

液泡蛋白酶 B 对酿酒酵母高温乙醇发酵效率的影响

魏小文^Δ 马翠^Δ 熊亮 张明明 赵心清* 白凤武

(大连理工大学 生命科学与技术学院 辽宁 大连 116023)

摘要:【目的】提高酿酒酵母的高耐温性,从而提高菌株在高温下的乙醇发酵性能。【方法】利用染色体整合过表达酿酒酵母液泡蛋白酶 B 编码基因 *PRB1*。【结果】在 41 °C 高温条件下进行乙醇发酵,过表达 *PRB1* 基因的重组酿酒酵母菌株可在 31 h 内消耗全部的葡萄糖,而对照菌株在相同时间内仅消耗不到一半的葡萄糖。【结论】利用蛋白酶 B 基因过表达可构建耐高温酿酒酵母菌株,提高在高温条件下乙醇的发酵效率。

关键词: 酿酒酵母, 液泡蛋白酶 B, 高温胁迫耐受性, 乙醇发酵

Effect of vacuolar proteinase B on high temperature ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*

WEI Xiao-Wen^Δ MA Cui^Δ XIONG Liang ZHANG Ming-Ming

ZHAO Xin-Qing* BAI Feng-Wu

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: [Objective] To improve thermal tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient ethanol fermentation under high temperature. [Methods] Vacuolar proteinase B encoding gene *PRB1* was integrated into the genome of *S. cerevisiae*, and cell growth and ethanol fermentation of the recombinant strain were compared with those of the control strain carrying the empty plasmid at 41 °C. [Results] *PRB1* overexpressing strain consumed glucose completely in the fermentation broth within 31 h, whereas high residual glucose was detected in the fermentation broth of the control strain (35 g/L, about 40% of the total sugar amount) at 23 h and the glucose level was not changed until 31 h. [Conclusion] Overexpression of vacuolar protease B encoding gene improved yeast thermal tolerance and ethanol production under high temperature. The robust strain developed in this study has provided basis to further improve thermal tolerance and efficiency of high-temperature ethanol fermentation of the industrial strains and reduce the production cost of fuel ethanol.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Protease B, Thermal tolerance, Ethanol fermentation

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA101805); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(No. NCET-11-0057); 国家自然科学基金项目(No. 21376043)

*通讯作者: ✉: xqzhao@sjtu.edu.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2014-12-03; 接受日期: 2015-02-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-11

近年来,燃料乙醇已经作为大规模生产和应用的再生清洁能源在国内外被普遍使用,但生产成本高是燃料乙醇工业化生产的瓶颈。因此,提高燃料乙醇生产的经济性,一直是国内外学者研究的重点。酿酒酵母是常用的乙醇发酵生产菌株,经过遗传改造的酿酒酵母菌株,可有效发酵纤维素水解液中的多种可发酵糖^[1]。因此,利用来源丰富、廉价、可再生的纤维素原料进行纤维素乙醇的生产,也普遍使用酿酒酵母。但是,酿酒酵母在发酵过程中会受到多种胁迫条件的影响,包括高温、高浓度乙醇以及纤维素原料水解产生的毒性抑制物等^[2-4]。此外,在利用纤维素原料进行同步糖化发酵过程中,纤维素酶的最适温度一般在 50 °C 左右,而酵母菌的最适生长温度和发酵温度通常在 30-37 °C,这种最适温度的显著差异阻碍了同步糖化发酵的有效进行^[5-6]。因此,提高酵母菌的耐热性以及高温胁迫条件下的发酵性能,不仅可以减少发酵过程中冷却水的使用量,节省工业生产成本,还可以大大提高同步糖化发酵效率及纤维素乙醇生产的经济性。

酵母细胞中的液泡在 pH 的调节以及代谢调控等方面发挥重要的生理作用,而液泡中的蛋白酶对液泡的生理功能至关重要,其中研究较多的有蛋白酶 A 和蛋白酶 B 等^[7]。本文中研究的液泡蛋白酶 B (Prb1p)是类似于枯草杆菌蛋白酶家族的一种丝氨酸蛋白酶,由 *PRB1* 基因编码^[8-9]。国内学者曾报道,酿酒酵母液泡蛋白酶 A 的缺陷可导致细胞的抗氧化胁迫能力下降^[10],但对于 Prb1p 与胁迫反应的关系研究较少,该酶蛋白与高温胁迫的关系还未见报道。研究发现,*PRB1* 基因受到转录因子 Yap1p 和 Zap1p 的调节,在其启动子区域也找到了这两个转录因子的保守结合基序^[11-12]。Zap1p 及 Yap1p 均是胁迫条件响应的转录因子,分别与锌浓度缺乏条件下基因的转录及氧化胁迫条件下基因的转录有关^[11-12]。由于 *PRB1* 基因受这两个转录调节因子的调控,推测 *PRB1* 基因所编码的蛋白可能与细胞的

胁迫耐受性有关。此外,最新研究发现,Prb1p 具有组蛋白 H3 链 N 末端的内切酶的活性^[13],可能参与广泛的基因表达调控过程。但是,*PRB1* 基因的过表达对酿酒酵母发酵性能的影响还没有相关报道。因此,本文通过将 *PRB1* 基因进行过表达,研究该基因对酵母细胞胁迫耐受性的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 微生物菌种及培养基

大肠杆菌 DH5 α 、酿酒酵母模式菌株 S288c 及乙醇发酵工业酵母菌株 Sc4126,由本实验室保存。

YPD 液体培养基(g/L):蛋白胨 20,葡萄糖 20,酵母浸粉 10。YPD 固体培养基(g/L):YPD 液体培养基中添加终浓度为 20 g/L 的琼脂粉。酵母菌种子培养基(g/L):葡萄糖 30,酵母浸粉 4,蛋白胨 3。乙醇发酵培养基(g/L):葡萄糖 85,酵母浸粉 4,蛋白胨 3;添加乙酸发酵时,使用前加入乙酸至终浓度为 5 g/L。LB 培养基(g/L):蛋白胨 10,酵母浸粉 5,氯化钠 10。固体培养基为 LB 液体培养基中,加入终浓度为 20 g/L 的琼脂粉。

1.2 过表达蛋白酶 B 基因 *PRB1* 的重组酿酒酵母的构建和转化

以酿酒酵母 S288c 基因组为模板,利用引物 PRB1-F (5'-CCCCCGGGATGAAGTTAGAAAATCTC-3')和 PRB1-R (5'-CCCTTAATTAATTAATAATATTCAATT-3')扩增得到 *PRB1* 基因,然后将 *PRB1* 基因与 pHO 整合表达载体^[14]连接后转化到大肠杆菌 DH5 α 中,通过含 100 mg/L 氨苄青霉素的平板筛选得到转化子。随后将确定含有目的基因的质粒用 *Not* I 酶切线性化后转化到工业酿酒酵母 Sc4126 中,转化子的筛选利用真菌抗生素 G418,终浓度为 300 mg/L (固体)或 100 mg/L (液体)。提取转化子的基因组,利用引物 PRB1-F (5'-CCCCCGGGATGAAGTTAGAAAATACTC-3')和 G418-R (5'-AGCCGTTTCTGTAATGAAGGAG-3')进行 PCR 验证。

1.3 重组菌的遗传稳定性分析

将重组菌株在 YPD 斜面上活化后,按文献^[15]

方法进行遗传稳定性分析。

1.4 重组菌株在高温条件下的生长和发酵评价

1.4.1 重组菌株与对照菌株的耐受性比较: 本文使用的载体为整合表达载体, 整合在酿酒酵母的 *HO* 位点, 该位点整合不影响菌株在 30 °C 条件下的生长和发酵^[16-17]。在前期实验过程中未发现出发菌株和含有 pHO 空载体的菌株在生长和发酵上存在差异。将对照菌株 Sc4126-HO 和重组酿酒酵母 Sc4126-PRB1 菌株接种到含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、150 r/min 培养过夜。分别取菌液, 测其在 620 nm 处吸光值 *OD*, 用灭菌后的蒸馏水调节 *OD* 值至相同; 对调节后的菌液按 10 倍梯度稀释, 取 2 μL 点样于对照 YPD 平板, 于 30 °C 静置培养; 此外, 为了测菌株的高温耐受能力, 将未添加胁迫因素的 YPD 平板置于 43 °C 培养, 待菌落长出后观察对比并拍照。实验至少重复 3 次, 得到一致的结果。

1.4.2 在 41 °C 条件下的高温摇瓶发酵实验: 把对照酵母菌株 Sc4126-HO 和重组酿酒酵母 Sc4126-PRB1 接种到含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 培养 16–20 h 至 *OD*₆₂₀ 值达到相同水平。然后从种子培养基中取 5% 样品分别接种到装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 41 °C、150 r/min 条件下发酵。在相同的时间点取样, 取菌液适当稀释后用酶标仪测定菌液在 620 nm 下的吸光值来确定菌体含量, 离心后取上清检测剩余葡萄糖、乙醇及甘油含量。摇瓶发酵实验重复 2 次, 得到一致的结果。

1.5 葡萄糖浓度、乙醇浓度、生物量及代谢物的测定

乙醇得率、生物量得率和乙醇产率的计算参考文献[18]进行。

发酵液中葡萄糖、乙醇和甘油用高效液相色谱进行分析, 分离条件为: Aminex HP-87H 有机酸分析柱(300 mm×7.8 mm; Bio-Rad, Hercules), 0.005 mol/L H₂SO₄ 为流动相, 流速 0.5 mL/min, 进

样量 20 μL, 柱温 50 °C, 示差折光检测器温度 50 °C。

1.6 RNA 提取及实时定量分析

PRB1 过表达菌株和对照菌株对数生长期的总 RNA 采用 TransGen Biotech 试剂盒提取, 经 TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒反转录为 cDNA 后, 采用 SYBR® Premix ExTaq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行了实时定量分析。*PRB1* 的 RT-PCR 引物为 rtPRB1-F (5'-GCGGTGTCACGTCCTATGTT-3') 和 rtPRB1-R (5'-TCGTCGTTAAGTGGGATGGTT-3'), 并以管家基因 *ACT1* 作为内参, 其引物为 ACT1-F (5'-GCCGAAAGAATGCAAAAGG A-3') 和 ACT1-R (5'-GGAAGGTAGTCAAAGAAGC CAAGA-3')。实时定量 PCR 在 Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Australia) 荧光定量 PCR 系统中进行, 反应条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s, 40 个循环。定量结果分析采用 2^{-ΔΔC_T} 法。

2 结果与讨论

2.1 重组菌株验证及传代稳定性实验验证

提取重组菌株及对照菌株的基因组, 以 PRB1-R 引物和 G418-F 引物进行 PCR 验证, 过表达菌株中得到目的片段, 而对照菌株中没有目的片段, 证明含有 *PRB1* 的重组菌株已成功构建(结果未显示)。同时, 将得到的重组菌株进行传代稳定性实验, 在无抗性平板上传代 5 次后, 随机挑取的 100 个单菌落均在抗性平板上正常生长, 证明重组菌株具有良好的稳定性。

2.2 重组酿酒酵母 Sc4126-PRB1 在高温胁迫条件下的平板生长比较

将重组菌株 Sc4126-PRB1 与对照菌株在高温胁迫条件下进行点板实验比较, 结果见图 1。可以得出 Sc4126-PRB1 的菌株与空载对照菌株在 30 °C 条件下的 YPD 平板上没有生长差异, 说明 *PRB1* 基因过表达不会影响菌株的正常生长。由高温条件培养的平板可以看出, 过表达 *PRB1* 基因可以提高酵母菌株的高温耐受性, 这对于提高菌株在高温条

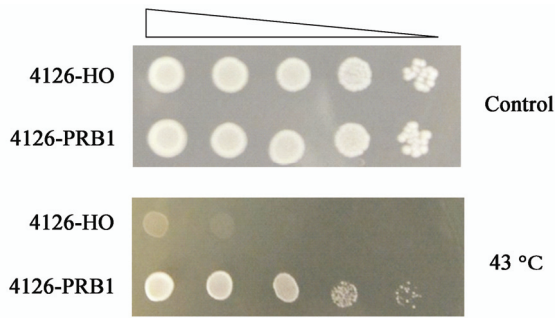


图 1 高温胁迫条件下的重组菌株与对照菌株的耐受性对比

Figure 1 Effect of over-expression of *PRBI* on cell growth of *S. cerevisiae* Sc4126 under high temperature

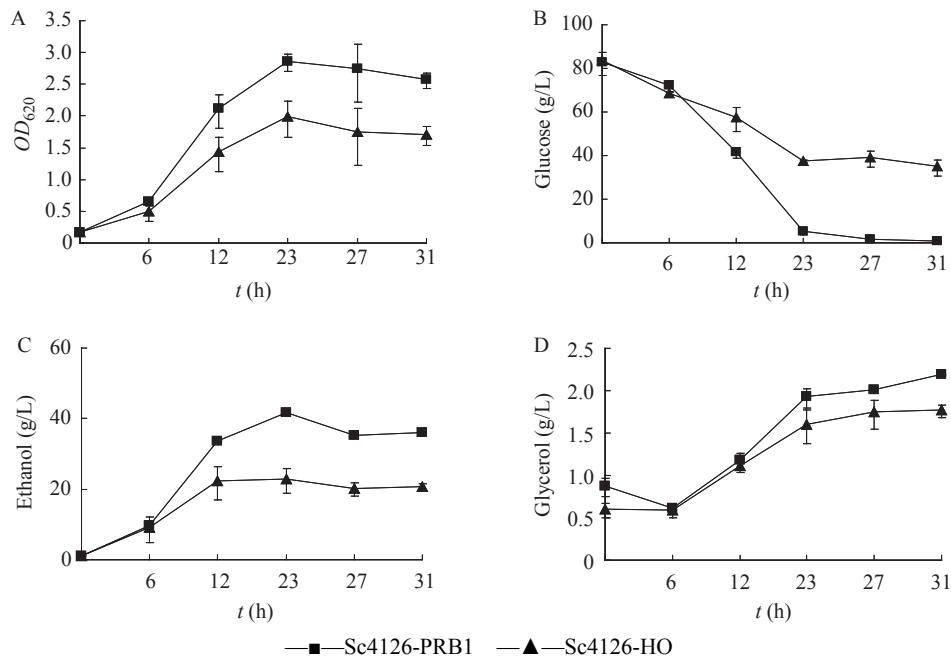


图 2 *PRBI* 过表达菌株 Sc4126-*PRBI* 菌株与对照菌株 Sc4126-*HO* 在 41 °C 高温条件下乙醇发酵性能比较
Figure 2 Ethanol fermentation of the *PRBI* over-expressing strain Sc4126-*PRBI* at 41 °C in comparison with that of the control strain Sc4126-*HO*

注：A：过表达 *PRBI* 基因对酵母菌株在 41 °C 条件下生长的影响；B：过表达 *PRBI* 基因对菌株在 41 °C 条件下消耗葡萄糖的影响；C：过表达 *PRBI* 基因对菌株在 41 °C 条件下乙醇产量的影响；D：过表达 *PRBI* 基因对菌株在 41 °C 条件下甘油积累的影响。

Note: A: Effect of over-expression of *PRBI* on cell growth of *S. cerevisiae* at 41 °C; B: Effect of over-expression of *PRBI* on sugar consumption of *S. cerevisiae* at 41 °C; C: Effect of over-expression of *PRBI* on ethanol production of *S. cerevisiae* at 41 °C; D: Effect of over-expression of *PRBI* on glycerol accumulation of *S. cerevisiae* at 41 °C.

件下的乙醇发酵具有重要的意义，因此后续进一步研究了高温条件下重组酿酒酵母乙醇发酵性能。

2.3 重组菌株在 41 °C 高温条件下的乙醇发酵

在 39、40、41、42 及 43 °C 条件下比较对照菌株和 *PRBI* 过表达菌株的生长，结果表明，在 39 °C 条件下，重组菌株与对照菌株的生长没有差别；40–42 °C 时，*PRBI* 过表达重组菌株的生长明显好于对照菌株；在 43 °C 条件下的发酵结果表明，两株菌的生长情况相似，均受到明显抑制(结果未显示)。由于 41 °C 条件下的发酵结果能显著的表明 *PRBI* 基因过表达对于菌株高温耐受性的提高，因

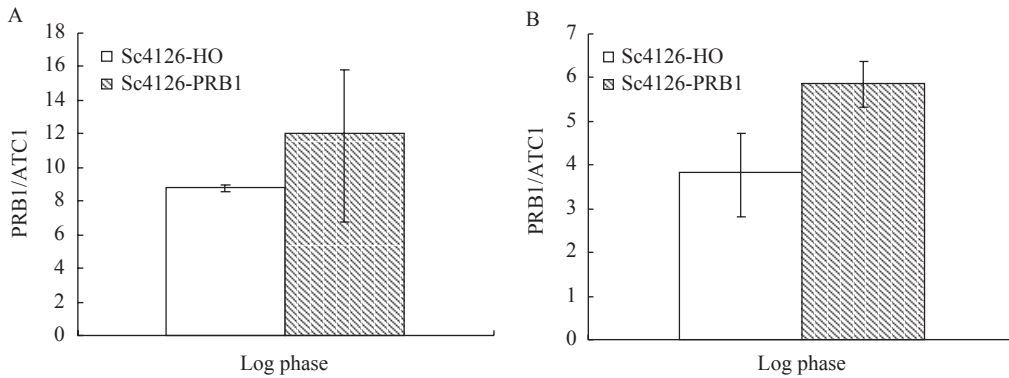


图3 不同温度条件下 *PRBI* 基因的相对表达量的比较

Figure 3 The relatively expression of *PRBI* under different conditions of the *PRBI* over-expressing strain Sc4126-PRB1 in comparison with the control strain Sc4126-HO

注: A: 在 41 °C 发酵时 *PRBI* 基因的相对表达量; B: 在 30 °C 发酵时 *PRBI* 基因的相对表达量。

Note: A: Relatively expression of *PRBI* at 41 °C; B: Relatively expression of *PRBI* at 30 °C.

此选择 41 °C 作为发酵温度比较两株菌的高温耐受性, 结果见图 2。图 2A 为细胞生长的比较, 可以看出, Sc4126-PRB1 菌株在高温条件下, 菌体生长远好于对照菌株, 在 23 h 时 OD₆₂₀ 值达到对照菌株的近 1.5 倍。图 2B 及图 2C 为菌株发酵过程中测得的残糖量及乙醇产量的变化, 可以看出 Sc4126-PRB1 重组菌的葡萄糖的消耗速度及乙醇终产量均高于空载菌株。重组菌株在发酵 27 h 时已经将葡萄糖完全消耗, 而对照菌株在发酵 31 h 时还剩 35 g/L 葡萄糖, 即使延长发酵时间也无法将糖完全消耗。甘油是酿酒酵母胁迫条件下细胞合成的保护性物质之一^[19], 虽然高温条件胁迫下, 过表达 *PRBI* 的重组菌株甘油产量高于对照菌株(图 2D), 但由于过表达 *PRBI* 的菌株生物量较高, 按照平均每 OD₆₂₀ 生物量来计算, 未发现过表达 *PRBI* 菌株与对照的差别, 因此, 推断过表达 *PRBI* 菌株高温耐受性提高与甘油的合成无关。由于高温可引起细胞内蛋白的变性^[20], 而 Prb1p 可以通过降解蛋白而帮助细胞清除变性的蛋白, 因此推测 *PRBI* 过表达提高高温耐受性的原因与突变体内有害变性蛋白可及时清除有关。本文结果说明 *PRBI* 基因过表达会提高发酵过程中菌体高温的耐受性, 提高菌株的生长及发酵性能。

2.4 实时定量 PCR 分析

为了证明在重组菌株中 *PRBI* 的表达水平的确提高, 利用高温发酵实验(41 °C)及正常温度(30 °C)发酵实验中两株菌的对数生长期细胞进行了实时定量 PCR 分析。图 3A 为高温条件下对数期样品的实时定量分析结果, 重组菌株中 *PRBI* 基因的相对表达量是对照菌株的 1.47 倍。图 3B 为正常温度条件下对数期样品的实时定量分析结果, 重组菌株中 *PRBI* 基因的相对表达量是对照菌株的 1.57 倍。结果表明 *PRBI* 基因的确在重组菌细胞中过量表达, 推测该基因的过表达很有可能是重组菌高温发酵效率提高的原因。

Prb1p 参与多种细胞内关键代谢酶的降解^[21]; 此外, Prb1p 也参与其自身及其他蛋白水解酶如 PrA 和 CpY 的成熟过程^[22]。作为液泡(溶酶体)蛋白酶的一种, Prb1p 可能对其他错误折叠或失去功能的酶进行降解^[23-24], 保证细胞的活性和正常功能的行使, 并进一步促进氨基酸的循环。因此 *PRBI* 基因所编码的蛋白可能参与细胞的胁迫耐受性应激反应。本文结果也显示, 过表达 *PRBI* 基因可以提高酿酒酵母的高温耐受性, 使菌株在高温条件下的获得良好的乙醇发酵性能。

3 结论

(1) 液泡蛋白酶 B 基因 *PRB1* 过表达可以提高酿酒酵母的高温耐性。

(2) 过表达 *PRB1* 基因的重组菌株在 41 °C 表现出良好的乙醇发酵性能, 可完全消耗培养基中的葡萄糖, 而对照菌株只能消耗部分葡萄糖。

本研究为首次报道过表达液泡蛋白酶 B 基因可提高酿酒酵母的高温耐性。本文的研究结果为进一步提高酿酒酵母在高温下的乙醇发酵效率, 节约工业生产中冷却水的使用, 降低生产成本, 提高燃料乙醇工业生产的经济效益提供了参考。

参考文献

- [1] Madhavan A, Srivastava A, Kondo A, et al. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Critical Review in Biotechnology, 2012, 32(1): 22-48
- [2] Li HX, Zhang XR, Shen Y, et al. Inhibitors and their effects on *Saccharomyces cerevisiae* and relevant countermeasures in bioprocess of ethanol production from lignocellulose-a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2009, 25(9): 1321-1328 (in Chinese)
李洪兴, 张笑然, 沈煜, 等. 纤维素乙醇生物加工过程中的抑制物对酿酒酵母的影响及应对措施[J]. 生物工程学报, 2009, 25(9): 1321-1328
- [3] Zhao XQ, Bai FW. Mechanism of yeast ethanol tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 144(1): 23-30
- [4] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013, 6(1): 151
- [5] Costa DA, de Souza CJ, Costa PS, et al. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(8): 3829-3840
- [6] Abdel-Banat BM, Hoshida H, Ano A, et al. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(4): 861-867
- [7] Liu XJ, Zhang HF, Fu ML, et al. Research progress in *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar proteinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(12): 377-379 (in Chinese)
刘晓杰, 章海峰, 傅明亮, 等. 酵母液泡蛋白酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2010, 31(12): 377-379
- [8] Moehle CM, Tizard R, Lemmon SK, et al. Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases[J]. Molecular and Cellular Biology, 1987, 7(12): 4390-4399
- [9] Naik RR, Nebes V, Jones EW. Regulation of the proteinase B structural gene *PRB1* in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(5): 1469-1474
- [10] Feng Y, Xu TY, Cai J, et al. Effect of deficiency of vacuolar proteinase-A in *Saccharomyces cerevisiae* on its oxidative stress[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013(2): 13-18 (in Chinese)
冯宇, 徐滕洋, 蔡瑾, 等. 蛋白酶 A 敲除对酿酒酵母抗氧化性的影响[J]. 中国食品学报, 2013(2): 13-18
- [11] Dumond H, Danielou N, Pinto M, et al. A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂- stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast[J]. Molecular Microbiology, 2000, 36(4): 830-845
- [12] Wu CY, Bird AJ, Chung LM, et al. Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 370
- [13] Xue Y, Vashisht AA, Tan Y, et al. *PRB1* is required for clipping of the histone H3 N terminal tail in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e90496
- [14] He LY, Zhao XQ, Bai FW. Engineering industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with the FLO1-derivative gene isolated from the flocculating yeast SPSC01 for constitutive flocculation and fuel ethanol production[J]. Applied Energy, 2012, 100: 33-40
- [15] Zhang JN, He XP, Guo XN, et al. Genetically modified industrial breing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 21(6): 942-946 (in Chinese)
张吉娜, 何秀萍, 郭雪娜, 等. 低双乙酰抗老化啤酒酵母工程菌的构建[J]. 生物工程学报, 2006, 21(6): 942-946
- [16] He LY, Zhao XQ, Ge XM, et al. Identification and functional study of a new *FLO10*-derivative gene from the industrial flocculating yeast SPSC01[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(8): 1135-1140
- [17] Voth WP, Richards JD, Shaw JM, et al. Yeast vectors for integration at the HO locus[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): e59
- [18] Xu GH, Zhao XQ, Li N, et al. Improvent of acetic acid tolerance of self-flocculating yeast by zinc supplementation[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2012, 63(6): 1823-1829 (in Chinese)
徐桂红, 赵心清, 李宁, 等. 锌离子提高絮凝酵母乙酸胁迫耐受性[J]. 化工学报, 2012, 63(6): 1823-1829
- [19] Aldiguer AS, Alfenore S, Cameleyre X, et al. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2004, 26(4): 217-222
- [20] Friant S, Meier KD, Riezman H. Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction[J]. EMBO Journal, 2003, 22(15): 3783-3791
- [21] Wolf DH, Ehmann C. Studies on a proteinase B mutant of yeast[J]. European Journal of Biochemistry, 1979, 98(2): 375-384
- [22] Hirsch HH, Schiffer HH, Wolf DH. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome) Proteinase yscB contributes molecularly and kinetically to vacuolar hydrolase-precursor maturation[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 207(3): 867-876
- [23] Chiang HL, Schekman R, Hamamoto S. Selective uptake of cytosolic, peroxisomal, and plasma membrane proteins into the yeast lysosome for degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(17): 9934-9941
- [24] van Den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Winther JR. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases[J]. Yeast, 1996, 12(1): 1-16