

啤酒酵母中 β -葡聚糖分子结构及构象的研究进展

刘晓永^{1,2}, 王 强^{2*}, 胡永金¹, 裴剑慧²

(1.江南大学食品学院, 江苏 无锡 214306; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094)

摘 要: SCG 是以 β -1,3 葡聚糖为主, β -1,6 葡聚糖为辅的一种混合多糖。SCG 与细胞壁中的几丁质和蛋白分子交连产生不溶性。在细胞壁中分子构象模型为 线性 β -1,3 葡聚糖链通过 β -1,6 键形成分支, 此后 β -1,3 葡聚糖的侧链延伸并交联到其他细胞壁成分上。SCG 在酵母细胞壁中的分子结构和生物构象的动态过程状态 动态过程中 SCG 分子结构和生物构象发生变化的调控机理 有关 SCG 合成的酶学机理等仍需作进一步的研究。 (孙悟)

关键词: β -葡聚糖; 啤酒酵母; 分子结构; 分子构象

中图分类号: TS262.5; TS261.1; D62 文献标识码: 文章编号: 1001-9286 (2005)12-0026-03

Research Progress in β -glucan Molecular Configuration and Conformation in *Saccharomyces cerevisiae*

LIU Xiao-yong^{1,2}, WAN G Qiang², HU Yong-jin¹ and PEI Jian-hui

1.School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214306; 2.Institute of Processing for Agricultural Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

Abstract: SCG is a compounded polysaccharide of β -1,3 glucan (main) and β -1,6 glucan (auxiliary). The coupling of SCG with chitin and protein molecules in cell wall resulted in insolubility. The molecular conformation model in cell wall is as follows: linear β -1,3 glucan chain formed branch through β -1,6 bond, then the side chain of β -1,3 glucan extended and cross-linked to other components in cell wall. The dynamic progress of molecular configuration and conformation of SCG in *S. cerevisiae* cell wall, the relative regulation and control mechanism, and the enzymology mechanism of SCG synthesis were still in need of further research. (tran. by YUE Yang)

Key words: β -glucan; *S. cerevisiae*; configuration; conformation

1 β -葡聚糖

β -葡聚糖存在于许多细菌、真菌和高等植物中, 它的一个重要来源是啤酒酵母 (*S. cerevisiae*), 是构成酵母细胞壁的主要成分, 占细胞壁干重的 30%~60%^[1]。 β -葡聚糖在食品工业中可用作增稠剂、膳食纤维和脂肪替代品^[1], 此外还具有刺激免疫、降低血液中的胆固醇、抗肿瘤和预防炭疽热等医学功效^[3~5], 日益引起人们的关注。本文在总结各种有关文献的基础上, 对 *S. cerevisiae* 中的 β -葡聚糖 (简称 SCG) 的分子结构、生物构象等方面做一综述。

2 SCG 的结构

SCG 是一种多糖, 属于结构多糖, 其大小和组成随

酵母菌种、培养条件以及其制备方法不同而有所差异, 现已提出的 SCG 结构都只是代表一个平均分子^[6~7]。

2.1 SCG 的分子结构

对 SCG 结构的研究最早为 1894 年, Salkowski 从酵母细胞壁中分离到碱溶性和碱不溶性两类多糖, 碱不溶性多糖的主要成分是 SCG, 引起了人们的关注。在 20 世纪上半叶, 由于细胞壁多糖的复杂性以及其相对的不溶性致使在分离提取和结构鉴定的研究进展缓慢^[8]。随着分离提取及测定技术的发展, 1941 年 Hassid 等人首次利用甲基化分析证实了 SCG 是通过 1,3-键连接的, 其乙酰化和甲基化的衍生物在水解过程中, 表现出低特异性旋转和向上旋转, 说明 β -键占主导地位。随后, Barry 等人在研究中发现 SCG 不能被高碘酸氧化 末端残基

收稿日期: 2005-06-28

作者简介: 刘晓永 (1974-), 男, 河南人, 博士研究生, 研究方向: 功能食品。

* 王强为通信联系人。

除外),这说明有大量 1,3 连接键的存在。进一步用 β -葡聚糖苷酶对其进行水解,证实了 β -1,3 键的存在。Peat 等通过对 SCG 物质的酸水解得到了一定量的 β -1,6 葡聚糖系列的寡糖,而首次证实了在 SCG 中有 β -1,6 键的存在。这样,SCG 是 β -1,3 葡聚糖和 β -1,6 葡聚糖组成的混合多糖,还是以 β -1,3/ β -1,6 键交替存在或带有一定分支的单-多糖,成了人们研究的重点。

在以前研究的基础上,Manners 等利用甲基化的方法进行了研究,发现以 2,4-二-O-甲基-D-葡萄糖形式存在的葡萄糖分子,这说明在 C-1,C-3 以及 C-6 处均由糖苷键连接。于是 Manners 等人推测 SCG 可能是一种带有侧链的葡聚糖,但是以 β -1,3 为主链还是以 β -1,6 为主链尚不得而知。Misaki 等用改进的甲基化和高碘酸法对水解产物进行分析,得到 2,3,4,6-四-O-甲基-D-葡萄糖、2,4,6-三-O-甲基-D-葡萄糖和 2,4-二-O-甲基-D-葡萄糖 (mol),以及微量的 2,3,4-三-O-甲基-D-葡萄糖,这表明 SCG 主要以 (1,3) 键为主,另外还含有小部分的 (1,6) 键连接的残基。Bacon 等在重复上述试验时,首次发现酸碱处理后的酵母在水中高压灭菌时,同时会有糖原和 β -1,6 葡聚糖的产生,这表明 SCG 确实是一种混合多糖。

在此基础上,Manners 和 Fleet 等人发现 85 % 的碱不溶性 SCG 是 β -1,3 键连接,同时在链间穿插 3 % 的 β -1,6 键,有着 1500 聚合度线性分子,分子量相当于 240 KDa,并推测其线状链段的排列更利于螺旋结构的形成,从而使分子具有一定的刚度和水中的不溶性。其余的 15 % 是 β -1,6 键连接的,有着 C-3,C-6 位双取代形式呈高度分支,聚合度为 140,相当于 22 KDa 的分子量。对于以上研究结果,我们认为 SCG 的实际生物聚合度要比以上的数据大,因为在研究过程中,SCG 的提取采用了热酸、碱的方法,这会使 SCG 发生一定的降解。此外,SCG 的生物聚合度还与菌种的培养条件、生长阶段有很大的关系。

以上研究主要集中在碱不溶性的 SCG 上,而对碱溶性 SCG Fleet 等人的研究认为碱溶性的 SCG 是以 β -1,3 和 β -1,6 键相结合的复合体,并带有少部分的支链。至于两者的关系,Hartland 等认为可溶性 SCG 和不可溶性 SCG 两者之间存在前体-产物的生物学关系。在结合以上研究的基础上,对 *S. cerevisiae* 中的葡聚糖的结构推断如图 1^[9]。

由此看来,SCG 是以 β -1,3 葡聚糖为主, β -1,6 葡聚糖为辅的一种混合多糖。至于 SCG 的碱不溶解性的问题,Manners 等人只提到了 β -1,3 键连接的碱不溶性 SCG 呈线性排列更利于形成螺旋结构,从而使分子在水中具有一定的不溶性。而对于以 β -1,6 键连接的碱不溶性 SCG 的水不溶性原因则没有提到。如按 Manners 等人

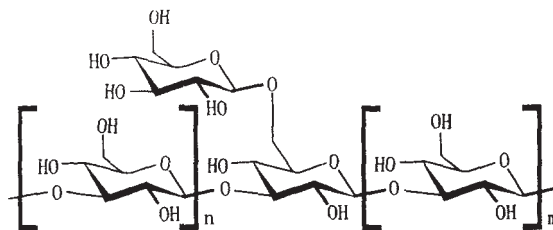


图1 *S. cerevisiae* 中的葡聚糖的推断结构

对 β -1,3 键连接的碱不溶性 SCG 的解释, β -1,6 键连接的碱不溶性 SCG 由于带有高度分支而阻碍葡聚糖分子形成螺旋结构,应该易溶于水但事实并不是如此,因此对 SCG 不溶性的成因还需作进一步的研究。

2.2 SCG 的交连结构

酵母细胞壁组成成分中 85 %~90 % 是多糖、10 %~15 % 为蛋白质。多糖由水溶性甘露糖、碱溶和碱不溶性 SCG、少量的几丁质等组成^[10]。因此,SCG 很可能是与细胞壁中的蛋白质或几丁质等发生交连而导致其不溶性的,于是对 SCG 结构的研究就转向了其与其他物质分子之间的相互作用等方向上。

2.2.1 与几丁质分子的交连

几丁质在酿酒酵母中是母细胞与子细胞之间初级间隔的主要成分,为碱不溶性物质,占酵母细胞壁干重的 2 % 左右^[11]。

20 世纪 70 年代以来,随着研究的深入,相继取得了一系列的有价值的成果。Sitema 等应用壳聚糖酶/亚硝酸去除 *Schizophyllum commune* 细胞壁上的壳聚糖,结果发现所有的 β -葡聚糖都变得可溶于水或碱,这说明壳聚糖和 β -葡聚糖之间的共价键影响着 β -葡聚糖的溶解性。而对于 *Saccharomyces cerevisiae* 酿酒酵母,Mol 等人的研究发现在其细胞壁中含量不到 2 % 的碱不溶性壳聚糖也是以共价键的形式与 β -葡聚糖相连,致使后者变为碱不溶性。既然 SCG 的不溶性主要是与几丁质的共价键连接造成的,但是二者以何种共价键相结合、相结合的部位等并没有指明。Hartland 等认为在酿酒酵母中,几丁质的还原末端以 β -1,4 键或 β -1,2 键与 β -1,3 键-葡聚糖支链的还原末端相连,而后者又附着于葡聚糖主链^[11]。Klis 也提到碱不溶性的 SCG 总是伴随着几丁质的出现,而在碱溶性的 SCG 中则检不出乙酰氨基葡萄糖 (几丁质) 的存在。Kollar 等人通过对 β -1,3 葡聚糖酶抗性物质作放射标记,以助于在酶水解壳聚糖之后检测并纯化细胞壁碎片的方法,将壳聚糖酶解后的水解物过 Bio-Gel P2 柱,氘标记的物质在早期的无效体积和后期的峰间都可检测到。分子量较小的寡糖经 NMR 光谱分析,显示在壳聚糖还原末端和 β -1,3 葡聚糖链的非还原端有 β -1,4 键连接的存在(但也不能排除 β -1,2 键连接的可能性)^[12]。由此看来,造成 SCG 溶解性

不同的原因主要是共价键结合几丁质造成的,这对 SCG 的改性提供了一种新思路。

2.2.2 与蛋白分子的交连

早在 1970 年, Fleet 和 Manners 等人就检测到 SCG 中含有少量的甘露糖和蛋白质, 并认为它们与 SCG 可能是共价连接。随后, Tsutomu 等对酵母细胞壁中的蛋白质与多糖的连接进行了研究, 发现由于细胞壁中的蛋白质中苏氨酸和丝氨酸含量较高, 蛋白质主要通过 O-糖苷键与甘露聚糖相连, 形成甘露糖蛋白聚合物^[13]。而 SCG 与蛋白的连接主要是通过甘露糖蛋白聚合物实现的, Kollar 等将纯化细胞壁碎片经壳聚糖酶水解后变成的可溶物过 Bio-GelP2 柱, 不能进入柱子的高分子物质进一步用伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A) 色谱进行分离, 显示 β -1,6 葡聚糖高聚物中 β -1,3 葡聚糖链与甘露聚糖蛋白、壳聚糖相连, 发现以甘露糖蛋白聚合物 C-末端的 GPI 锚 (一种含有 5 个 α -甘露糖基的糖基化磷脂酰肌醇) 残端作为固定锚 (anchor) 将甘露糖残基的还原末端与 β -1,6 葡聚糖链的非还原端葡萄糖残基相连接, 由此将一个甘露糖蛋白与 β -1,6 葡聚糖结合在一起^[14]。

2.3 在细胞壁中分子的构象

由于 β -1,3 葡聚糖含有适度的分支, 阻止了线性部分链段进一步的结晶, 对 SCG 进行 X-衍射发现 β -1,3 葡聚糖只有很少一部分处于结晶状态。 β -1,3 葡聚糖有着相对灵活的有弹性的线状结构, 可使其以不同的形式向外延伸^[15]。在延伸时, 局部排列成一行的链间易形成氢键而使 β -1,3 葡聚糖分子形成三维有弹性的网状结构。分离的酵母细胞壁着色后在电镜下观察, β -1,3 葡聚糖交联网络分布着 20~60 nm 大小不等的网孔^[16]。在此基础上, Kollar 等证实 β -1,6 葡聚糖高聚物先是附着到细胞壁蛋白的 GPI 残端上, 然后这些 β -1,6 葡聚糖的模块进而以共价键的形式连接入壳聚糖/ β -1,3 葡聚糖的交联网络中^[14]。Mouyna 等提出了一个 SCG 成熟过程的模型: 线性 β -1,3 葡聚糖链通过 β -1,6 键形成分支, 此后 β -1,3 葡聚糖的侧链延伸并交联到其他细胞壁成分上^[16]。

SCG 由于其特殊的结构在酵母的细胞壁中起着不可替代的作用, β -1,3 葡聚糖起着构建整个细胞壁骨架的作用, 而 β -1,6 葡聚糖可以给甘露糖蛋白提供结合锚点, 并通过共价键的形式与 β -1,3 葡聚糖和几丁质相连接, 由此看来 SCG 对酵母细胞壁的连接和稳定起到至关重要的作用^[17,18]。

3 展望

随着研究的深入, 有关酿酒酵母中 SCG 分子的结构和生物构象研究都取得了很大的进展。这为进一步拓宽 SCG 的应用提供了帮助, 还为将真菌细胞壁作为一

种新治疗剂的靶点提供了新思路, 使其研究不再局限于只针对 SCG 本身, 几丁质、GS 等都可以成为新的靶点, 但这方面的研究还处于前期阶段。今后, SCG 的分子结构以及构象研究还需在以下的几个方面作进一步的探讨: ① SCG 在酵母细胞壁中的分子结构和生物构象是一个动态过程, 随外部条件的改变而变化, 在相应极端条件下 SCG 又是怎样的一种状态呢? ② 在这个动态过程中, SCG 的分子结构和生物构象发生变化的调控机理仍不清楚; ③ SCG 分支的状况及其与其他物质的具体而详尽的作用尚待进一步探讨; ④ 有关 SCG 合成的酶学机理的研究还处在初期阶段, 尚有大量的工作有待进一步的开展。当然, 这需要时间和实验的积累, 而理解这些过程, 将会对进一步开发和利用 SCG 提供很大的帮助, 使其更好地服务于整个人类生活。

参考文献:

- [1] Lipke, P.N., Ovalle, R., Cell wall architecture in yeast: New structures and new challenges[J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(15): 3735-3740.
- [2] Konuklar, G., Inglett, E., Carrier, J., Felke, C., Use of a β -glucan hydrocolloid as a suspension in the manufacture of low-fat cheddar cheese: manufacture, composition, yield and microstructure[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(1): 109-119.
- [3] Gordon, D.B., Siamon, J., Fungal β -glucan and mammalian immunity[J]. Immunity, 2003, 19(3): 311-315.
- [4] James, S., Eason, J., Davidson, D., Ostroff, R., Use of aqueous soluble glucan preparation to stimulate latex production[J]. US Patent 1996, 5(1): 223-532.
- [5] Peter, J.R., Brent, E.L., Luke, A.B., Elizabeth, A., Harry, E.E., David, J.W., Pharmacokinetics of fungal (1-3)- β -D-glucans following intravenous administration in rats[J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(12): 1209-1215.
- [6] Catley, J., Isolation and analysis of cell walls in Yeast: A Practical Approach[M]. Oxford/Washington: IRL Press, 1988, 163-183.
- [7] Aguila, B., Francois, M., A study of the yeast cell wall composition and structural response to growth conditions and mode of cultivation[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 37(2): 268-274.
- [8] S. De. 贝特斯, E.J. 旺达姆, A. 斯泰因比歇尔生物高分子——真核生物多糖 (第 6 卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004, 162-193.
- [9] Douglas, W., Lowman, A., Donald, A., Ferguson, J., David, L., Structural characterization of (1/3)- β -D-glucans isolated from blastospore and hyphal forms of *Candida albicans*[J]. Carbohydrate Research, 2003, 338(14): 1491-1496.
- [10] Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L., Composition of the cell walls of several yeast species[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 50(2): 209-214.

(下转第 31 页)

再生率分别为 96.6%, 5.9%, 形成率×再生率为 5.7%, 优于 A₂B₂C₃ 组。综合考虑, 确定 A₂B₁C₃ 为最优组。

2.3 预处理剂的浓度及作用时间对原生质体形成和再生的影响

在上述最优组合的基础之上再进行预处理剂的实验, 预处理剂采用 β -巯基乙醇, 结果见表 4。

表 4 β -巯基乙醇浓度及作用时间对原生质体形成和再生的影响

β -巯基乙醇		K 氏酵母		糖化酵母	
浓度(%)	时间(min)	D	E	D	E
0.1	10	96.3	6.4	97.4	5.6
0.1	20	96.8	5.3	98.0	4.9
0.2	10	97.2	5.5	98.2	4.2
0.2	20	97.7	4.0	98.6	3.9

β -巯基乙醇可以提高原生质体的形成率, 但再生率却随之下降, 因此选用 0.1% β -巯基乙醇作用 10 min 即可获得较好的效果。

2.4 渗透压稳定剂对原生质体形成和再生的影响

考虑到 β -巯基乙醇对原生质体再生的不利作用, 实验中菌液不作预处理。以 K 氏酵母为例, 只采用 2% 酶浓度, 30℃ 处理 1.5 h 的酶解条件, 分别选用 0.8 M KCl, 1.2 M 山梨醇和 0.53 M 蔗糖为渗透压稳定剂配制蜗牛酶酶解液、稀释原生质体液及再生培养基。同时用 0.8 M KCl 配制酶解液, 用 0.53 M 蔗糖配制稀释液和再生培养基, 以此为试验组, 计算原生质体的形成率和再生率。

KCl 作渗透压稳定剂有利于原生质体的形成, 山梨醇也有较好的效果, 而以 0.53 M 蔗糖的效果最差。就再

生率而言, 其情况正好与上述相反, 无机盐类在促进原生质体再生方面不及糖和糖醇。虽然山梨醇对原生质体的形成和再生情况都很好, 但山梨醇成本较其他稳定剂要高很多。综合考虑, 选择在配制酶解液时采用 0.8 M KCl, 而在稀释及配制再生培养基时则采用 0.53 M 蔗糖。

3 讨论

通过一系列的单因素实验及正交实验, 确定了菌龄为对数生长期 14~16 h, 0.1% β -巯基乙醇为预处理剂, 作用 10 min 30℃, 用 2.0% 的蜗牛酶对 K 氏酵母酶解 1.5 h, 对糖化酵母酶解 1.0 h, 配制酶解液时渗透压稳定剂采用 0.8 M KCl, 在稀释及配制再生培养基时采用 0.53 M 蔗糖溶液, 可获得较理想的形成率和再生率。

参考文献:

- [1] 魏运平, 叶俊华, 赵光鳌. 原生质体融合技术及其在酿酒酵母菌株选育中的应用[J]. 酿酒科技, 2003, 115(1): 87-89.
- [2] VS Javadekari, SivaRaman, and DV Gokhale. Industrialeast strainimprovementconstructionofahighlyfloculenyeast withakilledcharacterby protoplasmfusion[J]. IndMicrobio, 1995, 15(2): 94-102.
- [3] 庞小燕, 王吉瑛, 赵凤生. 构建直接发酵淀粉产生酒精的酵母融合菌株的研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 165-169.
- [4] 张龙翔, 等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [5] 曾云中, 左小明, 吴雪昌, 等. 糖化酵母及酿酒酵母原生质体制备中若干条件的探索[J]. 杭州大学学报(自然科学版), 1995, 22(2): 204-209.

(上接第 28 页)

- [11] SbranaC, AvioL, GiovannettiJ, et al. The occurrence of calcofluor and lectin binding polysaccharides at the outer wall of arbuscular mycorrhizal fungal spores[J]. Mycol Res, 1995, 99: 1249-1252.
- [12] KollarR, PetrakovaE, AshwellG, RobbinsPW, CabibE. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β (1-3)-glucan[J]. J. Biol. Chem., 1995, 270: 1170-1178.
- [13] Tsutomu F, Hitoshi J, Yuzuru I, et al. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1427: 133-144.
- [14] KollarR, ReinoldsB.B, PetrakovaE, YehH, J.C, AshwellG, Drgonova, J, Kapteyn, J.C, KlisF.M, and Cabib, E. Architecture of the yeast cell wall. β (1-6)-glucan interconnects

mannoprotein β (1-3)-glucan and chitin[J]. J. Biol. Chem., 1997, 272: 17762-17775.

- [15] FransM, KlisP.M, KlaasH, StanleyB. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26: 239-256.
- [16] MouynaJ, FontaineJ, VaisM, MonodJ, FonziW.A, DiaquinM, PopoloJ, HartlandP, LatgeJP. Glycosylphosphatidylinositol anchored glucan synthase plays an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall[J]. J. Biol. Chem., 2000, 275: 14882-14889.
- [17] PaulaM, JohnF.C, and ClaudiaA. A refined method for the determination of *saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1,6-glucan in structure[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 301: 136-150.
- [18] PilaP, and JuanC.R. Cell wall analysis[J]. Method, 2004, 33: 245-251.