

## 酿酒酵母表面展示金属硫蛋白吸附葡萄酒中的铜离子

黄蓉<sup>1</sup>, 吕林灿<sup>1</sup>, 李莹<sup>1</sup>, 张阳<sup>2</sup>, 刘延琳<sup>1</sup>, 宋育阳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学葡萄酒学院 陕西杨凌 712100

<sup>2</sup>茅台学院 贵州仁怀 564500)

**摘要** 在葡萄酒酿造过程中,过量的铜会抑制发酵,导致葡萄酒发生氧化褐变。金属硫蛋白是一类半胱氨酸含量高,分子量低,可被金属诱导表达的蛋白质。利用细胞表面展示技术来展示金属硫蛋白,可在很大程度上规避金属离子跨膜的问题,降低重金属对细胞造成的损伤。本研究将来自于酿酒酵母 288c 菌株的金属硫蛋白基因 *CUPI* 在酿酒酵母细胞表面展示,成功获得 1 株对葡萄酒中铜离子具有较高吸附力的二倍体菌株。为解决葡萄酒中铜破败问题提供新思路,为实现 *CUPI* 金属硫蛋白全细胞吸附剂的工业化应用奠定理论基础。

**关键词** 金属硫蛋白; 铜离子吸附; 酵母表面展示; 酿酒酵母; 葡萄酒

文章编号 1009-7848(2022)07-0031-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.07.003

铜是葡萄酒产业中最受关注的一类重金属,对葡萄酒的品质影响很大。欧盟和南非规定葡萄酒中的铜含量不得超过 20 mg/L,葡萄酒中不得超过 1 mg/L<sup>[1-2]</sup>。然而,13%的葡萄和 18%的葡萄酒都存在铜残留量超标的现象。铜元素在低浓度范围,对葡萄酒发酵有积极的影响<sup>[3]</sup>,而过量的铜会抑制细胞的代谢活动,甚至可能产生毒性<sup>[4]</sup>。研究发现高浓度铜会导致发酵延迟,并降低酒精产量<sup>[5-6]</sup>。除此之外,铜还影响酒精发酵的副产物。适量的铜离子使葡萄酒中的硫化氢生成量减少,过量则会促进硫化氢的生成<sup>[7]</sup>,增加发酵中糖和挥发酸的残留量<sup>[6]</sup>,并加速葡萄酒中多酚类物质的氧化速率,最终导致葡萄酒质量下降<sup>[8]</sup>。总之,铜影响酿酒酵母的活性,继而影响葡萄酒的整个发酵过程。在人体内,铜主要由胃肠道吸收,并随部分粪便排出体外,其余的被转运至肝脏中<sup>[9]</sup>。若铜摄入过多,就会影响动物肝脏、肾脏的正常形态与功能,扰乱其氧化-还原平衡,还会导致人体脑组织抗氧化功能受损<sup>[10]</sup>。

随着葡萄酒工艺的改良,现阶段针对葡萄酒铜破败的主要解决办法是通过添加“下胶剂”下胶、过滤去除。而下胶过程比较复杂,下胶剂的用量不易精准判断,存在“下胶不完全”或“下胶过量”的现象,其残留物也会危害到人体健康,污染环境,影响葡萄酒的感官品质和香气质量<sup>[11-12]</sup>。近几年,研究人员发现酿酒酵母对重金属有很好的吸附作用。采用酿酒酵母吸附重金属,具有廉价、安全、高效、来源稳定等特点,在重金属生物吸附方面,具有较大潜力。葡萄酒酿制过程中,酿酒酵母进行酒精发酵的同时,去除多余的铜离子,不仅能确保葡萄酒的安全性和质量,也有助于保留葡萄酒原本的颜色和风味<sup>[12]</sup>,并对环境没有恶劣影响。

金属硫蛋白(通常简称 MT)是生物体内普遍存在的一种重要的生命物质,其定义为一类低分子量,高巯基,能结合金属离子,性能独特的蛋白质<sup>[13]</sup>。到目前为止,人们已从哺乳动物、植物和微生物等多种生物体内分离、提纯得到金属硫蛋白<sup>[14-15]</sup>,并发现它能吸附镉,还有锌、铜、汞等离子。金属硫蛋白的生物学意义涉及生物机体微量元素贮存、运输和代谢、重金属解毒、自由基清除以及机体生长发育、生殖衰老、免疫抵抗等各个方面,关于它的研究也涉及农业、医药保健、生物工程、环境保护、化妆品研发等各个领域<sup>[16]</sup>。

本研究以酿酒酵母 (*Saccharomyces*

收稿日期: 2021-07-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1002500); 国家自然科学基金项目(31501463); 国家现代农业(葡萄)产业技术体系建设专项(CARS-29-jg-03)

作者简介: 黄蓉(1998—),女,硕士生

通信作者: 宋育阳 E-mail: yuyangsong@nwsuaf.edu.cn

*cerevisiae*)288c 为金属硫蛋白 *CUP1* 的供体,利用酵母细胞表面展示技术表达并附着在酿酒酵母二倍体 82-9-35 的细胞表面,以期在酿酒酵母发酵过程中,吸附葡萄酒中的铜离子,并最终随酵母菌体一起被过滤掉,从而达到去除葡萄酒中铜离子的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物 以酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)288C(*MA $\alpha$* ; *SUC2*; *gal2*; *mal*; *mel*; *Flo1*; *flo8-1*; *hap1*; *ho*; *bio1*; *bio6*)基因组为模板,宿主菌株为酿酒酵母二倍体 (*S. cerevisiae*

82-9-35)菌株(实验室前期分离得到,*his3 $\Delta$ 1*,为SD-Ura 缺陷性酵母),这2株菌均为实验室保存。试验中对酿酒酵母 *S. cerevisiae* 82-9-35 进行改造,获得重组菌株二倍体酿酒酵母(*S. cerevisiae* 82-9-35-CUP1)。大肠杆菌(*E.coli*)DH5 $\alpha$ ,南京诺唯赞生物科技有限公司。出发质粒 GAP- $\alpha$ -factor-EGII-Sed1 为实验室前期构建的质粒,包含启动子 GAP,信号肽  $\alpha$ -factor,锚定蛋白 Sed1 和目的蛋白 EGII;因为金属硫蛋白 *CUP1* 的催化活性位点在 C 末端,所以需将原质粒的锚定蛋白替换为 C 末端结合的锚定蛋白 *Flo1p*,目标蛋白替换为 *CUP1*,即构建出酵母表面展示金属硫蛋白的重组质粒 GAP- $\alpha$ -factor-*Flo1p*-*CUP1*。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>CUP1</i> -f	AAATCACCAGCTCTGGTGGTGGTGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCT
<i>CUP1</i> -r	ACCTTCGAAGGGCCCTCTAGATCATTCCAGAGCAGCATGAC

1.1.2 工具酶与主要试剂 0.4 mol/L 碳酸钠溶液、乳酸缓冲液 (pH 3.0)、0.4 mol/L 的三氯乙酸、0.5 mol/L 的氢氧化钠、10.00 mg/mL 酪素溶液、100  $\mu$ g/mL 酪氨酸标准溶液、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 mol/L 乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA, pH 8.0)、TE 缓冲液 (Tris-EDTA buffer solution)、氨卡青霉素 (Amp)、1 mol/L 山梨醇、酵母感受态制备处理液、酵母全营养培养基 (YPD)、尿嘧啶缺陷型合成葡萄糖基础培养基 (SD-URA)、Luria-Bertain (LB) 培养基和 LB-Amp 培养基的配制方法参照 Zhang 等<sup>[17]</sup>的方法。In-Fusion HD Cloning kits, DNA 凝胶纯化试剂盒、SD-Ura DO Supplement、Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye)、DNA Markers 和 DNA 限制性内切酶 (*Cla* I、*Xba*1、*Sma* I), 宝生物 (大连) 有限公司; Phanta® Super-Fidelity DNA Polymerase, 南京诺唯赞生物科技有限公司; DNA 提取液 (酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)、1 mol/L 二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT)、DNA 纯化试剂盒和酵母基础氮源 (YNB), 北京索莱宝科技有限公司; 引物的合成和 DNA 测序交

由上海生物工程有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 *CUP1* 目的蛋白和锚定蛋白基因的克隆 目标基因 *CUP1* 和 *Flo1* 均以酿酒酵母 288C 的基因组为模板,高保真酶 PCR 体系参照 Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书。对扩增后的 PCR 片段进行试剂盒纯化回收,得到目的蛋白基因 *CUP1* 片段和锚定蛋白基因 *Flo1* 片段,用于后续试验。

#### 1.2.2 酿酒酵母表面展示金属硫蛋白载体的构建

通过双酶切和 In-fusion 技术将锚定蛋白 *Flo1p* 和金属硫蛋白 *CUP1* 先后替换掉实验室前期构建好的质粒 GAP- $\alpha$ -factor-EGII-Sed1 中的 EGII 和 Sed1 蛋白,构建出金属硫蛋白的表面展示载体 GAP- $\alpha$ -factor-*Flo1p*-*CUP1*,展示系统构建流程如图 1 所示。

1.2.3 大肠杆菌转化 一步克隆连接的表达载体转化入 *E.coli* DH5 $\alpha$ ,涂布在 LB-Amp 固体平板上,37  $^{\circ}$ C 培养 12~14 h,挑取单菌落用 Taq 酶体系 (参考宝生物 (大连) 有限公司) 进行菌落 PCR 验证,引物为 *CUP1*-f 和 *CUP1*-r。将验证成功的大肠

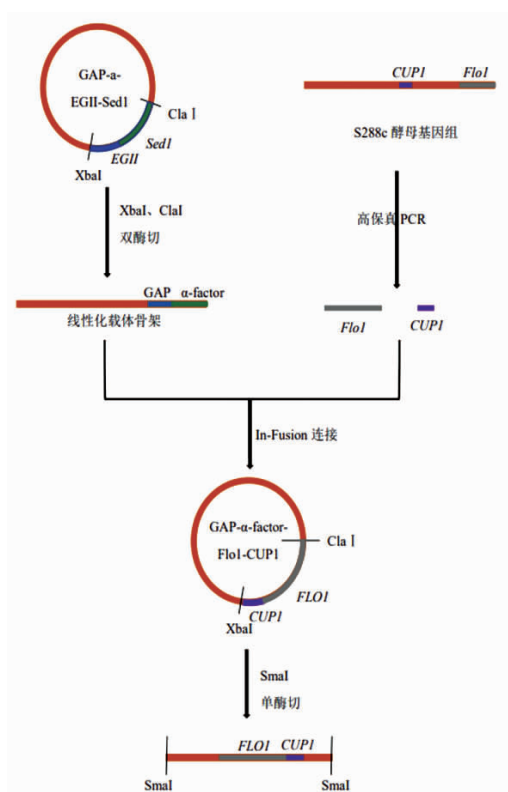


图 1 酵母表面展示系统构建流程图

Fig.1 Flow chart of construction of yeast surface display system

杆菌单菌落接种在 LB-Amp 液体培养基中,37 °C,180 r/min 振荡培养 12 h。

**1.2.4 目标酶基因插入酵母基因组** 用 OMEGA 质粒提取试剂盒提取大肠杆菌中含有 *CUP1* 的重组质粒,用 DNA 限制性快切酶 *Sma* I 单酶切后,进行试剂盒纯化回收。将回收后的 DNA 片段,转化至 SD-Ura 缺陷性酿酒酵母二倍体 82-9-35(目标片段依靠 His3 组氨酸同源臂与酵母基因组发生同源重组),后涂布在 SD-Ura 平板上,30 °C 恒温培养 48 h,挑取酵母单菌落进行酵母菌落 PCR 验证重组酵母。Taq 酶体系 PCR 验证引物为 *CUP1*-f 和 *CUP1*-r。

**1.2.5 铜离子测定方法** 采用分光光度法测定溶液中的铜离子浓度。在紫外分光光度计上设定波长 734.0 nm<sup>[18]</sup>。(1)用空白溶液,即 10 mmol/L EDTA 稀释铜离子溶液,制备浓度梯度为 0,2,4,6,8,10 mg/L 的标准溶液进样标定。(2)取菌液以 8 000 r/min 离心 3 min,收集上清液作为样品,测

量吸光度,每次测量做 3 次平行,最终结果取其平均值。数据处理和图片绘制由 office Excel 2016 和 Rstudio(64 位)完成。

**1.2.6 铜离子耐受性研究** 分别将重组菌(*S. cerevisiae* 82-9-35-CUP1)和原菌株(*S. cerevisiae* 82-9-35)接种在 YPD 液体培养基中,30 °C,200 r/min 条件下培养 16~18 h。血球计数板计数,以  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的接种量再分别接种在含铜离子的 YPD 液体培养基(铜离子质量浓度分别为 10,15,20,25,30 mg/L)中,30 °C,200 r/min 条件下培养。观察培养基状况,待低质量浓度铜离子的培养基混浊后,再通过血球计数板计数。对比不同质量浓度的铜离子,重组酵母在培养前、后的菌株数量变化,进行数据分析。

**1.2.7 细胞表面金属离子解析** 金属硫蛋白的重金属吸附平衡是一个动态平衡,它的吸附过程包括胞内吸附和胞外吸附 2 个过程。为研究金属硫蛋白在细胞表面表达后对酵母解析重金属能力的影响,将吸附平衡后的酵母菌用解析液,如 EDTA 或 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 解析处理<sup>[19]</sup>。Cu<sup>2+</sup>吸附平衡后,收集菌体,ddH<sub>2</sub>O 洗 3 次;10 mmol/L EDTA 在 30 °C,150 r/min 条件下解析 1 h;8 000 r/min 离心 3 min,取上清液。测量上清液中 Cu<sup>2+</sup>浓度,计算出上述试验中的稀释倍数,计算即得酵母表面金属离子解析浓度。结合 1.2.6 节的试验结果计算出单位菌体表面吸附铜离子的量,做解析后铜离子浓度的对比图和单位菌体表面吸附铜离子浓度对比图。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的构建

以酿酒酵母 288C 基因组为模板,PCR 扩增锚定蛋白基因 *Flo1*、金属硫蛋白基因 *CUP1* 经试剂盒纯化回收后,通过琼脂糖凝胶电泳验证,*Flo1* 基因片段长度为 3 264 bp,*CUP1* 基因片段长度为 291 bp,如图 2 和图 3 所示,所有片段长度均符合预期。在实验室前期已构建好的载体 GAP-α-EGII-Sed1 中,先、后插入锚定蛋白基因 *Flo1*、金属硫蛋白基因 *CUP1* 的金属硫蛋白表面展示载体。*Xba* I、*Cla* I 双酶切电泳结果如图 4 所示,有 2 个条带说明原质粒 GAP-α-factor-EGII-Sed1 线性化成功。重组质粒载体上有 *EcoR* I 位点,*Sph* I

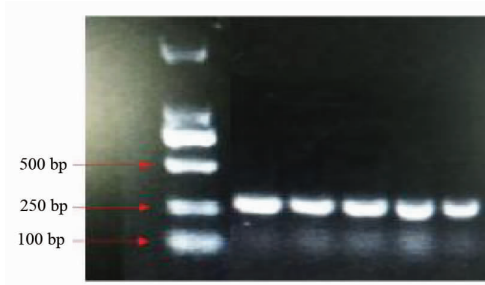


图2 *CUP1* 琼脂糖凝胶电泳验证  
Fig.2 *CUP1* agarose gel electrophoresis verification

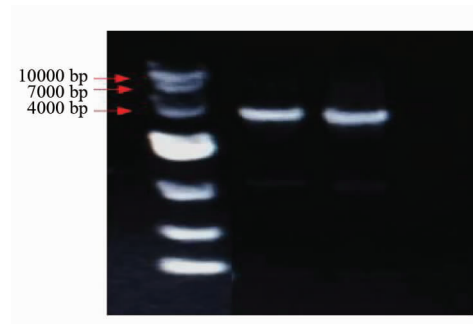


图3 *Flo1* 琼脂糖凝胶电泳验证  
Fig.3 *Flo1* agarose gel electrophoresis verification

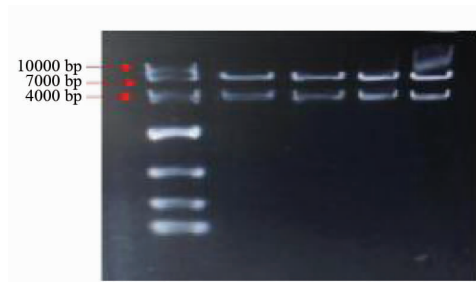


图4 *Xba* I、*Cla* I 双酶切验证  
Fig.4 *Xba* I and *Cla* I double enzyme digestion verification

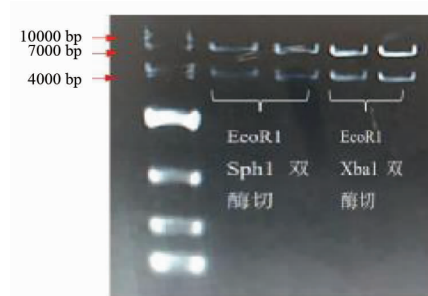


图5 重组质粒双酶切验证  
Fig.5 Recombinant plasmid double restriction digestion verification

位点和 *Xba* I 位点存在于目的基因和锚定蛋白基因上, 凝胶电泳结果图 5 显示 3 个酶切位点均已切开, 说明目的基因、锚定蛋白基因与原质粒载体三者成功相连, 重组质粒 GAP- $\alpha$ -factor-*Flo1p*-*CUP1* 构建成功。

### 2.2 电激转化酿酒酵母

图 6 凝胶中 7 000 bp 和 4 000 bp 处有 2 条条带, 与重组质粒含有 2 个 *Sma* I 位点的预期相同, 重组质粒已被线性化。参考文献[20]的方法制备酵母感受态并进行酵母电转化。将转化子划线在 YPD 和 SD-Ura 平板上, 恒温 30 ℃, 培养 48 h 后, 进行菌落 PCR 验证, 验证引物为 *CUP1*-f 和 *CUP1*-r。

### 2.3 铜离子吸附验证

设置紫外分光光度计在 734.0 nm 波长处测

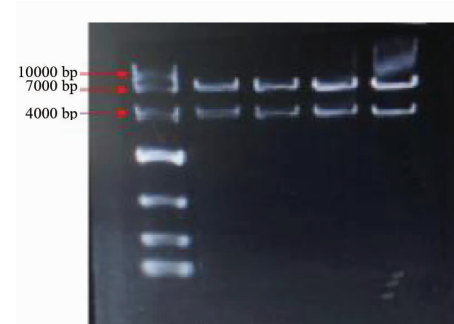


图6 *Sma* I 单酶切验证  
Fig.6 *Sma* I single restriction digestion verification

量铜离子标准溶液进行标定, 处理结果得出一元线性回归公式为:  $y=0.0025x+0.0635, R^2=0.9809$ , 并绘制一元线性回归曲线。

表2 铜离子标准曲线  
Table 2 Copper ion standard curve

初始铜离子质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0	2	4	6	8	10
OD 值 (734.0 nm)	0.0640	0.0697	0.0727	0.0767	0.0837	0.0903

注: \* 数据为 3 次测定的平均值; 结果是重复试验的平均值。



2.3.1 铜离子耐受性研究 最后一次接种后, 试验组和对照组酵母培养约 36 h, 从图中可明显看出, 整体上酿酒酵母的生长随浓度呈上升趋势, 说明一定浓度下的铜离子对酵母生长有促进作用。

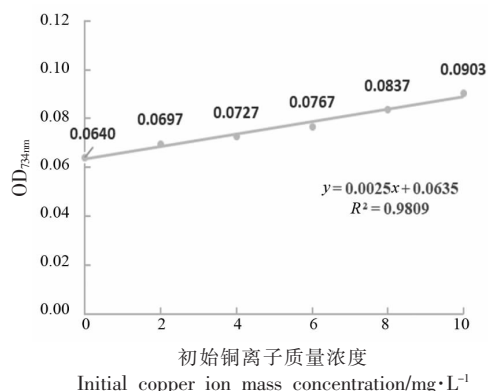
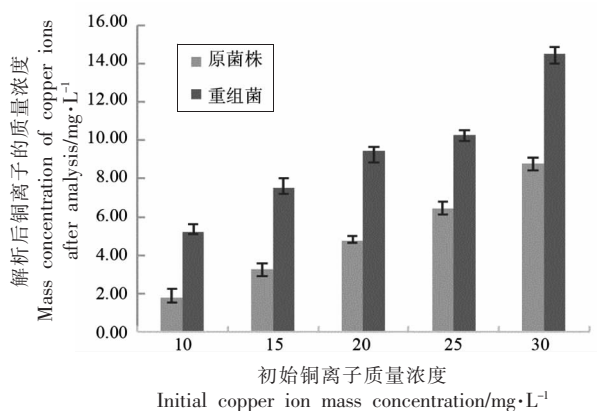


图7 铜离子标定回归曲线

Fig.7 Regression curve of copper ion calibration

2.3.2 细胞表面金属离子解析 根据图7的回归曲线和稀释倍数(2倍), 由吸光度  $A$  计算解析后的铜离子浓度, 结果与图8中试验结果相除得到单位菌体表面吸附的铜离子量。从图9、图10和表3可知, 重组菌株表面的解析浓度要明显高于对照组, 说明金属硫蛋白的表面展示显著提高了

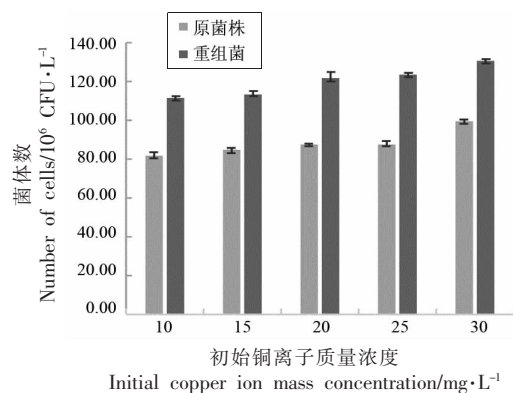


注: 数据为3次测定的平均值; 结果是重复试验的平均值, 误差线表示标准偏差 ( $P < 0.05$ )。

图9 解析后铜离子浓度的统计图

Fig.9 Statistical graph of copper ion concentration after analysis

且重组菌(*S. cerevisiae* 82-9-35-CUP1)的生长状况明显优于原菌株(*S. cerevisiae* 82-9-35), 与试验前预测: 金属硫蛋白的表面展示可提高酵母菌的重金属耐受性相符合。

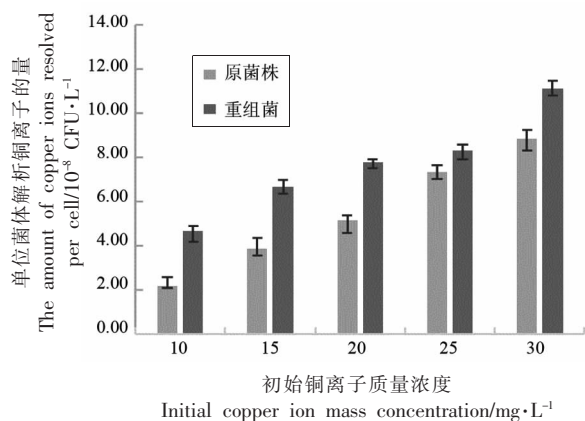


注: 数据为3次测定的平均值; 结果是重复试验的平均值, 误差线表示标准偏差 ( $P < 0.05$ )。

图8 铜离子耐受性曲线

Fig.8 Copper ion tolerance curve

酵母的胞外吸附能力, 且单位菌体的吸附量也随铜离子浓度的增加而增加, 可能由于酵母菌细胞内吸附铜离子速度远慢于细胞外吸附, 而导致更高浓度的铜离子环境下酵母表面更容易堆积铜离子所致。



注: 数据为3次测定的平均值; 结果是重复试验的平均值, 误差线表示标准偏差 ( $P < 0.05$ )。

图10 单位菌体表面吸附铜离子统计图

Fig.10 Statistical graph of adsorption of copper ions on the surface of a unit cell

表3 酵母表面铜离子解析试验结果

Table 3 Analysis results of copper ions on the surface of yeast

菌株	初始铜离子质量 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	吸光度 $A^*$	解析后铜离子 浓度 $^*/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	单位菌体表面吸附 铜离子量 $^*/10^{-8}\text{mg}\cdot\text{CFU}^{-1}$
原菌株 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35)	10.000	0.0679	1.77	2.1648
原菌株 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35)	15.000	0.0717	3.27	3.8584
原菌株 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35)	20.000	0.0754	4.76	5.1412
原菌株 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35)	25.000	0.0795	6.41	7.3156
原菌株 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35)	30.000	0.0854	8.77	8.8101
重组菌 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35-CUP1)	10.000	0.0765	5.21	4.6686
重组菌 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35-CUP1)	15.000	0.0823	7.59	6.6304
重组菌 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35-CUP1)	20.000	0.0871	9.45	7.7752
重组菌 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35-CUP1)	25.000	0.0891	10.24	8.2803
重组菌 ( <i>S. cerevisiae</i> 82-9-35-CUP1)	30.000	0.0997	14.48	11.0087

注:\*. 数据为3次测定的平均值;结果是重复试验的平均值。

### 3 讨论

酵母表面展示技术 (Yeast surface display, YSD) 是一种将蛋白质自动固定在酵母细胞表面的技术,研究已成功地将不同的酶,如纤维素酶、脂肪酶和金属结合肽蛋白等固定在细胞表面,通过生物自身的代谢,最大限度地提高各种蛋白质的产量和活性<sup>[21-23]</sup>。酵母菌株全细胞在生物催化过程中具有多种优势:所需的反应条件温和,具有立体选择转化的能力,而无需添加昂贵的外部辅因子,生物催化剂易于回收,产生的废弃污染物少,而且具有在难以穿透细胞或蛋白质固定化的底物上催化反应的可能性<sup>[22,24-25]</sup>。因此,它提供了在不利的介质中进行反应的机会,并增加了异源蛋白对 pH 值、温度、有机溶剂或蛋白酶的稳定性,可以最大程度地减少或完全避免酶对产品的污染,甚至可以改善其动力学性能<sup>[26]</sup>。除此之外,pH 值对金属硫蛋白的金属吸附也有很大的影响<sup>[27]</sup>。金属硫蛋白在低 pH 值条件下很稳定,然而当 pH 值调至中性时,金属硫蛋白分子间发生二硫交联,形成大分子聚合物,对金属吸附能力产生影响<sup>[28]</sup>,温度等则会对其吸附金属时的化学反应效率产生影响<sup>[29]</sup>。Kao 等<sup>[30]</sup>通过将金属硫蛋白分别表达在大肠杆菌细胞质和细胞周质中,发现表达位置对细胞金属吸附能力的提高有一定影响,细胞周质提高细胞吸附性的幅度更大。酵母细胞表面展示金属硫蛋白可以提高酵母的重金属吸附能力,金属硫蛋白在表面快速的吸附重金属离子后,便依赖于

宿主细胞的代谢,进行缓慢的胞内累积过程<sup>[31]</sup>,故而相较于在细胞内过表达金属硫蛋白,以提高细胞对金属离子的吸附能力,细胞表面展示具有更大的优势,不仅它本身可以吸附金属,还能提高重组菌吸附金属的能力和金属耐受性。

在酵母表面展示蛋白质,展示效率可能在很大程度上取决于目标肽/蛋白质的大小和性质<sup>[32]</sup>、锚长度和间隔、连接区的位置<sup>[33]</sup>、锚定蛋白本身的性质和启动子的影响<sup>[34]</sup>。启动子作为转录调控的重要元件,可显著影响目标基因所转录的 mRNA 的丰度以及 mRNA 的降解速率等,进而影响目标蛋白在宿主中的表达<sup>[35]</sup>。为了提高细胞表面展示效率,不仅需要根据目标蛋白选择合适的锚固系统,还需要增加表面展示基因表达盒的拷贝数,并且实现宿主二倍体化<sup>[36]</sup>。如 Yamada 等<sup>[37]</sup>报道,当表面展示纤维素酶的工程酵母菌株通过交配进行二倍化并评估其乙醇发酵性能时,观察到乙醇产率增加约 2.5 倍。在本试验中为了提高展示效率,构建了高拷贝质粒 GAP- $\alpha$ -factor-*Flo1p*-*CUP1*,选择了强启动子 GAP 和二倍体酿酒酵母宿主,这是由于与单倍体菌株相比,二倍体菌株具有更高的细胞生长速率,细胞产量和对各种胁迫的耐受性。同时为了简化工艺,降低成本,试验选择具有絮凝功能的 *Flo1p* 蛋白作为锚定蛋白,在发酵结束后,酵母细胞间相互黏连形成絮凝颗粒沉积到罐底,有利于实现发酵液和沉积物的分离。

截至目前,酿酒酵母表达异源蛋白使用最多

的信号肽是依然是  $\alpha$ -factor 信号肽<sup>[38]</sup>。 $\alpha$ -factor 信号肽不仅含有 1 个靶向内质网信号肽(19 aa), 还包含有 1 个前导区(66 aa)。在内质网腔中, 靶向内质网信号肽被切除, 形成囊泡转运至高尔基体, 在高尔基体中, 再由 Kex2 内肽酶剪切羧基端肽键释放前导区, 形成具有功能的蛋白质, 最终在囊泡包裹下抵达细胞外并发挥蛋白功能<sup>[39]</sup>。 $\alpha$ -factor 信号肽帮助蛋白质穿膜引导外源蛋白在酵母中的分泌表达, 其有利于重组菌的筛选和表达<sup>[34]</sup>。基于以上因素, 为了确保从表达盒产生的包含金属硫蛋白的融合蛋白能够通过细胞机制正确地定向到细胞表面, 本研究引入了  $\alpha$ -factor 信号肽。

#### 4 结论

本试验以金属硫蛋白基因 *CUP1* 为目的基因, *Flo1* 为锚定蛋白基因, 通过酵母表面展示技术搭建了酿酒酵母表面展示系统, 并成功在细胞表面表达。使酵母菌作为铜离子吸附剂的效率更高, 同时监测重组酵母的生长发现, 表面展示 *CUP1* 并没有对宿主菌株造成代谢压力而对其生长造成不利影响。探索了重组酵母关于铜离子的耐受性以及铜离子的吸附力, 最终结果表明, 金属硫蛋白的表面展示对提高酵母菌铜离子耐受性和胞外铜离子吸附能力有显著效果。

#### 参 考 文 献

- [1] CONVERSA G, MIEDICO O, CHIARAVALLE E, et al. Heavy metal contents in green spears of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) grown in Southern Italy: Variability among farms, genotypes and effect of soil mycorrhizal inoculation[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256(108559): 12.
- [2] GARCIA-ESPARZA M A, CAPRI E, PIRZADEH P, et al. Copper content of grape and wine from Italian farms[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2006, 23(3): 274-280.
- [3] AZENHA M, VASCONCELOS M T, MORADAS-FERREIRA P. The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2000, 90(2): 163-167.
- [4] PACHEU-GRAU D, WASILEWSKI M, OELJEKLAUS S, et al. COA6 facilitates cytochrome c oxidase biogenesis as thiol-reductase for copper metallochaperones in mitochondria [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(7): 2067-2079.
- [5] SUN X, LIU L, ZHAO Y, et al. Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 43-52.
- [6] LIU X, JIA B, SUN X, et al. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(4): M800-M808.
- [7] 刘富兵, 殷向静, 何娟, 等. 铜离子对葡萄酒发酵中硫化氢产量的影响[J]. *酿酒科技*, 2012(7): 17-19.
- [8] LIU F B, YIN X J, HE J, et al. Effects of copper ions on hydrogen sulfide production in the fermentation of grape wine[J]. *Liquor-making Science & Technology*, 2012(7): 17-19.
- [9] JIA B, LIU X, ZHAN J, et al. The effect of proanthocyanidins on growth and alcoholic fermentation of wine yeast under copper stress[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(6): 1319-1324.
- [10] KOMAREK M, VANEK R, MRNKA R, et al. Potential and drawbacks of EDSS-enhanced phytoextraction of copper from contaminated soils[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(7): 2428-2438.
- [11] ALIZADEH S, AGHDAMI N, SEYEDALIPOUR B, et al. Investigation the effect of copper nanoparticles on the toxicity and migration of keratinocyte cells[J]. *Tehran University Medical Journal*, 2018, 76(8): 543-549.
- [12] SUN X Y, NIU Y X, MA T T, et al. Determination, content analysis and removal efficiency of fining agents on ochratoxin A in Chinese wines[J]. *Food Control*, 2016, 73(9): 382-392.
- [13] SUN X Y, MA T T, HAN L Y, et al. Effects of copper pollution on the phenolic compound content, color, and antioxidant activity of wine[J]. *Molecules*, 2017, 22(5): 726.
- [14] DONG G, CHEN H, QI M, et al. Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11(3): 1582-

- 1586.
- [14] 励建荣, 宣伟, 李学鹏, 等. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 392-396.  
LI J R, XUAN W, LI X P, et al. Research progress in metallothionein[J]. Food Science, 2010, 31(17): 392-396.
- [15] 朱容娴, 颜瑶, 刘忠渊, 等. 重组金属硫蛋白 HcMT 的原核表达及其与金属离子竞争反应[J]. 生物技术, 2019, 29(6): 533.  
ZHU R X, YAN Y, LIU Z Y, et al. Prokaryotic expression of recombinant metallothionein HcMT and its competitive reaction with metal ions [J]. Biotechnology, 2019, 29(6): 533.
- [16] 朱丽梅, 李伟, 张志焱, 等. 益生菌诱导合成金属硫蛋白以及对自由基清除率和安全性研究[J]. 饲料与畜牧, 2013(5): 50-52.  
ZHU L M, LI W, ZHANG Z Y, et al. Induced synthesis of metallothionein by probiotics and research on free radical scavenging rate and safety [J]. Feed and Livestock, 2013(5): 50-52.
- [17] ZHANG Y, MIN Z, QIN Y, et al. Efficient display of *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase on *Saccharomyces cerevisiae* cell wall for aroma enhancement in wine [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2019, 67(18): 5169-5176.
- [18] 骆治昊, 田芬, 韦宇拓. 铜离子耐受菌的筛选及其吸附特性研究[J]. 广西科学, 2020, 27(1): 57-64.  
LUO Z H, TIAN F, WEI Y T. Study on screening and adsorption characteristics of copper ion resistance bacteria[J]. Guangxi Sciences, 2020, 27(1): 57-64.
- [19] TAO H C, LI P S, LIU Q S, et al. Surface - engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells displaying redesigned CadR for enhancement of adsorption of cadmium (II)[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016, 91(6): 1889-1895.
- [20] 谢文平. 代谢工程改造酿酒酵母生物合成类胡萝卜素的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.  
XIE W P. Metabolic engineering modification of carotenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [21] KOUICHI, KURODA, MITSUYOSHI, et al. Arming technology in yeast -novel strategy for whole -cell biocatalyst and protein engineering[J]. Biomolecules, 2013, 3(4): 632-650.
- [22] TSUTOMU T, AKIHIKO K. Cell-surface display of enzymes by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for synthetic biology[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15(1): 1-9.
- [23] UEDA M. Establishment of cell surface engineering and its development[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2016, 80(7): 1-11.
- [24] HEUX S, MEYNIAL-SALLES I, O'DONOHUE M J, et al. White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining[J]. Biotechnology Advances: An International Review Journal, 2015, 33(8): 1653-1670.
- [25] ANDREU C, DEL OLMO M L. Potential of some yeast strains in the stereoselective synthesis of (R)-(-)-phenylacetylcarbinol and (S)-(+) -phenylacetylcarbinol and their reduced 1,2-dialcohol derivatives[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(13): 5901-5913.
- [26] HARTMANN M, KOSTROV X. ChemInform abstract: Immobilization of enzymes on porous silicas &mdash; benefits and challenges [J]. Cheminform, 2013, 44(39): 6277-6289.
- [27] MIAO L, WANG C, HOU J, et al. Effects of pH and natural organic matter (NOM) on the adsorptive removal of CuO nanoparticles by periphyton [J]. Environmental Science & Pollution Research, 2015, 22(10): 7696-7704.
- [28] JAYAWARDENA D P, HEINEMANN I U, STILLMAN M J. Zinc binds non-cooperatively to human liver metallothionein 2a at physiological pH [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(1): 650-653.
- [29] SAYERS Z, BROUILLON P, VORGIAS C E, et al. Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant protein [J]. European Journal of Biochemistry, 2010, 212(2): 521-528.
- [30] KAO W C, CHIU Y P, CHANG C C, et al. Localization effect on the metal biosorption capability of recombinant mammalian and fish metallothioneins in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology Progress, 2010, 22(5): 1256-1264.
- [31] LI P S, TAO H C. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2015, 41(2): 140-149.



- [32] YANG N, YU Z, JIA D, et al. The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2014, 98(7): 2897–2905.
- [33] LIU Y, ZHANG R, LIAN Z. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications[J]. *Journal of molecular catalysis, B. Enzymatic*, 2014, 106(8): 17–25.
- [34] INOKUMA K, HASUNUMA T, KONDO A. Efficient yeast cell-surface display of exo- and endo-cellulase using the SED1 anchoring region and its original promoter[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1–11.
- [35] AHMAD M, HIRZ M, PICHLER H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5301–5317.
- [36] YAMADA R, TANAKA T, OGINO C, et al. Novel strategy for yeast construction using  $\delta$ -integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 85(5): 1491–1498.
- [37] YAMADA R, TANIGUCHI N, TANAKA T, et al. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 8.
- [13] HOU J, KEITH E J T, LIU ZH, et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Yeast Research*, 2012, 12(5): 491–510.
- [39] LESAGE G, PRAT A, LACOMBE J, et al. The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11(6): 1947–1957.

### The Adsorption of Copper Ions in Wine by Displaying Metallothionein on the Surface of *Saccharomyces cerevisiae*

Huang Rong<sup>1</sup>, Lü Lincan<sup>1</sup>, Li Ying<sup>1</sup>, Zhang Yang<sup>2</sup>, Liu Yanlin<sup>1</sup>, Song Yuyang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Enology, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi

<sup>2</sup>Moutai Institute, Renhuai 564500, Guizhou)

**Abstract** During the winemaking process, excessive copper has the effect of inhibiting fermentation, causing oxidative browning of wine. Metallothionein is a type of protein with high cysteine content and low molecular weight that can be induced by metals. The use of cell surface display technology to express that metallothionein can largely avoid the problem of metal ions transmembrane and reduce the damage of heavy metals to cells. In this study, the metallothionein gene *CUPI* from *Saccharomyces cerevisiae* 288c was displayed on the surface of *S. cerevisiae* cells, and a diploid strain with higher adsorption capacity for copper ions in wine was successfully obtained. The research can provide new ideas for solving the problem of copper in wine and lay a theoretical foundation for the industrial application of *CUPI* metallothionein whole-cell adsorbent.

**Keywords** metallothionein; copper ion adsorption; cell surface display; *Saccharomyces cerevisiae*; wine