋白肽链上的糖基少则 1 个,多则达数百^[34]。粘蛋白是一类高度糖基化的蛋白质,是形成粘膜的主要成分。最近研究表明,它们具有抑制小肠腺瘤生长的功能^[35],也具有抑制幽门螺旋杆菌感染和生长的功效^[36]。由于粘蛋白具有如此重要的性质,因而合成具有精确结构的人工粘蛋白用以结构和功能的研究就显得十分重要。

“人工粘蛋白”是聚(α-L-谷氨酸)(α-PGA)骨架上带有多价唾液酰寡糖单位的一种水溶性很好的糖聚合物,研究者已通过化学-酶法合成“人工粘蛋白”,使之作为抗人类流感病毒感染的抑制剂^[37]。在这种化学-酶法中,对-氨基苯二糖与 α-PGA 侧链上的 γ-羧基偶联,然后由 α2,3-或 α2,6-唾液酰基转移酶进行唾液酰化(图 6)。



对氨基苯-β-N-乙酰乳糖基与 α-PGA 侧链上的 γ-羧基通过缩合反应偶联,然后通过 α2,3 或 α2,6-唾液酰基转移酶唾液酰化

图 6 化学-酶法合成含有多价 α2,6 或 α2,3Neu5Ac 残基的人工粘蛋白

Fig. 6 Chemo-Enzymatic Synthesis of Artificial Mucins That Contain Multivalent α2-6 or α2-3 Neu5Ac Residues

通过增加糖聚合物的相对分子质量和唾液酰基的含量,可以显著提高人工粘蛋白对病毒的抑制活性。如 α -2,6-Sialo-PGA 的相对分子质量高达 260 000,既对某种流感 A 型病毒株(A/Memphis/1/71(H3N2))具有强抑制性,也对某种流感 B 型病毒株(B/Lee/49)具有很好的抗病毒效果。含有 Neu5Ac α 2,3Gal β 或 Neu5Ac α 2,6Gal 的人工粘蛋白对西班牙流感病毒的血细胞凝集素具有专一结合性,因而是一种非常有效的诊断试剂^[38]。

7 结 语

聚糖或糖复合物不能直接由 DNA 编码来转录和翻译,但可以由“糖-基因”转录和翻译的糖苷酶或糖基转移酶来合成。应用生物信息学工具对编码糖苷酶或糖基转移酶的突变基因库、蛋白质序列、

3D 结构、活性与功能的变化等做比对分析,从根本上揭示突变酶的催化机理和折叠机制、蛋白质一级序列与三级结构的关系以及结构与功能的关系等,为探索酶法合成低聚糖的新途径提供理论依据。例如,杨雪鹏等利用分子生物学手段构建非解脲栖热菌 HG102 耐热 β 糖苷酶,是具有水解功能和转糖苷功能的单体酶,解决了 β 糖苷酶合成低聚糖要在有机相中并需要高浓度的糖基供体的缺陷^[39],冯惠勇等利用定向进化技术改良 β -糖苷酶,也显著提高了其合成低聚糖的催化性能^[40]。

综上所述,通过酶法转化可以得到大量结构精确的低聚糖或糖复合物,这在研究低聚糖或糖复合物的生物活性和构效关系时十分有用,通过这种研究来构建新的具有药效的糖物质也将是非常有意义的。

参考文献(References):

- [1] Murata T, Usui T. Enzymatic synthesis of important oligosaccharide units involved in N- and O- glycans[J]. *Trends Glycosci. Glycotechnol*, 2000, 65:161-174.
- [2] Crout D H, Vic G. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2:98-111.
- [3] van Rantwijk F, Woudenberg-van Oosterom, Sheldon R A. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides[J]. *J Mol Cat B:Enzymatic*, 1999, 6:511-532.
- [4] 归莉琼,魏东芝,崔玉敏,等. 米曲霉 β -半乳糖苷酶催化合成低聚半乳糖[J]. 华东理工大学学报, 1998, 24(4):422-426. GUI Li-qiong, WEI Dong-zhi, CUI Yu-min, et al. Synthesis of Galacto-oligosaccharide by β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 1998, 24(4):422-426. (in Chinese)
- [5] 王红妹,肖敏,李正义,等. 转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌筛选和鉴定及酶催化合成低聚半乳糖[J]. 山东大学学报:理学版, 2006, 41(1):133-139. WANG Hong-mei, XIAO Min, LI Zheng-yi, et al. Screening and identification of β -galactosidase-producing microorganism and enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides using its transgalactosylation[J]. *Journal of Shandong University: Natural Science*, 2006, 41(1):133-139. (in Chinese)
- [6] 马莺,孙建华. β -D 呋喃果糖苷酶合成低聚果糖的工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(2):69-71. MA Ying, SUN Jian-hua. The Synthesis of Fructo-oligosaccharides by β -D-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(2):69-71. (in Chinese)
- [7] Kato T, Murata T, Usui T, et al. Improvement of the production of GFPuv- β -1,3-N- acetylglucosaminyltransferase 2 fusion protein using a molecular chaperone-assisted insect-cell-based expression system[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89: 424-433.
- [8] Hidari K I, Horie N, Murata T, et al. Purification and characterization of a soluble recombinant human ST6Gal I functionally expressed in *Escherichia coli*[J]. *Glycoconj J*, 2005, 22:1-11.
- [9] Hanson S, Best M, Bryan M C, et al. Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29:656-663.
- [10] Endo T, Koizumi S. Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10:536-541.
- [11] Murata T, Kosugi M, Nakamura T, et al. Enzymatic synthesis of sulfated disaccharides using β -D-galactosidase-catalyzed transglycosylation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65:2456-2464.
- [12] Uzawa H, Zeng X, Minoura N. Synthesis of 6'-sulfodisaccharides by β -N- acetylhexosaminidase-catalyzed transglycosylation[J]. *Chem Commun*, 2003, 7:100-101.
- [13] Saitoh H, Takagaki K, Majima M, et al. Enzymatic reconstruction of glycosaminoglycan oligosaccharide chains using the transglycosylation reaction of bovine testicular hyaluronidase[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:3741-3747.
- [14] Fukuda M N. Purification and characterization of endo- β -galactosidase from *Escherichia freundii* induced by hog gastric mucin[J]. *J Biol Chem*, 1981, 256:3900-3905.
- [15] Scudder P, Lawson A M, Hounsell E F, et al. Characterization of oligosaccharides released from human-blood-group O erythrocyte glycopeptides by the endo- β -galactosidase of *Bacteroides fragilis*; a study of the enzyme susceptibility of branched poly(N-acetylglucosamine) structures[J]. *Eur J Biochem*, 1987, 168:585-593.

- [16] Leng L, Zhu A, Zhang Z, et al. Cloning, functional expression and purification of endo- β -galactosidase from *Flavobacterium keratolyticus*[J]. *Gene*, 1998, 222:187-194.
- [17] Murata T, Hattori T, Amarume S, et al. Kinetic studies on endo- β -galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of N-acetylglucosamine-repeating oligosaccharide β -glycosides using its transglycosylation activity[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270:3709-3719.
- [18] Murata T, Honda H, Hattori T, et al. Enzymatic synthesis of poly-N-acetylglucosamines as potential substrates for endo- β -galactosidase-catalyzed hydrolytic and transglycosylation reactions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1722:60-68.
- [19] Vic G, Crout D H G. Synthesis of glucosidic derivatives with a spacer arm by reverse hydrolysis using almond β -D-glucosidase[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, 5:2513-2516.
- [20] Vic G, Hastings J J, Crout D H G. Glycosidase-catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: application to the chemoenzymatic synthesis of galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -galactopyranoside derivatives[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, 7:1973-1984.
- [21] Yasutake N, Totani K, Harada Y, et al. Efficient synthesis of glyceroyl β -lactoside and its derivatives through a condensation reaction by cellulase[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1620:252-258.
- [22] Yasutake N, Totani K, Harada Y, et al. Synthesis of glyceroyl β -N-acetylglucosaminide and its derivatives through a condensation reaction by cellulase[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67:1530-1536.
- [23] Mackenzie L F, Wang Q, Withers S G, et al. Glycosynthases; mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120:5583-5584.
- [24] Jakeman D L, Withers S G. On expanding the repertoire of glycosynthases; mutant β -galactosidases forming β -(1,6)-linkages[J]. *Can J Chem*, 2002, 80:866-870.
- [25] Hrmova M, Imai T, Rutten S J, et al. Mutated barley (1,3)- β -D-glucan endohydrolases synthesize crystalline (1,3)- β -D-glucans[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:30102-30111.
- [26] Okuyama M, Mori H, Watanabe K, et al. α -Glucosidase mutant catalyzes " α -glycosynthase"-type reaction[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66:928-933.
- [27] Fairweather J K, Fajjes M, Driguez H, et al. Specially studies of Bacillus 1,3-1,4- β -glucanases and application to glycosynthase-catalyzed transglycosylation[J]. *Chem Bio Chem*, 2002, 3:866-873.
- [28] Jahn M, Stoll D, Warren R A J, et al. Expansion of the glycosynthase repertoire to produce defined manno-oligosaccharides[J]. *Chem Commun*, 2003, 12:1327-1329.
- [29] Fort S, Boyer V, Greffe L, et al. Highly efficient synthesis of β (1 \rightarrow 4)-oligo- and -polysaccharides using a mutant cellulase[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122:5429-5437.
- [30] Jahn M, Marles J, Warren R, et al. Thioglycoligases; mutant glycosidases for thioglycoside synthesis[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42:352-354.
- [31] Saskiawan I, Mizuno M, Inazu T, et al. Chemo-enzymatic synthesis of the glycosylated α -mating factor of *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its biological activity[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 406:127-134.
- [32] Ohta T, Miura N, Fujitani N, et al. Glycotentacles; synthesis of cyclic glycopeptides, toward a tailored blocker of influenza virus hemagglutinin[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42:5186-5189.
- [33] Sato M, Sadamoto R, Niikura K, et al. Site-specific introduction of sialic acid into insulin[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43:1516-1520.
- [34] 施立楠, 吴军. 糖蛋白糖链的分析[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1):60-63.
SHI Li-nan, WU Jun. An analysis of saccharide of glycoprotein[J]. *Letters in Biotechnology*, 2005, 16(1):60-63. (in Chinese)
- [35] Velcich A, Yang W, Heyer J, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2[J]. *Science*, 2002, 295:1726-1729.
- [36] Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection[J]. *Science*, 2004, 305:1003-1006.
- [37] Totani K, Kubota T, Kuroda T, et al. Chemoenzymatic synthesis and application of glycopolymers containing multivalent sialyloligosaccharides with a poly(L-glutamic acid) backbone for inhibition of infection by influenza viruses[J]. *Glycobiology*, 2003, 13:315-326.
- [38] Kobasa D, Takada A, Shinya K, et al. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus[J]. *Nature*, 2004, 431:703-707.
- [39] 杨雪鹏, 杨寿钧, 韩北忠, 等. 非解脲热菌 HG102 耐热 β -糖苷酶的结构与功能研究[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1):84-91.
YANG Xue-peng, YANG Shou-jun, HAN Bei-zhong, et al. The Structure-function relationship of thermostable β -glycosidase from the thermophilic eubacterium *thermus nonproteolyticus* HG102[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(1):84-91. (in Chinese)
- [40] 冯惠勇, 仪宏, 王丽丽. 定向进化技术改良 β -糖苷酶的低聚糖合成性能[J]. 生物加工过程, 2006, 4(1):44-49.
FENG Hui-yong, YI Hong, WANG Li-li. Oligosaccharide synthesis performance of β -Glycosidase promoted by directed evolution[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2006, 4(1):44-49. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)