

酿酒酵母氮代谢物阻遏效应及其对发酵食品安全的影响*

张伟平¹ 赵鑫锐¹ 堵国成¹ 邹慧君³ 傅建伟³ 周景文^{1**} 陈坚^{1,2}

(¹江南大学生物工程学院 无锡 214122)

(²江南大学食品科学技术国家重点实验室 无锡 214122)

(³浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司 绍兴 312000)

摘要 综述了国内外发酵食品中氨(胺)类代谢物的研究进展,包括氨基甲酸乙酯的5种形成机制、生物胺和亚硝酸胺的形成机制,阐述了上述生物危害物形成的本质原因——发酵微生物的氮代谢阻遏效应;重点介绍了酿酒酵母胞内5大调控因子(Gln3p、Ure2p、Gat1p、Dal80p和Gzf3p)对其氮源利用的全局调控作用.并以精氨酸和尿素代谢为例,详细介绍了氮代谢阻遏效应的作用机理.酿酒酵母氮代谢物阻遏效应的研究成果,可为解决由于相关含氮有害代谢物积累导致的普遍存在于发酵中的食品安全问题提供理论依据和技术支撑.图5 表1 参52

关键词 发酵食品;氨基甲酸乙酯;生物胺;亚硝酸胺;氮代谢物阻遏效应;食品安全

CLC TS201.3 : TS201.6

Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on Safety of Fermented Foods*

ZHANG Weiping¹, ZHAO Xinrui¹, DU Guocheng¹, ZOU Huijun³,
FU Jianwei³, ZHOU Jingwen^{1**} & CHEN Jian^{1,2}

(¹School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(³Zhejiang Guyuelongshan Shaoxing Wine Company, Shaoxing 312000, Zhejiang, China)

Abstract Nowadays, people pay more attention to the food safety, and have been seriously concerned about the harmful compounds in traditional Chinese fermented foods. In this review, three types of harmful ammonia (amine) compounds in Chinese and other countries' fermented foods, including ethyl carbamate (EC), biogenic amines and nitrosamines, as well as their formation mechanism, are discussed. Meanwhile, nitrogen catabolite repression (NCR), the essential reason to the formation of these harmful concentrations is expounded. This paper focus on how to achieve the regulation of nitrogen metabolism by five key regulatory genes, *GLN3*, *URE2*, *GAT1*, *DAL80* and *GZF3*, in *Saccharomyces cerevisiae*. And their effects on the metabolism of arginine and urea are also discussed. The achievement of study on NCR in *Saccharomyces cerevisiae* will provide theory base and technical support to solve the common security issue in traditional Chinese fermented foods caused by the accumulation of harmful nitrogenous metabolites relevant to NCR. Fig 5, Tab 1, Ref 52

Keywords fermented food; ethyl carbamate; biogenic amines; nitrosamines; nitrogen catabolite repression; food safety

CLC TS201.3 : TS201.6

发酵食品在我国有着悠久的历史,是我国食品行业的特色产业之一.其中,已经形成较大规模的产品有:白酒、黄酒、酱油、食醋、豆豉、乳腐和泡菜等.近年来,随着人们对传统发酵食品营养价值认可度的不断提高,传统发酵食品行

业每年以20%的速度递增.据统计,2010年,国内传统发酵食品行业产值占整个食品工业产值约1/6,总产值超8 000亿.但伴随着传统发酵行业的飞速发展,与之相关的安全问题日益凸显.这些不良因素正严重危害着国人的生命健康,同时也使得相关产品在对外贸易时遭遇阻碍,甚至影响到了我国的国际形象.因此,加大对传统发酵食品安全方面重大科学问题研究的投入极其必要、刻不容缓.影响我国传统发酵食品安全最为重要的因素,是各种由于发酵过程中含氮化合物的不完全代谢而生成的胺(氨)类物质,如氨基甲酸乙酯、亚

收稿日期: 2011-10-20 接受日期: 2011-12-12

*国家自然科学基金项目(No. 31130043)、“973”项目(2012CB720802)

资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China

(No. 31130043) and “973” Program of China (No. 2012CB720802)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhoujw1982@jiangnan.edu.cn)

硝胺类和生物胺类等。其中氨基甲酸乙酯具有一定的神经毒性、强烈的肺毒性和较强的致癌性^[1],亚硝胺类和生物胺类会刺激神经、血管,也有较强的致癌性^[2]。长期摄入微量的胺(氨)类物质也会显著增加各种癌症的发病率。胺(氨)类物质的存在,严重影响了我国传统发酵食品的安全性,限制了我国传统发酵食品的出口贸易和食品文化影响力。最为重要的是,我国传统发酵食品中存在的多种生物危害物质与传统的原料、生产工艺以及微生物生理特性密切相关,是我国特有的食品安全问题,必须通过我国科研人员的自主研究才能得到妥善解决。

1 传统发酵食品氨(胺)类代谢物的形成

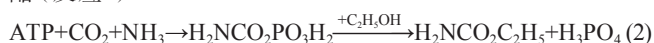
1.1 氨基甲酸乙酯的形成机理

目前在发酵类食品中研究发现的氨基甲酸乙酯的形成途径主要有5种,分别是:1)由焦炭酸二乙酯和氨反应生成,2)由氨甲酰磷酸和乙醇反应生成,3)由瓜氨酸和乙醇反应生成,4)由尿素和乙醇反应生成,以及5)由氰酸和乙醇反应生成。

1.1.1 由焦炭酸二乙酯和氨反应形成氨基甲酸乙酯 早在上世纪60年代,焦炭酸二乙酯由于能有效杀死葡萄酒中的酵母、细菌而被广泛应用。到1962年,Thoukis等发现了葡萄酒中存在焦炭酸二乙酯与氨的反应,最终可以形成有致癌作用的氨基甲酸乙酯(反应1)。由此,焦炭酸二乙酯不再允许在葡萄酒生产中应用。



1.1.2 由氨甲酰磷酸和乙醇反应生成 Ough等在1976年首先证实了由氨甲酰磷酸和乙醇可以反应形成氨基甲酸乙酯。酵母中的ATP、CO₂和氨在氨甲酰磷酸合成酶的作用下生成氨甲酰磷酸盐,随后氨甲酰磷酸盐与乙醇反应生成氨基甲酸乙酯(反应2)。



通过氨甲酰磷酸与不同浓度的乙醇反应发现,氨基甲酸乙酯的生成量基本上与乙醇的浓度成正比。但随着研究的不断深入,发现葡萄酒和黄酒中的氨基甲酸乙酯的形成并不主要依靠上述途径。

1.1.3 由瓜氨酸和乙醇反应生成 有研究者发现,在葡萄酒酿造过程中,通过向新鲜的葡萄汁中添加乙醇,经过70℃加热48 h后会有氨基甲酸乙酯产生,且这种氨基甲酸乙酯的产生与新鲜葡萄汁中是否有酸性脲酶无关。这一现象表明在新鲜葡萄汁中很可能存在形成氨基甲酸乙酯的前体物质。经过深入研究发现,由于瓜氨酸能与乙醇直接自发反应生成氨基甲酸乙酯,且在葡萄汁中均含有一定量的瓜氨酸,所以有研究者认为瓜氨酸就是形成氨基甲酸乙酯的前体物质。但也有研究表明,葡萄酒中氨基甲酸乙酯的生成量和瓜氨酸含量并不

具有线性关系,所以这一方面还有待进一步研究。

1.1.4 由尿素和乙醇反应生成 氨甲酰化合物主要有尿素、瓜氨酸、氨甲酰磷酸、氨甲酸、天冬氨酸和尿腺素等。其中尿素一直作为酵母的氮源而添加到酵母发酵的生产中,如黄酒、葡萄酒等酒类的酿造。研究表明,在黄酒酿造中,氨基甲酸乙酯主要来源于尿素与乙醇的反应(反应3)。



在黄酒和葡萄酒的酿造过程中,尿素的来源主要有两种:一是在发酵前作为氮源添加入发酵液中;二是酵母吸收氮源时降解精氨酸生成。当酵母胞内尿素含量过高来不及吸收利用时,会有一部分尿素被转运至胞外。分泌到细胞外的尿素和发酵前添加的尿素都有可能和发酵液中的乙醇反应生成氨基甲酸乙酯(图1)。

有研究者就精氨酸、瓜氨酸、氨、尿素和谷氨酸在葡萄酒发酵过程中对氨基甲酸乙酯形成的影响进行了研究,结果发现,氨基甲酸乙酯的主要来源是由精氨酸分解产生的尿素,由尿素形成的氨基甲酸乙酯远多于由氨甲酰磷酸和其他途径形成的氨基甲酸乙酯,因此形成氨基甲酸乙酯的主要前体物质是尿素^[3]。

通过对我国传统黄酒发酵过程工艺的研究,发现其中的氨基甲酸乙酯同样主要来自于尿素,而其中尿素主要是由其发酵原料带入。研究表明,黄酒中的尿素约有50%来自于原料,而由原料引入的尿素中约50%来自生曲。另外,通过对黄酒生产各过程的检测发现,黄酒中的氨基甲酸乙酯主要产生在黄酒的贮存阶段,分析原因可能是由于,在此阶段酒液中的酵母细胞裂解释放出胞内尿素,进一步使酒液中尿素含量上升,而贮酒过程普遍比较长,使得酒液中游离的尿素和乙醇能够充分的接触反应,由此产生大量的氨基甲酸乙酯。

1.1.5 由氰酸和乙醇反应生成 有研究表明,在蒸馏酒如白兰地中,在蒸馏的过程中,高温会使一部分尿素受热分解生成氰酸^[4],随后生成的氰酸会和酒精反应生成氨基甲酸乙酯(反应4)。



另外也有研究显示,在发酵过程中,存在于植物中的氰化物(或氰)也会产于氨基甲酸乙酯的生成反应^[3]。

1.2 生物胺的形成机理

生物胺是一类低分子量的含氮有机化合物的总称^[1],根据胺基数目可以分为单胺和多胺。根据碳链结构又可以分为脂肪族生物胺、芳香族生物胺和杂环类生物胺。脂肪族生物胺主要有:腐胺、尸胺、精胺和亚精胺等;芳香族生物胺有:酪胺和苯乙胺等;杂环类生物胺包括组胺和色胺等^[2]。生物胺是生物有机体内的正常活性成分,在机体内起着重要的生理作用,如可作为荷尔蒙、核酸、蛋白质等的合成前体。但摄入过量的生物胺会导致食源性中毒,造成腹部痉挛、呕吐和

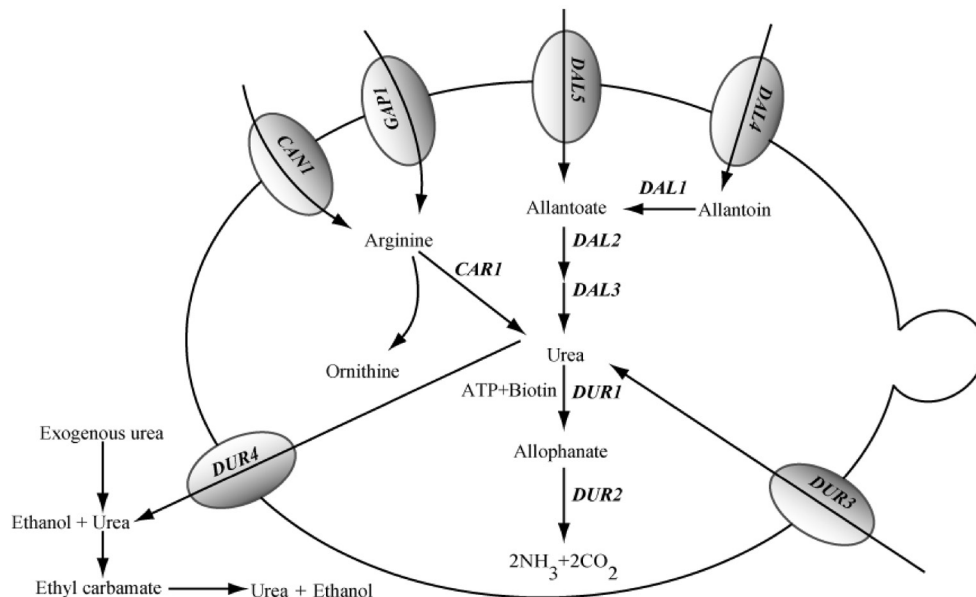


图1 酵母由尿素和乙醇反应生成氨基甲酸乙酯示意图

Fig. 1 The generation of EC from arginine and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*

腹泻等症状^[5]。

发酵食品中生物胺主要由发酵过程中某些微生物对发酵培养基中氨基酸进行的脱羧基作用产生^[6],或是醛和酮通过氨基化和转胺作用产生^[7]。

通过微生物产生生物胺需要具备3个基本条件:1)有足够的游离氨基酸;2)具有相应氨基酸脱羧酶活性的微生物;3)具有合适微生物生长和氨基酸脱羧酶合成的环境条件^[8]。

1.3 亚硝酸盐的形成机制

亚硝酸盐类物质主要存在于腌制的蔬菜食品如泡菜中。中国是世界上氮肥使用量最多、增长最快的少数几个国家之一^[9]。随着菜农大量施用化肥,加上一些用于腌制的蔬菜如大白菜,具有富集硝酸盐的特性,导致在用于腌制和发酵的蔬菜原料中含有大量的硝酸盐和其他含氮化合物。最后使得腌制和贮藏过程中,在一些杂菌和硝酸还原酶的作用下,这些含氮化合物被转化为亚硝酸盐而存在于用于食用的泡菜商品中^[10]。另外,在肉制品中,往往会添加亚硝酸盐以使肉制品保持较好的色、香和独特的风味,但同时也给食用者健康带来威胁。

综上所述不难发现,导致传统发酵食品中氨基甲酸乙酯、生物胺和亚硝胺等生物危害物积累的根本原因是:发酵过程中,微生物对含氮化合物不充分利用导致的各种危害物前体在发酵中过量积累。目前,关于这些前体物质过量积累的本质原因还不甚清楚,但随着相关研究的不断深入,越来越多的研究结果证实,微生物对氮源的利用可能受到某种全局调控机制的调控,而这种对氮源利用的全局调控机制,很可能就是导致微生物对氮源的不充分利用、最终产生氨

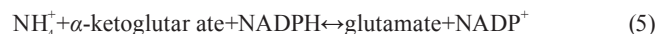
(胺)类生物危害物的根本原因。下面以酿酒酵母为例,介绍微生物对氮源的利用和调控情况。

2 酵母氮源利用的全局调控机制

2.1 酿酒酵母的氮代谢途径

酿酒酵母能够利用多种含氮化合物,例如各种氨基酸、尿素和 γ -氨基丁酸(GABA)等。它们可以被一种高效率、低特异性的通用氨基酸透性酶转运进入细胞,也可以被各种含氮化合物对应的高特异性、低效率的专一透性酶转运进入细胞。进入细胞之后,这些含氮化合物既可以直接进入蛋白质的合成途径,也可以降解成谷氨酸或是氨,再从头进入生物合成途径(图2)。

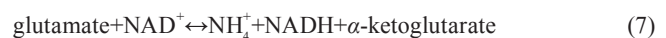
酿酒酵母可同化氮源(YAN)包括铵盐和含 α -氨基氮的氨基酸(脯氨酸除外,它在有氧发酵时不能作为酵母的氮源)。酿酒酵母对氮的吸收分两步:首先通过特定的透性酶吸收有效的氮源;其次降解氮源参与氮代谢途径。其主要的氮同化作用途径如下:



反应(5)由NADP相关的谷氨酸脱氢酶(NADP-GDH)催化发生,NADP-GDH由GDH1和GDH3两个基因编码。



反应(6)由谷氨酰胺合成酶(GS)催化发生,GS由GLN1编码。



反应(7)由依赖于NAD的谷氨酸脱氢酶(NAD-GDH)催化发生,NAD-GDH由GDH2编码。



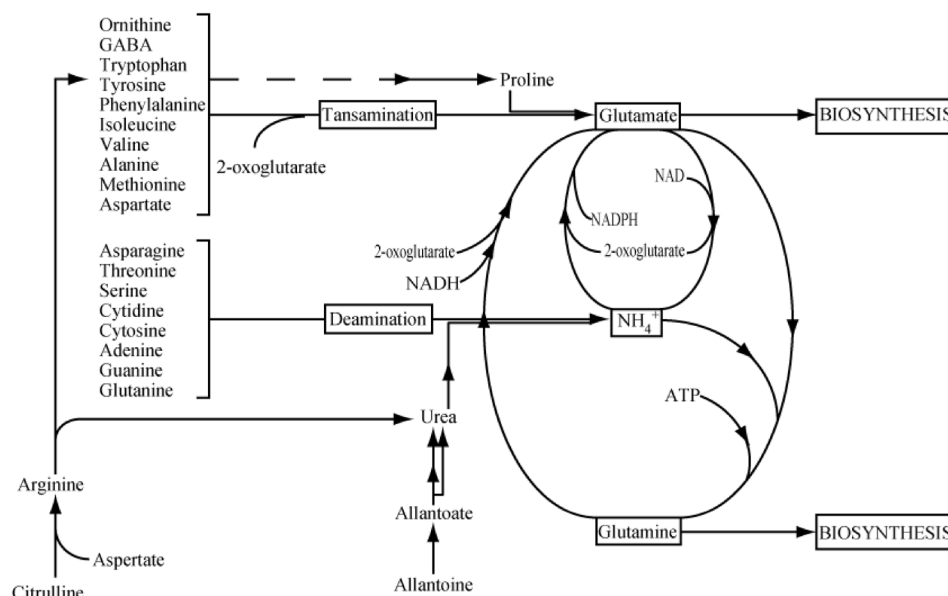


图2 酿酒酵母细胞内氮源的吸收与作用途径

Fig. 2 Outline of amino acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

反应(8)由谷氨酸合成酶(GOGAT)催化发生, GOGAT由GLT1编码。

2.1.1 酿酒酵母以铵盐为唯一氮源的代谢路径 反应(6)对于酿酒酵母利用铵盐是至关重要的。失去GS合成能力的细胞只能在谷氨酰胺为氮源的培养基上生长。反应(5)对于细胞在铵盐培养基上的生长影响不大, 因为代谢生成的GDH2在铵盐浓度提高时会被很好地抑制。而另一种谷氨酸脱氢酶基因GDH3能够利用 NH_4^+ 和 α -酮戊二酸合成谷氨酸。此外, 研究还发现在铵盐为氮源的培养基上, GDH1的突变能使细胞质中谷氨酸的浓度下降15倍。研究发现, 通过反应(6)和(8)协作, 能够生成不依赖于反应(5)的谷氨酸。但在细胞的生长速度上, GDH1的突变株只有野生菌株的一半。已经有3种特异性的铵盐透性酶被发现, 它们分别由MEP1、MEP2和MEP3 3个基因编码^[11]。它们能以不同的转运量和偏好性将铵盐转运入细胞, 从而实现在环境中铵盐充足时能对铵盐快速利用, 而缺少铵盐时能缓慢但依旧持续的利用。

2.1.2 酿酒酵母以谷氨酰胺为唯一氮源的代谢路径 当谷氨酰胺作为酿酒酵母的唯一氮源时, 细胞会将谷氨酰胺通过GS催化的反应(6)转化为谷氨酸。另外, 谷氨酸通过氧化脱氨基作用还能产生铵盐。在酿酒酵母中, 谷氨酰胺是由GNP1编码的谷氨酰胺透性酶转运进入细胞。

2.1.3 酿酒酵母以谷氨酸为唯一氮源的代谢路径 在酿酒酵母以谷氨酸为唯一氮源进行生长时, 谷氨酸首先由二羧酸透性酶转运入细胞。酵母对谷氨酸的利用优先性不如谷氨酰胺和铵盐, 可能是由于酵母对谷氨酸的转运效率不如另外两个。通过反应(7)能够将谷氨酸转化为铵盐, 通过反应(6)能够合

成谷氨酰胺。研究发现, GDH2的突变菌株其生长速度只有野生菌的20%。这种限制生长的现象可能是由于谷氨酸和丙酮酸之间发生转氨基作用生成了丙氨酸。在培养基中添加丙氨酸能使菌体的生长速率恢复到野生菌的水平, 这个现象证明了上述观点。

从以上论述可以发现, 任何能被转运如细胞, 并能够被代谢得到谷氨酸或铵盐类物质的含氮化合物都能作为酵母的唯一氮源。

2.2 酿酒酵母对氮源利用的全局调控机制

当培养基中同时存在多种氮源时, 酿酒酵母会优先利用丰富型氮源如谷氨酰胺、铵盐、谷氨酸、天冬酰胺等。只有在培养基中缺少上述丰富型氮源、或在丰富型氮源已被完全利用的情况下, 酿酒酵母才会开始利用精氨酸、尿素、尿囊素、GABA和脯氨酸等贫乏型氮源^[12]。这种由缺失丰富型氮源而引起的氮源对贫乏型氮源的转录水平上的去阻遏现象就称之为氮代谢阻遏效应(Nitrogen catabolite repression, NCR)。研究发现酿酒酵母对几种氮源利用的先后顺序为天冬氨酸/谷氨酰胺>铵盐>谷氨酸>尿素>GABA>脯氨酸^[13]。在酿酒酵母中, NCR相关基因的表达受4个GATA家族调控因子——GLN3、GZF3、GAT1、DAL80和一个调控蛋白——Ure2p的全局调控^[14]。其中GLN3和GAT1是阳性转录因子, GZF3和DAL80是阴性转录因子。另外GZF3、GAT1和DAL80不仅能调控NCR相关基因的表达, 也能调控彼此的表达^[15](图3和表1)。GZF3和GAT1主要在NCR状态下发挥作用, 而GLN3和DAL80主要在去阻遏的情况下发挥作用^[13]。上述4个转录调控因子主要通过与其相应NCR基因启动子区域保守的5'-GATAA-3'序列的相互作用来发挥调控作用。但GATAA两边的序列也能对NCR基

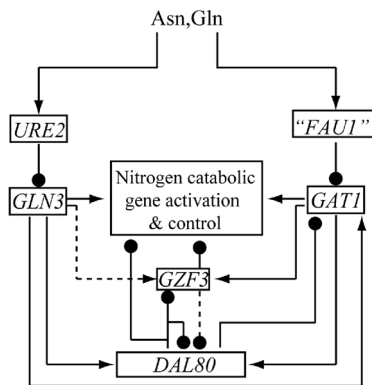


图3 4个GATA因子间的相互调控关系简图

Fig. 3 Outline of regulation of the four GATA-factors each other. Arrowheads indicate activation and round spots indicate repression. Broken lines indicate partly activation or repression. The same below

表1 在阻遏和去阻遏情况下, Ure2p、Gln3p、Gat1p、Gzf3p对调控基因GLN3、GAT1、DAL80和GZF3表达的影响

Table 1 Overview of the regulatory proteins Ure2p, Gln3p, Gat1p, Dal80p, Gzf3p regulating gene expression of GLN3, GAT1, DAL80, and GZF3

Repressing medium acting proteins on	Ure2p	Gln3p	Gat1p	Dal80p	Gzf3p
GLN3	+				
GAT1	(+)	+	+	-	+
DAL80	+	-	-	-	(+)
GZF3	(+)	(+)/-	(+)/-	-	(+)
Depressing medium acting proteins on	Gln3p	Gat1p	Dal80p	Gzf3p	
GLN3				+	
GAT1	(+)	-	(+)		
DAL80	+	+	(+)	-	
GZF3	(-)	+	(+)	-	

+, (+), (-)和-分别表示基因转录对某个调控蛋白的依赖程度, (+/-)表示有相反的研究报道

+, (+), (-), and - indicate how dependent the transcription is on a certain factor, (+/-) indicates contradicting reports.

因表达起到调控作用, 但相对于GATAA序列, 其作用情况要复杂得多^[13].

而调控蛋白Ure2p主要是通过上述4个GATA因子的结合来阻碍它们对NCR相关基因的调控, 从而间接地调控NCR相关基因的表达.

2.2.1 GLN3 GLN3是第一个被克隆和测序出来的氮代谢基因的阳性调控因子. 它由730个氨基酸构成, 并且在(306~330)区域上有一个锌指结构. 虽然Gln3p整体来说是偏碱性的, 但是它起始的140个氨基酸是较为酸性的, 静电荷为-20. GLN3可以结合到DNA的5'GAT^A/T₁A3'序列上, 这些序列称之为上游激活序列(UAS_{NTR}). 其中, NTR是nitrogen regulation的简写. 研究发现, 两个位置相对靠近的UAS_{NTR}序列是高转录激活的必要条件. 一种辅助序列——TTG^T/G对GLN3实现对

GAP1、GLN1和GDH2三者的激活转录有重要作用^[16~17]. 敲除分析显示, 在Gln3p蛋白序列中, 有一段13个氨基酸残基组成的QQNGEIAQLWDFN序列, 它能够形成一个 α -螺旋结构, 由此来进行对相关基因的转录调控^[18].

GLN3在丰富型培养基中被抑制. 谷氨酰胺信号能够激活URE2, 随后URE2的表达产物Ure2p能结合到Gln3p上使其留在细胞质中, 不能激活相关调控基因的表达^[15]. 这种对GLN3的抑制作用主要发生在培养基中有铵盐、谷氨酰胺和天冬氨酸存在的情况下, 而不在谷氨酸存在时发生. 这主要是由于铵盐和天冬氨酸可以很直接地生成大量的谷氨酰胺, 从而起到抑制作用. 而当谷氨酸作为唯一氮源时, 谷氨酸转化为谷氨酰胺效率太低, 无法使谷氨酰胺的浓度达到抑制所需的浓度, 以至于不能激活Ure2p. 如表2所示, 在去阻遏的培养基中, Gzf3p研究显示能抑制GLN3的转录, 然而Gln3p、Gat1p和Dal80p对GLN3转录的影响还没有研究清楚. 在阻遏性培养基上, Gln3p能够激活GAT1的转录, 在一定程度上也能激活GZF3, 但不会激活DAL80. 在去阻遏培养基上, Gln3p能够激活DAL80, 一定程度上也能激活GAT1, 但不会激活GZF3.

2.2.2 URE2 URE2位于酿酒酵母第14号染色体上, 它编码了354个氨基酸构成的蛋白. Ure2p可以通过转录前修饰将Gln3p修饰为无功能的Gln3p. Ure2p不是唯一的对GLN3和GAT1表达起抑制作用的调控因子, 因为在URE2突变的菌株中发现了Gln3p和Gat1p下调NCR相关基因表达的现象^[19~21]. 敲除实验发现, URE2所编码蛋白的N端65个氨基酸能使Ure2p转变成一种朊病毒Ure3p^[22~23]. 除了N端65个氨基酸, Ure2p剩下的部分还能行使正常的功能. Ure3p能够感染Ure2p, 使Ure2p转变成Ure3p, 效果和对Ure2p进行突变一样. 呈现Ure3阳性的细胞表现出对NCR的不敏感性. 子代会通过有丝分裂和减数分裂遗传亲代的这种感染性. 这一现象在1971年首先由R.B.Wickner发现, 同时他还发现了Ure3p的一种不依赖染色体的遗传现象^[24].

2.2.3 GAT1 GAT1是酿酒酵母氮代谢途径中相关基因的第二激活因子. 和GLN3相似, GAT1编码产物也含有一个锌指结构, 这使它能够有效地结合到DNA上. 和GLN3被谷氨酰胺抑制不同, GAT1在谷氨酸浓度高的时候会被抑制, 而在铵盐培养基上会被激活^[25]. GAT1位于酿酒酵母的六号染色体上, 其编码的蛋白由510个氨基酸组成, 且和Gln3p有较高的同源性^[9]. Gat1p有一个由160个氨基酸残基构成酸性很强的区域, 这是转录激活结构的一个特征区域. GAT1的发现是源于对GAP1(通用透性酶基因)、CAN1(精氨酸透性酶基因)和DAL5(尿囊酸透性酶基因)表达情况的观察. 观察发现, 在去阻遏的培养基上, 以上三者在GLN3、URE2和DAL80三重突变菌株中的表达没有被阻断, 其表达仍表现为NCR

敏感的^[20]。在*GAP1*启动子序列,至少要含有一个UAS_{NTR}—5'GATAA3'和一个5'TTG^G/T序列,来保证能被*GLN3*和*GAT1*激活转录。*GLN3*和*GAT1*都能识别一种拥有7个GATAA重复序列的区域^[25]。两个相邻但有间隔的GATAA序列比两个相连的GATAA序列能更好地让*GAT1*激活基因的表达。这种现象说明,在Gln3p和Gat1p形成二聚体的时候,可能对转录的激活更加有效。另外,在上游激活序列中含有GATTAGATTA时,*GAT1*不能起到激活基因表达的作用。这是*GLN3*和*GAT1*最显著的区别^[25]。无论是在阻遏性,还是去阻遏性培养基上,*GAT1*能激活转录抑制因子*GZF3*的转录。另外,在去阻遏的培养基上,*GAT1*能激活*DAL80*的转录。但在阻遏性培养基上,*DAL80*的转录会被其阻遏,并维持在一个很低的水平。在脯氨酸培养基上,敲除*GLN3*、*DAL80*和*URE2*不能阻止*GAT1*的转录。在谷氨酰胺培养基上,*GAT1*会出现不由*URE2*介导的表达抑制现象。这表明在谷氨酰胺培养基上生长时,可能存在一种*GAT1*的抑制因子,抑制*GAT1*的活性,就像*URE2*抑制*GLN3*的活性一样^[19, 25]。在谷氨酰胺培养基上,*GZF3*能够通过和*GAT1*竞争表达来抑制*GAT1*的表达^[26]。在贫乏型氮源上,*GAT1*的表达是不依赖Gat1p的,而在丰富型氮源上生长时,*GAT1*的表达依赖于Gat1p^[25, 27]。

2.2.4 DAL80 *DAL80*基因大小为870 bp,编码了一个269个氨基酸长度的蛋白质。从第21个氨基酸残基到第80个之间的氨基酸可以形成一个锌指结构。这个锌指结构和Gln3p中的同源。在(225~253)区域内,能形成一个明显的二聚体,这可能是形成超螺旋的基础。另外,在(176~179)和(192~195)两个区域内,还有两个明显的天冬酰胺的糖基化位点。在Dal80p的C末端有一段被亮氨酸残基有规律的隔开的氨基酸序列(L-X₆-L-X₆-Y-X₆-L-X₆-L),这段序列可能可以形成某种超螺旋结构,例如亮氨酸拉锁。普通的亮氨酸拉锁结构前面都有一个碱性区域,并且能够结合到DNA上。但是,Dal80p的这个可能的亮氨酸拉锁结构的前面却有许多酸性氨基酸,并且和*DAL82*激活因子的C末端相似^[28]。另外,敲除锌指结构会使*DAL80*失去活性。*DAL80*的表达对NCR敏感,在它的启动子区域有若干个5'GATAA3'序列。另外还发现有4个5'CACCC3'或5'CCACC3'序列存在,这些序列和GATA序列临近^[28]。和*GLN3*一样,*DAL80*也能和DNA的5'GATAA3'序列结合,当Dal80p和DNA上的5'GATAA3'序列结合时,它们称之为URS_{GATA};当它们和Gln3p结合时,它们就称之为UAS_{NTR}。Dal80p也能结合到其自身启动子区域的URS_{GATA}位点上^[27-29]。Dal80p作为一种阻遏蛋白,能够通过和基因启动子区域的URS_{GATA}结合来阻遏众多氮代谢途径中基因的表达^[30](图4)。一些基因中的URS_{GATA},例如*DAL3*和*UGA4*,是由两个相隔大于15 bp的、含有GATAA的序列构成的。如果5'GATAA3'能够尾尾相连或者首尾相连的排列,那么Dal80p能与URS_{GATA}进行最强的结

合^[29]。*DAL80*的表达是Gln3p依赖性的,而且在脯氨酸培养基上,Dal80p能够抑制*DAL80*自身的表达。在阻遏性培养基上,*DAL80*不影响*GLN3*、*GAT1*和*GZF3*的表达,但在去阻遏的培养基上却是有影响的^[27]。

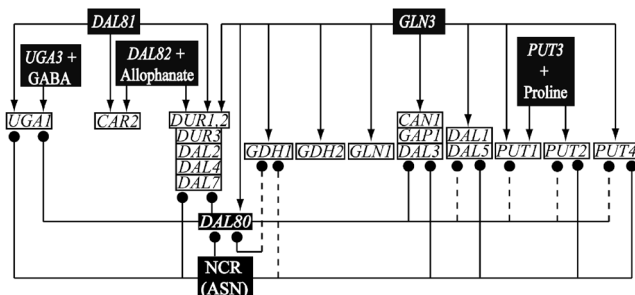


图4 Gln3p和Dal80p对氮代谢中相关基因表达的调控关系图^[13]

Fig. 4 Summary of Gln3 and Dal 80 regulating nitrogen catabolite gene expression^[13]

图中还给出了NCR对相关基因表达的作用情况

The effect of NCR is also indicated

2.2.5 GZF3 *GZF3*是最晚被发现的、在丰富型培养基中能对氮代谢相关基因的表达起抑制作用的转录调控因子^[26-27, 31]。Gzf3p和Dal80p具有高度的同源性:在Gzf3p的C末端也有标志性的亮氨酸拉锁结构。此外,它还具有和Gln3p、Gat1p、Dal80p和其他GATA因子同源的锌指结构。Gzf3p和Dal80p都缺少像Gln3p和Gat1p中那种与转录激活相关的酸性结构域,*GZF3*的启动子区域内共含有GATA序列或其自身的保守序列(TATC)11个。

研究表明,*GZF3*的表达是依赖于Gln3p和Gat1p的,因为在*GLN3*和*GAT1*双突变的细胞中,*GZF3*的表达水平很低。但是,如果仅仅敲除*GLN3*,对*GZF3*的表达没有影响,而单敲除*GAT1*却能使*GZF3*的表达量抑制的比双突变时更低^[27]。通过表达一个报告质粒*GZF3-lacZ*发现,在双突变的情况下,不论是在阻遏型培养基还是在去阻遏的培养基上,gln3p和gat1p都不能激活*GZF3*的表达。但有相反的研究结论报道,Soussi-Boudekou等在研究时发现,在脯氨酸培养基上,单独敲除*GAT1*对*GZF3*的表达没有影响;但在铵盐培养基上能够使其表达量提高25%;另外,还发现不论在阻遏还是去阻遏的培养基上,*GLN3*的敲除都能使*GZF3*的表达量提高25%^[31]。由此可见,*GZF3*的表达与*GLN3*和*GAT1*之间的关系是很复杂,还有待进一步研究。但也有研究者对在阻遏型培养基上,通过敲除*GLN3*和*GAT1*能够提高*GZF3*表达量的现象提出了假设性的解释:在只有Gln3p或Gat1p时,它们自身能够形成具有更高转录激活性能的二聚物来激活表达^[31]。在阻遏型培养基上,Gzf3p能够抑制其自身的表达。Dal80p在阻遏型培养基上抑制*GZF3*的表达,而Gzf3p在去阻遏的培养基上抑制*DAL80*的表达。和*GAT1*一样,*GZF3*在去阻遏型培养基上的表达量相

对于在阻遏型培养基上要低得多^[19]。Gzf3p能够通过和Gat1p竞争相同的结合位点, 阻抑Gat1p的功能, 除非是在没有谷氨酰胺和谷氨酸的培养基上, Gat1p能够转变成一种活性更高的形式存在^[25]。

综上所述, *GLN3*、*GAT1*、*DAL80*和*GZF3*这4个转录调控因子能够相互之间影响表达。总的来说, Dal80p和Gzf3p主要是通过和Gln3p和Gat1p竞争GATAA结合位点来阻遏相关基因的转录的。所有的调控因子在阻遏和去阻遏的培养基中都存在, 只是相对量不同, 尤其是在完全去阻遏的(谷氨酰胺)和完全阻遏的(脯氨酸)培养基上表现得更加明显。

研究这4个GATAA因子最主要的原因在于, 它们能对酿酒酵母利用氮源进行全局性的调控。有研究表明, 它们对于酿酒酵母进行的基于氮源的氮调控效应, 约影响到酿酒酵母10%基因的表达^[32], 其中包括编码负责催化各种代谢反应的酶的基因, 还包括编码第一步负责将含氮物质从细胞外转运如细胞的各种透性酶基因。这种调控效应的结果, 在发酵过程中的体现即为酿酒酵母对各种氮源利用的优先性。

3 酿酒酵母氮代谢阻遏效应对氮源利用的影响

酿酒酵母中氮代谢基因的表达与氮源的种类有关。当培养基中含丰富型氮源(如天冬酰胺、谷氨酰胺、氨等), 将会抑制编码利用贫乏型氮源(如脯氨酸、尿囊素等)的基因的表达, 这些基因能够编码吸收利用氮源的酶和转运系统, 这种效应就是酿酒酵母的氮代谢阻遏效应(NCR)。

如前所述, 发酵食品中的氨(胺)类有害代谢物的形成与它们的含氮前体被发酵微生物的利用情况紧密相关。下面主要讨论氨基甲酸乙酯途径中的两种重要含氮前体——精氨酸和尿素, 在酿酒酵母中的利用情况及其受NCR调控的机制。

3.1 NCR对精氨酸利用的影响

精氨酸作为一种半必需氨基酸, 对维持生物体正常的生理功能起着重要的作用^[33]。从酵母倍增时间来看, 精氨酸对于酵母来说是一种普通的氮源。它被分解为鸟氨酸和尿素, 最后降解为谷氨酸和铵盐, 这由*CAR1*编码的精氨酸酶和*CAR2/CARGB*编码的鸟氨酸氨基转移酶催化。然后经由脯氨酸和尿素降解途径进一步降解。由精氨酸降解生成的尿素只能进入尿素降解途径生成铵盐。

*CAR1*编码的精氨酸酶由3个亚基组成, 每个由333个氨基酸残基构成。Car2p由423氨基酸残基构成。精氨酸通过一个特殊的组成型的、NCR敏感型的精氨酸透性酶Can1p转运入胞内。另外通过诱导表达的通用型氨基酸透性酶——Gap1p也能将精氨酸转运入细胞。*CAN1*编码了一个590个氨基酸残基组成的跨膜蛋白, 这蛋白有一个93个氨基酸残基构成的极其亲水的N末端区域。亲水性分析显示至少有11个跨膜

片段。这种透性酶也能转运碱性氨基酸如赖氨酸、组氨酸和鸟氨酸进入细胞, 只不过专一性较低。

精氨酸代谢途径仅由两步酶催化反应构成, 受到严密的调控表达。在*CAR1*的启动子区域(-375~255), 发现有多個Rap1p和Abf1p(它们都是通用的翻译激活位点)结合位点^[34]。启动子区域的多种敲除研究显示, 只要有一个Rap1和一个Abf1p能结合在该区域就足够保证*CAR1*最基本的无需诱导的表达^[35]。在另一个区域(-440~500)发现有两个Rap1p和一个Abf1p结合位点存在。这些位点的点突变, 能导致报告基因翻译活性下降12倍^[36]。但在*CAR1*启动子区域进行同样的突变不会引起*CAR1*转录活性的降低。敲除(-375~255)区域会使*CAR1*基因基础水平的转录也消失。这说明在*CAR1*基因启动子区域, -440到-500之间的序列对基础水平转录的影响不大^[35]。3个位于UAS_{BASAL}(固有上游激活序列)区域的富含GC的序列对于*CAR1*的基础表达是十分重要的^[37]。另外, UAS_{BASAL}元件对*CAR1*的诱导表达仅有很弱的促进作用。

与其他代谢途径相似, *CAR1*和*CAR2*的表达也受到由他们降解的底物的诱导表达, 如鸟氨酸、精氨酸或其他精氨酸的类似物。另外, *CAR2*也通过一个和在*DAL7*中发现的UIS同源的上游诱导序列而受脲基甲酸盐的诱导表达。除了鸟氨酸, 精氨酸也被降解为尿素, 随后尿素又会形成脲基甲酸盐最后代谢成铵盐。脲基甲酸盐是尿素循环的最后一个中间物, 所以通过它可诱导*CAR2*的表达, 可能起到一个使鸟氨酸和尿素同时降解的双重控制作用。脲基甲酸盐也能诱导*DAL2*、*DAL4*、*DAL7*、*DUR1/2*和*DUR3*的表达。在*CAR1*启动子中, (-220~165)区域, 如精氨酸盒子, 使*CAR1*的表达对精氨酸敏感^[38]。对这个区域进行敲除研究显示, 在这区域有3个分开的小区域相互协同作用, 从而能保证基因表达的最大化^[39]。通过对比代谢途径基因*CAR1*、*CAR2*和合成途径基因*ARG3*、*ARG5*、*ARG6*的启动子区域序列显示, 在它们的启动子区域内都含有相同的精氨酸盒子(Arginine box)。

在代谢过程中, 有精氨酸存在时, 精氨酸盒子通过作为一个阻遏物的结合位点, 起到一个UAS_{ARG}(上游精氨酸激活序列)的作用^[40]。在代谢个合成途径中, 通过UAS_{ARG}和URS_{ARG}(上游精氨酸阻遏序列)对基因进行的调控作用主要是由一个复合蛋白介导的, 它包括Mcm1p、Arg80p、Arg81p和Arg82p。在没有精氨酸存在时, 对*MCMI*进行突变, 结果产生了一种对*CAR1*和*CAR2*的组成型激活表达^[41]。凝胶转移实验表明, 这种四蛋白的复合物能特异性地结合到*CAR1*基因上游的(-220~165)区域^[35]。Arg81p属于Zn(II)₂Cys₆型蛋白, 而Mcm1p和Arg80p属于转录因子中的MADS-box家族。MADS-box是一个由56个氨基酸组成的连续保守序列, 其中的9个氨基酸是该家族的特征性序列。这些蛋白中大部分是结合到保守序列CC(4/7)₆GG上, 但每个基因都明显拥有不同的结合特

异性。一些MADS-box中的蛋白能特异性地吸引其他的转录因子,从而构成多成份的调控复合物^[42]。UAS_{ARG}相对具有延展性,因此这个四蛋白聚合体可能能够通过结合到DNA上来使DNA发生弯曲作用。

在有诱导物存在的情况下,Gln3p能够极大地激活*CAR1*的表达。而在没有诱导物,但是在脯氨酸培养基上生长时,Gln3p也能激活*CAR1*表达,只是激活程度较小^[43]。在*CAR1*序列的(-492~375)区域中,发现了3个5'GATAA3'序列。通过定点突变发现,在将上述3个GATAA序列中的G突变为T时,其效果和突变*GLN3*的效果一样,所以认为它们与*CAR1*依赖于Gln3p的表达相关。在阻遏培养基(铵盐)上生长的*URE2*突变的菌株中发现,*CAR1*的转录也被抑制了。这再一次证明了Gln3p对*CAR1*转录的调控作用^[40]。在加有精氨酸的铵盐培养基上,敲除*GLN3*基因能使*CAR1*的表达量提高6倍。但同时发现,*ARG81*的突变也能产生这种效果。一种可能的解释是,Gln3p的缺失会使UAS_{ARG}结合的蛋白复合物免受空间阻遏效应的影响,能表现出更强的结合活性,从而更有效地激活*CAR1*的表达。基于酵母双杂交系统,排除了Gln3p和UAS_{ARG}结合复合蛋白相互作用的可能^[35]。*CAN1*的表达也是依赖于Gln3p的^[21, 30]。但是,在脯氨酸上生长时,*CAN1*在gln3p突变的菌株中的表达没有停止,并且仍是NCR敏感型的^[20]。

*CAR1*能在氮代谢阻遏的情况下,通过非直接的形式进行表达,而*CAR2*不行^[44]。由于调控引发的外排作用,主要的透性酶Gap1p在有优质氮源存在的情况下,会被Npi1p和Npi2p调控处于未激活状态。而在不存在优质氮源的情况下,Gap1p会被Npr1p和Npr2p重新激活。这些调控因子也可以用来调控其他的透性酶^[40]。因此,对于*CAR1*和*CAR2*表达的调控,主要是通过UAS_{ARG},而不是通过UAS_{NTR}。和这个一致的是,在细胞内存在充足的精氨酸时,*CAR1*的是NCR不敏感的^[44]。

检查*CAR2*的启动子序列发现,只有一个5'GATAA3'序列,但还有两个5'TTTGTTT3'序列存在。这些富含T的序列是可以通过GATAA序列来激活转录的。Northern blot发现,Gat1p对*CAR1*的表达有轻微的影响^[37]。

当在脯氨酸培养基上生长时,Dal80p一定程度上是作为一个抑制因子对*CAR1*的表达产生影响的。*CAR1*启动子的(-157~-146)处是一个URS区域,认为它是Dal80p的结合位点,因为敲除这个区域会引起在铵盐培养基上生长时,*CAR1*表达量的大幅度升高;而敲除*DAL80*却没有这样的效果^[35, 45]。但是通过和Dal80p结合实验显示,这些URS只和GATAA序列有较低的同源性,而且它们还是富含GC的。后来的研究主要关注的是*DAL80*自身表达和其他NCR调控因子的关系,如Gln3p和Ure2p。研究发现,在贫乏型氮源培养基上,Gln3p正向调控*DAL80*的表达。丰富型氮源会通过Ure2p抑制*DAL80*的表达,随后抑制Gln3p^[36]。所以,*DAL80*不能在丰富型培养

基上抑制*CAR1*的表达。*CAN1*的表达受控于Gln3p、Dal80p和Ure2p^[21]。当突变上述3种调控因子基因时,相对于只突变*GLN3*和*DAL80*的菌株,*CAN1*基因的mRNA有所增加。这显示还有另一种调控机制存在,例如通过Gat1p^[20]。

如果不考虑Dal80p和(-157~-146)区域的相互作用,另外一种阻遏物Car80p的作用就比较突出了,因为将*CAR80*进行突变,能够使在铵盐为氮源的培养基上生长地菌株胞内*CAR1*和*CAR2*基因的mRNA量提高。它的URS序列是AGCCGCCGA,这个序列在*CAR2*中也找到了,并且有3个。纯化Car80p和URS区域结合实验显示,Car80p有两个蛋白构成,分别是Buf1p(M_r 73.5×10³)和Buf2p(M_r 37.5×10³)。其中,Buf是binding URS factor的首字母缩写^[46~47]。Car80p是通过URS对*CAR1*的表达进行抑制的必要条件,但是它实际上不能结合到DNA上^[48]。对Buf2p进行序列分析发现,它含有一个锌指结构,而且和那些能结合到DNA上的相似。Buf1p和Buf2p还能结合到一个位于UAS_{ARG}上有的、和URS相似的序列上。这种序列成为UAS_{BUF}。当它们和一个报告基因相连时,这些序列也能像UAS序列那样发挥作用,可能是通过(-350~-300)区域内富含GC的序列^[46, 49]。但是,在URS的抑制作用解除之后,在*CAR1*启动子周边的UAS_{BUF}序列只能作为一种上游激活序列来起作用^[35]。这种激活作用可能也是由某种还没有发现的蛋白介导的,就像发现Car80p是和Buf1p和Buf2p一同起抑制作用的。

另外还发现有两个调控因子参与到*CAR1*基因的表达。它们是Car81p和Car82p,研究发现它们能通过*CAR1*编码区域的一些序列来抑制*CAR1*的表达。它们能参与到*CAR1*的转录后调控中。在低精氨酸浓度的情况下,测定*CAR1*的mRNA和相应精氨酸酶的活性发现,在有mRNA存在时,没有发现有精氨酸酶活性。这可能是由于Car81p和Car82p的存在,使*CAR1*的mRNA处于没有翻译活性的状态而使*CAR1*能转录但不能翻译,因此没有精氨酸酶活性。这种情况,在*CAR2*的表达中也有发现。

综上所述,在脯氨酸培养基上,Rap1p、Abf1p、Gln3p和Cat1p通过两个UAS_{BASAL}和一个UAS_{NTR}位点能够激活*CAR1*的表达。而Car80p、Buf1p和Buf2p复合物能够通过URS位点一定程度上抑制*CAR1*的表达。在一般情况下,激活效应和阻遏效应是两相平衡的,但是精氨酸的存在会使总体效果偏向于激活。因为在精氨酸存在时,Mcm1p和Arg80-82p能够激活UAS_{ARG},同时靠近UAS_{ARG}的UAS_{BASAL}元件在有诱导物存在的情况下作用效果更加明显。而在阻遏状态下,由于诱导物的缺失,透性酶的表达量会大幅降低,同时*GLN3*也会被Ure2p失活。因此在阻遏状态情况下,激活与阻遏的平衡会被破坏向阻遏效果倾斜,因而*CAR1*的表达会被阻断。

3.2 NCR对尿素利用的影响

尿素是酿酒酵母中精氨酸、尿囊素和尿囊酸代谢的中间产物,对酿酒酵母有一定毒性。尿素会被Dur1p降解为尿囊酸,随后被Dur2p降解为铵盐和二氧化碳(图1)。分析发现,*DUR1*和*DUR2*是一个多功能基因*DUR1/2*的两个部分。它可以编码一个尿素羧化酶和一个尿囊酸水合酶。尿素由*DUR3*诱导表达的特异性尿素透性酶转运入细胞。这是一个活跃的转运系统,它在胞外尿素浓度在25 mmol/L时发挥作用。另一种将尿素转运入细胞的途径是通过一种协助扩散作用。在胞外尿素浓度在0.5 mmol/L以上时,这种转运作用起主导作用。*DUR3*位于酿酒酵母的第八号染色体上,编码了一个735个氨基酸长度的蛋白质。这个蛋白是高度疏水性的。它具有透性酶所具有的特性,由交替的亲水区域和疏水区域构成。

图5是*DUR1/2*启动子区域示意图,在*DUR1/2*启动子的(-600~-400)区域内存在4个UAS_{NTR}位点,分别两两相连,另外还存在两个UIS位点。通过Northern blot分析发现,在脯氨酸培养基上,*DUR1/2*和*DUR3*的mRNA有微弱的聚集现象。然而,添加一种不能被代谢降解的脲基甲酸类似物能够强力的诱导*DUR1/2*和*DUR3*的转录^[34]。同样,也有实验证明,脲基甲酸也能诱导*DUR1/2*的表达。在没有诱导物存在的条件下,这些基因的表达量都很低。Dal81p和Dal82p被发现能作为激活因子激活*DUR1/2*和*DUR3*的表达。它们对于在途径中最后一个中间产物是脲基甲酸或是它的类似物,甚至直接是尿素存在时,诱导相关基因的表达是十分重要的。在尿囊素和GABA的代谢过程中也需要这两个激活因子的参与。

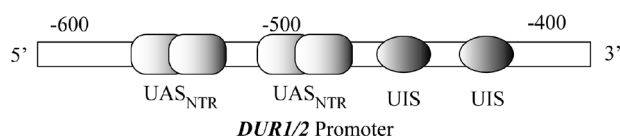


图5 *DUR1/2*启动子区域示意图

Fig. 5 Outline of the *DUR1/2* promoter

*DUR1/2*启动子的(-600~-400)区域内存在4个UAS_{NTR}位点,分别两两相连,另外还存在两个UIS位点

There are four UAS_{NTR} sites, which is one overlapping the other respectively, and two UIS sites

一段和*DAL7*的UIS同源的上游激活序列,也能在*CAR2*、*DAL2*、*DAL4*、*DUR1/2*和*DUR3*中发现,而Dal81p和Dal82p就是通过它发挥作用的。精氨酸、尿囊素和尿素途径都是以尿素为终代谢产物,而GABA途径并非如此,但GABA途径基因还是受Dal81p和Dal82p的调控。

通过饱和突变发现,Dal81p和Dal82p结合的保守序列是5'-G₆/C₆AAA^A/T₆NTGCG^T/C^T/G₆/C₆3'^[50]。*DAL81*和*DAL82*的表达能够被Dal80p轻轻地阻遏。*DAL82*的表达依赖于Gln3p,而被Dal81p阻遏。*DAL81*的表达是不需要诱导物存在的,而且对NCR不敏感。有趣的现象是,在脯氨酸培养基上,敲除*DAL81*

能够提高*DUR1/2*的表达量。在没有Dal81p存在时,*DUR1/2*启动子区域能够空出位置以供Gln3p和Dal80p更容易的结合来发挥作用。

*DUR3*的表达对Gln3p的需求性在脯氨酸培养基上被分析出来,而且数据显示这种需求不是很强也不是很弱,比较适中。但在添加了草酰脲的脯氨酸培养基上,相同的结果没有出现^[51]。在诱导状态下,*DUR1/2*的表达对Gln3p的依赖性很高。在没有Gln3p诱导物的脯氨酸培养基上,*DUR1/2*的表达也需要Gln3p。但*DUR1/2*在脯氨酸培养基上的表达量普遍很低。

代谢途径中,Ure2p的需求性已被分析,另外在天冬氨酸和GABA培养基上,*URE2*的突变能使*DUR1/2*的表达量提高^[21]。但在脯氨酸培养基上,*URE2*对*DUR1/2*表达量的提升有限。通过对比在GABA和脯氨酸培养基上,Ure2p对*DUR1/2*表达抑制作用的强弱可以发现,*DUR1/2*的表达对于Gln3p的需求是很强的。在脯氨酸培养基上,在*URE2*突变菌株中,*DUR3*的表达量明显的下降了。这说明,可能是Gln3p激活了*DAL80*的表达,从而产生对*DUR3*表达的抑制作用。另一方面,*DUR3*的表达在GABA培养基上大幅提升,而在天冬酰胺上没有变化。一篇研究Ure2p在尿素途径中作用的文章表明,在脯氨酸培养基上,野生菌中*DUR1/2*的表达量很高^[21]。这和其他两篇论文中报道的,在脯氨酸培养基上*DUR1/2*不表达相矛盾。这种差异,可能是由不同实验室的酵母菌株的差异引起的。

在脯氨酸和尿素培养基上,*DAL80*的敲除能使*DUR3*的表达量提高45倍。这说明在没有诱导物存在的条件下,Dal80p能将*DUR3*的表达量抑制在一个较低的水平。*DUR1/2*的表达量也随着*DAL80*的敲除提高。在天冬酰胺和脯氨酸培养基上生长时,不论Dal80p存在与否,*DUR3*和*DUR1/2*的表达都是对NCR高度敏感的。研究发现,Npr2p可能参与到对成熟的尿素透性酶功能的调控中^[52]。

4 氮代谢阻遏问题的解决对解决食品安全问题的积极影响

从以上叙述不难发现,氨基甲酸乙酯、生物胺和亚硝酸盐等生物危害物广泛存在于我国特色的发酵食品中的根本原因,都与发酵微生物对相应氮源的利用不充分或选择性利用相关。例如我国发酵黄酒中普遍存在的氨基甲酸乙酯,其产生就是由于在发酵初期,发酵菌株酿酒酵母优先利用谷氨酰胺、谷氨酸等优质氮源而不利用精氨酸,最终使得胞内尿素含量过高而向胞外分泌,从而尿素与发酵液中乙醇接触反应生成EC。

如果能够彻底阐释清楚酿酒酵母在氮源代谢过程中的复杂调控途径,那么就能通过生物工程手段有目的地对其进行改造,使得能够优先快速利用精氨酸、尿素,从根本上减少EC前提物质的积累,从而降低甚至消除发酵食品中的这种

有害物质。不光对于氨基甲酸乙酯,对于生物胺、亚硝酸胺等其他的危害物,也能通过NCR的方法来从根本上减少和降低它们在发酵食品中的残留量。

综上所述,关于酿酒酵母氮代谢物阻遏效应的研究成果,可为解决由于氮代谢物阻遏效应相关的含氮有害代谢物积累导致的普遍存在于发酵中的食品安全问题提供理论依据和技术支撑,对于提高我国食品安全质量、打破国外针对我国传统发酵食品行业设置的技术壁垒、传承和发展中国特色食品文化具有重要的理论和实践意义。

References

- Forkert PG. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate. *Drug Metab Rev*, 2010, **42** (2): 355~378
- Silla Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*, 1996, **29** (2~3): 213~231
- Gao NF (高年发), Bao JH (宝菊花). Research advancement of ethyl carbamate. *China Brewing* (中国酿造), 2006, **9** (1): 1~4
- Taki N, Imamura L, Takebe S, Kobashi K. Cyanate as a precursor of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Jpn J Toxicol Environ Health*, 1992, **38** (6): 498~505
- Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem*, 2007, **103** (4): 1475~1486
- Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi L, Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol*, 1994, **5** (2): 42~49
- Maijala R, Eerola S, Aho M, Hirn J. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *J Food Prot*, 1993, **56** (2): 125~129
- Pereira C, Barreto Crespo M, San Romao M. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int J Food Microbiol*, 2001, **68** (3): 211~216
- Li FM (李方敏), Fan XL (樊小林). Effect of controlled release fertilizers on methane emission from paddy field. *Chin J Appl Environ Ecol* (应用与环境生物学报), 2006, **11** (4): 408~411
- 吴晖. 泡菜中亚硝酸盐的研究进展. *现代食品科技*, 2007, **23** (7): 63~66
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1997, **17** (8): 4282~4293
- ter Schure EG, van Riel NA, Verrips CT. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24** (1): 67~83
- Hofman-Bang J. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol*, 1999, **12** (1): 35~73
- Cooper TG. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, **26** (3): 223~238
- Deed NK, van Vuuren HJ, Gardner RC. Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a commercial strain of *S. cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89** (5): 1537~1549
- Rai R, Daugherty JR, Cooper TG. UASNTR functioning in combination with other UAS elements underlies exceptional patterns of nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1995, **11** (3): 247~260
- Stanbrough M, Rowen DW, Magasanik B. Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, **92** (21): 9450~9454
- Svetlov V, Cooper TG. The minimal transactivation region of *Saccharomyces cerevisiae* Gln3p is localized to 13 amino acids. *J Bacteriol*, 1997, **179** (24): 7644~7652
- Coffman JA, Rai R, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG. Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (3): 847~858
- Coffman JA, Rai R, Cooper TG. Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression-sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1995, **177** (23): 6910
- Coffman JA, el Berry HM, Cooper TG. The *URE2* protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1994, **176** (24): 7476~7483
- Masison DC, Wickner RB. Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science*, 1995, **270** (5233): 93~95
- Kushnirov V, Ter-Avanesyan M, Smirnov V. Structural and functional similarity of Sup35p and Ure2p yeast proteins and mammalian prions (a review). *Mol Biol*, 1995, **29** (4): 427~430
- Wickner RB. [URE3] as an altered URE2 protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 1994, **264** (5158): 566~569
- Stanbrough M, Magasanik B. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1995, **177** (1): 94~102
- Rowen DW, Esiobu N, Magasanik B. Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1997, **179** (11): 3761~3766
- Coffman JA, Rai R, Loprete DM, Cunningham T, Svetlov V, Cooper

- TG. Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1997, **179** (11): 3416~3429
- 28 Coornaert D, Vissers S, Andre B, Grenson M. The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. *Curr Genet*, 1992, **21** (4): 301~307
- 29 Cunningham TS, Cooper TG. The *Saccharomyces cerevisiae* *DAL80* repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URSGATA). *J Bacteriol*, 1993, **175** (18): 5851~5861
- 30 Daugherty JR, Rai R, el Berry HM, Cooper TG. Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1993, **175** (1): 64~73
- 31 Soussi-Boudekou S, Vissers S, Urrestarazu A, Jauniaux JC, Andre B. Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 1997, **23** (6): 1157~1168
- 32 Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J, Andre B. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 2007, **27** (8): 3065~3086
- 33 Xu ZH (许正宏), Dou WF (窦文芳), Wang X (王霞), Tao WY (陶文沂). Effect of nitrogen source and its supply manner on production of *L*-arginine by *Corynebacterium crenatum* JDN28-75. *Chin J Appl Environ Ecol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (3): 381~385
- 34 Alberti S, Gitler AD, Lindquist S. A suite of gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2007, **24** (10): 913~919
- 35 Dubois E, Messenguy F. Integration of the multiple controls regulating the expression of the arginase gene *CAR1* of *Saccharomyces cerevisiae* in response to different nitrogen signals: role of Gln3p, ArgRp-Mcm1p, and Ume6p. *Mol Gen Genet*, 1997, **253** (5): 568~580
- 36 Azevedo Z, Couto JA, Hogg T. Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Lett Appl Microbiol*, 2002, **34** (1): 32~36
- 37 Smart WC, Coffman JA, Cooper TG. Combinatorial regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CAR1* (arginase) promoter in response to multiple environmental signals. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (10): 5876~5887
- 38 Benjamin PM, Wu JI, Mitchell AP, Magasanik B. Three regulatory systems control expression of glutamine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* at the level of transcription. *Mol Gen Genet*, 1989, **217** (2~3): 370~377
- 40 Andrade SL, Einsle O. The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins. *Mol Membr Biol*, 2007, **24** (5~6): 357~365
- 41 Messenguy F, Dubois E. Genetic evidence for a role for *MCMI* in the regulation of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (4): 2586~2592
- 42 Shore P, Sharrocks AD. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 1995, **229** (1): 1~13
- 43 Angeles R, Devine J, Barton K, Smith M, McCauley R. Mutation of K234 and K236 in the voltage-dependent anion channel 1 impairs its insertion into the mitochondrial outer membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 1999, **31** (2): 137~142
- 44 Cooper TG, Kovari L, Sumrada RA, Park HD, Luche R, Kovari I. Nitrogen catabolite repression of arginase (*CAR1*) expression in *Saccharomyces cerevisiae* is derived from regulated inducer exclusion. *J Bacteriol*, 1992, **174** (1): 48~55
- 45 Hicke L, Riezman H. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, 1996, **84** (2): 277~287
- 46 Luche RM, Smart WC, Marion T, Tillman M, Sumrada RA, Cooper TG. *Saccharomyces cerevisiae* BUF protein binds to sequences participating in DNA replication in addition to those mediating transcriptional repression (*URS1*) and activation. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (9): 5749~5761
- 47 Luche RM, Smart WC, Cooper TG. Purification of the heteromeric protein binding to the *URS1* transcriptional repression site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (16): 7412~7416
- 48 Park HD, Luche RM, Cooper TG. The yeast *UME6* gene product is required for transcriptional repression mediated by the *CAR1* *URS1* repressor binding site. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (8): 1909~1915
- 49 Kovari LZ, Cooper TG. Participation of ABF-1 protein in expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *CAR1* gene. *J Bacteriol*, 1991, **173** (20): 6332~6338
- 50 Dorrington RA, Cooper TG. The *DAL82* protein of *Saccharomyces cerevisiae* binds to the *DAL* upstream induction sequence (UIS). *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (16): 3777~3784
- 51 ElBerry HM, Majumdar ML, Cunningham TS, Sumrada RA, Cooper TG. Regulation of the urea active transporter gene (*DUR3*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1993, **175** (15): 4688~4698
- 52 Rousselet G, Simon M, Ripoche P, Buhler JM. A second nitrogen permease regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 1995, **359** (2~3): 215~219