



酿酒酵母蛋白酶 A 外泌与酒类酿造

陈叶福, 卢 君, 韩月然, 刘明明, 肖冬光

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室,
天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 蛋白酶 A (EC 3.4.23.6) 是酿酒酵母中重要的蛋白酶, 与酶原激活、生孢等多种生理功能密切相关. 在酒类酿造过程中往往会发生蛋白酶 A 外泌进而影响发酵产品质量的现象. 研究胁迫条件下蛋白酶 A 的外泌及其调控机制, 对于酿酒酵母菌种选育和酒类产品质量控制具有重要的理论指导意义. 本文主要对蛋白酶 A 外泌机制和蛋白酶 A 外泌对酒类酿造影响的相关研究进行综述.

关键词: 蛋白酶 A; 酿酒酵母; 生理功能; 分泌途径; 酿酒

中图分类号: Q939.97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2013)05-0001-08

Extracellular Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* Proteinase A and Brewing—a Review

CHEN Yefu, LU Jun, HAN Yueran, LIU Mingming, XIAO Dongguang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Proteinase A (EC 3.4.23.6), the major protease in *Saccharomyces cerevisiae*, plays an essential role in zymogens activation, sporulation and other physiological processes in vivo. Extracellular secretion of proteinase A often occurs during alcoholic fermentation, and finally has important impacts on the quality of fermented products. The research on extracellular secretion of proteinase A and its regulatory mechanism under stress conditions can significantly benefit yeast strain improvement and the quality control of the liquor products. In this paper, we review the research history and developments on the mechanism of extracellular proteinase A secretion, and the impact of extracellular proteinase A secretion on alcohol brewing is also addressed.

Key words: proteinase A; *Saccharomyces cerevisiae*; physiological functions; secretory pathway; brewing

酿酒酵母是重要的真核模式生物, 蛋白酶 A 是酿酒酵母中主要的蛋白酶, 对于酿酒酵母具有重要的生理生化作用. 蛋白酶 A 不仅参与正常代谢条件下多种胞内酶和蛋白因子(如转录激活因子)的成熟和激活过程, 更与多种胁迫应答相关. 如在氮饥饿胁迫条件下, 蛋白酶 A 可分解液泡内多余蛋白质促进多倍体酵母生孢; 而在乙酸胁迫条件下, 蛋白酶 A 则参与线粒体降解而引起酵母细胞死亡^[1-3].

酿酒酵母还是酒精饮品发酵生产所必需的微生物菌种. 不同酒精饮品生产工艺条件下, 酿酒酵母会

面临不同的胁迫环境, 蛋白酶 A 的分泌会对这些发酵产品的品质产生重要影响. 如啤酒发酵后期, 蛋白酶 A 的外泌会分解泡沫阳性蛋白, 降低啤酒泡持性, 对纯生啤酒的泡沫质量产生不利影响^[4-5]. 在葡萄酒发酵过程中, 酿酒酵母蛋白酶 A 外泌可分解出更多的氨基酸, 加速酒球菌的苹果酸-乳酸发酵进程^[6]; 而对于葡萄酒产品(如白葡萄酒)而言, 蛋白酶 A 的外泌则可有效水解酒体中的蛋白质, 从而避免储存过程中蛋白质聚集沉淀形成非生物浑浊而影响产品感官质量^[7]. 黄酒发酵过程中, 蛋白酶 A 的外泌则可更

收稿日期: 2013-05-28; 修回日期: 2013-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271916)

作者简介: 陈叶福(1973—), 男, 吉林通化人, 教授, yfchen@tust.edu.cn.

多地将发酵醪中的蛋白质分解为氨基酸,促进发酵进程,提高产品中氨基酸含量。因此,探明不同胁迫条件下酿酒酵母蛋白酶 A 的外泌及调控机制,对于特定发酵产品菌种选育和产品质量控制具有重要的理论指导意义。

1 酿酒酵母蛋白酶 A 简介

蛋白酶 A (EC 3.4.23.6) 是酵母中第一个被研究的酶,其特性与哺乳动物胃蛋白酶、组织蛋白酶 D 和 E 以及人的血管紧张肽原酶相似^[8],是一种天冬氨酸蛋白酶,由 *PEP4* 基因编码,定位于酵母细胞液泡内,活性中心为 Asp³²-Thr-Gly-Ser 及 Asp²¹⁵-Thr-Gly-Ser^[9]。*PEP4* 基因由 2 146 bp 碱基组成,临近酵母染色体 XVI 的 *GAL4* 端,该基因通过转录翻译形成蛋白酶 A 前体,即前蛋白酶 A 原(preproPrA)^[10]。前蛋白酶 A 原是由 405 个氨基酸残基组成的单体蛋白,包括氨基端信号肽、前肽、活性蛋白酶 A,相对分子质量约为 4.4×10^4 ^[11]。

2 蛋白酶 A 结构

一级结构:成熟的酵母蛋白酶 A (PrA)由 329 个氨基酸及 7.5%的中性糖(甘露糖)和 1%的葡萄糖胺、半乳糖胺组成^[12]。329 个氨基酸残基中有 2 个二硫桥,分别位于 46~51、252~285 位(即 preproPrA 的 122~127、328~361 位)的半胱氨酸残基之间。Asn-67 和 Asn-266 为 PrA 的 2 个糖基化位点(即 preproPrA 的 Asn-144、Asn-345),连接方式为 N-连接^[13-14],其活性中心为 Asp³²-Thr-Gly-Ser 及 Asp²¹⁵-Thr-Gly-Ser^[9,13]。

二级结构:酵母蛋白酶 A 与其他天冬氨酸蛋白酶空间结构相似,二级结构形式主要为 β -折叠,另有 10 个小的右手 α -螺旋以及发夹结构^[15]。

三级结构:酵母蛋白酶 A 的 329 个氨基酸残基折叠形成 2 个拓扑学相似的叶片状结构域,2 个结构域拥有同一个中心轴,穿过含有天冬氨酸残基的活性位点平面。这种结构特点与其他天冬氨酸蛋白酶(如胃蛋白酶、肾素、组织蛋白酶 D)相似,即都具有 2 个结构域^[15]。酵母蛋白酶 A 的三级结构如图 1 所示^[15]。

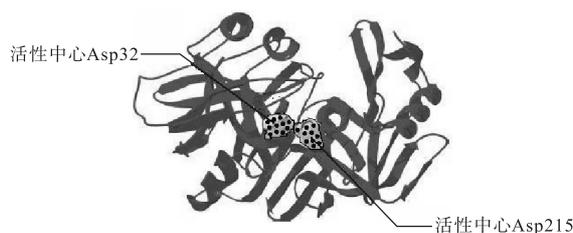


图 1 酿酒酵母蛋白酶 A 三级结构示意图

Fig. 1 Tertiary structure of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A

3 蛋白酶 A 的生理作用

蛋白酶 A 对于酵母细胞具有重要的生理生化作用,能催化细胞内蛋白质水解,特别是在氮缺乏、孢子形成时,蛋白酶 A 能通过水解蛋白质为孢子新蛋白合成提供氨基酸来源^[1]。在液泡中,酵母蛋白酶 A 参与多种酶的转录后加工。通过对蛋白酶 A 编码基因 *PEP4* 进行突变,例如插入突变、无义突变、错义突变的研究发现,酵母蛋白酶 A 不仅对自身的加工成熟过程起到重要作用,还参与液泡中其他液泡酶的成熟和激活过程。如蛋白酶 B 前体及其酶原被蛋白酶 A 切割成熟后进一步对羧肽酶 Y 前体进行加工,蛋白酶 A 也可以直接切割羧肽酶 Y 前体并使其成熟^[16]。

另外,蛋白酶 A 也与氨肽酶 I、核糖核酸酶、碱性磷酸酶、海藻糖酶的成熟激活有关^[17]。蛋白酶 A 在酵母细胞代谢中起到重要作用,在营养缺乏的条件下,如果酵母细胞缺乏蛋白酶 A 和蛋白酶 B,那么酵母合成蛋白质的能力下降 85%以上,并导致酵母死亡率大幅增加^[2]。

酵母细胞内的蛋白酶 A 的作用活性需要保持在适当的范围,活性太高不利于酵母的正常生理功能。因此,酵母细胞质中存在蛋白酶 A 的专一性抑制剂——小分子蛋白 IA3。IA3 的作用是在酵母细胞中的液泡酶泄露的情况下,IA3 能够起到安全保护的作用,防止蛋白酶 A 降解细胞质中的必要蛋白质;IA3 还能调节酵母细胞内蛋白酶 A 的作用程度,保证蛋白酶 A 适当地发挥其生物功能^[18]。

浙江大学的刘晓杰^[19]研究了蛋白酶 A 缺失对工业啤酒酵母菌株的一些生理功能的影响。研究表明:酵母蛋白酶 A 的敲除明显影响酵母胞内某些糖代谢关键酶的酶活表达和胞内 ATP 积累;在低氮条件下,

蛋白酶 A 的缺失使得酵母胞内仍积累大量粗蛋白,同时酵母丙酮酸激酶酶活始终处于较低水平;在抗逆性上,蛋白酶 A 的缺失使得酵母对乙醇、过氧化氢、低氮的耐受能力显著下降;针对啤酒发酵,蛋白酶 A 的缺失使得发酵所得的酒体中含有大量粗蛋白,所得产品过滤难度增加;同时,突变后的酵母菌株在环境胁迫条件下的存活能力较对照明显降低。

4 蛋白酶 A 液泡分选途径

蛋白酶 A 是液泡蛋白酶,主要在液泡内起作用,正常代谢条件下蛋白酶 A 被运输至液泡。其具体分泌过程是,前蛋白酶 A 原(preproPrA)在粗面内质网合成后,先经过内质网的修饰和折叠,再运输到高尔基体,最终被定向运输至液泡并在液泡中形成成熟的蛋白酶 A (PrA)。在内质网中,前蛋白酶 A 原在其 2 个糖基化位点上完成核心糖基化修饰,其 N 端由 22 个氨基酸残基组成的信号肽被切除^[1]。

在内质网中被修饰后的前蛋白酶 A 原被运输到高尔基体。在高尔基体中,糖链延伸形成相对分子质量约为 5.2×10^4 的蛋白酶 A 原(porPrA)^[20]。

蛋白酶 A 原最终在反面高尔基体网络(TGN)被分选运输至液泡,并在到达液泡后被激活,由 54 个氨基酸残基组成的前肽被切除,最后形成相对分子质量约为 4.2×10^4 的活性蛋白酶 A^[1]。TGN 中可溶性蛋白向液泡的定向运输需要分选信号(sorting signal)的导向作用,可溶性蛋白自身携带的分选信号被 TGN 上受体膜蛋白识别并特异性结合,进而生成网格蛋白包被膜泡(转运膜泡)被运送至晚期内体,最终被运送至液泡。Klionsky 等^[1]利用检测融合蛋白酶活力的方法确定了蛋白酶 A 的信号因子和细胞定位。将不同长度的 *PEP4* 基因 N 端序列融合上完整的 *SUC2* 基因(蔗糖酶基因),融合蛋白既能表现出蔗糖酶活力,其定位又受到蛋白酶 A 前肽分选信号的控制,据此可根据胞内外蔗糖酶活力作为蛋白酶 A 细胞定位的标准。当融合蛋白包含 *PEP4* 基因的 N 末端 90、137、404 个氨基酸序列时,只能在细胞内检测到融合蛋白的蔗糖酶活力,进一步研究确定了在 *PEP4* 基因的 N 末端 76 个氨基酸前 22 个氨基酸序列是信号肽,其余 54 个氨基酸残基组成的前肽则包含液泡分选信号^[1]。

Westphal 等^[21]同样利用检测融合蛋白的方法确定了在成熟蛋白酶 A 的基因序列上同样包含有液泡

导向的分选信号因子,尽管导向能力比较弱;该研究还表明了蛋白酶 A 前肽对其表达与成熟有着不可替代的作用。缺乏信号序列,前蛋白酶 A 原无法完成在内质网中的正确折叠而被降解。本研究室^[22]对蛋白酶 A 的前肽序列进行了研究,结果表明 54 个氨基酸的前肽序列缺失,胞内外皆检测不到蛋白酶 A 酶活;表明前肽序列不仅仅含有蛋白酶 A 液泡分选信号,同时对其活性折叠至关重要。

液泡分选信号与信号受体蛋白特异性结合是完成液泡运输的必要条件。蛋白酶 A 液泡分选的信号受体蛋白可能有多种,除了与羧肽酶 Y 共用一种信号受体蛋白 VPS10 外,还发现一种类似哺乳动物 6-P-甘露糖受体-MRL1^[23]。Westphal 等^[21]发现如果敲除 *VPS10* 基因,仍会有 85%的蛋白酶 A 进入液泡。而过表达 *VPS10* 基因则能够抑制由于过表达 *PEP4* 基因而导致的蛋白酶 A 错误分选现象。从另一个反面验证,对于敲除了 *VPS10* 基因的重组菌株,那么少量的过表达 *PEP4* 基因则会导致酵母蛋白酶 A 分选载体的饱和,导致液泡外分泌。然而当 *VPS10* 基因和 *MRL1* 基因双缺失,仍有 20%的蛋白酶 A 被运送至液泡,暗示还存在两者之外的其他液泡分选机制。研究^[21]表明,除了与羧肽酶 Y 共用一种信号受体蛋白 VPS10 外,蛋白酶 A 定向运输到液泡有 2 种蛋白分选途径:Vps10P 依赖途径和非 Vth1P/Vth2p/vps10P 依赖途径。

5 胁迫条件下蛋白酶 A 外泌途径

蛋白酶 A 在以往被认为不从活细胞中释放出来,在培养基中能检测到被认为是因为细胞自溶而被释放出来。然而,1970 年 Maddox 和 Hough^[24]以及 1983 年 Dreyer 等^[25]证实了胞内蛋白水解酶可从活酵母细胞壁泄漏。1986 年, Rothman 等^[26]研究证实,蛋白酶 A 过量表达会使得液泡分选系统过饱和,导致很大一部分蛋白酶 A 被分泌至细胞外部空间。

现在,蛋白酶能从活细胞中泄漏的观点已经被普遍接受。许多研究表明这种现象是由于发酵液中营养缺乏造成的,但是,相对分子质量约为 4.2×10^4 的蛋白酶 A 从细胞壁泄漏的机制到目前为止仍不清楚。

1999 年, Kondo 等^[27]总结了前人的研究成果,推断了在啤酒酿造这种胁迫生长条件下蛋白酶 A 的分泌途径(图 2)。

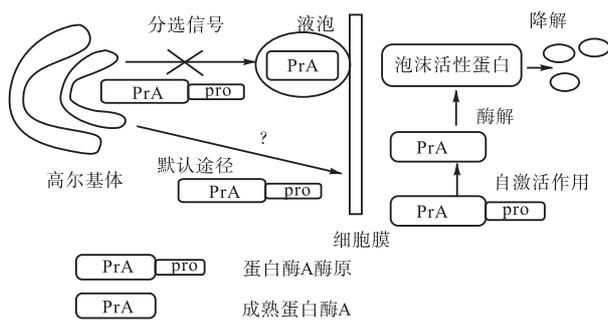


图2 胁迫条件(啤酒酿造)蛋白酶A从活酵母细胞中的分泌示意图

Fig. 2 Excreting of proteinase A from live cells under stress condition (beer brewing)

研究结果指出酵母在胁迫条件下蛋白酶A可能通过默认途径(default pathway)被错误地运输出活细胞,而不是像在正常代谢过程中那样,被准确地从高尔基体运输到液泡.非活性的蛋白酶A前体被分泌到酵母细胞外,并在合适的条件下可能通过自催化加工转变成活性的成熟形式,进而降解发酵液中的泡沫阳性蛋白.如果液泡定位系统过载或不能识别分泌蛋白,这些分泌蛋白则通过非选择性的默认途径——组成型分泌(constitutive secretary)被分泌至胞外.组成型分泌是真核细胞中一种主要的分泌型蛋白和膜蛋白运输方式,一直被认为是区别于调节型分泌(regulated secretary)和液泡运输的一种非选择性膜泡运输方式,无需特定的信号识别模式来引导分泌^[28].以往的研究多集中在编码蛋白酶A的基因(*PEP4*)自身的信号肽或分选信号对其细胞内运输的影响,研究的重心是以液泡为终点的液泡运输途径,而胁迫条件下蛋白酶A细胞内运输和外泌机理研究国内外鲜有报道.

我们推测蛋白酶A的外泌可能是通过胞吐作用实现的.具体来说就是酵母细胞内新合成的蛋白酶A酶原进入内质网后进行修饰、加工、折叠和组装,然后进入高尔基体进行进一步的修饰与加工.成熟态的蛋白酶A先被囊泡裹入形成分泌泡,然后与细胞质膜接触、融合并向外释放被裹入的蛋白,这种分泌过程称之为胞吐作用.在酵母细胞中存在2种胞吐作用方式,即在组成型分泌活动中,胞吐作用是自发进行的,但是在调节型的细胞中,胞吐作用必须有信号的触发^[29-30].

酿酒酵母在胁迫条件下为适应环境变化胞内会生成应激蛋白,但与此同时也会分泌胞外蛋白作为特定信号载体或分泌蛋白酶来应对环境的变化^[31-33].

有报道^[27]表明,酿酒酵母胞内蛋白酶A的含量水平与培养基中的碳源、氮源的水平有关.例如在培养过程中氮源的缺乏会导致蛋白酶A过度表达,甚至分泌到细胞外.在酿酒酵母生长过程中的指数生长期,由于含糖量较高,蛋白酶A的含量水平很低;而在细胞进入稳定期以后,由于含糖量降低,蛋白酶A的含量开始较快地增加^[34].

营养物质缺乏时活细胞也会分泌蛋白酶A, Wolff等^[35]在*PEP4*过量表达的营养缺乏培养基中检测到成熟的相对分子质量约为 4.2×10^4 的蛋白酶A和相对分子质量约为 4.3×10^4 的拟蛋白酶A,后者由蛋白酶A酶原不完全水解而成.

在营养生长条件下,蛋白酶A与另一种蛋白酶(蛋白酶B)负责细胞内40%的蛋白水解反应,而在生孢条件下,这2种蛋白酶负责细胞内80%~90%的蛋白水解反应^[2].很显然,蛋白酶A的细胞内含量水平与培养基营养胁迫条件有关.

酿酒酵母一般胁迫应激反应(GSR)的产生是由氧胁迫、pH胁迫、热胁迫、渗透压胁迫和氮源缺乏等环境压力造成的.研究^[36]显示,酿酒酵母的胁迫应激反应(GSR)会上调200个基因及相关蛋白,以此完成一些细胞功能的改变.

Causton等^[37]利用DNA芯片技术探讨了酿酒酵母在不同培养条件下,如不同温度、溶氧、营养成分、pH和渗透压条件下基因的表达量差异. Marks等^[38]研究葡萄酒酵母在葡萄酒发酵过程中的基因表达,发现一些基因在发酵过程中表达量提高,如发酵胁迫应答相关基因,例如高渗抗性、高乙醇浓度和抗氧化压力等有关.

Alexandre等^[39]研究了在酒精胁迫的条件下不同特性的酵母菌株有关基因表达的差异. PrA外泌作为酵母胁迫应激反应的一种表现,肯定也受到某种细胞信号的调控.信号调控直接体现在通路上相关基因表达量的变化. Rossignol等^[40]利用DNA微阵列技术研究了葡萄酒酵母在复水活化前后过程中相关基因表达谱的变化情况.此研究中将*PEP4*基因作为酵母氮源利用相关基因,并且专门研究了酵母复水活化过程中*PEP4*基因表达情况的变化过程.该学者监控了葡萄酒酵母复水活化过程,论述了酵母自身吸收利用外界氮源与*PEP4*基因表达程度的关系.

对分泌蛋白的研究有助于揭示酿酒酵母胁迫应答机理和胁迫条件下的各种生命活动的分子机制.并且,酿酒酵母在工业发酵生产时会面临各种胁迫

迫环境,蛋白酶A的分泌对相关发酵产品的发酵进程和最终产品质量同样影响重大,揭示酿酒酵母胁迫条件下蛋白酶A的分泌机理对发酵行业具有重要的理论指导意义。

6 蛋白酶A与酒类酿造

酿酒酵母是酒精饮品的发酵菌种,在各种酒类酿造过程的各个阶段,酿酒酵母都面临不同的胁迫环境,蛋白酶A表达水平调节及外泌与否作为胁迫应答的一种表现,自然与各种酒类酿造密不可分。如前所述,对于葡萄酒产品而言,蛋白酶A的外泌有利于提高葡萄酒的澄清度,提高酒体稳定性和感官质量;也可以分解出更多的氨基酸,加速酒体球菌的苹果酸-乳酸发酵进程。在黄酒发酵过程中,蛋白酶A的外泌则可提高产品中氨基酸含量,进一步提高黄酒的营养品质。

由于蛋白酶A是影响啤酒泡沫稳定性的直接因素,因此与蛋白酶A关系最为密切的是啤酒。本文重点介绍近些年来有关蛋白酶A与啤酒泡沫,尤其是纯生啤酒泡沫稳定性关系的研究进展。

Meussdoerffer等^[41]通过在不同条件下对酵母蛋白酶A进行保温然后测定其酶活性发现,pH 5.5条件下45℃保温2h后蛋白酶A仍很稳定,在25℃条件下pH 5~6时保温48h后也很稳定。蛋白酶A对热比较稳定这一特性可能是造成纯生啤酒存放过程中泡沫衰减的一个主要原因。

Kondo等^[42]通过实验室规模和工业化生产大规模啤酒发酵,发现发酵液中的蛋白酶A活力呈现逐渐升高的态势。当发酵液中的营养物质,尤其是氮源不足时,蛋白酶A活力快速升高。Kondo等^[42]还发现蛋白酶A能够从活的酵母细胞中向发酵液中分泌,并非是之前认为的啤酒发酵液中的蛋白酶A全部是来源于死酵母裂解进而释放。比较这14株酵母分泌的蛋白酶A能力发现,不同的酵母菌株产生的蛋白酶A不同,相应的二代、三代或更高代数的酵母产生的蛋白酶A是最初使用酵母的2倍或3倍。说明了酵母菌株活力的高低直接影响细胞外分泌蛋白酶A的量,因为二代、三代或更高代数的酵母活力要明显低于初代酵母,这也是酒类酿造过程中尽量不要选择多次回收的酵母的原因^[42]。

降低啤酒中蛋白酶A的活力主要有2种方法:

一是筛选低蛋白酶A活力突变株,二是添加蛋白酶A抑制剂。

(1) 筛选低蛋白酶A活力突变株

采用诱变方式,筛选低蛋白酶A活力突变株。2007年,珠江啤酒科研中心的王德良等^[43]采用NTG和EMS复合诱变,以酸性血红蛋白为筛选方法筛选得到了1株PrA降幅达20%以上的突变株,且具有良好的泡沫稳定性与发酵性能。2008年,新疆农业大学的傅力等^[44]采用NTG和EMS连续诱变,通过酸变性血红蛋白平板筛选得到1株产PrA活力降低了19.83%的啤酒酵母突变菌株。该菌株发酵性能良好,中试生产的啤酒泡沫更为细腻、持久。2009年,新疆农业大学的陈旭等^[45]采用EMS对啤酒酵母进行化学诱变,利用酸变性血红蛋白平板筛选得到5株低产PrA的菌株。通过发酵实验最后确定了1株在发酵力、双乙酰还原能力和风味物质等综合指标保持了亲株的优良性状且PrA活力最低的突变株。2011年,江南大学的李刚等^[46]分别采用紫外诱变和近年来兴起的N⁺离子束注入诱变试图选育低PrA的啤酒酵母菌株,最后比对了2种诱变手段所获突变株*PEP4*基因的突变位点及效率,发现N⁺离子束注入诱变所获突变株的PrA降幅没有紫外诱变的明显。

利用基因工程手段,筛选低蛋白酶A活力突变株。目前,国内外均有报道使用基因工程手段对编码酵母PrA的*PEP4*基因进行分子改造,以获得PrA活力降低的酵母菌株。江南大学的郝俊光等^[47]将Cre/*LoxP*报告基因挽救系统和PCR介导的基因中断技术相结合,采用缩进式先后成功敲除了酿酒酵母2个*PEP4*等位基因,然后将报告基因*KanMX*剔除,使突变菌株中不含任何外源基因,获得了基因安全性高的PrA缺陷突变株。新疆农业大学的周建中等^[48]采用基因敲除技术获得了1株*PEP4*基因突变的工业酿酒酵母,经初步的酶活测定,该酵母PrA已失活,有效地提高了啤酒的泡持性。浙江大学的王肇悦等^[49]采用PCR介导的基因敲除法,构建了1株PrA缺陷型啤酒酵母菌株,该菌株不再表达PrA,且酒体各项理化指标均达到国家优级啤酒标准。此外,2008年张强等^[50]采用同源重组技术构建了1株PrA低表达且能产β-葡聚糖酶的酿酒酵母菌株,对其遗传稳定性、生长性能、发酵力、凝聚性、热死灭温度等几个重要的生理指标进行了测试,并对发酵液进行了PrA活性、β-葡聚糖酶活性的测定和研究。结果表明重组菌株在低表达PrA的基础上产生了较高活性的β-葡聚

糖酶,且该菌株小试生产所酿造的啤酒酯香突出、苦味较重,啤酒泡持性从 202 s 增加到 274 s,其他各项理化指标均达到国家优级标准.中科院北京微生物研究所的刘喜凤等^[51]自克隆酿酒酵母的糖化酶基因 *GAI*,将其替代 *PEP4* 基因的部分序列,从而达到中断 *PEP4* 基因目的的同时过表达糖化酶基因 *GAI*,得到了 1 株低表达 PrA 高产糖化酶的重组菌株.该重组菌株无 PrA 活性,且糖化酶活力高达 91.69 U/mL,大幅提高了啤酒泡持性与发酵度.相比于之前的研究大多都是敲除 *PEP4* 基因的 1 个等位基因,本实验室^[52]充分考虑出发菌株的特性,利用多重基因中断技术敲除了工业啤酒酵母菌株 *PEP4* 基因的 2 个等位基因,重组菌株蛋白酶 A 活力明显降低,啤酒泡沫稳定性从最初的 212 s 提高到了 244 s.本研究室还构建 *PEP4* 基因前肽缺失同时 *SOD* 基因过表达的重组菌株,结果重组菌株蛋白酶 A 活力下降 20.4%,啤酒泡持性增加 13.8%(结果待发表).

(2) 添加蛋白酶 A 抑制剂

江南大学田亚平等^[53]采用大豆为原料,提取制备了蛋白酶 A 的抑制剂,采用分子筛层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳对粗提取液进行分离和分析,发现抑制剂的主要成分是相对分子质量约为 5×10^3 的蛋白质.在啤酒中添加抑制剂的应用实验中,这种抑制剂对其中的蛋白酶显示出一定的抑制效果.

田亚平等^[54]还采用热水抽提、乙醇分级沉淀等步骤从灵芝发酵全粉中初步筛得 1 种粗蛋白酶 A 抑制剂;进一步采用 superdex-200 和 ACA44 凝胶层析方法对其进行分离和组成分析,发现相对分子质量约为 3.8×10^4 的蛋白质部分有较强抑制效果,一定条件下抑制率可达 71%;应用实验中发现抑制剂的添加能明显提高纯生啤酒的泡沫稳定性.

杨毅等^[55]从灵芝中提取的相对分子质量为 $1.8 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^4$ 的蛋白酶 A 抑制剂 L(多糖和蛋白质复合物),其抑制效果较明显,且对啤酒的非生物稳定性无明显影响,具有广泛应用的价值和前景.

徐春等^[56]从灵芝真菌中分离提取出 1 种可用于抑制纯生啤酒中蛋白酶 A 活性的抑制剂,添加适量的此种抑制剂可使纯生啤酒的泡沫稳定性明显提高.

李泉^[57]以马铃薯汁为原料分离提取出了 1 种蛋白酶 A 抑制剂.这种抑制剂在纯生啤酒中能够对蛋白酶 A 起到较强的抑制作用,有利于提高纯生啤酒的泡沫稳定性.

7 展 望

对于蛋白酶 A 的分泌途径,尤其是胁迫条件下蛋白酶 A 外泌机制,至今仍没有较为清晰的认识.蛋白酶 A 几乎关系到所有酿酒过程,探明其外泌机制,从调控蛋白酶 A 外泌的角度出发来调控酒类酿造过程,可为提升啤酒、葡萄酒等酒类产品品质提供新的可能性.从液泡分选机制入手,通过蛋白互作等蛋白质组学研究手段,或许能够找出胁迫条件下导致 PrA 外泌的根本原因,丰富 PrA 外泌途径细节,为调控蛋白酶 A 外泌找到更多控制靶点.

参考文献:

- [1] Mechler B, Wolf D H. Analysis of proteinase A function in yeast[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1981, 121(1): 47-52.
- [2] Teichert U, Mechler B, Müller H, et al. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(27): 16037-16045.
- [3] Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1992, 119(2): 301-311.
- [4] Hao Xin, Xiao Dongguang, Zhang Cuiying, et al. Influence of nutrients on proteinase A activity in draft beer during fermentation[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(6): 1169-1174.
- [5] Kondo H, Shibano Y, Fukui N, et al. Development of a novel and sensitive method for measurement of proteinase A in beer[C]//*Proceedings of Congress-European Brewery Convention*. Oxford: Oxford University Press, 1995: 669.
- [6] Guilloux-Benatier M, Remize F, Gal L, et al. Effects of yeast proteolytic activity on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 263(2): 183-188.
- [7] Younes B, Cilindre C, Villaume S, et al. Evidence for an extracellular acid proteolytic activity secreted by living cells of *Saccharomyces cerevisiae* PIR1: Impact on grape proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chem-*

- istry, 2011, 59(11): 6239–6246.
- [8] Lenney J F, Matile P, Wiemken A, et al. Activities and cellular localization of yeast proteases and their inhibitors[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1974, 60(4): 1378–1383.
- [9] Pearl L, Blundell T. The active site of aspartic proteinases[J]. FEBS Letters, 1984, 174(1): 96–101.
- [10] Ammerer G, Hunter C P, Rothman J H, et al. *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors[J]. Molecular and Cellular Biology, 1986, 6(7): 2490–2499.
- [11] Klionsky D J, Banta L M, Emr S D. Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase: Proteinase A propeptide contains vacuolar targeting information[J]. Molecular and Cellular Biology, 1988, 8(5): 2105–2116.
- [12] Dreyer T, Halkier B, Svendsen I B, et al. Primary structure of the aspartic proteinase A from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carlsberg Research Communications, 1986, 51(1): 27–41.
- [13] Parr C L, Keates R A, Bryksa B C, et al. The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A[J]. Yeast, 2007, 24(6): 467–480.
- [14] Woolford C A, Daniels L B, Park F J, et al. The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the post-translational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases[J]. Molecular and Cellular Biology, 1986, 6(7): 2500–2510.
- [15] Aguilar C F, Cronin N B, Badasso M, et al. The three-dimensional structure at 2.4 Å resolution of glycosylated proteinase A from the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 267(4): 899–915.
- [16] Jones E W. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(13): 7963–7966.
- [17] van den Hazel H B, Kielland-Brandt M C, Winther J R. Autoactivation of proteinase A initiates activation of yeast vacuolar zymogens[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 207(1): 277–283.
- [18] Beck I, Fink G R, Wolf D H. The intracellular proteinases and their inhibitors in yeast: A mutant with altered regulation of proteinase A inhibitor activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(10): 4821–4828.
- [19] 刘晓杰. 蛋白酶 A 敲除对工业啤酒酵母生理代谢和发酵的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [20] Mechler B, Müller M, Müller H, et al. In vivo biosynthesis of the vacuolar proteinases A and B in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(19): 11203–11206.
- [21] Westphal V, Marcusson E G, Winther J R, et al. Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(20): 11865–11870.
- [22] Wu Deguang, Chen Yefu, Lu Jun, et al. Effect of proteinase A propeptide deletion on its enzyme activity in *Saccharomyces cerevisiae*[C]// International Conference on Applied Biotechnology. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012: 1459–1467.
- [23] Whyte J R C, Munro S. A yeast homolog of the mammalian mannose 6-phosphate receptors contributes to the sorting of vacuolar hydrolases[J]. Current Biology, 2001, 11(13): 1074–1078.
- [24] Maddox I S, Hough J S. Proteolytic enzymes of *Saccharomyces carlsbergensis*[J]. Biochemical Journal, 1970, 117(5): 843–852.
- [25] Dreyer T, Biedermann K, Ottesen M. Yeast proteinase in beer[J]. Carlsberg Research Communications, 1983, 48(3): 249–253.
- [26] Rothman J H, Hunter C P, Valls L A, et al. Overproduction-induced mislocalization of a yeast vacuolar protein allows isolation of its structural gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 83(10): 3248–3252.
- [27] Kondo H, Yomo H, Furukubo S, et al. Advanced method for measuring proteinase A in beer and application to brewing[J]. Journal of the Institute of Brewing, 1999, 105(5): 293–300.
- [28] Brion C, Miller S G, Moore H P. Regulated and constitutive secretion. Differential effects of protein synthesis arrest on transport of glycosaminoglycan chains to the two secretory pathways[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(3): 1477–1483.
- [29] 曲东明, 曲丽萍. 细胞中蛋白质的合成和转运(一)[J]. 生物学杂志, 1999, 16(5): 5–6.
- [30] Battey N H, James N C, Greenland A J, et al. Exocytosis and endocytosis[J]. The Plant Cell Online, 1999, 11(4): 643–659.
- [31] Sanchez Y, Taulien J, Borkovich K A, et al. Hsp104 is

- required for tolerance to many forms of stress[J]. The EMBO Journal, 1992, 11 (6) : 2357-2364.
- [32] 杨静,李成云,王云月,等. 酿酒酵母分泌蛋白组的计算机分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38 (3) : 516-522.
- [33] 郝欣,陈叶福,郭学武,等. 发酵条件对纯生啤酒中酸性蛋白酶分泌的影响[J]. 酿酒科技, 2007 (10) : 46-47.
- [34] Hansen R J, Switzer R L, Hinze H, et al. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 496 (1) : 103-114.
- [35] Wolff A M, Din N, Petersen J G L. Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A[J]. Yeast, 1996, 12 (9) : 823-832.
- [36] Gibson B R, Lawrence S J, Leclaire J P, et al. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31 (5) : 535-569.
- [37] Causton H C, Ren B, Koh S S, et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes[J]. Molecular Biology of the Cell, 2001, 12 (2) : 323-337.
- [38] Marks V D, Ho Sui S J, Erasmus D, et al. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8 (1) : 35-52.
- [39] Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, et al. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 2001, 498 (1) : 98-103.
- [40] Rossignol T, Postaire O, Storai J, et al. Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71 (5) : 699-712.
- [41] Meussdoerffer F, Tortora P, Holzer H. Purification and properties of proteinase A from yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 1980, 255 (24) : 12087-12093.
- [42] Kondo H, Shibano Y, Amachi T, et al. Substrate specificities and kinetic properties of proteinase A from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the development of a novel substrate[J]. Journal of Biochemistry, 1998, 124 (1) : 141-147.
- [43] 王德良,吴小映,李惠萍,等. 采用复合诱变选育低分泌蛋白酶 A 啤酒酵母菌株的研究[J]. 啤酒科技, 2007 (10) : 39-43.
- [44] 傅力,张卓,王德良,等. 低产蛋白酶 A 啤酒酵母的诱变选育及在啤酒中试发酵中应用的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29 (8) : 213-218.
- [45] 陈旭,王德良,俞雅琼,等. 甲基磺酸乙酯(EMS)诱变选育低产蛋白酶 A 啤酒酵母的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25 (4) : 35-37.
- [46] 李刚,李崎,李永仙,等. 低蛋白酶 A 酵母菌株的选育及其基因层面初探[J]. 食品工业科技, 2011, 32 (8) : 202-205.
- [47] Hao Junguang, Dong Jianjun, Speers R A, et al. Construction of a single *PEP4* allele deletion in *Saccharomyces carlsbergensis* and a preliminary evaluation of its brewing performance[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2008, 114 (4) : 322-328.
- [48] 周建中,王德良,王忠民,等. 采用基因敲除手段降低啤酒酵母蛋白酶 A 表达的研究[J]. 酿酒, 2006, 33 (1) : 62-64.
- [49] Wang Zhaoyue, He Guoqing, Ruan Hui, et al. Construction of proteinase A deficient transformant of industrial brewing yeast[J]. European Food Research and Technology, 2007, 225 (5/6) : 831-835.
- [50] Zhang Qiang, Chen Qihe, Fu Mingliang, et al. Construction of recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with *bglS* gene insertion into *PEP4* locus by homologous recombination[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9 (7) : 527-535.
- [51] Liu X F, Wang Z Y, Wang J J, et al. Expression of *GAI* gene and disruption of *PEP4* gene in an industrial brewer's yeast strain[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49 (1) : 117-123.
- [52] Lu Jun, Dong Jian, Wu Deguang, et al. Construction of recombinant industrial brewer's yeast with lower diacetyl production and proteinase A activity[J]. European Food Research and Technology, 2012, 235 (5) : 951-961.
- [53] 田亚平,王宇,周楠迪,等. 大豆蛋白酶 A 抑制剂的提取和性质初探[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29 (1) : 27-31.
- [54] 田亚平,李屹松. 灵芝发酵全粉中蛋白酶 A 抑制剂的提取及应用初探[J]. 酿酒, 2003, 30 (6) : 90-92.
- [55] 杨毅,田亚平,顾国贤. 纯生啤酒蛋白酶 A 抑制剂的应用研究[J]. 啤酒科技, 2004 (11) : 14-16.
- [56] 徐春,黄亚东. 蛋白酶抑制剂对纯生啤酒泡沫稳定性影响[J]. 江苏调味副食品, 2005, 22 (3) : 5-6.
- [57] 李泉. 马铃薯蛋白酶 A 抑制剂的研究[D]. 无锡:江南大学, 2008.