DOI:10.12441/spyswjs.20240227001 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0064-10

提取方法对酵母甘露糖蛋白组分及免疫活性的影响

张海波[1,2] 夏永军[1,2] 王光强[1,2] 彭 宁[3] 陈智仙[3] 艾连中[1,2*]

(1. 上海理工大学健康科学与工程学院,上海 200093; 2. 上海理工大学上海食品微生物工程技术研究中心,上海 200093; 3. 酵母功能湖北省重点实验室,湖北 宜昌 443003)

摘要:【目的】以酵母细胞壁为原料,比较不同提取方法对酵母甘露糖蛋白的提取得率、组分的影响,并评价其抗炎活性。**【方法】**采用热水提取、碱提取、酶法提取3种方法获得酵母甘露糖蛋白,经乙醇沉淀分别得到酵母甘露糖蛋白MP-W、MP-B、MP-E,利用单糖组成、氨基酸组成、相对分子质量分布、傅里叶变换红外光谱分析其组分和化学结构,并采用细胞试验研究其抗炎活性。**【结果】**3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白的提取得率分别为9.7%、11.5%和23.1%,MP-E的提取得率显著高于MP-W和MP-B。3种酵母甘露糖蛋白均是由甘露糖、葡萄糖和氨基葡萄糖组成,MP-E中葡萄糖峰面积占比显著高于MP-W和MP-B。MP-E的总氨基酸质量分数、天冬氨酸(Asp)质量分数显著低于MP-W和MP-B,苏氨酸(Thr)质量分数显著高于MP-W和MP-B。MP-W、MP-B、MP-E的重均分子量(M_w)分别为103 493、106 579、118 286。傅里叶变换红外光谱显示,3种酵母甘露糖蛋白均是糖蛋白结构,主要官能团无显著差异。当质量浓度为150 μg/mL时,在增加巨噬细胞RAW264.7白细胞介素10(IL-10)分泌与抑制肿瘤坏死因子-α(TNF-α)分泌方面,MP-E效果极显著优于MP-W(P<0.001)和MP-B(P<0.001)。**【结论】**3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白的主要官能团无显著差异,但酶法提取能显著提升酵母甘露糖蛋白的提取得率,且所得样品显示出更高的抗炎活性,可为酵母甘露糖蛋白的开发与应用提供理论依据。

关键词:酵母;酵母甘露糖蛋白;提取方法;免疫活性

Effects of Extraction Methods on the Composition and Immunological Activities of Yeast Mannoproteins

ZHANG Haibo[1,2] *XIA Yongjun*[1,2] *WANG Guangqiang*[1,2] *PENG Ning*[3]
CHEN Zhixian[3] *AI Lianzhong*[1,2*]

(1. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Food Microbiology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 3. Hubei Provincial Key Laboratory of Yeast Function, Yichang 443003, China)

Abstract: [**Objective**] The extraction efficiency of different methods and the effects of these methods on the composition of mannoproteins extracted from yeast cell walls were compared. Furthermore, the anti-inflammatory activities of the extracted mannoprotein were evaluated. [**Method**] Three yeast mannoproteins (MP-W, MP-B, and MP-E) were extracted *via* high-temperature water, alkali, and enzyme-assisted extraction methods and purified *via* ethanol precipitation. The identification of monosaccharide composition and amino acid composition, distribution of relative molecular mass, and Fourier transform infrared spectroscopy were employed to analyze the composition and chemical structures of yeast mannoproteins. A cell experiment was carried out to examine the anti-inflammatory activity. [**Result**] The yields of yeast mannoproteins extracted by the three

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2023YFF1104400)。
通信作者:艾连中(1976—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail: ailianzhong1@126.com
收稿日期:2024-02-27 **修回日期:**2024-05-09

methods were 9.7%, 11.5%, and 23.1%, respectively. The yield of MP-E was significantly higher than those of MP-W and MP-B. The yeast mannoproteins obtained were composed of mannose, glucose, and glucosamine, and the peak area proportion of glucose in MP-E was significantly higher than those in MP-W and MP-B. MP-E had significantly lower mass fractions of total amino acids and aspartate (Asp) and significantly higher mass fraction of threonine (Thr) than MP-W and MP-B. The weight-average molecular weights of the extracted yeast mannoproteins were 103 493, 106 579, and 118 286, respectively. Fourier transform infrared spectroscopy showed that all the three yeast mannoproteins were glycoproteins, with no significant difference in the main functional groups. At the mass concentration of 150 μg/mL, MP-E extremely outperformed MP-W (P<0.001) and MP-B (P<0.001) in increasing interleukin-10 secretion and inhibiting tumor necrosis factor- α secretion in RAW264.7 cells. [**Conclusion**] There is no significant difference in the main functional groups of yeast mannoproteins obtained by the three extraction methods. However, the enzyme-assisted extraction method can significantly improve the yield of yeast mannoprotein, and the obtained yeast mannoprotein shows higher anti-inflammatory activity. The findings provide a theoretical basis for the development and application of yeast mannoproteins.

Keywords: yeast; yeast mannoprotein; extraction method; immunological activity

酵母甘露糖蛋白存在于酵母细胞壁的外层，是以α-1，6-*D*-甘露聚糖为主链、α-1，2-甘露聚糖为支链的糖蛋白，其甘露聚糖经丝氨酸或Asp与肽或蛋白质连接[1]。酵母甘露糖蛋白可通过结合Dectin-2受体、促进巨噬细胞有丝分裂、诱导巨噬细胞产生一氧化氮而激活免疫反应，进而调节机体免疫力[2]。酵母甘露糖蛋白可与大分子噬菌体和树突状细胞表面的甘露糖受体结合以增强吞噬作用，并与血清甘露糖结合凝集素（MLB）结合，从而激活先天性免疫[3]。此外，酵母甘露糖蛋白也可通过激活T细胞以增强体液免疫[4]。在葡聚糖硫酸钠诱导的炎症性肠病小鼠模型中，酵母甘露糖蛋白显著降低了白细胞介素-1α（IL-1α）、白细胞介素-1β（IL-1β）、白细胞介素-6（IL-6）、粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、单核细胞趋化蛋白及Toll样受体-2（TLR-2）、TLR-4、TLR-7的mRNA表达，从而改善临床症状[5]。

大分子多糖的结构对其功能的发挥起到关键作用。研究表明，酵母甘露糖蛋白的组成和结构不仅受菌种和发酵条件影响，也受提取方法影响[6-7]。关于酵母甘露糖蛋白的提取方法主要有热水提取、碱提取和酶法提取。Liu等[8]研究了酵母甘露糖蛋白的提取方法及其抗氧化活性，采用热水提取、等电点法脱蛋白质提取得到的酵母甘露糖蛋白由α-糖苷键连接，具有良好的抗氧化活性。Huang[9]采用1 g/dL NaOH溶液在100 ℃处理酵母细胞壁2 h，离心得到上清液，中和后采用乙醇沉淀，再用Sevage法脱除蛋白质得到酵母甘露糖蛋白，并进行了酵母甘露糖蛋白的结构研究，傅里叶变换红外光谱显示其在3 450、1 680、1 200 cm^{-1}处有较强吸收峰。Li等[10]采用酶解工艺制备酵母甘露糖蛋白，指出以β-葡聚糖酶处理细胞壁可以获得更高的产量，且酶的添加量和反应时间是影响提取率的关键因素。

尽管酵母甘露糖蛋白的提取方法已有报道，但关于不同提取方法对酵母甘露糖蛋白的提取得率、分子结构以及功能的对比研究较少。作者以酵母细胞壁为原料，比较了不同提取方法对酵母甘露糖蛋白的提取效率、组成的影响，并评价其抗炎活性，为酵母甘露糖蛋白的开发与应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

酵母细胞壁：安琪酵母股份有限公司；葡聚糖酶：丹麦诺维信公司；单糖标准品、葡聚糖标准品：优级纯，美国Sigma公司；NaOH、HCl、冰乙酸、三氟乙酸、H_2SO_4、H_2O_2、无水乙醇：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；CCK-8细胞计数试剂：日本东仁化工公司；小鼠单核巨噬细胞RAW264.7（ATCCTIB-71）：美国标准生物品收藏中心；DMEM高糖细胞培养基：美国Gibco公司；TNF-α ELISA检测试剂盒：武汉伊莱瑞特生物技术有限公司；IL-10 ELISA检测试剂盒：武汉博士德生物工程有限公司；聚葡萄糖标准品：T-2000（M_w为2 000 000）、T-580（M_w为580 000）、

T-190（M_w为188 000）、T-70（M_w为70 000）、T-10（M_w为10 000）、T-5（M_w为4 600）、麦芽五糖（M_w为828），美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

高速离心机：22331型，德国Sigma公司；可见分光光度计：V-5000型，上海元析仪器有限公司；高效液相色谱仪（配有2410示差折光检测器和M32工作站）：Waters 600型，美国Waters公司；离子色谱仪：ICS-5000型，美国戴安公司；氨基酸自动分析仪：H835-50型，日本Hitachi公司；CO_2培养箱：150I型，美国Thermo Fisher Scientific公司；超净工作台：SW-CJ-1 F型，苏净安泰公司；显微镜：CK53型，日本奥林巴斯公司；多功能酶标仪：TECAN型，瑞士SPARK公司；超低温冰箱：OW-86L626型，青岛海尔公司。

1.3 方法

1.3.1 酵母甘露糖蛋白提取

1）热水提取：参照文献[11]中方法进行适当调整。配制质量浓度为5.0 g/dL的酵母细胞壁悬浮液，用1 mol/L乙酸溶液和1 mol/L NaOH溶液调节pH至7.2，在120 ℃高温处理1 h；5 000 r/min离心10 min，收集上清液，将沉淀加水混悬后离心，重复2次，合并上清液，用透析袋（截留相对分子质量8 000~14 000）在纯水中透析2 d，截留液中加入3倍体积的无水乙醇，4 ℃ 静置48 h；5 000 r/min离心10 min后取沉淀，经冷冻干燥得到热水提取酵母甘露糖蛋白样品MP-W。

2）碱提取：参照文献[12]中方法进行适当调整。配制质量浓度为5.0 g/dL的酵母细胞壁悬浮液，加入NaOH使其浓度达1.0 mol/L，室温搅拌（10 r/min）提取1 h；用6 mol/L HCl溶液调至中性，5 000 r/min离心10 min，收集上清液，将沉淀加水混悬后离心，重复2次，合并上清液，用透析袋（截留相对分子质量8 000~14 000）在纯水中透析2 d，截留液中加入3倍体积的无水乙醇，4 ℃ 静置48 h；5 000 r/ min离心10 min后取沉淀，经冷冻干燥得到碱提取酵母甘露糖蛋白样品MP-B。

3）酶法提取：参照文献[13]中方法进行适当调整。配制质量浓度为5.0 g/dL的酵母细胞壁悬浮液，用1 mol/L乙酸溶液调节pH至5.0，温度调至50 ℃，加入葡聚糖酶至0.5 g/dL，提取8 h；90 ℃灭酶1 h，5 000 r/min离心10 min，收集上清液，将沉淀加水混悬后离心，重复2次，合并上清液，用透析袋（截留相对分子质量8 000~14 000）在纯水中透析2 d，截留液中加入3倍体积的无水乙醇，4 ℃静置48 h；5 000 r/min离心10 min后取沉淀，经冷冻干燥得到酶法提取酵母甘露糖蛋白样品MP-E。

4）提取得率计算：称取一定量的干燥样品，根据式（1）计算酵母甘露糖蛋白的提取得率。

$$Y=\frac{m_1}{m_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

Y——样品的提取得率，%；

m_1——提取样品质量，g；

m_0——酵母细胞壁质量，g。

1.3.2 酵母甘露糖蛋白组分测定

1）甘露聚糖和葡聚糖质量分数测定：参照文献[14]中酸水解-离子色谱法进行测定。称取20 mg酵母甘露糖蛋白样品于20 mL的耐热玻璃管中，加入3.0 mL质量浓度为60.0 g/dL的三氟乙酸溶液，混合均匀后，于100 ℃保温1.75 h后立即冷却，用0.1 mol/L NaOH溶液调节pH至6.0~7.0，然后定容至100 mL。采用离子色谱仪测定样品溶液中甘露糖和葡萄糖质量浓度，并计算甘露聚糖和葡聚糖质量分数。仪器参数：Dionex CarboPac PA20阴离子交换柱，柱温30 ℃，流量0.5 mL/min，流动相A为水，流动相B为0.25 mol/L NaOH溶液。梯度洗脱程序：0~22.0 min，B体积分数为2.0%；22.0~23.0 min，B体积分数为2.0%~80.0%；23.0~30.0 min，B体积分数为80.0%；30.0~31.0 min，B体积分数为80.0%~2.0%；31.0~40.0 min，B体积分数为2.0%。

2）蛋白质和氨基酸质量分数测定：参照文献[15]中凯氏定氮法测定蛋白质质量分数，其值为总氮质量分数乘以6.25。参照文献[16]中柱后衍生离子交换色谱法测定氨基酸组成。精确称取一定量酵母甘露糖蛋白样品于水解管中，加入8 mL 6 mol/L HCl溶液，抽真空后于110 ℃水解22 h，冷却；将水解液定容至25 mL后进行过滤，取1 mL滤液真空干燥，加入0.02 mol/L HCl溶液静置30 min。仪器参数：进样量50 μL，流量0.225 mL/min，柱温53 ℃，茚三酮显色，检测波长为570 nm和440 nm。

1.3.3 酵母甘露糖蛋白相对分子质量分布测定

采用高效体积排阻色谱法[10]测定酵母甘露糖蛋白相对分子质量。用二甲基亚砜溶解样品，配制

样品质量浓度为4~5 mg/mL的溶液，过滤后进样。色谱条件：Ultrahydrogel™ Linear色谱柱（300 mm×7.8 mm），流动相为0.1 moL/L NaAC，流量0.9 mL/min，柱温45 ℃，进样量10 μL。

以M_w和数均分子量（M_n）表征相对分子质量分布，并根据式（2）计算聚合物多分散性指数（polydispersity index，PDI）。

$$I_{PD}=M_w/M_n \quad (2)$$

式中：

I_{PD}——聚合物多分散性指数；

M_w——重均分子量；

M_n——数均分子量。

1.3.4 酵母甘露糖蛋白单糖组成测定

采用酸水解-离子色谱法[17]测定酵母甘露糖蛋白单糖组成。称取5 mg酵母甘露糖蛋白样品于5 mL的具塞刻度试管中，加入1 mL 2 mol/L三氟乙酸，在121 ℃烘箱中水解2 h，用水定容至50 mL，经0.45 μm微孔滤膜过滤后测定甘露糖、葡萄糖、氨基葡萄糖峰面积。色谱条件：Dionex CarboPac PA20阴离子交换柱，柱温30 ℃，流量0.5 mL/min，流动相及梯度洗脱方案同1.3.2。

1.3.5 傅里叶变换红外光谱测定

称取1 mg酵母甘露糖蛋白样品和150 mg干燥的溴化钾（KBr），用研钵研磨均匀，压片后在波数4 000~650 cm^{-1}进行傅里叶变换红外光谱扫描。

1.3.6 巨噬细胞RAW264.7炎症因子抑制活性测定

1）样品制备：3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品（MP-W、MP-B、MP-E）经0.22 μm滤膜过滤后，用细胞培养基稀释至所需质量浓度。

2）细胞准备：巨噬细胞RAW264.7用细胞培养基于37 ℃、体积分数5% CO_2条件下培养，控制细胞浓度为1.0×10^5~5.0×10^6个/mL，传代后24~36 h用于生物学活性测定。

3）受试物安全质量浓度筛选：巨噬细胞RAW264.7以10 000个/孔接种于96孔板中，贴壁培养24 h；倒去旧培养基，加入含有不同质量浓度（0、0.039、0.078、0.156、0.313、0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 mg/mL）受试物的完全培养基孵育24 h；加入CCK-8细胞计数试剂孵育2 h，用多功能酶标仪测定波长490 nm处吸光度，根据式（3）计算细胞活力。

$$C=\frac{A_2-A_0}{A_1-A_0}\times100\% \quad (3)$$

式中：

C——细胞活力，%；

A_0——空白组（含培养基和CCK-8细胞计数试剂）的吸光度；

A_1——对照组（含细胞、培养基、CCK-8细胞计数试剂）的吸光度；

A_2——试验组（含细胞、培养基、CCK-8细胞计数试剂和不同质量浓度的酵母甘露糖蛋白）的吸光度。

4）功效检测：巨噬细胞RAW264.7用新鲜完全培养基重悬，用细胞培养基稀释细胞至接种密度（接种后24 h融合度达到45%~60%），接种至24孔板中。

采用脂多糖（lipopolysaccharides，LPS）进行诱导，设置对照组、阴性对照组（1 μg/mL LPS）、给药组（1 μg/mL LPS+MP-W，MP-W质量浓度分别为37.5、75.0、150.0 μg/mL；1 μg/mL LPS+MP-B，MP-B质量浓度分别为37.5、75.0、150.0 μg/mL；1 μg/mL LPS+MP-E，MP-E质量浓度分别为37.5、75.0、150.0 μg/mL）、阳性对照组（1 μg/mL LPS+10 μg/mL地塞米松）。每孔给药体积500 μL，每组重复3次。加入酵母甘露糖蛋白或地塞米松预处理2 h后，再加入1 μg/mL LPS，放置于CO_2培养箱中培养（24±2）h。培养结束后，收集1.5 mL细胞培养上清液于无菌离心管中，置于-80 ℃超低温冰箱中冷冻保存。按照TNF-α ELISA检测试剂盒和IL-10 ELISA检测试剂盒的操作说明书分别测定TNF-α、IL-10质量浓度。

1.4 数据处理

所有试验均进行3次重复，以“平均值±标准差”表示。数据分析采用SPSS 25统计软件，组间的显著性差异采用单因素方差分析，图像处理采用GraphPad Prism 8软件。

2 结果与讨论

2.1 提取方法对酵母甘露糖蛋白的提取得率与组分的影响

3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品（MP-W、MP-B、MP-E）的提取得率和组分见表1。MP-E的提取得率为23.1%，显著高于MP-W（9.7%）和MP-B（11.5%）的提取得率。MP-E的甘露聚糖、葡聚糖、蛋白质质量分数分别为73.5%、8.2%、14.0%，其中葡聚糖质量分数显著高于MP-W和MP-B，甘露聚糖质量分数和蛋白质质量分数与MP-W和MP-B无显著差异。

由以上结果可以看出，相比热水提取和碱提取，酶法提取能够更好地使酵母细胞壁中多糖，尤其是甘露聚糖溶出，这与酵母细胞壁的结构存在一定关系。酵母细胞壁的结构类似三明治[1]，外层为酵母甘露糖蛋白，中间层是蛋白质分子，内层为β-葡聚糖。外层酵母甘露糖蛋白通过支链β-1，6-葡聚糖与细胞壁的其他组分连接[18-19]。相比热水提取和碱提取，采用葡聚糖酶水解能够切断外层酵母甘露糖蛋白与内层葡聚糖之间的连接，更有利于酵母甘露糖蛋白的释放。

表 1　酵母甘露糖蛋白的提取得率和组分

Table 1　Yields and composition of yeast mannoproteins

单位：%

样品	提取得率	甘露聚糖质量分数	葡聚糖质量分数	蛋白质质量分数
MP-W	9.7±0.4^a	69.0±3.5^a	3.5±0.2^a	11.7±0.5^a
MP-B	11.5±1.2^a	65.7±2.2^a	2.9±0.2^a	14.1±0.8^a
MP-E	23.1±3.8^b	73.5±3.4^a	8.2±1.5^b	14.0±0.3^a

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2.2　提取方法对酵母甘露糖蛋白的单糖组成和氨基酸质量分数的影响

2.2.1　单糖组成

3 种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品（MP-W、MP-B、MP-E）经酸水解后通过离子色谱定量分析单糖组成，各单糖峰面积占比见表 2。MP-W、MP-B、MP-E 的单糖组成都以甘露糖为主，甘露糖峰面积占比分别达到 93.90%、93.32%、91.15%，3 种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白以甘露糖的聚合物为主，与文献报道[20-21]一致。酵母甘露糖蛋白主要存在于酵母细胞壁外层，通过葡聚糖与细胞壁内层连接[22]，3 种提取方法均能有效促进酵母甘露糖蛋白释放。除甘露糖外，还含有少量葡萄糖（5.29%、5.78%、7.88%）和氨基葡萄糖（0.82%、0.90%、0.97%），这与酵母细胞壁的结构有关[23]。酵母菌种、发酵条件对细胞壁的组成影响较大[24-25]，氨基葡萄糖主要存在于酵母细胞壁的出芽痕位置[20]，在提取过程中有少量残留，与之前报道的研究结果[26]基本一致。不同提取方法得到的样品单糖组成中，甘露糖、葡萄糖和氨基葡萄糖的峰面积占比略有差异，MP-E 的葡萄糖峰面积占比（7.88%）显著高于 MP-W 和 MP-B，这可能是由于酶法提取通过水解酵母细胞壁中部分葡聚糖，使酵母甘露糖蛋白成分中残留部分葡聚糖[13]。

表 2　酵母甘露糖蛋白的单糖组成

Table 2　Monosaccharide composition of yeast mannoproteins

单位：%

样品	峰面积占比		
	氨基葡萄糖	葡萄糖	甘露糖
MP-W	0.82±0.04^a	5.29±0.53^a	93.90±2.52^a
MP-B	0.90±0.04^a	5.78±0.69^a	93.32±2.77^a
MP-E	0.97±0.06^a	7.88±0.76^b	91.15±2.91^a

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

2.2.2　氨基酸质量分数

3 种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品（MP-W、MP-B、MP-E）中氨基酸组成见表 3。MP-W、MP-B、MP-E 的总氨基酸质量分数分别为 11.76%、11.13%、8.91%，与之前的研究结果[27-28]一致，即酵母甘露糖蛋白中蛋白质质量分数为 10%~50%。MP-E 的总氨基酸质量分数显著低于 MP-W 和 MP-B，其中 Asp 质量分数显著低于 MP-W 和 MP-B，Thr 质量分数显著高于 MP-W 和 MP-B。此外，MP-E 的谷氨酸（Glu）、甘氨酸（Gly）、精氨酸（Arg）、丙氨酸（Ala）、苯丙氨酸

表 3　酵母甘露糖蛋白氨基酸质量分数

Table 3　Mass fractions of amino acids in yeast mannoproteins　　单位：%

样品	质量分数								
	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr
MP-W	1.12±0.05^a	1.64±0.07^a	0.92±0.04	0.23±0.02	0.68±0.04^a	1.68±0.09^a	0.30±0.02^a	0.92±0.04^a	0.35±0.02
MP-B	1.03±0.05^a	1.53±0.05^a	0.89±0.05	0.21±0.02	0.65±0.03^a	1.73±0.08^a	0.28±0.02^a	0.93±0.04^a	0.30±0.02
MP-E	0.71±0.04^b	1.19±0.05^b	0.99±0.05	0.15±0.02	0.32±0.02^b	1.92±0.08^b	0.08±0.01^b	0.64±0.02^b	0.21±0.02
样品	质量分数								
	Cys-Cys	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro	总氨基酸
MP-W	0.08±0.02	0.73±0.06	0.08±0.01	0.39±0.03^a	0.47±0.03	0.50±0.02	0.68±0.03	1.00±0.04	11.76±0.73^a
MP-B	0.05±0.01	0.71±0.10	0.02±0.00	0.39±0.04^a	0.53±0.04	0.50±0.02	0.53±0.02	0.85±0.04	11.13±0.52^a
MP-E	0.06±0.01	0.72±0.06	0.02±0.00	0.17±0.02^b	0.31±0.02	0.28±0.01	0.36±0.02	0.78±0.05	8.91±0.34^b

注：同列不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。

（Phe）质量分数显著低于MP-W和MP-B，MP-W和MP-B的单个氨基酸质量分数和总氨基酸质量分数无显著差异。

有研究显示，Asp与甘露聚糖和蛋白质的*N*-糖基化有关，而Thr与甘露聚糖和蛋白质的*O*-糖基化有关[22,29]，不同的氨基酸组成和蛋白质质量分数可能与酵母甘露糖蛋白的糖基化连接方式有关。因此，提取方法对酵母甘露糖蛋白的糖基化类型可能产生显著的影响。

2.3 酵母甘露糖蛋白相对分子质量分布结果

3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品（MP-W、MP-B、MP-E）采用高效体积排阻色谱法测定其相对分子质量分布，并用GPC软件处理数据得到M_w，见表4。MP-W、MP-B、MP-E经纯化后，能去除大部分的小分子物质，M_w分别为103 493、106 579、118 286，略有差异，但均在100 000~120 000，表明不同提取方法对样品相对分子质量影响并不显著。有研究表明，化学法提取的酵母甘露糖蛋白相对分子质量在21 000~62 000，而酶法分离的酵母甘露糖蛋白相对分子质量在64 000~112 000[30]。该研究结果显示，不同提取方法对酵母甘露糖蛋白M_w无显著影响，酶处理和碱处理并不会对酵母甘露糖蛋白的分子大小造成影响[26]，这可能与所采用的原料和酶的种类有关[31-32]。

表4 酵母甘露糖蛋白相对分子质量分布

Table 4 Relative molecular mass distribution of yeast mannoproteins

样品	M_w	M_n	PDI
MP-W	103 493	16 118	6.42
MP-B	106 579	21 627	4.93
MP-E	118 286	23 194	5.09

2.4 傅里叶变换红外光谱结果

酵母甘露糖蛋白的傅里叶变换红外光谱如图1所示，MP-W、MP-B、MP-E均在3 300、1 644、1 019、810 cm^{-1}附近有较强吸收峰。其中，3 300 cm^{-1}处为糖苷结构中—OH伸缩振动；950~1 200 cm^{-1}处为碳水化合物中典型键的拉伸振动，如C—CO和CO—H[33]。未观察到3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品的官能团有显著差异。酵母甘露糖蛋白样品的傅里叶变换红外光谱相似，强度略有差异，说明提取方法对酵母甘露糖蛋白的特征官能团无显著影响。详细的结构分析如甘露聚糖的聚合方式和比例、糖基化的连接方式等，需结合甲基化、NMR等手段进行综合分析。

2.5 酵母甘露糖蛋白免疫调节活性分析

2.5.1 细胞耐受性考察

巨噬细胞RAW264.7安全质量浓度筛选结果见图2。可以看出，MP-W、MP-B、MP-E分别在质量浓度0.156、0.313、0.313 mg/mL下不会对细胞生长造成明显的负面影响。根据细胞耐受性试验结果，分别选择37.5、75.0、150.0 μg/mL作为测试质量浓度用于考察酵母甘露糖蛋白对巨噬细胞RAW276.4抗炎活性的影响。

2.5.2 酵母甘露糖蛋白对巨噬细胞RAW264.7分泌IL-10的影响

各组别IL-10质量浓度检测结果见图3。对照组、阴性对照组和阳性对照组的IL-10质量浓度分别为（106.55±7.08）、（225.99±14.46）、（322.31±12.07）pg/mL；相比对照组，阴性对照组IL-10质量浓度极显著上调（P<0.001）；相比阴性对照组，阳性对照组IL-10质量浓度极显著升高（P<0.001），证明造模有效。

3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白在一定质量浓度下均能增加巨噬细胞RAW264.7抗炎因子IL-10的生成，IL-10质量浓度随酵母甘露糖蛋白质量浓度的增加而增加。在MP-W、MP-B、MP-E质量浓度为150.0 μg/mL时，IL-10的质量浓度分别为（269.86±8.37）、（262.76±7.17）、（295.53±4.91）pg/mL。且在该质量浓度下，与阴性对照组相比，3种酵母甘露糖蛋白均能非常显著地增加IL-10质量浓度（P<0.01），其中MP-E效果极显著优于MP-W和MP-B（P<0.001）。

IL-10是一种具有抗炎特性的细胞因子[28]，可通过限制对病原体的免疫反应来防止宿主的损害，在感染中发挥核心作用[34-35]。有研究表明，在动物试验中低剂量酵母甘露糖蛋白可以保护肠道组织免受鼠伤寒沙门氏菌感染，表现为肠道上皮中促炎反应降低、TLR5下调和细胞凋亡受抑制[36]。来自酿酒酵母的甘露糖蛋白通过结合几种免疫细胞受体，而被视为一种有效的免疫激活剂[37]。在结构上，酵母甘露糖蛋白具有广泛的氮和氧连接的糖基化蛋白，可作为巨噬细胞和树突

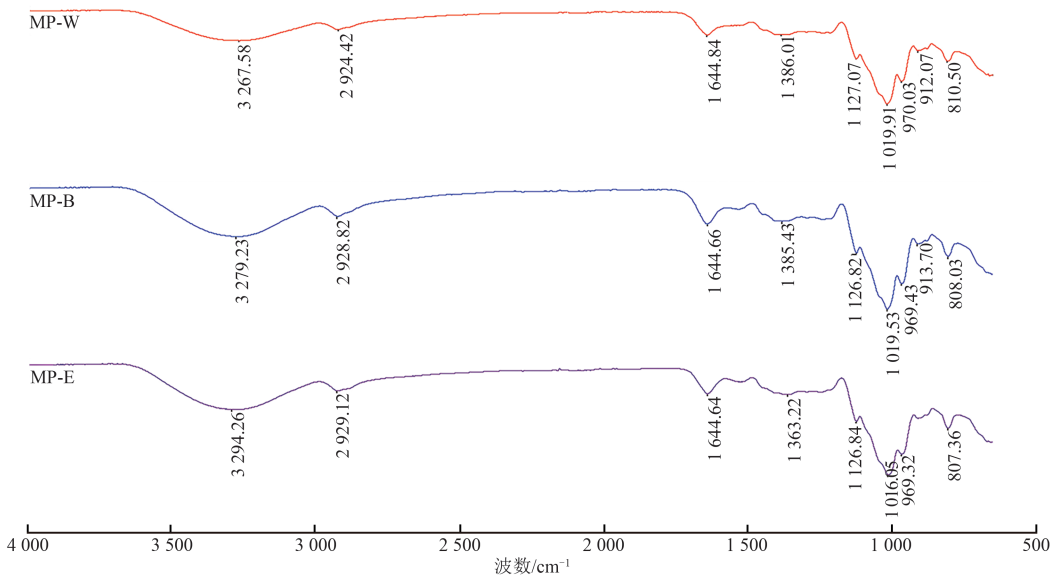
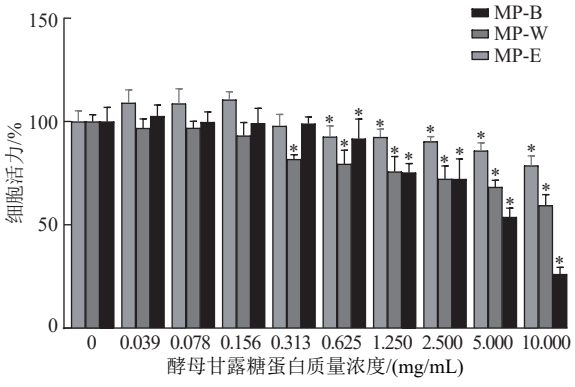


图 1　酵母甘露糖蛋白傅里叶变换红外光谱

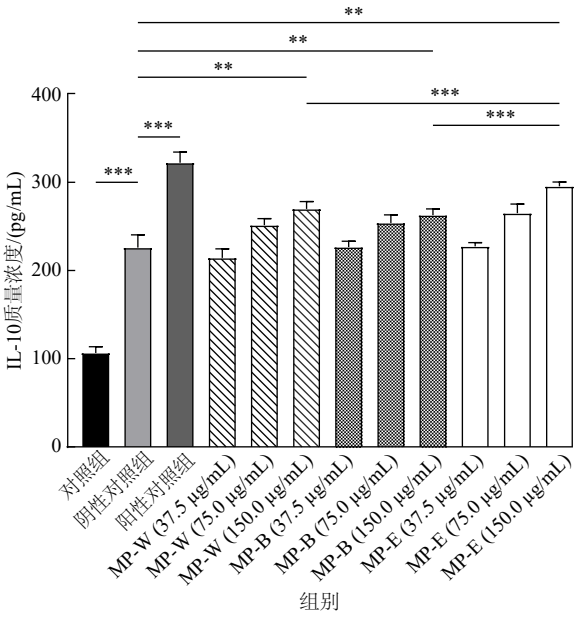
Fig. 1　Fourier transform infrared spectra of yeast mannoproteins



*—与空白组相比差异显著（P<0.05）。

图 2　酵母甘露糖蛋白的细胞耐受性

Fig. 2　Cellular tolerance to yeast mannoproteins



*—差异显著（P<0.05），**—差异非常显著（P<0.01），***—差异极显著（P<0.001）。

图 3　酵母甘露糖蛋白对巨噬细胞 RAW264.7 分泌 IL-10 的影响

Fig. 3　Effects of yeast mannoproteins on the secretion of IL-10 by RAW264.7 cells

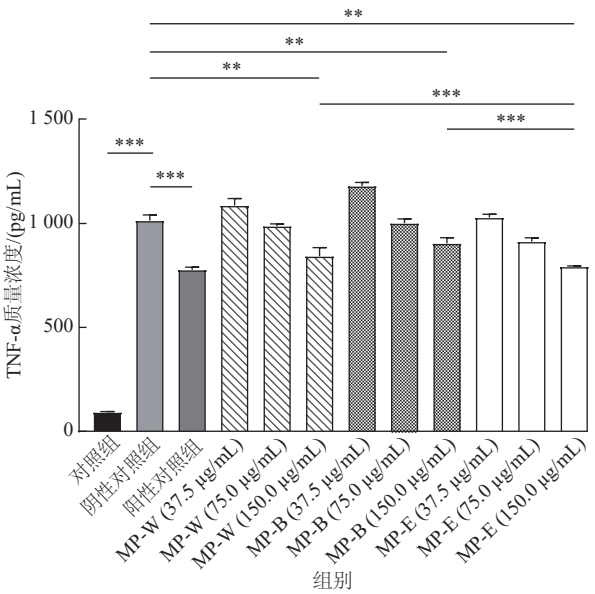
状细胞上的半乳糖凝集素-3（Gal-3）、甘露糖受体的配体[38]。有研究表明，在白色念珠菌 DSS 模型中，Gal-3 敲除小鼠受肠道炎症和白色念珠菌定植的影响小于野生型小鼠[39]。此外，酶法提取得到的酵母甘露糖蛋白相比碱提取和热水提取具有更优的效果，可能与其结构中氨基酸组成和糖基化方式有关。

2.5.3　酵母甘露糖蛋白对巨噬细胞 RAW264.7 分泌 TNF-α 的影响

各组别 TNF-α 质量浓度检测结果见图 4。对照组、阴性对照组和阳性对照组的 TNF-α 质量浓度分别为（91.74±3.31）、（1 014.02±27.65）、（777.41±12.77）pg/mL；相比对照组，阴性对照组 TNF-α 质量浓度极显著上调（P<0.001）；相比阴性对照组，阳性对照组 TNF-α 质量浓度极显著降低（P<0.001），证明造模有效。

3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白在一定质量浓度下均能降低巨噬细胞RAW264.7促炎因子TNF-α的生成，TNF-α质量浓度随酵母甘露糖蛋白质量浓度的增加而降低。在MP-W、MP-B、MP-E质量浓度为150 μg/mL时，TNF-α的质量浓度分别为（843.21±41.19）、（905.12±27.08）、（793.15±33.17）pg/mL。且在该质量浓度条件下，与阴性对照组相比，3种酵母甘露糖蛋白均能非常显著地降低TNF-α的质量浓度（P<0.01），其中MP-E效果极显著优于MP-W和MP-B（P<0.001）。

TNF-α属于促炎细胞因子，参与正常炎症反应和免疫反应，可以协同调节其他细胞因子的产生、细胞存活来协调组织的稳态。有研究报道，酵母甘露聚糖蛋白能抑制由真菌毒素导致的上皮细胞氧化损伤[40]，抑制TNF-α、IL-6、IL-8等促炎因子的分泌。



*—差异显著（P<0.05），**—差异非常显著（P<0.01），***—差异极显著（P<0.001）。

图4　酵母甘露糖蛋白对巨噬细胞RAW264.7分泌TNF-α的影响

Fig. 4　Effects of yeast mannoproteins on the secretion of TNF-α by RAW264.7 cells

3　结论

该研究以酵母细胞壁为原料，对不同提取方法制备得到的酵母甘露糖蛋白的提取得率、组分和体外抗炎活性进行了比较。采用热水提取、碱提取和酶法提取获得酵母甘露糖蛋白，初步纯化后，结果显示，酶法提取得到的酵母甘露糖蛋白提取得率达到23.1%，显著高于热水提取（9.7%）和碱提取（11.5%）的提取得率。

3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品单糖组成中，甘露糖为主要成分，还含有少量葡萄糖和氨基葡萄糖，酶法提取得到的酵母甘露糖蛋白的葡萄糖峰面积占比显著高于其他方法。MP-W、MP-B、MP-E的M_w分别为103 493、106 579、118 286；与以往报道不同，3种提取方法对酵母甘露糖蛋白相对分子质量的影响无显著差异。酶法提取得到的酵母甘露糖蛋白的Asp、Gly等氨基酸质量分数和总氨基酸质量分数显著低于MP-W和MP-B，Thr质量分数显著高于MP-W和MP-B。结合傅里叶变换红外光谱结果，3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白样品的氨基酸、单糖组成具有一定差异，但主要官能团、相对分子质量无显著差异。因此，不同提取方法对酵母甘露糖蛋白的组成有明显影响，但对分子结构的影响有待进一步研究。

酵母甘露糖蛋白免疫调节活性试验结果表明，3种提取方法得到的酵母甘露糖蛋白在一定质量浓度下，均可以显著增强巨噬细胞RAW264.7抗炎因子IL-10的分泌和抑制TNF-α的分泌，显示出较好的免疫调节活性，且酶法提取得到的酵母甘露糖蛋白样品的体外免疫调节活性优于其他2种提取方法得到的样品。

综上，3种提取方法对酵母甘露糖蛋白的提取得率、组分及体外抗炎活性有明显影响，但主要官能团和相对分子质量分布无显著影响。酶法提取能够更好地提升酵母甘露糖蛋白的提取得率，为酵母多糖的工业化开发和工艺选择提供了技术支持和理论依据。然而，该研究对酵母甘露糖蛋白提取方法的探讨尚不深入，不同提取方法对酵母甘露糖蛋白结构影响的研究仍处于初级阶段，对其免疫调节活性的研究还不够全面，对其作用机制、详细的结构及构效关系还有待进一步解析。

参考文献

[1] FLEET G H. Composition and structure of yeast cell walls [J]. Current Topics in Medical Mycology, 1985, 1: 24-56.

[2] GALINARI É, ALMEIDA-LIMA J, MACEDO G R, et al. Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory effects of cell wall *α*-*D*-mannan fractions from *Kluyveromyces marxianus* [J]. International Journal of Biological

Macromolecules，2018，109：837-846.

[3] SAEVARSDOTTIR S，VIKINGSDOTTIR T，VALDIMARSSON H. The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes [J]. Scandinavian Journal of Immunology，2004，60（1/2）：23-29.

[4] BAZAN S B，BREINIG T，SCHMITT M J，et al. Heat treatment improves antigen-specific T cell activation after protein delivery by several but not all yeast genera [J]. Vaccine，2014，32（22）：2591-2598.

[5] HOVING L R，VAN DER ZANDE H J P，PRONK A，et al. Dietary yeast-derived mannan oligosaccharides have immune-modulatory properties but do not improve high fat diet-induced obesity and glucose intolerance [J]. PLoS One，2018，13（5）：e0196165.

[6] FREIMUND S，SAUTER M，KÄPPELI O，et al. A new non-degrading isolation process for 1，3-*β*-*D*-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Carbohydrate Polymers，2003，54（2）：159-171.

[7] LI J，KARBOUNE S. A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，119：654-661.

[8] LIU Y，HUANG G L，LV M J. Extraction，characterization and antioxidant activities of mannan from yeast cell wall [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2018，118：952-956.

[9] HUANG G L. Extraction of two active polysaccharides from the yeast cell wall [J]. Zeitschrift für Naturforschung，2008，63（11/12）：919-921.

[10] LI J，KARBOUNE S. Characterization of the composition and the techno-functional properties of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell walls [J]. Food Chemistry，2019，297：124867.

[11] 张玉香，周元，屈慧鸽，等. 甘露糖蛋白的提取及乳化性质研究[J]. 安徽农业科学，2008，36（25）：10742-10744.
ZHANG Y X，ZHOU Y，QU H G，et al. Extraction of mannose glycoprotein and research on emulsification properties [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences，2008，36（25）：10742-10744.（in Chinese）

[12] LIU H Z，WANG Q，HE Y. Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein [J]. Carbohydrate Polymers，2011，83（4）：1690-1695.

[13] LI J，KARBOUNE S，ASEHRAOU A. Mannoproteins from inactivated whole cells of baker's and brewer's yeasts as functional food ingredients：isolation and optimization [J]. Journal of Food Science，2020，85（5）：1438-1449.

[14] FREIMUND S，JANETT S，ARRIGONI E，et al. Optimised quantification method for yeast-derived 1，3-*β*-*D*-glucan and *α*-*D*-mannan [J]. European Food Research and Technology，2005，220：101-105.

[15] PETERSON G L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable [J]. Analytical Biochemistry，1977，83（2）：346-356.

[16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定：GB 5009.124—2016[S]. 北京，中国标准出版社，2016.

[17] 戴军，朱松，汤坚，等. PMP柱前衍生高效液相色谱法分析杜氏盐藻多糖的单糖组成[J]. 分析测试学报，2007，26（2）：206-210.
DAI J，ZHU S，TANG J，et al. Analysis of monosaccharide compositions in polysaccharides from *D. salina* by pre-column derivatization high performance liquid chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis，2007，26（2）：206-210.（in Chinese）

[18] KAPTEYN J C，MONTIJN R C，VINK E，et al. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked *β*-1，3-/*β*-1，6-glucan heteropolymer[J]. Glycobiology，1996，6（3）：337-345.

[19] KOLLÁR R，PETRÁKOVÁ E，ASHWELL G，et al. Architecture of the yeast cell wall：the linkage between chitin and *β*（1→3）-glucan[J]. The Journal of Biological Chemistry，1995，270（3）：1170-1178.

[20] ORLEAN P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. Genetics，2012，192（3）：775-818.

[21] ASSUNÇÃO-BICCA S，PONCET-LEGRAND C，WILLIAMS P，et al. Structural characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins：impact of their polysaccharide part[J]. Carbohydrate Polymers，2022，277：118758.

[22] LIPKE P N，OVALLE R. Cell wall architecture in yeast：new structure and new challenges [J]. Journal of Bacteriology，1998，180（15）：3735-3740.

[23] 杨翠竹，李艳，阮南，等. 酵母细胞破壁技术研究与应用进展[J]. 食品科技，2006，31（7）：138-142.
YANG C Z，LI Y，RUAN N，et al. Study and applications of technology about breaking yeast cell wall [J]. Food Science and Technology，2006，31（7）：138-142.（in Chinese）

[24] SCHIAVONE M，SIECZKOWSKI N，CASTEX M，et al. Effects of the strain background and autolysis process on the composition and biophysical properties of the cell wall from two different industrial yeasts [J]. FEMS Yeast Research，2015，15（2）：fou012.

[25] WANG J J，LI M Q，ZHENG F Y，et al. Cell wall polysaccharides：before and after autolysis of brewer's yeast [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology，2018，34(9)：137.

[26] WAN M Z，WANG M Y，ZHAO Y，et al. Extraction of mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its chemical composition and molecular structure [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2021，193：2252-2259.

[27] 张玉香，尹卓容. 甘露糖蛋白的提纯及分子量测定[J]. 酿酒科技，2005(4)：72-74.
ZHANG Y X，YIN Z R. Purification of mannose glycoprotein and measurement of its molecular weight [J]. Liquor-Making Science & Technology，2005(4)：72-74.(in Chinese)

[28] SNYMAN C，MEKOUE N J，SIECZKOWSKI N，et al. Optimised extraction and preliminary characterisation of mannoproteins from non-*Saccharomyces* wine yeasts[J]. Foods，2021，10(5)：924.

[29] BASTOS R，OLIVEIRA P G，GASPAR V M，et al. Brewer's yeast polysaccharides：a review of their exquisite structural features and biomedical applications [J]. Carbohydrate Polymers，2022，277：118826.

[30] KATH F，KULICKE W M. Polymer analytical characterization of glucan and mannan from yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Die Angewandte Makromolekulare Chemie，1999，268(1)：69-80.

[31] 魏丕芳. 不同自溶方式对啤酒废酵母甘露聚糖的降解作用[J]. 食品研究与开发，2008，29(9)：75-77.
WEI P F. Studies on the degrading of *Saccharomyes cerevisiae* mannan during different autolysis [J]. Food Research and Development，2008，29(9)：75-77.(in Chinese)

[32] 王敏，李崎，顾国贤. 啤酒酵母自溶与细胞壁关系[J]. 生命的化学，2008，28(4)：504-506.
WANG M，LI Q，GU G X. Relationship between auto-lysis of *Saccharomyces cerevisiae* and cell wall[J]. Chemistry of Life，2008，28(4)：504-506.(in Chinese)

[33] CASILLO A，FABOZZI A，RUSSO K I，et al. Physicochemical approach to understanding the structure，conformation，and activity of mannan polysaccharides[J]. Biomacromolecules，2021，22(4)：1445-1457.

[34] SARAIVA M，O'GARRA A. The regulation of IL-10 production by immune cells [J]. Nature Reviews Immunology，2010，10：170-181.

[35] ISHIDA-OKAWARA A，NAGI-MIURA N，OHARASEKI T，et al. Neutrophil activation and arteritis induced by *C. albicans* water-soluble mannoprotein-*β*-glucan complex (CAWS)[J]. Experimental and Molecular Pathology，2007，82(2)：220-226.

[36] POSADAS S J，CAZ V，CABALLERO I，et al. Effects of mannoprotein E1 in liquid diet on inflammatory response and TLR5 expression in the gut of rats infected by *Salmonella typhimurium*[J]. BMC Gastroenterology，2010，10：58.

[37] LEE D H，KIM H W. Innate immunity induced by fungal *β*-glucans *via* dectin-1 signaling pathway[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms，2014，16(1)：1-16.

[38] POULAIN D，JOUAULT T. *Candida albicans* cell wall glycans，host receptors and responses：elements for a decisive crosstalk[J]. Current Opinion in Microbiology，2004，7(4)：342-349.

[39] JAWHARA S，THURU X，STANDAERT-VITSE A，et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3 [J]. The Journal of Infectious Diseases，2008，197(7)：972-980.

[40] GUO W Y，GU X L，TONG Y Q，et al. Protective effects of mannan/*β*-glucans from yeast cell wall on the deoxyniyalenol-induced oxidative stress and autophagy in IPEC-J2 cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，135：619-629.

（责任编辑：许艳超）