

## 酿酒酵母的糖转运机理研究进展

刘增然 李树立 张光一

(河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄, 050061)

**摘要** 简要概述了酿酒酵母所利用的3种主要糖: 葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖转运进入细胞机理的研究现状, 分析了目前存在的问题, 提出了今后的研究方向。

**关键词** 糖转运, 酿酒酵母, 转运蛋白, 基因表达

糖代谢是酿酒酵母的重要代谢活动, 在酒精类发酵中, 3个主要可利用的糖是葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖, 这些糖的转运是其代谢的限速步骤, 需要借助转运蛋白才能跨膜进入细胞进行代谢。在酵母菌 6000 个左右的基因中, 271 个基因编码膜转运蛋白。通过序列同源性和功能分析发现, 编码糖转运蛋白及同源蛋白的基因家族是最大的家族, 包括 35 个基因, 根据同源性它们又被分为 5 个亚簇, 其中 Cluster II 是麦芽糖通透酶亚簇, 另一亚簇是己糖转运酶(HXT)亚簇。

### 1 酿酒酵母的己糖转运

葡萄糖是酿酒酵母的最适碳源, 并具有复杂的调控机制以确保在发酵介质中存在葡萄糖时各种糖分解代谢酶基因的表达(其中包括麦芽糖通透酶和麦芽糖酶)受到抑制。在工业发酵中也观察到这种现象。

在酿酒酵母中, 己糖代谢的第一步是细胞对糖的吸收, 葡萄糖主要通过促进扩散进入细胞, 己糖转运对酵母细胞生长速度及葡萄糖代谢具有很大影响。对酵母染色体的全分析表明: 酿酒酵母的己糖转运蛋白家族由 18 种蛋白质组成即 Hxt1p-Hxt17p 和 Gal2p, 2 个葡萄糖传感蛋白 Snf3p 和 Rgt2p 与这些转运蛋白有密切关系。这些转运蛋白确保在各种条件下己糖能够有效转运。HXTs 基因编码的转运蛋白的氨基端和羧基端位于细胞质内, 由 12 个高度同

源的跨膜部分和同源性很低的氮端氨基酸区域组成。己糖转运蛋白是高度自身调控的, 通过抑制或诱导机理在基因转录水平进行高度调控使酵母细胞适应各种条件下的碳源供应及能量供应。这些转运蛋白编码基因不但受可利用糖浓度的调节, 而且受渗透压、营养缺乏及细胞所处的生理状态的调节。当环境的葡萄糖浓度低时, HXT2, HXT6 和 HXT7 三个基因得到表达, 其中编码葡萄糖高结合转运蛋白的 HXT6 和 HXT7 基因转录活性最高<sup>[1]</sup>。己糖转运速度由己糖转运蛋白的活性和数量决定, 当氮源受到限制或蛋白质合成受到限制时, 一些己糖通透酶失活<sup>[2]</sup>。

每种己糖转运蛋白都有特定的底物和不同的结合力, 可以认为酵母细胞中的各种转运蛋白都不同程度的起作用。Hxt1p 和 Hxt3p 是葡萄糖低结合力转运蛋白, Hxt6p 和 Hxt7p 是葡萄糖高结合力转运蛋白; 而 Hxt2p 和 Hxt4p 与葡萄糖有中度结合力, Hxt5p 对葡萄糖有中度结合力, 对果糖结合力较低, 对甘露糖结合力最低。Hxt1p~Hxt4p, Hxt6p 和 Hxt7p 是主要转运蛋白, 这些转运蛋白不仅动力学性能不同, 而且表达类型不同<sup>[3]</sup>。当葡萄糖浓度高时, 己糖转运蛋白与葡萄糖结合力低; 当葡萄糖浓度低时, 转运蛋白与葡萄糖结合力高。

在酿酒酵母的实验室菌株中, HXT1-HXT7 基因缺失使细胞失去己糖转运的能力, 其中任何一个基因在 hxt1-7 缺失的突变株中

第一作者: 博士。

收稿时间: 2004-08-17

表达都可以使酵母利用葡萄糖、果糖和甘露糖, 而进行需氧生长。*HXT5* 基因是保守转运基因, 可能参与葡萄糖刚刚出现初期吸收。Jasper 等发现基因 *HXT5* 位于酵母染色体 III 上, 在 *HXT1* 和 *HXT4* 的上游, 编码具有葡萄糖转运功能的转运蛋白。René Verwace<sup>[4]</sup> 研究表明: *HXT5* 基因的表达由细胞生长速度决定, 而不依赖于胞外葡萄糖浓度。*HXT5* 的启动子含有调节元件, 使细胞在低速生长下表达。葡萄糖同位素追踪研究证明, 在酵母低速生长或葡萄糖浓度低时, *HXT5* 基因得到大量转录, *HXT5* 的转录与高结合力己糖转运蛋白的表达相关联。后来研究发现: 仅 Hxt5p 的存在就足以维持酵母的糖酵解途径正常进行。在细胞发芽期、平衡期和低糖条件下, Hxt5p 大量存在, 它可能参与葡萄糖出现初期的吸收和转运。Ramsdonk<sup>[5]</sup> 等研究发现 Hxt5p 的长氨基酸链和各种条件下 *HXT5* 基因的独特表达类型使细胞低速生长, 并导致海藻糖的积累。在 CEN.PK 的 *hxt1-17gal2* 缺失情况下, *HXT8-17* (*HXT12* 除外) 基因分别过表达使细胞可以在葡萄糖上生长, 表明 Hxt8-11p 和 Hxt13-17p 也可以转运葡萄糖, 但在正常条件下, 生长缓慢。

在工业发酵中, 酵母细胞面临特殊的、变化的条件, 与实验室菌株在许多方面是不同的。Kattie Lyyten<sup>[6]</sup> 等研究了酿酒酵母在发酵条件下 *HXT1-7* 基因的功能及其表达产物己糖转运蛋白的作用, 发现基因 *HXT7* 在各种条件下都可转录, 不论是在间歇培养还是恒化 1 培养。研究表明: *HXT7* 基因的启动子、基因拷贝数影响 *HXT7* 表达水平, *HXT7* 基因似乎受一般葡萄糖抑制途径的调节, 受依赖于 *Snf3* 的葡萄糖感应途径的调节; 当葡萄糖浓度高时, *HXT7* 的表达受到抑制; 当葡萄糖浓度低时, *HXT7* 的表达受到诱导, 并且低葡萄糖浓度的表达水平比高浓度时抑制水平高的多。

## 2 麦芽糖的转运

在啤酒发酵中, 麦芽糖是酿酒酵母利用的

重要碳源。在酿酒酵母中, 内源麦芽糖酶( $\alpha$ -糖苷酶)将麦芽糖水解为葡萄糖。麦芽糖的跨膜转运与葡萄糖的跨膜转运机理不同。麦芽糖通过与质子共转运机理被吸收。一个质子需要消耗一个 ATP, 因此一个麦芽糖分子进行乙醇发酵产生 3 个分子 ATP。

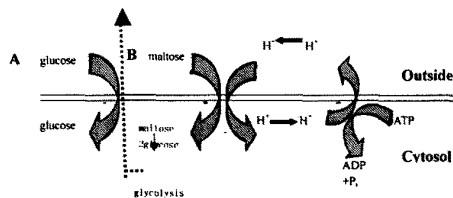


图1 葡萄糖和麦芽糖在酿酒酵母中转运示意图  
A 葡萄糖的促进扩散, 糖浓度梯度为动力。B 麦芽糖和质子共转运, 质子和糖浓度梯度为动力。由细胞膜上的 ATPase 酶使 ATP 水解释放  $H^+$ 。氢质子与麦芽糖一起进入细胞。1, Hxt 转运蛋白, 2, 麦芽糖通透酶, 3,  $H^+$ -ATPase 复合物。

过去的发酵糖分析主要集中在麦芽糖发酵体系, 酿酒酵母编码麦芽糖通透酶的基因位于 5 个高度同源的基因簇上 (*MAL1*、*MAL2*、*MAL3*、*MAL4* 和 *MAL6*), *MAL* 基因簇的多少和性质依菌株不同而不同。每个基因簇都由 3 个不同功能的基因组成, 这些基因是麦芽糖被酵母发酵所需要的。*MALx1* 编码质子-麦芽糖通透酶(x 代表原始基因簇), *MALx2* 编码麦芽糖酶负责胞内麦芽糖的降解, 第 3 个基因 *MALx3* 编码 1 个与 DNA 结合、依赖麦芽糖的转录激活子, 专一调控 *MALx1* 和 *MALx2* 基因的表达。*MAL* 基因簇的基因具有高度同源性, 一个 *MAL* 基因簇上的基因可以弥补另一个 *MAL* 基因簇的基因突变。任何一个基因簇都可使麦芽糖发酵, 基因簇的种类和数量依菌株不同而有所不同。这些基因受葡萄糖、果糖和蔗糖的抑制, 尤其是在氮缺乏时, 发生葡萄糖和麦芽糖自身诱导的麦芽糖转运蛋白的分解代谢物失活, 这种失活包括已经存在的转运蛋白分子的蛋白酶解。

麦芽糖通透酶家族, 含有 5 个通透酶, 有 2 个麦芽糖通透酶: Mal31p, Mal61p, 1 个  $\alpha$ -葡萄糖苷通透酶和 2 个仍未定性的基因编码的蛋白

YDL247w(MPH2)和 YJR160c(MPH3),该 2 基因序列与 MAL31 和 MAL61 有 75% 同源性,与 AGT1 有 53% 的同源性,被命名为 MPH,其基因家族用 MPH<sub>x</sub> 表示。Wieczorke 等人发现 MPH2, MPH3 和 AGT1 介导残存麦芽糖吸收。尽管 MPH2 和 MPH3 与 MAL<sub>x</sub>1 通透酶基因有同源性,但仍不知他们是否编码 α-葡糖苷转运蛋白、调控机理是否与 MAL 基因相同。Jespersen 等人通过序列分析认为 MPH<sub>x</sub> 基因在麦芽糖转运中不起主要作用,它们的 5'-非编码区与 MAL<sub>x</sub>1 和 AGT1 基因的对应区无高度同源,因此受调控可能不同。Rachel E. Day<sup>[7]</sup>等报道, MPH<sub>x</sub> 基因家族编码活性 α-葡糖苷转运蛋白,他们证明 MPH<sub>x</sub> 编码与麦芽糖及麦芽三糖高结合的转运蛋白, MPH<sub>x</sub> 基因簇直接受 Mal<sub>x</sub>3p 激活子调节,形成 MAL 调节子的一部分,受麦芽糖和麦芽三糖的诱导。他们认为将 MPH<sub>x</sub> 基因归于麦芽糖和 α-葡糖苷转运蛋白家族是正确的,之所以有原来结论,是由于在酵母单倍体细胞中很少存在该基因簇。酿酒酵母的麦芽糖代谢受葡萄糖的强有力的负调控,葡萄糖与结合在 MAL 基因间隔区的转录抑制因子 Mig1p 结合抑制 MAL<sub>x</sub>1 和 MAL<sub>x</sub>2 转录,并可以使麦芽糖通透酶的分解物失活。葡萄糖诱导的失活包括 2 个不同的信号途径。第 1 个途径用 Rgt2p 作为胞外葡萄糖的传感器,诱导麦芽糖通透酶降解。第 2 个途径依赖葡萄糖转运系统使麦芽糖转运活性失活,继而使麦芽糖通透酶降解。但这一解释有争议,一些人提出这一途径还需要借助 Hxt 转运蛋白的己糖转运。

大部分关于麦芽糖的研究来自实验室菌株在葡萄糖或麦芽糖含量一定的介质中,关于工业酿酒酵母的麦芽糖转运研究较少。Jespersen 等筛选了 5 株浓啤酒酵母菌株(上面发酵酵母)和 25 株贮藏酵母菌株(下面发酵酵母)发现它们都含有 MAL<sub>x</sub>1 基因,除 1 株外都含有 AG71 基因<sup>[8]</sup>。Jari Rautio<sup>[9]</sup>等研究了工业酵母的麦芽汁发酵过程中麦芽糖转运,结果证明麦芽糖吸收是控制麦芽糖发酵速率的主要因

素,对于贮藏酵母菌株麦芽糖转运蛋白受麦芽三糖、蔗糖和海藻糖的弱抑制,说明主要的麦芽糖转运是由 MAL<sub>x</sub>1 基因编码的麦芽糖专一型转运蛋白完成;对浓啤酒酵母菌株麦芽糖转运蛋白受麦芽三糖、蔗糖和海藻糖的强抑制,说明主要的麦芽糖转运蛋白是由 AGT1 编码的,并可同时转运麦芽三糖、蔗糖和海藻糖。在浓啤酒酵母菌株细胞中葡萄糖对麦芽糖转运蛋白的抑制比在贮藏酵母菌株中强的多。

尽管酿酒酵母的麦芽糖代谢具多层调节,几个研究报告已表明:酿酒酵母难以应付胞外麦芽糖浓度的突变,由麦芽糖受限的需氧恒化培养转为过量麦芽糖培养会加速细胞死亡。麦芽糖的无限制吸收和降解使细胞向培养基释放葡萄糖,细胞生存能力降低,伴随着胞内葡萄糖和质子的迅速积累,使细胞死亡并发生自溶。麦芽过量积累导致细胞释放葡萄糖的现象在葡萄糖代谢抑制发生突变的酿酒酵母株中也存在。Mickel L. A. Jansen et al<sup>[10]</sup>已证明酵母细胞自溶或胞外麦芽糖水解引起葡萄糖的释放。葡萄糖代谢起始步骤酶的不协调表达及随后的葡萄糖异生引起了葡萄糖的释放。Brown 等人 1998 年发现,微生物对营养限制的最普遍响应是基因复制, MPH<sub>x</sub> 区复制或许是选择压力所致。Jespersen 等人得出结论,其他己糖转运蛋白的存在能驱动它的复制,然而,麦芽糖和己糖的转运蛋白不能同时复制。

一般认为酿酒酵母同时利用葡萄糖和麦芽糖可加速酿酒酵母的发酵。Kodama 将携带多拷贝质粒(含组成型 GAPD 启动子和 MAL61 基因)的酿酒酵母菌用于高浓麦芽汁的发酵,发现发酵时间缩短;而过表达编码麦芽糖酶或蛋白激活子的 MAL62 或 MAL63 基因,不能缩短发酵时间。通过对葡萄糖抑制 MAL 基因转录的分子生物学分析促进了麦芽糖发酵菌株的研发<sup>[11]</sup>。

### 3 麦芽三糖的转运

麦芽三糖是麦汁中第 2 大丰富的糖类,由寡聚糖糊化形成,在麦芽汁中占 15%~20%。

它最不易被酵母细胞利用,只有麦芽汁中所含葡萄糖有一半被酵母细胞吸收以后,麦芽糖和麦芽三糖才被酵母细胞吸收,并且麦芽三糖比麦芽糖吸收的慢<sup>[12]</sup>。在酿酒工业普遍存在的问题是麦芽三糖的缓慢吸收甚至不完全吸收,使啤酒中残存麦芽三糖,造成原料浪费。啤酒中碳水化合物含量高,啤酒呈非典型风味是啤酒厂经常遇见的问题之一。麦芽汁发酵中麦芽三糖的吸收和代谢速率是决定麦芽汁发酵效率和产品质量的主要因素之一,但酵母的麦芽三糖代谢受到的关注与葡萄糖和麦芽糖代谢相比少的多。

多数关于酵母细胞利用麦芽三糖的研究是对酿造发酵中影响碳源吸收的环境因素分析。关于啤酒酵母不能很好利用麦芽糖有不同的解释。Findlay 认为麦芽三糖不是其可很好利用的碳源;而 Casey 认为随着高浓发酵的进行,酵母细胞壁所受压力增大,营养供应不足产生低效发酵;Zheng 等人认为发酵条件是决定其不完全发酵的原因,发酵过程中酿酒酵母所处的环境导致了麦芽三糖的不完全利用;Hornsey 提出酿酒酵母在酿造过程中存在基因突变和/或麦芽三糖通透酶的丢失;CR Zastrow et al 证明麦芽三糖的跨膜转运是其发酵的限速步骤<sup>[13]</sup>。

早期关于酵母细胞糖代谢的研究证明麦芽糖和麦芽三糖的跨膜转运由不同的转运系统来完成。尽管许多酵母细胞中麦芽三糖的转运得到研究,关于是否存在特定麦芽三糖通透酶,麦芽糖转运体系是否也负责麦芽三糖转运一直有争议。Virsur et al 和 Kotyk<sup>[14]</sup>等研究认为:麦芽糖和麦芽三糖转运具竞争抑制,由相同机理转运。Harris 和 Thompson 认为可能存在特定麦芽三糖通透酶。Han<sup>[15]</sup>等人对普通  $\alpha$ -糖苷通透酶进行了特性研究,证明它负责麦芽三糖转运。Charron 和 Michels 发现 AGT1 ( $\alpha$ -糖苷转蛋白 1) 基因是 MAL11 的等位基因,编码底物专一性与 Mal11p 不同的通透酶。AGT1 转运系统包括活泼质子的同向转运,转运底物有  $\alpha$ -葡萄糖苷、麦芽糖、麦芽三糖、异麦芽糖、松三

(68)

糖、甲基葡萄糖苷、蔗糖、海藻糖、松二糖,它可以被麦芽糖诱导,或许受 MALx3 转录激活子(与位于 AGT1 结构基因序列上游的麦芽糖专一增强子结合)的调控。Stambuk<sup>[16]</sup>也发现 AGT1 通透酶是 1 个活泼的  $H^+$  共转运蛋白,它转运许多  $\alpha$ -配糖苷糖,包括麦芽糖、麦芽三糖、海藻糖、松三糖、蔗糖。它对蔗糖和海藻糖具高结合力,对麦芽糖和麦芽三糖结合力低。实际上所有酿酒酵母都含有 AGT1 通透酶基因。Rachel<sup>[13]</sup>等人用同位素标记麦芽三糖研究了工业酿酒酵母的麦芽糖和麦芽三糖利用,结果表明麦芽糖通透酶基因的过表达使麦芽糖和麦芽三糖的转运速度同时提高。MAL31、MAL61 和 AGT1 基因编码的 3 个麦芽糖通透酶可以高结合转运麦芽三糖;啤酒中麦芽三糖的存在不是由于酿酒酵母细胞不能应用麦芽三糖,而是由于发酵后期的不利条件导致对麦芽三糖的结合力降低所致。

#### 4 讨 论

虽然关于酿酒酵母糖转运的研究已经取得很大进展,但糖在工业酵母中的转运机理尚待进一步深入研究,尤其是麦芽三糖的转运机理和酿酒酵母不能很好利用麦芽三糖原因。对于酿酒酵母糖转运的研究有利于构建麦芽糖或麦芽三糖发酵率高的菌株,有助于提高发酵介质的利用率,提高基质发酵度。所以对酿酒酵母的糖转运和酿酒酵母的高效糖代谢的关系进一步研究是不可缺少的。

#### 参 考 文 献

- 1 Diderich J A, Schepper M, van Hock P et al. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. J Biol Chem, 1999, 274:15350~15359
- 2 Penalver E, Lucero P, Moreno E, Lagunnas R. Catabolite inactivation of the maltase transporter in nitrogen-starved yeast could be due to the stimulation of general protein turn over [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 166:317~324
- 3 Reifemberger E, Boles E, Ciriacy M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccha-*

- Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression[J]. Eur J Biochem, 1997, 245:324~333
- 4 Rene Verwace, Johannes W G Paalman, Astrid Hogenkamp, et al. HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 2002, 19:1029~1038
  - 5 Léonie M Ramsdonk, Jasper A Diderich, Arthur Kuiper et al. Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the *HXK2* gene[J]. Yeast, 2001, 18:1023~1033
  - 6 Kattie Luyten, Christine Riou, Bruno Blondin. The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. Yeast, 2002, 19:713~726
  - 7 Rachel E Day, Vincent J Higgins, Peter J Rogers et al. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJRI60c. Yeast, 2002, 19:1015~1027
  - 8 Jespersen L, Cesar L B, Meaden P G Multiple alpha-glucoside transporter genes in brewer's yeast[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65:450~456
  - 9 Jari Rautio, John Londesborough. Maltose transport by brewer's yeasts in brewer's wort[J]. Journal of the institute of brewing, 2003, 109:251~261
  - 10 Mickel L A Jansen, Johannes H De Winde, Jack T. Pronk. 2002. Hxt-Carrier-Mediate glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose[J]. Appl Environ Microbio, 2002, 68, 4259~4265
  - 11 Randez F, P Sanz. Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 42:581~586
  - 12 Patel G B, WM Ingledew. Trends in wort carbohydrate utilization[J]. Appl Microbiol, 1973, 26:349~353
  - 13 Racheel E Day, Peter J. Rogers Ian W Dawes, Vincent J Higgins. Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 9: 5326 ~ 5335
  - 14 Visuri K, B H Kirsop. The influence of pH and of selected cations on the fermentation of maltose and maltotriose[J]. J Inst Brew, 1970, 76:362~366
  - 15 Han E K, F Cotty, C Sottas. Characterization of AGT1 encoding a general  $\alpha$ -glucoside transporter from *Saccharomyces*[J]. Mol Microbiol, 1995, 17: 1093~1107
  - 16 Stambuk B U, MA da Silva, AD Panek. Active  $\alpha$ -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett, 1999, 170:105~110

## The Research Progress on Sugar Transportation of *Saccharomyces cerevisiae*

Liu Zengran   Li Shuli   Zhang Guangyi

(Bioscience and Bioengineering College, Hebei Economy and Trade University, Shijiazhuang, 050061)

**ABSTRACT** In the article, the research progress on sugar transportation in strains of *Saccharomyces cerevisiae* and the related properties were summarized. The existing problems were put forward and the research orientation was pointed out.

**Key words** sugar transportation, transporter, gene expression, strains of *Saccharomyces cerevisiae*

行业动态

### 燕京啤酒投资3.8亿元人民币新建3大基地

在先后并购了国内15家啤酒生产企业后,燕京啤酒集团布局全国的战略又有了新举措。日前,该公司宣布,集团总公司会同3家外埠子公司,投资3.8亿元人民币,分别在湖北仙桃、江西抚州、广西玉林各建1个年产10万t的啤酒生产企业。目前,这三个生产基地的建设已进入签订协议或开工阶段。

自1999年起,燕京啤酒集团突破固有的北京市场,开始向外扩张,先后在江西、湖南、湖北、山东等省市收购兼并了15家外埠企业,形成了燕京啤酒的全国市场战略布局。去年燕京啤酒集团外埠企业产销量占公司总量的63.81%;销售收入占公司总量的57.45%;利润总额占公司总量的52.72%。