酵母β-葡聚糖水解酶的表达及应用

周 星[1]，王 丽[1]，堵国成[1,2]，康 振[*1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：酵母β-葡聚糖是一种具有多种生物功能的细胞壁结构多糖，但天然的酵母β-葡聚糖水溶性较差，影响了其在医疗、保健食品和化妆品行业中的应用。作者通过β-1,3-葡聚糖水解酶Gly5m和β-1,6-葡聚糖水解酶BT3312水解酵母β-葡聚糖制备小分子酵母葡聚糖，提高其水溶性。以大肠杆菌为宿主，异源表达β-1,3-葡聚糖水解酶Gly5m和β-1,6-葡聚糖水解酶BT3312。在25 ℃条件下，添加0.2 mmol/L IPTG诱导后，Gly5m和BT3312的最高酶活分别为1 086 U/mL和2 355 U/mL。酵母β-葡聚糖经过Gly5m和BT3312水解后，溶解率分别提高了2.6倍和2.4倍。采用Gly5m和BT3312共同水解，酵母β-葡聚糖溶解率提高了3.2倍（水溶性酵母葡聚糖的质量浓度为12.5 g/L）。因此，Gly5m和BT3312在提高酵母葡聚糖的水溶性和制备小分子酵母葡聚糖领域具有重要的应用价值。

关键词：酵母；β-葡聚糖；水解酶；水溶性；小分子β-葡聚糖

中图分类号：Q 786　**文章编号：**1673-1689(2021)02-0019-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.02.003

Expression and Application of Yeast β-Glucanase

ZHOU Xing[1]，*WANG Li*[1]，*DU Guocheng*[1,2]，*KANG Zhen*[*1,2]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Yeast β-glucan is a component of cell wall structural polysaccharide with various biological functions. However, the poor water solubility of natural yeast β-glucan has limited its application in medical, health food and cosmetic industries. The low molecule β-glucan was prepared to improve the solubility by degradation of yeast β-glucan using β-1,3-glucanase Gly5m and β-1,6-glucanase BT3312. Heterologous expression of β-1,3-glucanase Gly5m and β-1,6-glucanase BT3312 were expressed by *Escherichia coli*. After induced with 0.2 mmol/L IPTG at 25 ℃, the highest enzyme activities of Gly5m and BT3312 were 1 086 U/mL and 2 355 U/mL, respectively. The solubility of yeast β-glucan separately hydrolyzed by Gly5m or BT3312 increased by 2.6 or 2.4 times. The solubility of yeast β-glucan co-hydrolyzed by Gly5m and BT3312 increased by 3.2 times, and the concentration of water-soluble yeast glucan reached 12.5 g/L. Therefore, Gly5m and BT3312

收稿日期：2019-01-24

基金项目：国家自然基金面上项目(31670092)；江南大学自主科研计划重点项目(JUSRP51707A)；国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-16)。

*** 通信作者：**康　振(1982—)，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事多糖的生物合成及应用方面的研究。E-mail：zkang@jiangnan.edu.cn

have important application value in improving the water solubility of yeast glucan and preparing small molecule yeast glucan.

Keywords: yeast, β-glucan, hydrolase, water-soluble, small molecule β-glucan

酵母β-葡聚糖是存在于酵母细胞壁中的一种多糖,占细胞壁干质量的40%~60%[1]。酵母β-葡聚糖是以β-1,3-葡聚糖为主,β-1,6-葡聚糖为辅的一种混合多糖,其中85%左右为水不溶性。研究表明,酵母β-葡聚糖是一种良好的生物效应应答剂,具有增强免疫力、激活免疫细胞、抗肿瘤、抗感染等功能[2]。此外,酵母β-葡聚糖还可以抗氧化、抗辐射、降低胆固醇和血脂。因此,酵母β-葡聚糖已广泛应用于医疗、保健食品和化妆品行业中[3-5]。

酵母β-葡聚糖通过分子间氢键的相互作用,形成致密的三股螺旋结构而不溶于水,水不溶性不仅制约了酵母β-葡聚糖的应用范围,也会影响其生物活性的发挥[6]。为了提高酵母β-葡聚糖的水溶性,国内外学者对其进行了修饰和改性研究,主要方法有化学方法、物理方法和生物方法。物理方法主要有超声波法[7]、辐照法[8]和机械活化法[9];化学方法有羧甲基化[10]、硫酸酯化[11]和磷酸酯化[12];生物方法主要是酶法。酶法增溶改性是通过β-葡聚糖酶将大分子酵母β-葡聚糖酶解成小分子葡聚糖,从而增加酵母β-葡聚糖的水溶性,水解过程条件温和,不会破坏酵母β-葡聚糖的结构,对其生物活性影响较小。目前,用于生物法对酵母葡聚糖改性增溶的酶种类少,价格昂贵[13]。本研究中,作者在大肠杆菌中异源表达两种不同的酵母β-葡聚糖水解酶,分别是β-1,3-葡聚糖水解酶Gly5m[14]和β-1,6-葡聚糖水解酶BT3312[15]。Gly5m来源于*Saccharophagus degradans* 2-40T,对于β-1,3-葡聚糖具有内切水解作用。BT3312来源于*Bacteroides thetaiotaomicron*,对β-1,6-葡聚糖具有内切水解作用。通过两种不同的酵母β-葡聚糖的水解作用,可以降低酵母β-葡聚糖的相对分子质量,增加其在水中的溶解率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli*(大肠杆菌)JM109:用于构建和增殖重组质粒,作者所在实验室保存;*E. coli*(大肠杆菌)BL21:表达宿主,作者所在实验室保存;质粒pET-28a(+)(Kan$^+$,T7启动子):作者所在实验室保存。

1.1.2 酶、引物、DNA marke及相关试剂盒 Primer STAR DNA聚合酶、DNA marker、T4 DNA连接酶和大肠杆菌感受态细胞制备盒:均购自TaKaRa(大连);各种限制性内切酶:购自Thermo公司;PCR引物:由生工生物(上海)有限公司合成,见表1;质粒小量抽提试剂盒:购自生工生物(上海)有限公司;酵母葡聚糖:购自安琪酵母公司。

表1 PCR扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

引物	序列(5′-3′)
F1	GACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAGAGAAAAGTTGTTGAGAGC
R1	GCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTCTAATCCACTGCTTCAACAG
F2	GACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGATAAACATGAGAAATATA
R2	GCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTACTTTGACTTTGCCCAAC

注:表中标注下划线部分为同源臂序列。

1.1.3 培养基 LB培养基(组分g/L):蛋白胨10,氯化钠10,酵母粉5;自然pH。制备固体培养基时添加2 g/dL的琼脂。

TB培养基(组分g/L):蛋白胨12,酵母提取物24,KH_2PO_4 2.31,K_2HPO_4 12.54;甘油4 mL。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得

1)*gly5m*的获得:根据GenBank噬菌体的*gly5m*基因(基因收录号:ABD82280.1)由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成。

2）*bt3312* 的获得：根据 GenBank 多形拟杆菌的 *bt3312* 基因（基因收录号：AE015928.1）由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成。

1.2.2　重组载体的构建

1）pET-28a(+)-*gly5m* 的构建：设计引物 F1 和 R1，以合成的 *gly5m* 为模板 PCR 扩增得到上游带有 *BamH* I 酶切位点和下游带有 *Xho* I 酶切位点的 *gly5m* 产物。用 *BamH* I 和 *Xho* I 对 PCR 产物和质粒 pET-28a(+)进行酶切后，用 T4 DNA 连接酶进行过夜连接，转化 *E. coli* JM109 感受态，挑取转化子测序，测序正确即获得重组质粒 pET-28a(+)-*gly5m*，见图 1。

2）pET-28a(+)-*bt3312* 的构建：设计引物 F2 和 R2，以合成的 *bt3312* 为模板 PCR 扩增得到上游带有 *BamH* I 酶切位点和下游带有 *Xho* I 酶切位点的 *bt3312* 产物。用 *BamH* I 和 *Xho* I 对 PCR 产物和质粒 pET-28a(+)进行酶切后，用 T4 DNA 连接酶进行过夜连接，转化 *E. coli* JM109 感受态细胞，挑取转化子测序，测序正确即获得重组质粒 pET-28a(+)-*bt3312*，见图 1。

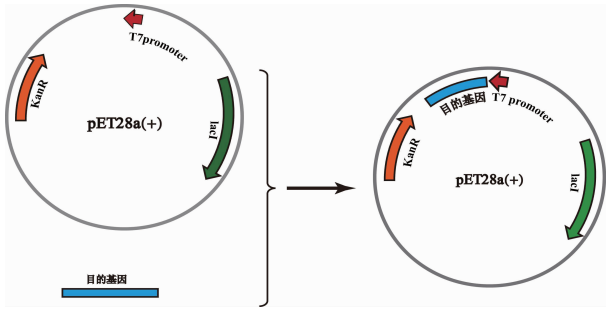


图 1　重组质粒 pET-28a(+)-*gly5m* 和 pET28a(+)-*bt3312* 构建过程图

Fig. 1　Schematic of plasid construction pET-28a(+)-*gly5m* and pET28a(+)-*bt3312*

1.2.3　重组载体的转化与诱导表达

挑取测序正确的重组质粒转化 *E.coli* BL21(DE3)，挑取单菌落接种于装有 3 mL LB 液体培养基（含有 50 μg/mL 氨苄青霉素或卡那霉素）的 12 mL 摇菌管中，37 ℃、220 r/min 过夜培养。种子液按 2%接种体积分数转接至含 50 mL TB（含有 50 μg/mL 氨苄青霉素或卡那霉素）的 250 mL 三角瓶中，37 ℃、220 r/min 培养至 OD_{600}=0.6~0.8，添加终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导，诱导表达 12 h，收集菌体。

1.2.4　重组β-葡聚糖水解酶的酶活测定

发酵液于 7 000 r/min 离心 10 min，分离得到上清液即胞外粗酶液。收集菌体，用质量分数 0.9%的生理盐水洗涤，20 mmol/L PBS 缓冲液（pH 7.5）重悬菌体，稀释至合适的浓度，超声破碎。13 000 r/min 离心 30 min，分离得到破碎上清液，即胞内粗酶液。底物配制：20 mmol/L PBS 缓冲液（pH 7.5），10 mg/mL 的酵母葡聚糖。990 μL 底物加 10 μL 适当稀释的粗酶液于 37 ℃水浴保温 30 min，DNS 法测还原糖质量浓度。

1.2.5　重组β-葡聚糖水解酶水解产物 HPLC 分析

水解条件：20 mmol/L PBS 缓冲液（pH 7.5），酵母葡聚糖 4 g/L，酶活 10 U/mL。设置 3 个实验组：第一组只添加β-1,3-葡聚糖水解酶 Gly5m；第二组只添加β-1,6-葡聚糖水解酶 BT3312；第三组同时添加等酶活的β-1,3-葡聚糖水解酶 Gly5m 和β-1,6-葡聚糖水解酶 BT3312。37 ℃下反应 12 h，取样分析。水解样品使用孔径 0.22 μL 的滤膜过滤后，采用高效体积排阻色谱和多角度激光散射联用进行相对分子质量测定。采用 Ultrahydrogel™ 色谱柱（300 mm×7.8 mm，美国沃特斯公司）、多角度激光散射检测器（美国怀雅特公司）检测和示差折光检测器（美国怀雅特公司）检测。条件：0.1 mol/L $NaNO_3$ 溶液作为流动相，流速恒定保持在 0.6 mL/min，柱温保持在 40 ℃，进样量为 10 μL。

1.2.6　重组β-葡聚糖水解酶产物溶解率测定

水解条件：20 mmol/L PBS 缓冲液（pH 7.5），酵母葡聚糖 25 g/L，酶活 200 U/mL。设置 3 个实验组：第一组只添加β-1,3-葡聚糖水解酶 Gly5m；第二组只添加β-1,6-葡聚糖水解酶 BT3312；第三组同时添加等酶活的β-1,3-葡聚糖水解酶 Gly5m 和β-1,6-葡聚糖水解酶 BT3312。37 ℃反应 12 h，定时取样。样品于 12 000 r/min 离心 10 min，用蒽酮法测定上清液中的总糖质量浓度。

$$\text{溶解率}=\frac{\text{上清液中的总糖质量}}{\text{固体酵母葡聚糖质量}}$$

2　结果与分析

2.1　目的基因的扩增和重组载体的构建

2.1.1　pET-28a（+）-*gly5m* 的构建

以合成的 *gly5m* 为模板，引物 F1 和 R1 进行 PCR 扩增，扩增得到大约 2 700 bp 的片段，见图 2(a)。

采用 DNA 纯化回收试剂盒对单一凝胶片段进

行回收,回收后的 *gly5m* 片段与用 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切后得到的线性质粒 pET-28a (+)-*gly5m* 连接,转化 *E. coli* JM109,挑取转化子交由上海生工生物工程有限公司测序,测序结果正确,重组载体 pET-28a(+)-*gly5m* 构建成功。

2.1.2 pET-28a (+)-*bt3312* 的构建 以合成的 *bt3312* 为模板,引物 F2 和 R2 进行 PCR 扩增,扩增得到大约 1 600 bp 的片段,见图 2(b)。采用 DNA 纯化回收试剂盒对单一凝胶片段进行回收,回收后的 *bt3312* 片段与用 *BamH* I 和 *Xho* I 酶切后得到的线性质粒 pET-28a (+)-*bt3312* 连接,转化 *E. coli* JM109,挑取转化子交由上海生工生物工程有限公司测序,测序结果正确,重组载体 pET-28a (+)-*bt3312* 构建成功。

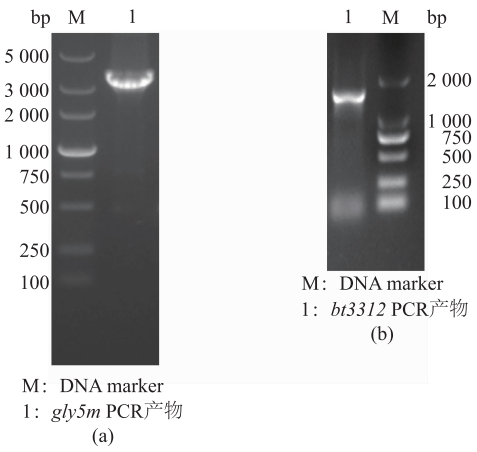


图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

2.2 诱导温度对重组 β-葡聚糖水解酶的影响

2.2.1 诱导温度对 Gly5m 的影响 将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)-pET-28a (+)-*gly5m* 分别在 20、25、30 ℃下诱导 12 h,离心得到胞外粗酶液,菌体超声破碎后得到胞内粗酶液,结果见图 3(a)。重组菌分别在 20、25、30 ℃下诱导 12 h 后,所得重组 β-葡聚糖水解酶 Gly5m 总酶活分别为 605、707、559 U/mL。结果表明,温度对重组 β-葡聚糖水解酶 Gly5m 的酶活影响较小。另外,重组菌在 30 ℃诱导 12 h 后,Gly5m 都分泌到胞外,细胞破碎上清液无酶活;在 20、25 ℃诱导 12 h 后,细胞破碎上清液中还存在少量重组 β-葡聚糖水解酶。

2.2.2 诱导温度对 BT3312 的影响 将重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)-pET-28a (+)-*gly5m* 分别在 20、25、30 ℃下诱导 12 h 后,离心得到胞外粗酶液,菌体超声破碎后得到胞内粗酶液,结果见图 3(b)。重组菌在 30、25、20 ℃下诱导 12 h 后,所得重组 β-葡聚糖水解酶 BT3312 总酶活分别为 1 652、1 896、1 888 U/mL,25 ℃诱导时酶活最高。另外,重组菌在 20 ℃诱导时,BT3312 胞内酶活最高。结果表明,温度不仅影响 BT3312 的酶活,同时也会影响 BT3312 向胞外分泌。

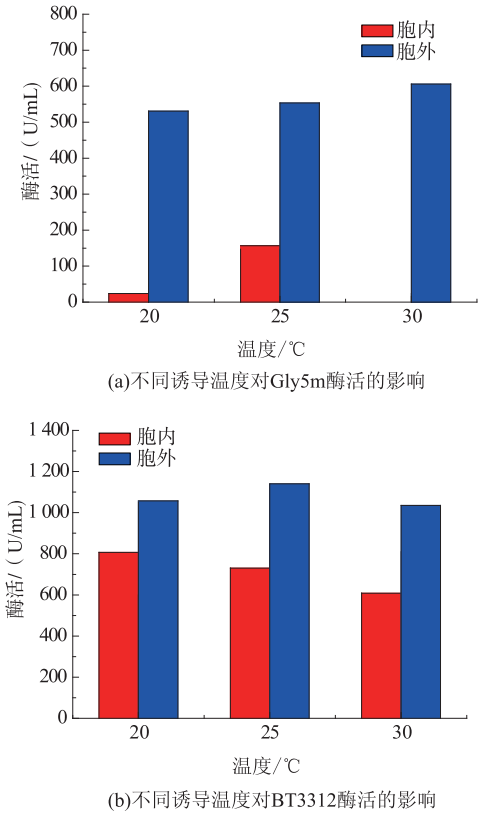


图 3 不同诱导温度对 Gly5m 和 BT3312 酶活的影响

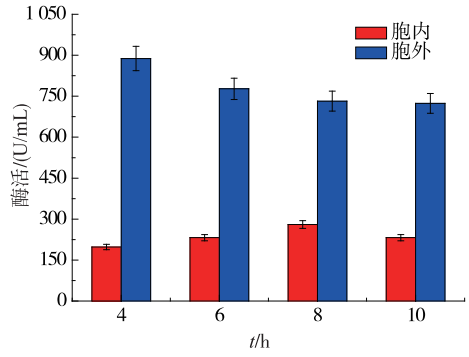
Fig. 3 Effects of different induction temperatures on the enzyme activity of Gly5m and BT3312

2.3 诱导时间对重组 β-葡聚糖水解酶的影响

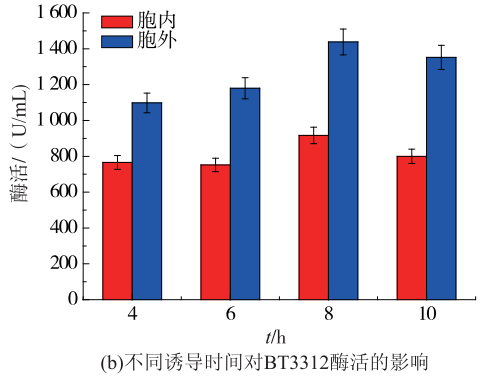
2.3.1 诱导时间对 Gly5m 的影响 由 2.2.1 可知,重组菌 *E. coli* BL21(DE3)- pET-28a(+)-*gly5m* 在 25 ℃诱导时酶活最高,故将重组菌在 25 ℃分别诱导 4、6、8、10 h。离心得到胞外粗酶液,菌体超声破碎后得到胞内粗酶液,结果见图 4(a)。重组菌在 25 ℃诱导 4 h 后,重组 β-葡聚糖水解酶 Gly5m 总酶活达到最高,为 1 086 U/mL,且此时胞外酶活也达到最

高，为 888 U/mL。此外，重组菌在诱导时间超过 4 h 后，总酶活开始下降，说明 Gly5m 不稳定，开始降解。

2.3.2　诱导时间对 BT3312 的影响　由 2.2.2 可知，重组菌 *E. coli* BL21(DE3)– pET–28a(+)–*bt3312* 在 25 ℃诱导时酶活最高，故将重组菌在 25 ℃分别诱导 4、6、8、10 h。离心得到胞外粗酶液，菌体超声破碎后得到胞内粗酶液，结果见图 4(b)。重组菌在 30 ℃诱导 8 h 后，总酶活达到最高，为 2 355 U/mL，且此时胞内、胞外酶活均达到最高，分别为 917、1 438 U/mL。此外，重组菌在诱导时间超过 8 h 后，酶活开始下降，说明BT3312 也不稳定。



(a)不同诱导时间对Gly5m酶活的影响



(b)不同诱导时间对BT3312酶活的影响

图 4　不同诱导时间对 Gly5m 和 BT3312 酶活的影响

Fig. 4　Effects of different induction time on the enzyme activity of Gly5m and BT3312

2.4　重组β–葡聚糖水解酶的水解产物 HPLC 分析

以未经重组β–葡聚糖水解酶水解的酵母葡聚糖为对照，对 3 个实验组水解产物进行 HPLC 分析，结果见图 5。两种重组酶都有水解酵母葡聚糖的能力，且两种重组酶可以同时添加共同发挥作用。比较 3 种水解方式所得产物发现，经 BT3312 水解后，所得产物相对分子质量最大，推测原因可能是 BT3312 专一性水解β–1,6–糖苷键，而在酵母β–葡聚糖中，β–1,6–葡聚糖少，占 10%~15%[16]，因此通过 BT3312 水解后，所得产物中大部分的β–葡聚糖没有水解，故相对分子质量大。反之，Gly5m 主要水解β–1,3–糖苷键，在酵母β–葡聚糖中，β–1,3–葡聚糖多，故经 Gly5m 水解后，所得产物相对分子质量更小。此外，当 BT3312 和 Gly5m 共同水解时，水解最彻底，剩余的底物最少，推测原因是酵母β–葡聚糖中同时含有β–1,3–糖苷键和β–1,6–糖苷键，而β–1,6–糖苷键的存在可能会影响β–1,3–葡聚糖水解酶 Gly5m 发挥作用，故当β–1,6–葡聚糖水解酶 BT3312 水解掉β–1,6–糖苷键后，Gly5m 才能更好地发挥水解作用，使水解更加彻底。

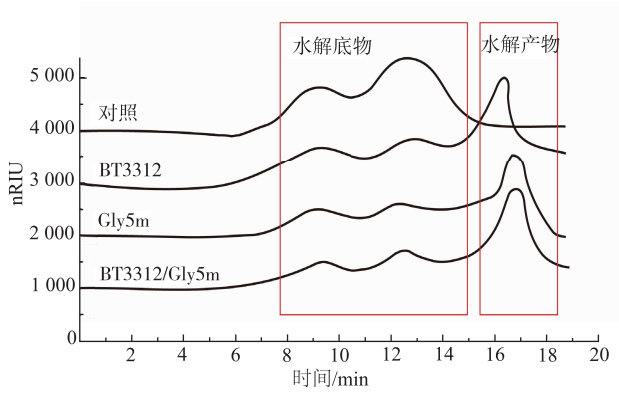


图 5　Gly5m 和 BT3312 水解酵母β–葡聚糖的产物分析

Fig. 5　Analysis of yeast β–glucan hydrolyzed by Gly5m and BT3312

2.5　重组β–葡聚糖水解酶水解产物的溶解率

酵母β–葡聚糖经过 Gly5m 和 BT3312 单独或共同水解后，溶解率均有增加，结果见图 6。添加相同酶量水解时，同时添加 Gly5m 和 BT3312，水解产物溶解率增加量最多，从 12%增加到 50%，水溶性酵母葡聚糖质量浓度为 12.5 g/L。当 Gly5m 和 BT3312 共同水解时，酵母葡聚糖水解最彻底，前后结果一致。当只用 Gly5m 水解时，酵母葡聚糖溶解率提高了 2.6 倍，水溶性酵母葡聚糖质量浓度为 11 g/L；当只用 BT3312 水解时，酵母葡聚糖溶解率提高了 2.4 倍，水溶性酵母葡聚糖质量浓度为 10.25 g/L。

3　结　语

酵母β–葡聚糖广泛应用于医疗、保健食品和化

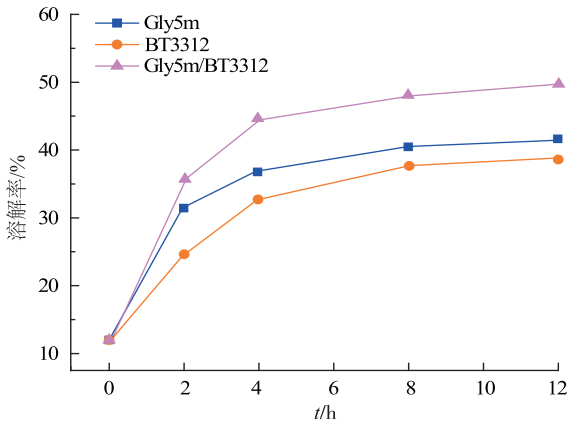


图 6　Gly5m 和 BT3312 水解酵母 β-葡聚糖产物溶解率

Fig. 6　Water-solubility of yeast β-glucan hydrolyzed by Gly5m and BT3312

妆品行业中,但因为其水不溶性,限制了它的应用。作者在 *E. coli* 中表达了两种不同的酵母 β-葡聚糖水解酶，两种酶不仅都有水解酵母 β-葡聚糖的能力，而且可以同时发挥作用。通过两种不同的酵母 β-葡聚糖水解酶的水解作用,使得酵母 β-葡聚糖溶解性增加,且结构和活性不被破坏。但是,两种水解酶在 *E. coli* 中表达量低,SDS-PAGE 检测分析中没有明显条带,为进一步提高表达量和酶活,可通过优化培养基、培养条件、构建不同启动子的表达系统等进行尝试表达。此外,作者对两种酵母 β-葡聚糖水解酶共同水解酵母葡聚糖以提高其水溶性只进行了初步探索,为进一步提高水解效率,可以优化水解条件、添加的酶活浓度以及两种水解酶的比例。

参考文献:

[1] AIMANIANDA V,CLAVAUD C,SIMENEL C,et al. Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*:structural characterization and in situ synthesis[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2009,284(20):13401-13412.

[2] SAMUELSEN A B C,JURGEN S,KNUTSEN S H. Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans:a review[J]. **Molecular Nutrition & Food Research**,2014,58(1):183-193.

[3] DU B,BIAN Z,XU B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms:a review[J]. **Phytotherapy Research:PTR**,2014,28(2):159-166.

[4] DALONSO N,GOLDMAN G H,GERN R M M. β-(1→3),(1→6)-Glucans:medicinal activities,characterization,biosynthesis and new horizons[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2015,99(19):7893-7906.

[5] RIEDER A,BALLANCE S,BÖcker U,et al. Quantification of 1,3-β-*D*-glucan from yeast added as a functional ingredient to bread[J]. **Carbohydrate Polymers**,2017,181:34-42.

[6] 高洁,刘红芝,刘丽,等. 修饰改性 β- 葡聚糖溶液构象研究进展[J]. 食品科学,2013,34(13):323-328.

[7] 王强,刘晓永,胡永金,等. 酿酒酵母 β- 葡聚糖超声修饰及其对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(4):79-84.

[8] 李彦杰,哈益明,范蓓,等. 辐照技术在多糖分子修饰中的应用[J]. 食品科学,2009,30(21):403-408.

[9] 石纪奎,李永富,史锋. 机械活化酿酒酵母葡聚糖改善其水溶性[J]. 食品与生物技术学报,2015,34(5):536-541.

[10] MAGNANI M,CALLIARI C M,MORI M P,et al. Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative[J]. **Carbohydrate Polymers**,2009,78(4):658-665.

[11] 王庆华,李玮,唐松山. 酵母葡聚糖硫酸酯的制备及抗凝血活性[J]. 食品研究与开发,2011,32(7):32-35.

[12] WILLIAMS D L,MCNAMEE R B,JONES E L,et al. A method for the solubilization of a (1→3)-β-*d*-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Carbohydrate Research**,1991,219(1):203-213.

[13] 张学况,杜丽平,王超,等. 酶解法增溶酵母(1→3)-β-*D*-葡聚糖的研究[J]. 食品与发酵工业,2012,38(7):48-52.

[14] WANG D,KIM D H,SEO N,et al. A novel glycoside hydrolase family 5 beta-1,3-1,6-endoglucanase from *Saccharophagus degradans* 2-40T and its transglycosylase activity[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2016,82(14):4340-4349.

[15] TEMPLE M J,CUSKIN F,BASLE A,et al. A bacteroidetes locus dedicated to fungal 1,6-beta-glucan degradation:unique substrate conformation drives specificity of the key endo-1,6-beta-glucanase[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2017,292(25):10639-10650.

[16] TEPARIC R,MRSA V. Proteins involved in building,maintaining and remodeling of yeast cell walls[J]. **Current Genetics**,2013,59(4):171-185.