

## 东方伊萨酵母羧酸转运蛋白基因的表达及功能验证

孙广玲<sup>1</sup>, 刘俊丽<sup>1</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 刘雨新<sup>1</sup>, 姜娇<sup>1,2,3</sup>, 宋育阳<sup>1,2,3\*</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>西北农林科技大学合阳葡萄试验示范站 陕西合阳 715300

<sup>3</sup>西北农林科技大学宁夏贺兰山东麓葡萄酒试验示范站 宁夏永宁 750104)

**摘要** 生物降酸是现代果酒绿色酿造的重要发展方向,目前关于部分羧酸转运蛋白及其转运调控机制仍不完整,严重限制了高效降酸菌株的定向选育。本试验以 1 株自主筛选的具有良好降酸能力的东方伊萨酵母 GS1-1 为材料,对其羧酸转运蛋白基因进行表达及功能验证。首先,利用 NCBI 上已有东方伊萨酵母基因组序列与被证明为不同羧酸转运蛋白的编码基因进行 BLAST 比对,获得 5 条候选羧酸转运蛋白基因,利用生物信息学进行基因比对、跨膜螺旋预测、构建系统进化树,并采用绿色荧光蛋白定位。构建单倍体酿酒酵母 BY4741 *ADY2*、*JEN1* 羧酸转运蛋白双缺失工程菌,将含候选片段的质粒在酿酒酵母中进行表型验证及特异性验证,发现目的片段 4 (OUT23260.1) 为苹果酸羧酸转运蛋白,目的片段 1 (XP\_029319440.1) 是柠檬酸转运蛋白,目的片段发挥功能区域定位于酵母细胞膜上。本研究为探索发酵工程领域中非酿酒酵母降酸机理提供参考。

**关键词** 非酿酒酵母; 绿色荧光蛋白; 醋酸锂转化法; Cre-LoxP 系统; 有机酸

**文章编号** 1009-7848(2023)02-0048-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.02.005

羧酸是糖酵解和三羧酸循环等中央代谢途径的中间体,在所有细胞的代谢中起着关键作用。酵母羧酸代谢的研究在食品以及制药和生物医学等行业均非常重要<sup>[1-2]</sup>,其中关于羧酸转运蛋白的探究更是酵母羧酸代谢研究的关键环节。

酵母羧酸转运蛋白虽有很长的研究历史,但主要集中于一元酸和二元酸的转运方面,关于三羧酸转运体方面的研究目前仍相对欠缺。首个乳酸摄取转运蛋白在产假假丝酵母(*Candida utilis*)<sup>[3]</sup>和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[4]</sup>中被发现,相关基因被命名为 *JEN1*<sup>[5]</sup>,经绿色荧光蛋白定位,发现其在酵母细胞膜上发挥功能且受葡萄糖抑制<sup>[6]</sup>,且转录因子 Sok2p 也参与其调控<sup>[7]</sup>。其次从乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)中鉴定出两个 *JEN1* 同源物,一个编码单羧酸乳酸和丙酮酸的单羧酸转运蛋白(*KIJEN1*),另一个编码二元羧

酸苹果酸和琥珀酸的二羧酸转运蛋白(*KIJEN1*)<sup>[8-9]</sup>,在白色念珠菌(*Candida albicans*)中也存在类似的转运蛋白<sup>[10]</sup>。这些 *JEN1* 同源物的系统发育分析表明羧酸转运蛋白存在两个功能簇,分别包含功能特征的单羧酸和二羧酸两种功能的转运蛋白<sup>[1-2]</sup>。近几年,发现解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)编码的 6 个 *JEN* 家族基因序列与单羧酸、二羧酸和三羧酸(乳酸、丙酮酸、富马酸、苹果酸、琥珀酸和柠檬酸)的转运均有关系<sup>[11]</sup>。毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)存在两种 PkJEN 蛋白均具有转运二元羧酸的功能,可有效将琥珀酸、富马酸和 L-苹果酸等羧酸导入细胞<sup>[12]</sup>。另外,在 1986 年 Osothsilp 等<sup>[13]</sup>于粟酒裂殖酵母中第一次发现酵母中存在苹果酸转运蛋白。酵母中羧酸渗透酶基因命名为 *MAE1*<sup>[14]</sup>。解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)的 *Gpr1* (TC 2.A.96.1.2) 是第一个在酵母中鉴定的 AceTr 家族成员<sup>[15]</sup>,研究显示与乙酸敏感性、细胞和菌落形态、细胞寿命有关<sup>[16]</sup>,转录受葡萄糖抑制,通过荧光显微镜定位在质膜上<sup>[17]</sup>。然而,酵母中关于柠檬酸转运体的研究较少,Cássio 等<sup>[18-19]</sup>在 1991 年首次在产假假丝酵母中发现柠檬酸的高亲和力和低亲和力转运系统。虽并未对其进行基因定位,但研究证明转运系统受到葡萄糖抑制。解脂耶氏酵

收稿日期: 2022-02-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1002500); 宁夏回族自治区重大研发计划项目(2020BCF01003); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目(TGZX2019-27)

第一作者: 孙广玲,女,硕士生

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

母中同样发现了可将柠檬酸转进胞内的柠檬酸转运蛋白<sup>[11]</sup>。近期,在毕赤酵母中发现 PJEN2-2 蛋白的 392WCVQGGLGVVPS 403 片段具有明显的柠檬酸转运活性<sup>[12]</sup>。以上的研究结果均表明非酿酒酵母中羧酸转运蛋白依旧存在巨大的探索空间。

东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)是一种非酿酒酵母,可以在高酸条件下生长,并被用于生产各种有机酸<sup>[20-22]</sup>,并且以东方伊萨酵母为基础模型研究遗传工具箱等研究也有了一定的进展。前期筛选获得的东方伊萨酵母具有良好降酸能力<sup>[23]</sup>,可应用于猕猴桃、柑橘、山楂等高酸果酒的酿造。基于酿酒微生物的生物降酸方法,因其具有对酒质负面影响小、成本低、操作简单等特点,受到果酒酿造行业的高度关注,是现代果酒绿色酿造的重要发展方向。如今,生物信息学已经成为动植

物<sup>[25]</sup>、真菌<sup>[26]</sup>以及人类<sup>[27-28]</sup>乃至细菌和病毒<sup>[29]</sup>等分子机制研究的热点分析工具。本文利用生物信息学技术手段对东方伊萨酵母羧酸转运蛋白进行探索,并运用基因工程手段于去除内源性羧酸转运蛋白的酿酒酵母中进行验证与鉴定。本试验结果对羧酸转运蛋白基因的研究提供理论依据和技术支持,对解析非酿酒酵母及其降酸机理具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及引物 本研究所用到引物序列如表 1 所示,已经构建成功的重组酵母及携带的质粒信息如表 2 所示。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the study

引物	序列(5'-3')
PM1-f	TCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGCTGATTTAGAGTCACAACAT
PM1-r	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTAACATTGCTGGTTACGAGCGTG
PM2-f	TCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGCTGATTTAGAGTCACAACAT
PM2-r	TGACTCGAGGTCGACGGTATCGATCTATTGGGTTGGAGGATGCAA
PM3-f	GGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGACTTTACACAAAAATTCC
PM3-r	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTATGCTCTTGAAGTTCCCAAGTT
PM4-f	TCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGACTTTACACAAAAATTCCAAC
PM4-r	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTATGCTCTTGAAGTTCCCAAGTT
PM5-f	GGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGACTTTACACAAAAATTCC
PM5-r	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTCATTTGTTTTGCTCTGGTTCCG
PY-eGFP-F	TCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGTGAGCAAGGCCGAGGAGCTG
PY-eGFP-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
EcoR I -eGFP-F	TCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGTGAGCAAGGCCGAGGAGCTG
eGFP-R	AGAACCACCACCACCGCATGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
L-eM1-F	CTAATTACATGACTCGAGGTCGACGGTATCGATTTAACATTGCTGGTTACGAGCGTG
e-M1-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTAACATTGCTGGTTACGAGCGTG
GS linker-M2-F	GGTGGTGGTGGTTCTGCTGGTGGTGGTTCTGCTGATTTAGAGTCA CAACAT
e-M2-R	TGACTCGAGGTCGACGGTATCGATCTATTGGGTTGGAGGATGCAA
GS linker-M3-F	GGTGGTGGTGGTTCTGCTGGTGGTGGTTCTGCTGATTTACACAAAA TTCCAAC
e-M3-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTATGCTCTTGAAGTTCCCAAGTT
GS linker-M4-F	GGTGGTGGTGGTTCTGCTGGTGGTGGTTCTGCTGATTTACACAAAA TTCCAAC
e-M4-R	CTCGAGGTCGACGGTATCGATTTATGCTCTTGAAGTTCCCAAGTT



(续表 2)

菌株编号	菌株特征	质粒特征
B $\Delta$ A $\Delta$ JZL3	携带质粒 pY26-ZL3	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 M3 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ JZL4	携带质粒 pY26-ZL4	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 M4 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ JZL5	携带质粒 pY26-ZL5	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 M5 候选羧酸转运蛋白片段基因
B-PY26	携带质粒 pY26TEF-GPD	含有 TEF、GPD 双启动子及 <i>URA3</i> 尿嘧啶编码基因的商业质粒
B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26	携带质粒 pY26TEF-GPD	含有 TEF、GPD 双启动子及 <i>URA3</i> 尿嘧啶编码基因的商业质粒
B-PY26- <i>eGFP</i>	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i>	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i>
B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26- <i>eGFP</i>	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i>	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i>
B- <i>eGFP</i> -ZL1	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL1	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M1 候选羧酸转运蛋白片段基因
B- <i>eGFP</i> -ZL2	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL2	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M2 候选羧酸转运蛋白片段基因
B- <i>eGFP</i> -ZL3	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL3	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M3 候选羧酸转运蛋白片段基因
B- <i>eGFP</i> -ZL4	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL4	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M4 候选羧酸转运蛋白片段基因
B- <i>eGFP</i> -ZL5	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL5	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M5 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ J- <i>eGFP</i> -ZL1	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL1	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M1 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ J- <i>eGFP</i> -ZL2	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL2	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M2 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ J- <i>eGFP</i> -ZL3	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL3	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M3 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ J- <i>eGFP</i> -ZL4	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL4	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M4 候选羧酸转运蛋白片段基因
B $\Delta$ A $\Delta$ J- <i>eGFP</i> -ZL5	携带质粒 pY26- <i>eGFP</i> -ZL5	在 pY26 质粒的多克隆位点插入 <i>eGFP</i> 和 M5 候选羧酸转运蛋白片段基因
	pYES2- <i>eGFP</i>	含有绿色荧光蛋白基因( <i>eGFP</i> )的商业质粒
	pUG6	含有 <i>LoxP</i> - <i>KanMX</i> - <i>LoxP</i> 敲除框的商业质粒
	pUG6SH	含有 <i>LoxP</i> - <i>HphMX</i> - <i>LoxP</i> 敲除框(本实验室保藏)

注: M1~M5 为候选羧酸转运蛋白片段基因的编号。

1.1.2 培养基及试剂 葡萄糖, 广东光华科技股份有限公司; 胰蛋白胨、蛋白胨、酵母浸粉, 奥博星生物技术有限公司; 氯化钠、乳酸, 四川西陇科学有限公司; 无氨基酵母氮源(YNB)、琼脂、苹果酸, Solarbio 公司; 柠檬酸, Aladdin 公司; 潮霉素抗生素、G418 抗生素、氨基青霉素溶液, 上海源叶生物科技有限公司; 尿嘧啶(URA), TAKARA 公司。

YPD 培养基配制方法如下: 20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母浸粉; YPL 培养基配制方法如下: 10 g/L 乳酸、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母浸粉; YPM 培养基配制方法如下: 10 g/L 苹果酸、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母浸粉; YPC 培养基配制方法如下: 10 g/L 柠檬酸、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母浸粉; LB 培养基配制方法如下: 10 g/L 氯化钠、10

g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母浸粉,加入去离子水配置液体 LB 培养基,20 g/L 琼脂配置固体 LB 培养基;LB-AMP 培养基配制方法如下:在 LB 培养基基础上添加体积分数为 1% 氨苄青霉素溶液;SD-URA 培养基配制方法如下:20 g/L 的葡萄糖、1.7 g/L 的 YNB、0.77 g/L 的 URA,pH 值调至 6.8,加入 20 g/L 琼脂配置固体 SD-URA 培养基。YPD-G418 培养基:以 YPD 为基础,每毫升添加 1  $\mu$ L 质量浓度为 200 mg/mL 的 G418 抗生素;YPD-Hyg 培养基:以 YPD 为基础,每毫升添加 3  $\mu$ L 质量浓度为 100 mg/mL 的潮霉素抗生素。

## 1.2 仪器与设备

DYY-10C 型电泳仪,北京市六一仪器厂;C1000 型 PCR 仪,BioRAD 公司;LC-10ATVP 型液相色谱仪,日本岛津公司;Lecia TCS SP 8 型生物激光共聚焦显微镜,德国莱卡公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 生物信息学挖掘与分析

1.3.1.1 NCBI 比对 通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),检索解脂耶氏酵母编码具有转运不同羧酸功能的质膜羧酸转运体基因片段。对东方伊萨酵母膜基因组 BLAST 比对,筛选东方伊萨酵母候选编码细胞膜羧酸转运蛋白编码基因<sup>[30]</sup>。

1.3.1.2 跨膜螺旋预测 通过 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测候选羧酸转运蛋白编码基因跨膜螺旋结构<sup>[31]</sup>。

1.3.1.3 系统进化树构建 系统发育树是生物信息学中寻找物种间进化关系的重要方法。通过 MEGA 7.0 软件制作<sup>[32-33]</sup>候选羧酸转运蛋白编码基因的系统发育树。

1.3.2 候选片段质粒重构 将质粒 pY26 进行双酶切,以 pYES2-*eGFP* 为模板,通过同源臂引物 PY-*eGFP*-F、PY-*eGFP*-R;EcoR I -*eGFP*-F、*eGFP*-R 扩增不同同源臂 *eGFP* 基因;以东方伊萨酵母 *GS1-1* 基因组为模板,使用带有同源臂的引物 PM1-f 和 PM1-r、PM2-f 和 PM2-r、PM3-f 和 PM3-r、PM4-f 和 PM4-r、PM5-f 和 PM5-r 分别扩增候选羧酸转运蛋白编码片段 M1、M2、M3、M4、M5 的 DNA 序列,并以东方伊萨酵母 *GS1-1* 基因组为模板,使用同源臂引物 L-eM1-F 和 e-M1-R、

GS linker-M2-F 和 e-M2-R、GS linker-M3-F 和 e-M3-R、GS linker-M4-F 和 e-M4-R、GS linker-M5-F 和 e-M5-R 分别扩增 GS linker-M1、GS linker-M2、GS linker-M3、GS linker-M4、GS linker-M5 的 DNA 序列。将带有同源臂的 *eGFP* 分别与 GS linker-M1、GS linker-M2、GS linker-M3、GS linker-M4、GS linker-M5 DNA 序列通过 Overlap 体系进行连接,形成带有同源臂的 *eGFP*-GS linker-M1、*eGFP*-GS linker-M2、*eGFP*-GS linker-M3、*eGFP*-GS linker-M4、*eGFP*-GS linker-M5 DNA 序列。将带有同源臂的 *eGFP* 序列、候选羧酸转运蛋白(M1、M2、M3、M4、M5)、绿色荧光蛋白片段与候选柠檬酸转运蛋白连接片段(*eGFP*-GS linker-M1、*eGFP*-GS linker-M2、*eGFP*-GS linker-M3、*eGFP*-GS linker-M4、*eGFP*-GS linker-M5)的 DNA 序列及线性化质粒骨架同源重组连接,构建成功的质粒转入感受态 DH5 $\alpha$  后,通过 LB-Amp 培养基进行筛选,菌落 PCR 验证后,活化阳性菌株提取的质粒后进行 PCR 验证,将验证正确的重组质粒送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3.3 双缺失菌株的构建 为去除单倍体酿酒酵母 BY4741 中 *JEN1* 和 *ADY2* 负责羧酸转运的基因,使用 Cre-LoxP 系统敲除。通过引物 JLKL-F、JLKL-R 和引物 ALHL-F、ALHL-R 分别从质粒 pUG6 和 pUG6SH 扩增构建带有 *JEN1* 基因两侧同源臂的 loxP-KanMX-loxP 和带有 *ADY2* 基因两侧同源臂的 loxP-HphMX-loxP。*ScJEN1* 的两端同源臂由酿酒酵母基因组 DNA 扩增,随后在 loxP-KanMX-loxP 模块的两侧连接以生成 *JEN1* 基因敲除框。从酿酒酵母基因组 DNA 扩增的 *ScADY2* 片段与 loxP-HphMX-loxP 模块连接以生成 *ADY2* 基因敲除框,双缺失菌株构建流程如图 1 所示。

通过醋酸锂转化法<sup>[34]</sup>,根据图 2 分别进行 *ADY2*、*JEN1* 基因的敲除并验证。破坏 *ADY2* 基因,使用带有潮霉素(Hyg)标记基因的 BY4741,随机挑取在 YPD-Hyg 平板上生长的单菌落,提取基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,用引物对 QADY2 -F 和 QADY2 -R、ADY2HphMX -F 和 ADY2HphMX -R、ADY2QY -F 和 ADY2QY -R 对单敲除菌株进行 PCR 验证。通过 YPD-Hyg 培养



基筛选成功敲除的阳性菌株,下文称为 BΔA。通过上述方法破坏 BΔA 中的 *JEN1* 基因,使带有 G418 标记基因,随机挑取在 YPD-G418 平板上生长的单菌落,提取基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,用引物对 QJEN1-F 和 QJEN1-R、JEN1Kan-

MX-F 和 JEN1KanMX-R、JEN1QY-F 和 JEN1QY-R 对双敲除候选菌株进行 PCR 验证。通过 YPD-Hyg-G418 培养基筛选成功敲除的阳性菌株称为 BΔAΔJ。

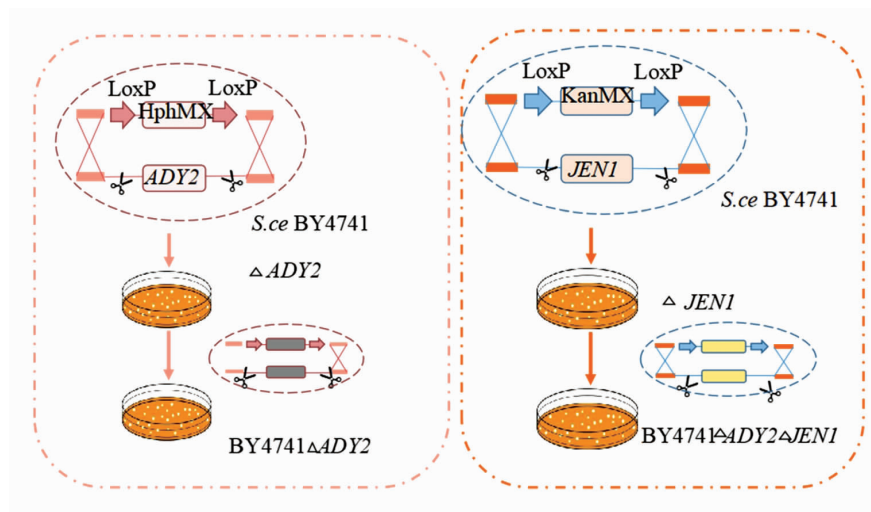


图 1 双缺失菌株构建流程图

Fig.1 Flow chart for the construction of double deletion strains

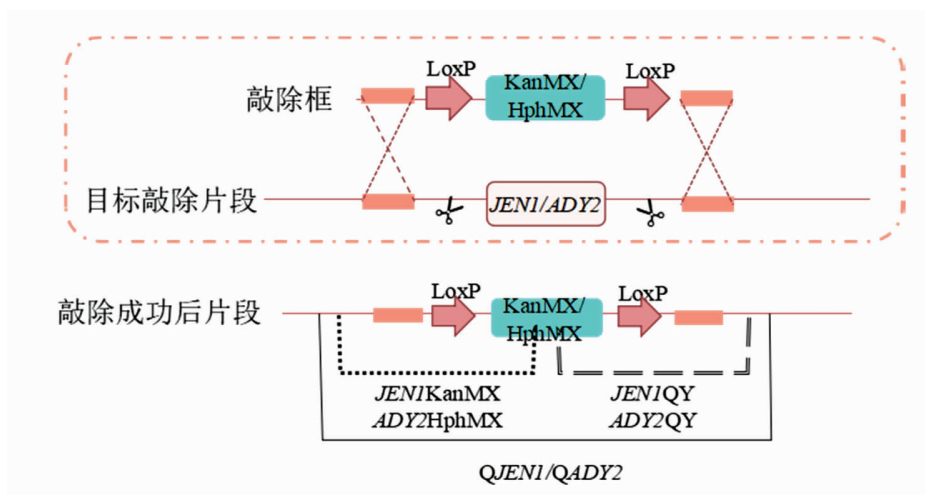


图 2 缺陷型菌株敲除原理及验证流程图

Fig.2 Defective strain knockout principle and verification flow chart

1.3.4 重构质粒的转化 经过 PCR 验证成功的大肠杆菌单菌落,使用 LB-AMP 液体培养基增殖扩培并进行质粒提取。采用醋酸锂转化法<sup>[34]</sup>,将已连接成功的重组质粒 pY26-ZL1、pY26-ZL2、pY26-ZL3、pY26-ZL4、pY26-ZL5、pY26-eGFP、pY26-eGFP-ZL1、pY26-eGFP-ZL2、pY26-eGFP-ZL3、pY26-eGFP-ZL4、pY26-eGFP-ZL5 分别转入

BY4741 及双敲除菌株 BΔAΔJ 后涂布至 SD-URA、SD-URA-G418-Hyg 固体培养基上进行培养。将培养皿在 30 °C 下孵育 2~3 d,挑取单菌落活化,提取酵母内质粒进行 PCR 验证。

1.3.5 绿色荧光蛋白定位 使用激光共聚焦显微镜观察酵母内转化质粒展示效果。用 50 mL 的 SD-URA-G418-Hyg 液体培养基于 30 °C 培养重组

酵母 48 h 后,取 5  $\mu$ L 菌液制片<sup>[35]</sup>。

1.3.6 表型验证 相应培养基活化酵母单菌落,采用血球计数板计数,以  $1 \times 10^7$  CFU/mL 接种量分别接种至 YPD、YPL、YPM、YPC 液体培养基,30  $^{\circ}$ C 培养 120 h。

1.3.7 有机酸含量的测定 采用高效液相色谱法测定发酵过程中及发酵结束后有机酸含量<sup>[23]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选羧酸转运蛋白的确定及生物信息学分析

已有研究表明<sup>[11]</sup>,解脂耶氏酵母中存在 6 个编码质膜羧酸转运体的基因片段,将东方伊萨酵母质膜基因组与该 6 个基因片段进行比对,获得 5 个高分匹配片段,具体见表 3。

表 3 东方伊萨酵母候选质膜柠檬酸转运蛋白

Table 3 *I. orientalis* suspected plasma membrane citrate transporter

编号	候选柠檬酸转运蛋白名称	蛋白质查询 ID	基因 ID	长度/bp
M1	非特征蛋白 C5L36_0A05580	XP_029319440.1	XM_029463580.1	1 572
M2	假定蛋白 CAS74_001759	OUT23441.1	NHMM01000002.1	2 432
M3	假定蛋白 C5L36_0A03680	XP_029319245.1	XM_029463385.1	1 620
M4	非特征蛋白 CAS74_001578	OUT23260.1	OUT23260.1	1 620
M5	羧酸转运蛋白	ONH76733.1	MQVM01000003.1	1 957

由表 4 可知候选羧酸转运蛋白的长度,5 条候选羧酸转运蛋白均含有 10 条跨膜螺旋数,根据跨膜螺旋预期的氨基酸数,预测为跨膜蛋白,通过蛋白质的前 60 个氨基酸中跨膜螺旋的预期氨基

酸数目,判断候选羧酸转运蛋白在膜上的概率均大于 96%,综上所述,筛选得到的 5 条候选羧酸转运蛋白存在位于质膜的跨膜螺旋。

表 4 跨膜螺旋预测结果数据表

Table 4 Data table of prediction results of transmembrane spiral

	M1	M2	M3	M4	M5
长度	523	639	539	539	515
预测跨膜螺旋数	10	10	10	10	10
跨膜螺旋中预期的氨基酸数目	210.90921	211.48011	227.86869	227.86869	228.31771
该蛋白质的前 60 个氨基酸中跨膜螺旋的预期氨基酸数	$1 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	0	0	0
位于膜的细胞质侧的总概率	0.98156	0.98097	0.96935	0.96935	0.96930

对所筛选 5 组基因绘制系统进化树,进化树如图 3 所示。图中起始节点代表共同祖先,分支的节点代表假定祖先,分支长度反应互相之间的同源关系,数值代表该节点下树结构的置信程度。由于多篇文献<sup>[2,11-12]</sup>对非酿酒酵母质膜羧酸转运体的研究均始于膜蛋白组与酿酒酵母 *SCJEN1* 序列的比对,故构建系统进化树是非常必要的。进化树除了反映 5 个片段与酿酒酵母 *SCJEN1* 具有高度同源性以外,还可以看到 2、4 片段相近,其次与 5 号片段次接近,而与 1、3 片段较近;这代表它们很可

能执行不同功能,比如一个转运二羧酸一个转运三羧酸。5 组片段都与乳酸克鲁维酵母的 *KLJEN2* 有极高的的同源性,提示本试验所筛选片段很可能执行二、三羧酸质膜转运功能,说明质膜羧酸转运蛋白的多样化很可能是非酿酒酵母代谢功能多样化的一个基础。

### 2.2 PCR 扩增及质粒重构结果

目标片段 PCR 反应体系反应结束后进行凝胶电泳验证,扩增片段特异性初步鉴定良好。菌落 PCR 凝胶电泳电泳结果良好。在生工生物工程(上

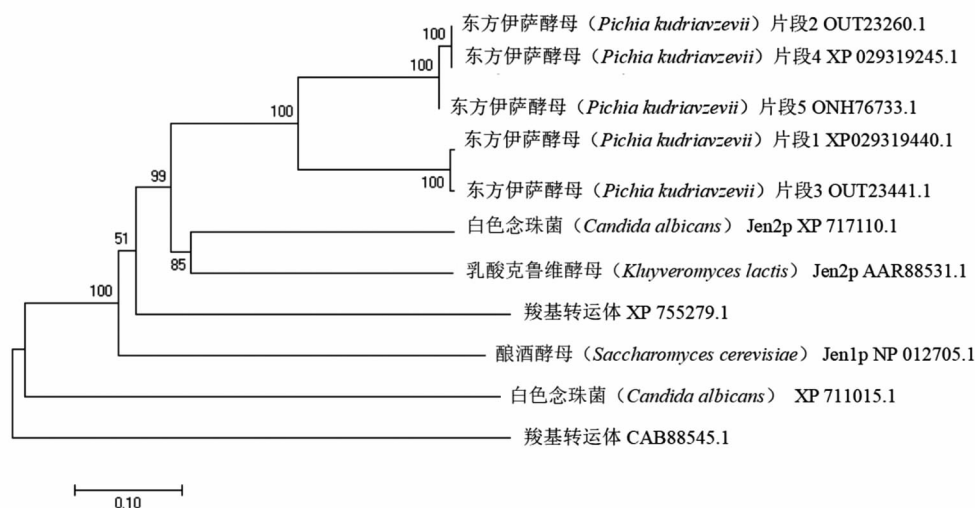


图 3 基于部分已验证为羧酸转运蛋白片段的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on partially verified fragments of carboxylic acid transporters

海)股份有限公司进行的测序结果正确。

### 2.3 羧酸转运蛋白重组菌的获得

为验证单敲除、双敲除菌株构建结果,根据图 1、2 敲除原理及验证方式,进行敲除框扩增验证,电泳条带 JEN1LKL PCR 和 ADY2LHL PCR 分别为 1 839 bp, 1 921 bp,电泳条带长度正确,说明正确构建 B $\Delta$ A 工程菌;由于电泳验证条带长度正确,表明 B $\Delta$ A $\Delta$ J 双敲除菌株构建成功。根据验证成功获得双敲除缺陷型菌株。

通过验证阳性转化菌株,电泳条带长度正确,

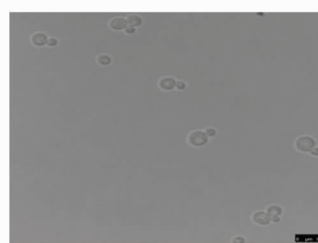
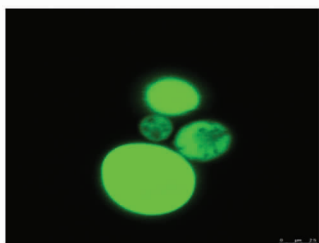
为正确阳性转化菌株,为后续表型验证提供基础材料。

### 2.4 利用激光共聚焦显微镜羧酸转运蛋白的定位

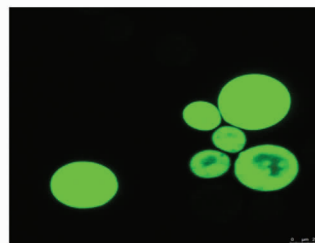
为了进一步探究成功转化的羧酸转运蛋白的定位,在激光共聚焦显微镜下观察重组酵母中绿色荧光蛋白所在的位置。如图 4 所示,对照组中的 B-PY26、B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26 没有观察到绿色荧光;B-PY26-eGFP、B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26-eGFP 表达的绿色荧光蛋白滞留在细胞质中;试验组重组酵母 B-



(a) B-PY26(携带质粒 pY26 的重组 BY4741)

(b) B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26(携带质粒 pY26 的重组 B $\Delta$ A $\Delta$ J)

(c) B-PY26-eGFP(携带质粒 pY26-eGFP 的重组 BY4741)

(d) B $\Delta$ A $\Delta$ J-PY26-eGFP(携带质粒 pY26-eGFP 的重组 B $\Delta$ A $\Delta$ J)



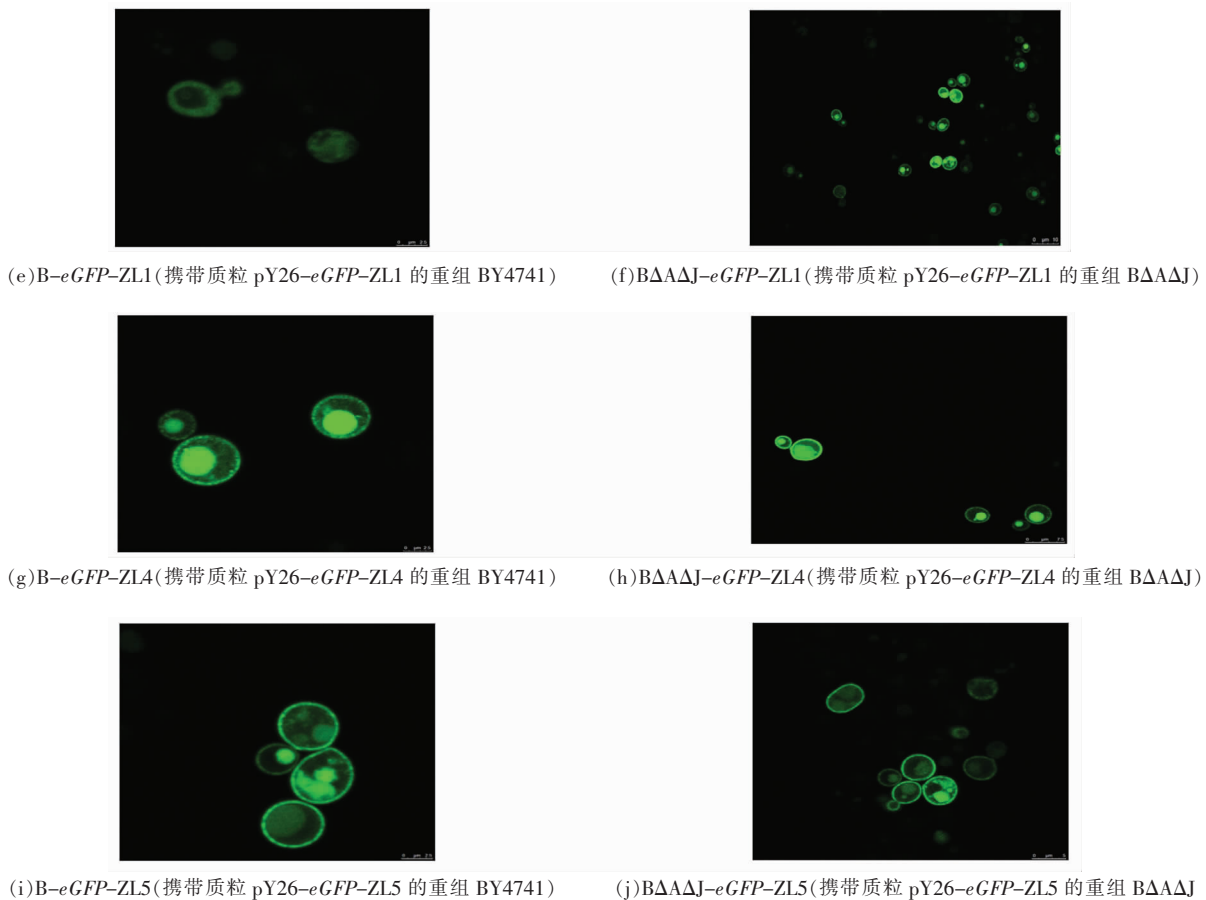


图4 GFP在重组酵母中的定位

Fig.4 Localization of GFP in recombinant yeasts

*eGFP-ZL1*、B-*eGFP-ZL4*、B-*eGFP-ZL5*、B $\Delta\Delta\Delta$ J-*eGFP-ZL1*、B $\Delta\Delta\Delta$ J-*eGFP-ZL4*、B $\Delta\Delta\Delta$ J-*eGFP-ZL5* 绿色荧光蛋白定位于细胞膜。本研究结果与以往羧酸转运蛋白利用荧光显微镜定位结果相一致<sup>[6-7,17]</sup>。

## 2.5 表型及特异性验证

为了确定候选羧酸转运蛋白的转运功能及转运特异性,不同碳源条件下培养重组菌株,在吸光值为 600 nm 下测定的菌体细胞密度,菌株生长量如图 5 所示。在以葡萄糖为唯一碳源条件下酵母菌株生长状态良好,东方伊萨酵母 GS1-1 在葡萄糖为唯一碳源条件下菌体细胞密度约是以羧酸为唯一碳源时菌株量的 3 倍,说明在不同羧酸条件下,菌体细胞密度均受到羧酸不同程度的抑制。阴性对照 BY4741、阴性对照 BAJ 在羧酸为唯一碳源条件时几乎无法正常生长,表明该菌株内不存

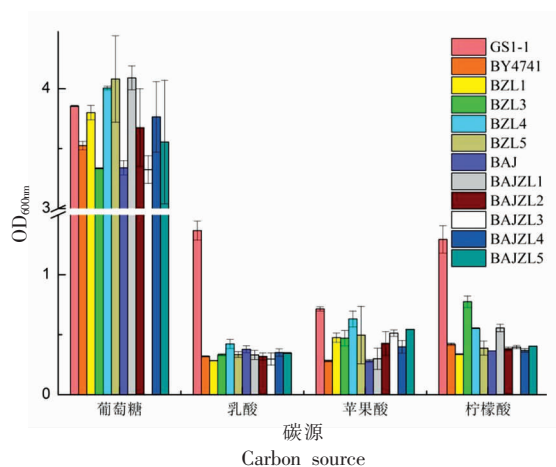


图5 不同碳源条件下菌株生长量

Fig.5 Growth of strains under different carbon sources

在相应羧酸转运蛋白,或存在相应转运蛋白但缺少代谢途径中重要的调控因子。

相同碳源条件下,不同菌株生长量如下表 5 可知,葡萄糖为碳源,菌株生长量无显著性差异,说明插入候选片段对各菌株在基本培养基条件下生长无影响且生长状态良好;乳酸条件下,阳性对照菌株 GS1-1 与其它菌株存在显著性差异,阴性对照与工程菌无显著性差异,说明候选片段与乳酸的转运代谢无关;苹果酸条件下,BZL4 与阳性对照菌株 GS1-1 无显著性差异且与 BY4741 存在显著性差异,BAJZL5 与阳性对照菌株 GS1-1 无

显著性差异且与 BAJ 存在显著性差异,表明候选片段 4、5 与苹果酸的转运代谢相关;柠檬酸条件下,阳性对照菌株 GS1-1 与其它菌株存在显著性差异,BZL3 菌株与阴性对照 BY4741 菌株呈现显著性差异,且与阳性对照 GS1-1 也存在显著性差异。BAJZL1 菌株与阴性对照 BAJ 菌株呈现显著性差异,且与阳性对照 GS1-1 也存在显著性差异,表明候选片段 1、3 与柠檬酸的转运代谢相关。

表 5 相同碳源条件下菌株生长量及其单因素分析

Table 5 Strain growth and its single factor analysis under the same carbon source condition

碳源	菌株											
	GS1-1	BY4741	BZL1	BZL3	BZL4	BZL5	BAJ	BAJZL1	BAJZL2	BAJZL3	BAJZL4	BAJZL5
葡萄糖	3.86 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	3.80 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.01 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.36 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.06 <sup>a</sup>	4.09 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.68 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.33 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.77 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.52 <sup>a</sup>
	1.37 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.38 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>bc</sup>	0.35 ± 0.00 <sup>bc</sup>
苹果酸	0.72 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>abcd</sup>	0.47 ± 0.06 <sup>abcd</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.50 ± 0.24 <sup>abcd</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.30 ± 0.09 <sup>cd</sup>	0.43 ± 0.10 <sup>abcd</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>abcd</sup>	0.40 ± 0.05 <sup>bcd</sup>	0.54 ± 0.00 <sup>abc</sup>
	1.30 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.34 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>d</sup>	0.37 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.40 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.40 ± 0.00 <sup>d</sup>

注:表中同一行中不同字母表示处理间具有显著性差异(Duncan 检验,  $P < 0.05$ )。

不同羧酸条件下菌株羧酸含量及降酸率分析结果见表 6。不同菌株在羧酸培养基中,降酸羧酸

含量呈现差异显著。苹果酸条件下,BAJZL3、BAJZL4 和 BAJZL5 与阴性对照 BAJ 存在显著性差

表 6 不同菌株在不同碳源条件下降酸效果

Table 6 The acid reduction effect of different strains under different carbon source conditions

菌株	碳源					
	初始苹果酸含量/g·L <sup>-1</sup>	苹果酸/g·L <sup>-1</sup>	苹果酸降酸率/%	初始柠檬酸含量/g·L <sup>-1</sup>	柠檬酸/g·L <sup>-1</sup>	柠檬酸降酸率/%
GS1-1	9.21	5.28 ± 0.51 <sup>bcd</sup>	42.69	8.01	4.79 ± 0.22 <sup>c</sup>	40.17
BY4741	9.21	10.32 ± 0.49 <sup>ab</sup>	-12.22	8.01	8.05 ± 0.09 <sup>a</sup>	-0.01
BZL1	9.21	9.99 ± 0.49 <sup>abc</sup>	-8.55	8.01	7.67 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.26
BZL3	9.21	6.54 ± 1.07 <sup>abcd</sup>	28.96	8.01	7.74 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.39
BZL4	9.21	8.42 ± 1.08 <sup>abcd</sup>	8.55	8.01	7.71 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.78
BZL5	9.21	5.47 ± 0.52 <sup>bcd</sup>	40.63	8.01	7.44 ± 0.71 <sup>ab</sup>	7.21
BAJ	9.21	9.45 ± 1.32 <sup>a</sup>	-2.64	8.01	8.16 ± 0.04 <sup>a</sup>	-1.80
BAJZL1	9.21	6.40 ± 2.48 <sup>abcd</sup>	30.50	8.01	6.27 ± 0.65 <sup>b</sup>	21.71
BAJZL2	9.21	9.07 ± 0.31 <sup>abcd</sup>	1.52	8.01	8.03 ± 0.05 <sup>a</sup>	-0.17
BAJZL3	9.21	4.50 ± 1.25 <sup>d</sup>	51.16	8.01	7.86 ± 0.65 <sup>a</sup>	1.96
BAJZL4	9.21	4.95 ± 1.85 <sup>cd</sup>	46.25	8.01	7.66 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.36
BAJZL5	9.21	5.43 ± 2.88 <sup>bcd</sup>	40.99	8.01	7.43 ± 0.03 <sup>ab</sup>	7.22

注:表中同一列中不同字母表示处理间具有显著性差异(Duncan 检验,  $P < 0.05$ )。

异,且上述3株工程菌株降酸率均为40%以上;柠檬酸条件下,BAJZL1与阴性对照BAJ柠檬酸含量存在显著性差异,且上述工程菌株柠檬酸含量与阳性对照GS1-1存在显著性差异。综上,根据相同碳源不同菌株生长量( $OD_{600nm}$ )的显著性分析以及结合相同碳源羧酸含量显著性数据分析可知,目的片段4为苹果酸羧酸转运蛋白;目的片段1是柠檬酸转运蛋白。

为探究菌株生长量( $OD_{600nm}$ )及菌株降酸率是否存在关联性,根据双变量Pearson检验相关性数据分析可知,二者呈现大致相同的变化趋势,二者呈极显著( $r=0.528^{**}, P<0.01$ )即菌株生长状况越好,其降酸能力越强。因此,在发酵结果验证中,可通过观察菌株生长状况来大致确定菌株的降酸能力。

### 3 结论

生物信息学技术手段可有效挖掘东方伊萨酵母潜在的羧酸转运蛋白,且分析数据可靠,对于挖掘鉴定潜在片段具有一定参考意义。本试验在双敲除羧酸转运蛋白的酿酒酵母中进行东方伊萨酵母候选羧酸转运蛋白的验证,根据绿色荧光蛋白定位,发现其发挥功能区域为细胞膜上,符合先前对于羧酸转运蛋白在酵母体内的定位分析。确定候选片段4为苹果酸羧酸转运蛋白;候选片段1是柠檬酸转运蛋白。本文成功利用生物信息学手段,挖掘并鉴定到东方伊萨酵母潜在的二、三羧酸转运蛋白片段,拓展了酵母羧酸转运蛋白家族成员,进一步解析了东方伊萨酵母的降酸机制,为探索非酿酒酵母的降酸机理奠定了理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] MARGARIDA C, SANDRA P, ODÍLIA Q, et al. Transport of carboxylic acids in yeasts[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(6): 974-994.
- [2] CASAL M, QUEIROS O, TALAIA G, et al. Carboxylic acids plasma membrane transporters in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016, 892: 229-251.
- [3] LEO C, VAN UDEN N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Candida utilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1986, 23(5): 389-393.
- [4] CASSIO F, LEO C, VAN UDEN N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53(3): 509-513.
- [5] CASAL M, PAIVA S, ANDRADE R P, et al. The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(8): 2620-2623.
- [6] PAIVA S, KRUCKEBERG A L, CASAL M. Utilization of green fluorescent protein as a marker for studying the expression and turnover of the monocarboxylate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Society, 2002, 363 (Pt 3): 737-744.
- [7] PAIVA S, STRACHOTOVÁ D, KUČEROVÁ H, et al. The transport of carboxylic acids and important role of the Jen1p transporter during the development of yeast colonies[J]. Biochemical Journal, 2013, 454 (3): 551-558.
- [8] LODI T, FONTANESI F, FERRERO I, et al. Carboxylic acids permeases in yeast: Two genes in *Kluyveromyces lactis*[J]. Gene, 2004, 339: 111-119.
- [9] TIZIANA L, JULIE D, ANDRÉ G, et al. Evolution of the carboxylate Jen transporters in fungi[J]. FEMS Yeast, 2007, 7(5): 646-656.
- [10] VIEIRA N, CASAL M, JOHANSSON B, et al. Functional specialization and differential regulation of short-chain carboxylic acid transporters in the pathogen *Candida albicans*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 75(6): 1337-1354.
- [11] GUO H, LIU P, MADZAK C, et al. Identification and application of keto acids transporters in *Yarrowia lipolytica*[J]. Scientific Reports, 2015, 5 (1): 8138.
- [12] XI Y Y, ZHAN T, XU H T, et al. Characterization of JEN family carboxylate transporters from the acid-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* and their applications in succinic acid production[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(3): 1130-1147.
- [13] OSOTHSILP C, SUBDEN R E. Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 168(3): 1439-1443.

- [14] GROBLER J, BAUER F, SUBDEN R E, et al. The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids [J]. *Yeast*, 1995, 11(15): 1485–1491.
- [15] KUJAU M, WEBER H, BARTH G. Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase[J]. *Yeast*, 1992, 8(3): 193–203.
- [16] TZSCHOPPE K, AUGSTEIN A, BAUER R, et al. trans-dominant mutations in the *GPR1* gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Yeast*, 1999, 15(15): 1645–1656.
- [17] AUGSTEIN A, BARTH K, GENTSCH M, et al. Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*[J]. *Microbiology*, 2003, 149(3): 589–600.
- [18] CÁSSIO F, LEÃO C. Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(12): 3623–3628.
- [19] CÁSSIO F, LEÃO C. A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: Evidence for a general organic acid permease[J]. *Yeast*, 1993, 9(7): 743–752.
- [20] SUTHERS P F, DINH H V, FATMA Z, et al. Genome-scale metabolic reconstruction of the non-model yeast *Issatchenkia orientalis* SD108 and its application to organic acids production[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 11: e00148.
- [21] LI Y D, WU Z F, LI R Y, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the acetic acid stress in *Issatchenkia orientalis*[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(6): e13203.
- [22] WADA K, FUJII T, AKITA H, et al. IoGAS1, a GPI-anchored protein derived from *Issatchenkia orientalis*, confers tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple acids[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 190(4): 1349–1359.
- [23] 郝爱玲, 冯莉, 秦义, 等. 降解柠檬酸酵母菌的筛选及其发酵性能研究[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(11): 72–80.
- HAO A L, FENG L, QIN Y, et al. Screening of citric acid degrading yeast and its fermentation performance [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(11): 72–80.
- [24] CAO M F, FATMA Z, SONG X F, et al. A genetic toolbox for metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis*[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 87–97.
- [25] FOROUTAN M, GHAFFARIFAR F, SHARIFI Z, et al. Bioinformatics analysis of ROP8 protein to improve vaccine design against *Toxoplasma gondii*[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 62: 193–204.
- [26] ZHANG L, LOH K, LIM J W, et al. Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review[J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2019, 100: 110–126.
- [27] LIU X K, WU J R, ZHANG D, et al. Identification of potential key genes associated with the pathogenesis and prognosis of gastric cancer based on integrated bioinformatics analysis[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 265.
- [28] 肖翠, 杨建宝, 王成, 等. 基于生物信息学分析 CIRBP 在肺腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, (2021-06-28)[2021-09-06]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=TDFJfL\\_btVUvFM3xAdD4J0hkbAt-fy9Yuhn7AF2zYTmb4fKyUC9Ekbc5J1cimvzj-xfVUAlQ6JkwY6cL18jjs6kXa39EI9eUkprPtQx-6YjsSILFYV2gdZovUf3OwrSHpXoMNPhNIzg=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=TDFJfL_btVUvFM3xAdD4J0hkbAt-fy9Yuhn7AF2zYTmb4fKyUC9Ekbc5J1cimvzj-xfVUAlQ6JkwY6cL18jjs6kXa39EI9eUkprPtQx-6YjsSILFYV2gdZovUf3OwrSHpXoMNPhNIzg=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG).
- XIAO C, YANG J B, WANG C, et al. The expression and clinical significance of CIRBP in lung adenocarcinoma based on bioinformatics analysis[J]. *Chinese Journal of Clinical Thoracic and Cardiovascular Surgery*, (2021-06-28)[2021-09-06]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=TDFJfL\\_btVUvFM3xAdD4J0hkbAt-fy9Yuhn7AF2zYTmb4fKyUC9Ekbc5J1cimvzj-xfVUAlQ6JkwY6cL18jjs6kXa39EI9eUkprPtQx-6YjsSILFYV2gdZovUf3OwrSHpXoMNPhNIzg=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=TDFJfL_btVUvFM3xAdD4J0hkbAt-fy9Yuhn7AF2zYTmb4fKyUC9Ekbc5J1cimvzj-xfVUAlQ6JkwY6cL18jjs6kXa39EI9eUkprPtQx-6YjsSILFYV2gdZovUf3OwrSHpXoMNPhNIzg=&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG).
- [29] 陈嘉源, 施劲松, 丘栋安, 等. 2019 新型冠状病毒基因组生物信息学分析[J]. *生物信息学*, 2020, 18(2): 96–102.
- CHEN J Y, SHI J S, QIU D A, et al. Bioinformatics analysis of the 2019 novel coronavirus genome[J]. *Bioinformatics*, 2020, 18(2): 96–102.
- [30] SAYERS E W, BECK J, BOLTON E E, et al.

- Database resources of the National Center for Biotechnology Information [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49: D10–D17.
- [31] KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: Application to complete genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567–580.
- [32] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [33] KAPLI P, YANG Z, TELFORD M J. Phylogenetic tree building in the genomic age[J]. *Nature Reviews. Genetics*, 2020, 21(7): 428–444.
- [34] GIETZ R D. High efficiency DNA transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with the LiAc/SS-DNA/PEG method[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2014: 177–186.
- [35] 张阳. 酿酒酵母高效表面展示 $\beta$ -葡萄糖苷酶提高葡萄酒香气的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- ZHANG Y. Research on the efficient surface display of  $\beta$ -glucosidase by *Saccharomyces cerevisiae* to improve the aroma of wine [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.

### Expression and Functional Verification of Carboxylic Acid Transporter in *Issatchenkia orientalis*

Sun Guangling<sup>1</sup>, Liu Junli<sup>1</sup>, Wu Di<sup>1</sup>, Liu Yuxin<sup>1</sup>, Jiang Jiao<sup>1,2,3</sup>, Song Yuyang<sup>1,2,3\*</sup>

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

<sup>2</sup>Heyang Grape Experimental Demonstration Station, Northwest A&F University, Heyang 715300, Shaanxi

<sup>3</sup>Ningxia Helan Mountain's East Foothill Wine Experiment and Demonstration Station of Northwest A&F University, Yongning 750104, Ningxia)

**Abstract** Biological acid reduction is an important development direction of modern fruit wine green brewing. However, the current mechanism of some carboxylic acid transporters and their transport regulation is still incomplete, which severely limits the targeted breeding of high-efficiency acid-reducing strains. To this end, this experiment used a self-selected strain of *Issatchenkia orientalis* GS1-1 with good acid-reducing ability as the material, excavated its potential carboxylic acid transporter and identified it. First, the existing *Issatchenkia orientalis* genome sequence on NCBI was used to perform blast comparison with genes encoding different carboxylic acid transporters, and use bioinformatics techniques to perform gene comparison. Prediction of transmembrane helix, construction of phylogenetic tree, and use of green fluorescent protein for positioning. The haploid *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 *ADY2* and *JEN1* carboxylic acid transporter double deletion engineering bacteria were constructed, and the plasmid containing the suspected target fragment was phenotype verified and specificity verified in *Saccharomyces cerevisiae*. The results showed that the target fragment 4 (OUT23260.1) was a malate carboxylic acid transporter; the target fragment 1 (XP\_029319440.1) was a citrate transporter, and the functional region of the target fragment was located on the yeast cell membrane. This research has laid a theoretical foundation for exploring the acid reduction mechanism of non-*Saccharomyces cerevisiae* in the field of fermentation engineering.

**Keywords** non-*Saccharomyces cerevisiae*; green fluorescent protein; lithium acetate conversion method; Cre-LoxP system; organic acid