

西藏来源的植物内生酵母 *Wickerhamomyces rabaulensis* 生产 γ -氨基丁酸

范婷婷¹, 王淇¹, 王慕瑶¹, 孙梦林¹, 曾杜文¹, 章漳², 李俊^{2*}, 赵心清^{1*}

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

2 伽蓝(集团)股份有限公司, 上海 200233

范婷婷, 王淇, 王慕瑶, 孙梦林, 曾杜文, 章漳, 李俊, 赵心清. 西藏来源的植物内生酵母 *Wickerhamomyces rabaulensis* 生产 γ -氨基丁酸[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2609-2619.

FAN Tingting, WANG Qi, WANG Muyao, SUN Menglin, ZENG Duwen, ZHANG Zhang, LI Jun, ZHAO Xinqing. Production of γ -aminobutyric acid by the endophytic yeast *Wickerhamomyces rabaulensis* isolated from Tibetan plant[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2609-2619.

摘要: 【目的】对西藏地区分离的一株植物内生维克汉姆酵母 *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 生产 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的条件进行研究, 并考察胁迫处理对生产的影响。【方法】利用 26S rDNA 序列进行菌株鉴定, 考察葡萄糖和木糖对 *W. rabaulensis* JT229 生产 GABA 的影响, 并利用添加乙酸、乙醇和高温等胁迫条件提升其发酵生产 GABA 的能力。【结果】*W. rabaulensis* JT229 可以利用葡萄糖和木糖生产 GABA, 并且在适当的高温、乙酸和乙醇的胁迫诱导下胞外 GABA 浓度明显提升, 产量分别为 80.07、67.02、104.15 mg/L, 分别是对照条件下的 2.15、1.85 和 2.87 倍, 且胞内也检测到存在一定浓度的 GABA。在添加 5 g/L 乙酸和 37 °C 高温胁迫的条件下, 胞内 ROS 水平和细胞膜透性均有明显提高; 添加 3 g/L 乙酸的条件与对照组相比, 胞内 ROS 水平有所下降, 但是细胞膜透性有明显提升; 在 37 °C 的胁迫条件下胞内 GABA 含量明显下降。胞外的 GABA 产量提升推测是由于胁迫导致胞内 GABA 外排增多导致的。【结论】本研究首次在国内外分离鉴定了内生酵母 *W. rabaulensis*, 并发现菌株 *W. rabaulensis* JT229 具有生产 GABA 的潜力, 此外, 利用胁迫处理促进了该菌株的 GABA 胞外生产, 为进一步开发利用酵母资源生产 GABA 及富含 GABA 的产品提供了基础。

关键词: 植物内生酵母; *Wickerhamomyces rabaulensis*; γ -氨基丁酸(GABA); 环境胁迫; 细胞膜透性

资助项目: 上海市自然科学基金(19ZR1427500)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanghai (19ZR1427500).

*Corresponding authors. ZHAO Xinqing, Tel: +86-21-34206673, E-mail: xqzhao@sjtu.edu.cn;

LI Jun, Tel: +86-21-22275897, E-mail: lijun2@jala.com.xn

Received: 2022-12-03; Accepted: 2023-01-26

Production of γ -aminobutyric acid by the endophytic yeast *Wickerhamomyces rabaulensis* isolated from Tibetan plant

FAN Tingting¹, WANG Qi¹, WANG Muyao¹, SUN Menglin¹, ZENG Duwen¹, ZHANG Zhang², LI Jun^{2*}, ZHAO Xinqing^{1*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² JALA Group Co., Ltd., Shanghai 200233, China

Abstract: [Objective] To promote the production of γ -aminobutyric acid (GABA) by an endophytic yeast *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 isolated from plants in Tibet. [Methods] The D1/D2 region sequence of 26S rRNA gene was used for strain identification. Glucose and xylose were tested for GABA production. In addition, stress treatments, including high temperature and high concentration of ethanol and acetic acid, were investigated to increase the extracellular production of GABA by the strain. [Results] *Wickerhamomyces* sp. JT229 was identified as *Wickerhamomyces rabaulensis*, which produced GABA using glucose and xylose, and the GABA production was enhanced under the moderate stress of high temperature, acetic acid and ethanol. The extracellular production of GABA was 80.07, 67.02 and 104.15 mg/L under the above stress conditions, which were 2.15, 1.85 and 2.87 times those of the control conditions, respectively, and the intracellular accumulation of GABA was also detected. Under the conditions of 5 g/L acetic acid and 37 °C, the intracellular ROS level and cell membrane permeability increased more markedly than those under the control conditions. Compared with the control group, 3 g/L acetic acid lowered the intracellular ROS level while enhanced the cell membrane permeability. Under 37 °C, the content of intracellular GABA dropped. Therefore, we inferred that the increased extracellular production of GABA was resulted from its increased intracellular secretion. [Conclusion] This is the first time that endophytic *W. rabaulensis* was identified. We revealed that *W. rabaulensis* strain JT229 isolated from Tibet had the potential to produce GABA, and also demonstrated the enhanced production of GABA under stress treatments. The results facilitated further development and utilization of yeast strains for production of GABA and GABA-containing products.

Keywords: endophytic yeasts; *Wickerhamomyces rabaulensis*; γ -aminobutyric acid (GABA); stress treatments; cell membrane permeability

西藏自治区地处我国西部边远地区,具有非常独特的地理环境,比如强紫外辐射、高海拔、低温、氧气匮乏等,当地独特的地理环境可能蕴含着特殊的微生物资源。早期研究者对西藏地区微生物的研究大多集中在湿地微生物、藏式酸奶、青稞酒曲以及用于藏药的微生物^[1-2]。近年

来,很多研究者从西藏地区分离耐冷酵母用于生物防治^[3-4]或者去除水中的重金属^[5]。但是,目前对西藏地区野生来源的内生酵母的应用研究还比较少。

植物表面和内部都附着很多细菌或真菌。内生菌(endophytes)在多种植物中普遍存在,包括

真菌、细菌和放线菌等,并呈现寄生和共生等多种生活方式^[6]。对内生菌的研究和开发不仅可以丰富自然界的微生物资源,还可以了解内生菌与其植物宿主的相互作用^[7],也可以用于天然药物和其他活性物质的研发中,为其提供新思路 and 新的菌株资源^[8-10]。

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种天然存在的四碳非蛋白质氨基酸,广泛存在于植物、动物以及微生物体内。GABA 在人体内是一种抑制性神经递质,主要活性是调节突触传递、放松神经从而发挥助眠以及抗抑郁的作用^[11],另外还具有抗高血压、抗糖尿病以及抗癌的作用^[12]。GABA 的市场应用非常广泛,可以被添加到很多助眠药物以及保健品中;也可以添加到畜禽的饲料中,具有促生长和抗应激的作用^[13];还可以作为护肤品的主要成分,具有平复皱纹的作用^[14]。但是,目前还未见报道从植物内生菌中分离得到 GABA 生产菌。

目前 GABA 的产生途径主要有微生物合成、植物提取以及化学合成等。化学合成和植物提取分别以环境污染和产量低为主要限制^[15],因此微生物发酵法合成 GABA 是目前主要的研究方向。目前文献报道有一些酵母可以合成 GABA,包括马克斯克鲁维酵母等在内的多种非常规酵母菌株^[14,16-19]。非常规酵母具有耐性强、可以利用生物质来源的多种碳源、可生产多种活性物质等优点^[20],因此,探究更多可生产 GABA 的非常规酵母菌株,有利于更好利用酵母资源和生物质资源进行生物炼制,实现可持续发展^[21]。

维克汉姆酵母(*Wickerhamomyces rabaulensis*)原来命名为 *Pichia rabaulensis*,模式菌株分离于蜗牛的分泌物^[22],目前对其生物技术应用研究非常有限,研究报道从腐木分离的 *W. rabaulensis* 菌株可在甘蔗渣半纤维素水解物中利用木糖生产乙醇^[23]和木糖醇^[24]。但是,目前

国内外还没有将酵母 *W. rabaulensis* 作为微生物细胞工厂生产 GABA 以及相关活性化合物的研究报道。

本研究发现从西藏采集的姜果实内部分离的 *W. rabaulensis* 酵母菌株可以生产 GABA,并探究了利用胁迫刺激促进其生产 GABA 的方法,为利用维克酵母生产 GABA 和富含 GABA 的产品提供了新的策略。此外,本研究也是首次报道分离获得植物内生 *W. rabaulensis* 菌株,为进一步开发利用相关非常规酵母资源提供了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株和培养方法

本研究所用酵母菌株分离自 2019 年 10 月,分离样本为西藏林芝地区的野生姜果实。该菌株已于 2021 年 4 月在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)保藏,保藏编号为 CGMCC No. 2.6477。在 YPD 培养基培养酵母菌株,YPD 培养基组成为:10 g/L 酵母粉、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 葡萄糖,配制固体培养基时加入 20 g/L 琼脂粉,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.2 菌种鉴定

YPD 固体培养基上长出肉眼清晰可见的酵母菌落后,在光学显微镜下观察细胞形态。粗提酵母基因组,使用 26S rRNA D1/D2 区域通用引物 26S-F (5'-GCATATCGGTAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 26S-R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 进行 PCR 扩增,产物由上海擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列相似性比对。

1.3 菌株耐温性能检测

取 20 μ L 于-80 °C 保存的菌液接种到 1 mL

YPD 液体培养基中, 于 25 °C 摇床中培养 24 h, 取 50 μ L 接种到 5 mL 新鲜 YPD 液体培养基上培养 12 h, 将菌液进行梯度稀释, 依次取 2 μ L 点至 YPD 固体培养基上, 将平板分别置于 4、8、20、23、25、28、30 和 37 °C 培养箱中倒置培养, 拍照并观察菌株的生长状况。

1.4 菌株发酵生产 GABA 和胁迫条件处理

将保存的菌液从-80 °C 冰箱取出, 取 50 μ L 接种到 5 mL YPD 液体培养基中, 于 25 °C、200 r/min 摇床中培养 24 h 后转接到 100 mL YPD 种子培养基中, 置于 25 °C 摇床中培养 17–18 h, 按照初始细胞密度 OD_{600} 为 0.1 接种到 YPD 发酵培养基中, 用透气封口膜封口, 在 25 °C、200 r/min 培养条件下发酵。外源添加乙醇和乙酸时分别按照乙醇 3%和 5%、乙酸 3 g/L 和 5 g/L 的比例在接种之前加入, 放于 25 °C 摇床培养。

1.5 胞外 GABA 浓度检测

在发酵 24 h 时取样 1 mL, 在 8 000 r/min 条件下离心 3 min, 取上清液 20 μ L 稀释 50 倍至 1 mL, 混匀过 0.22 μ m 滤膜, 用超高效液相色谱-四极杆质谱仪测定 GABA 的含量。流动相: A: 0.1%甲酸-水, B: 乙腈; 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μ m, 2.1 mm \times 100 mm; 温度: 35 °C; 进样体积: 2 μ L; 流速: 0.25 mL/min。GABA 的出峰时间为 1.010 min。

1.6 胞内 GABA 含量检测

发酵 24 h 后取样 50 mL, 于 4 °C 下离心收集菌体, 用无菌去离子水洗涤 2 次, 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液和玻璃珠, 用细胞破碎仪破碎细胞, 随后收集所有上清液并加入适量体积的碘基水杨酸, 在 4 °C 静置 1 h, 在 4 °C 下离心 30 min 后收集上清液, 调 pH 为 1.9, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 用全自动氨基酸分析仪检测 GABA 的含量, 同时测相同干重的细胞用于计算最终含量。

1.7 胞内 ROS 检测

使用活性氧试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)的方法检测。

1.8 细胞膜透性检测

采用文献[25]的方法并进行改进, 取发酵 24 h 的细胞 1 OD_{600} , 用 PBS 缓冲液洗 2 遍, 用稀释后的 PI 染液悬浮细胞, 置于黑暗中孵育 20 min, 每 5 min 上下颠倒混匀 1 次, 随后用 PBS 缓冲液洗 2 遍, 用多功能酶标仪在 513 nm 激发光和 617 nm 发射光条件下测定荧光值, 以空白 PBS 的荧光值作为对照。利用荧光值与相应的 OD_{600} 值进行计算, “(样品荧光值-PBS 荧光值)/ OD_{600} ”即为细胞膜透性。

2 结果与分析

2.1 *W. rabaulensis* JT229 的筛选及其耐温性

利用文献[26]报道的显色反应对本实验室分离鉴定的酵母菌株进行筛选, 发现 *W. rabaulensis* 具有 GABA 生产能力。该菌株分离自西藏林芝地区的姜果实样品内部, 将该菌株编号为 JT229。为了探究该菌株的最适生长温度, 对该菌株进行不同温度条件下平板上生长的测定, 结果表明, *W. rabaulensis* JT229 的最适生长温度为 25 °C, 耐低温性较强, 在 4 °C 和 8 °C 下均能生长; 该菌株耐高温性能相对较差, 在 30 °C 条件下生长能力稍减弱, 在 37 °C 下生长明显被抑制(图 1)。有研究表明, 青藏高原酵母类种群多数属于耐低温酵母^[27], 这可能与西藏地区独特的低温环境相关。

2.2 *W. rabaulensis* JT229 胞外 GABA 的产量

2.2.1 菌株利用葡萄糖和木糖生产 GABA

W. rabaulensis JT229 可以在 YPD 培养基中利用葡萄糖生产 GABA, 已知一株 *W. rabaulensis* 酵母在甘蔗渣半纤维素水解物中可

利用木糖生产乙醇^[23], 因此本研究测试了菌株在 30 °C 下以不同浓度的葡萄糖和木糖为碳源的 YPD 和 YPX 培养基中的 GABA 生产情况, 结果如图 2 所示。菌株以葡萄糖为碳源时, 生长和

GABA 的产量均无显著差异(图 2A、2C)。菌株以不同浓度的木糖作为碳源条件下的生长无差别, 并且可以利用木糖作为碳源生产 GABA, 产量也无明显差别(图 2B、2D), 说明该菌株具

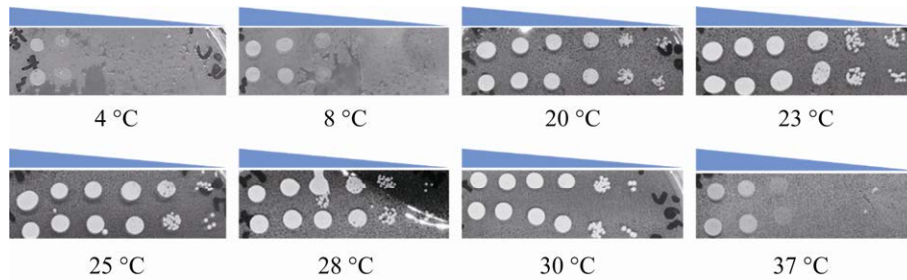


图 1 *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 在不同温度条件下的生长

Figure 1 Growth of *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 under different temperatures. *W. rabaulensis* JT229 was grown on YPD agar medium at different temperatures for 48 h before being photographed.

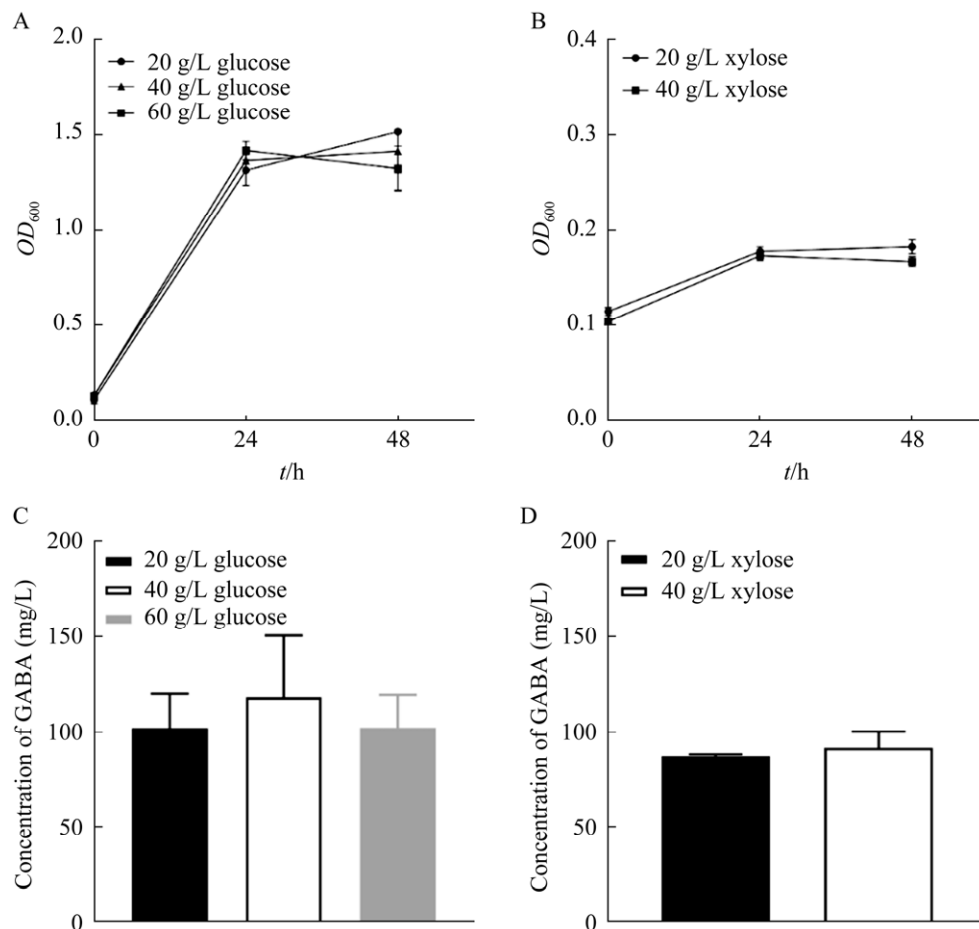


图 2 *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 利用葡萄糖和木糖为碳源的生长(A、B)和 GABA 生产(C、D)
Figure 2 Growth (A, B) and production of GABA (C, D) by *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 using glucose or xylose as carbon sources.

有利用秸秆水解液中的木糖进行 GABA 生产的潜力。此外,考察了利用混合糖发酵生产 GABA 的能力,但混合糖未能促进菌株更好的生产 GABA (结果未显示)。考虑到较低浓度的葡萄糖就可以产生较高浓度的 GABA,因此选用 20 g/L 葡萄糖作为单一碳源进行后续的实验探究。

2.2.2 利用胁迫条件诱导生产 GABA

GABA 作为一种胁迫保护剂可以提高菌株的胁迫耐受性^[28],推测利用人为施加的胁迫条件,可以促使菌株更多地生产 GABA,因此本研究进行了胁迫驱动的 GABA 生产探究。由于本课题组长期从事木质纤维素类生物质的生物

炼制研究,因此围绕相关的胁迫开展了探究,高温是发酵生产中常见的胁迫,乙醇是酵母常见的毒性发酵产物,乙酸是秸秆水解液中普遍存在的抑制性物质^[29],因此选择了这 3 个胁迫条件进行探究。

首先以 25 °C 作为对照培养条件,考察了 30 °C 和 37 °C 作为不同高温的胁迫条件对 GABA 生产的影响。结果表明,在 30 °C 和 37 °C 下,菌株生长受到抑制,尤其是在 37 °C 下,菌株几乎不生长(图 3A),但在几乎不生长的 37 °C 下更有利于胞外 GABA 的产生,达到 80.07 mg/L,是对照条件下产量 37.27 mg/L 的 2.15 倍(图 3C)。

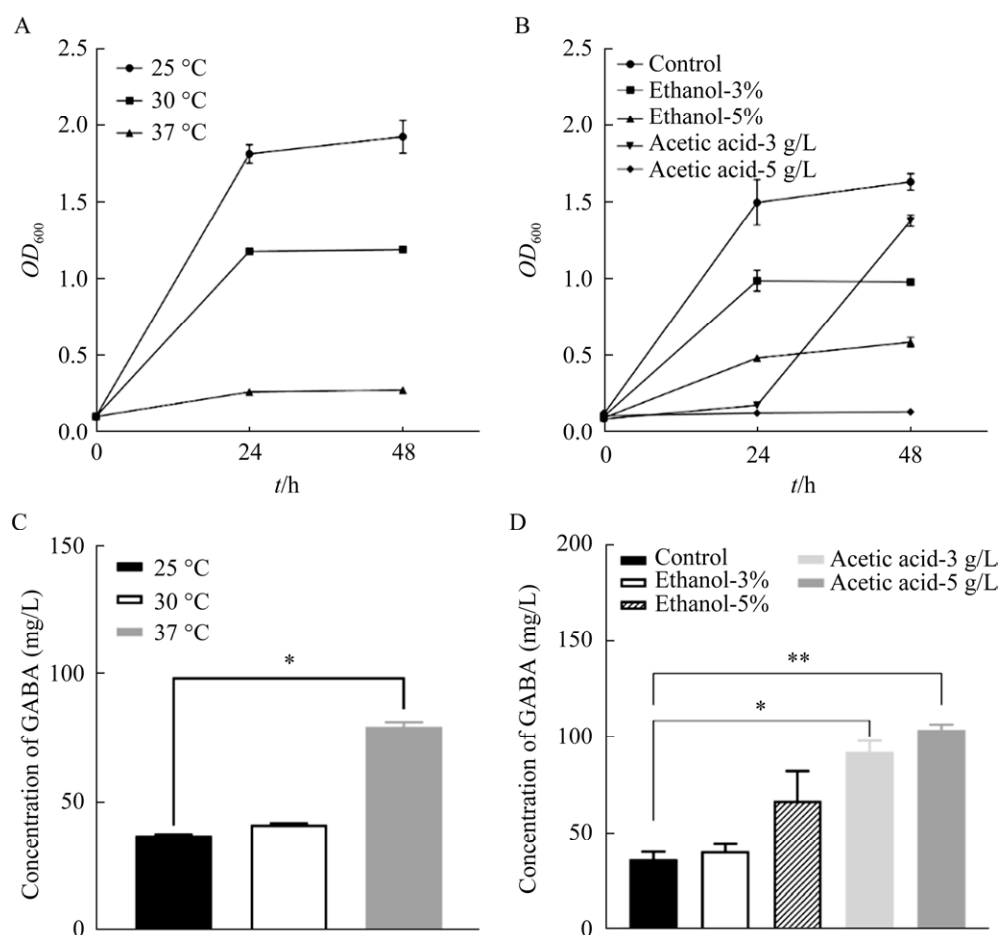


图 3 *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 在胁迫条件下的生长(A、B)和 GABA 生产(C、D)

Figure 3 Growth (A, B) and production of GABA (C, D) of *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 under stress conditions. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

该菌株对于乙酸的耐受性较差, 在添加乙酸的条件下前 24 h 均不能生长, 其中在添加 5 g/L 乙酸的条件下, 菌株几乎无生长能力; 添加 3 g/L 乙酸的菌株在 24 h 后迅速生长。菌株对于乙醇的耐受性强于乙酸, 在 3% 和 5% 的乙醇浓度下可以生长(图 3B)。对于 GABA 的生产情况, 乙酸促进胞外 GABA 产量的提升更明显, 并且 3 g/L 和 5 g/L 的促进作用差别不大, 分别为 92.49 mg/L 和 104.15 mg/L, 为对照条件 36.31 mg/L 的 2.55 倍和 2.87 倍; 乙醇对胞外 GABA 的生产也有一定的诱导效果, 分别为 40.57 mg/L 和 67.02 mg/L, 为对照条件的 1.12 倍和 1.85 倍(图 3D)。酵母细胞在低浓度的乙酸中, 可以将乙酸转化为乙酰辅酶 A 后参与 TCA 循环以维持细胞的生长和代谢^[30], 但是本研究菌株在 24 h 内几乎无生长, 因此推测乙酸并未被吸收利用。酵母细胞在受到乙酸胁迫时, 其细胞膜和细胞壁的完整性、流动性以及质膜成分都会发生变化, 因此推测胞外 GABA 产量提高是由于乙酸胁迫导致质膜变化引起的^[31]。

由图 3 可看出, 高温、乙醇和乙酸胁迫均能促进 GABA 的产生, 且在本研究中的几个条件下最有效的是 5 g/L 乙酸的诱导。另外, 同一条件下不同程度的胁迫对促进胞外 GABA 的产生都有促进作用, 且在一定范围内胞外 GABA 含量与胁迫程度成正比。但是 GABA 的产量并不与菌株的生长状况成正比, 而是在一定程度下, 菌株生长受到抑制的条件更有利于 GABA 的产生。由于 GABA 是胁迫保护物质, 因此我们推测胁迫条件下有可能 GABA 的合成提高, 或者由于胁迫导致细胞膜损伤, GABA 的外排增多。此外, 在胁迫过高的情况下并不能达到更好地诱导产 GABA 的效果, 反而使胞外 GABA 含量有所下降。

2.3 *W. rabaulensis* JT229 在胁迫条件下胞内 ROS 和细胞膜透性的变化

细胞在受到外部胁迫条件的诱导时会使胞

内 ROS 水平升高^[32], 从而产生大量的胁迫保护性的物质例如 GABA, 以应对胞内 ROS 水平的升高, 并且细胞在受到胁迫刺激时可能使细胞膜透性提高, 促进 GABA 的释放。为了验证这一猜想, 本研究检测了在 GABA 产量较高的 3 个条件下的胞内 ROS 的积累和细胞膜透性, 结果如图 4 所示。在添加 5 g/L 乙酸和 37 °C 高温的条件下, 胞内 ROS 水平和细胞膜透性均有明显提高, 其中添加 5 g/L 乙酸的条件下胞内 ROS 是对照条件下的 10.05 倍, 细胞膜透性是对照条件下的 2 223.62 倍。添加 3 g/L 乙酸的条件下胞内 ROS 水平有所下降, 但是细胞膜透性有明显提升, 是对照组的 9.80 倍。由此可见, 胁迫条件下该酵母的胞内 ROS 水平高不一定引起细胞膜透性的提高。

2.4 *W. rabaulensis* JT229 在胁迫条件下胞内氨基酸的积累

为了探究胞内 GABA 以及其他氨基酸的变化情况, 检测了乙酸和高温胁迫 2 个条件下的

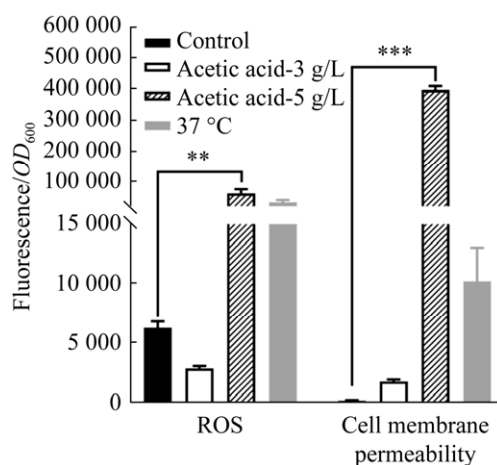


图 4 胁迫条件下 *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 的胞内 ROS 和细胞膜透性

Figure 4 Intercellular ROS and cell membrane permeability of *Wickerhamomyces rabaulensis* JT229 under stress conditions. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

胞内氨基酸的含量,结果如图 5 所示。由于菌株在乙醇添加条件下的 GABA 产量提升不明显,因此未对添加乙醇条件下的胞内 GABA 进行探究。GABA 在细胞的生命活动中具有吸收和外排的途径,且大部分积累在胞内^[33],本研究结果表明对照和胁迫条件下的细胞内确实蕴含着大量 GABA,3 g/L 的乙酸诱导与对照条件下的胞内 GABA 含量几乎无差别,分别为 1 766.72 mg/g 干重和 1 824.45 mg/g 干重;且 37 °C 高温诱导下的胞内 GABA 含量(492.47 mg/g 干重)明显低于对照组(图 5A)。谷氨酸是 GABA 合成的前体^[18],在胁迫条件下,谷氨酸含量无发现下降,反而在高温条件下有所提高,因此推测,胞外 GABA 含量提高不是由于胞内 GABA 合成提高造成的。我们推测若胁迫条件下胞内的 GABA 合成增多,则其前体谷氨酸的含量应下降,但本研究结果显示谷氨酸在 2 个胁迫条件下的含量均高于对照,因此胁迫条件下胞内可能没有合成更多的 GABA。另外发现,高温和乙酸胁迫条件下多个氨基酸都没有很显著变化,只有高温条件下

丙氨酸明显上调(图 5A、5B),具体机制还不清楚。结合图 4 细胞膜的通透性结果,我们推测 2 种胁迫条件下胞外 GABA 产量提高的原因是由于胁迫条件导致细胞膜透性提高,胞内 GABA 更多的排出到胞外。

3 讨论

本研究首次发现一株分离自西藏姜果实的非常规酵母 *W. rabaulensis* 具有生产 GABA 的潜力,还发现该菌株具有比较好的木糖利用性能。木糖是木质纤维素生物质中含量除了葡萄糖外最丰富的糖^[34],本研究分离的菌株具有可利用廉价可再生生物质资源进行高值产品 GABA 生产的能力。木质纤维素水解液中经常含有多种抑制物,其中乙酸是含量比较高的抑制物,来自于半纤维素的乙酰基,普遍存在于多种水解液中,该抑制物的存在会严重影响酵母的生长和发酵能力^[35-36]。但本研究发现 *W. rabaulensis* JT229 可以在乙酸的胁迫下生产 GABA,提示含有抑制物的秸秆水解液可能更有利于一些活性物质的生产。

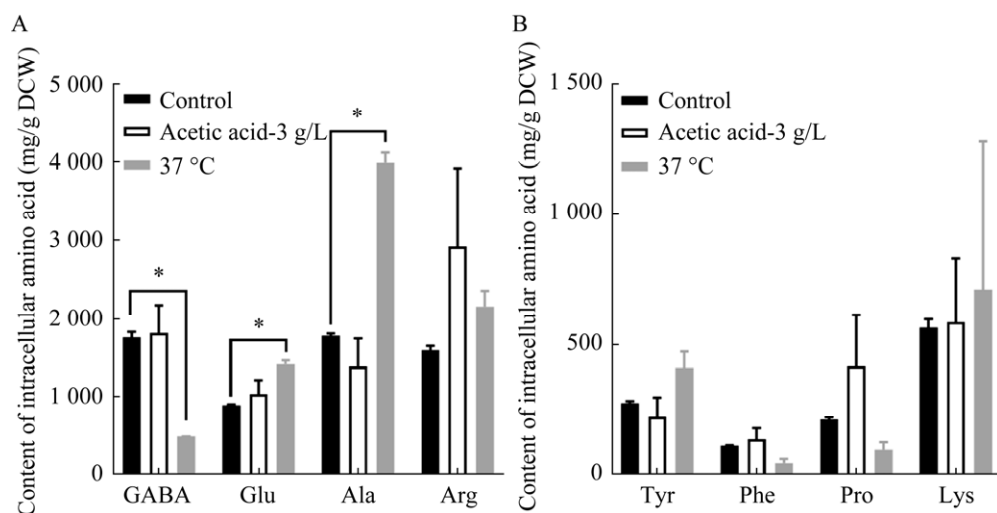


图 5 胁迫条件下 *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 的胞内氨基酸含量

Figure 5 Content of intracellular amino acid of *Wickerhanomyces rabaulensis* JT229 under stress conditions. A: The intracellular content of amino acid is higher than 1 000 mg/g DCW. B: The content of amino acid is less than 1 000 mg/g DCW. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

前期研究多集中在胞外 GABA 的生产, 对胞内的研究很少。本研究探究了胞外和胞内 GABA 的产量, 证明维克汉姆酵母胞内也存在较多的 GABA, 为利用其他酵母和相关微生物生产 GABA 和类似的胁迫保护物质提供了新的思路。此外, 本研究还发现 GABA 在胞内也有比较高的积累, 可以通过细胞破壁、高温或乙醇提取等方法对胞内 GABA 进行提取, 则可以实现 GABA 胞内外总量的获得。另外, 值得注意的是, 国内的一些文献使用显色法检测 GABA 的含量, 本实验室前期验证结果表明, 此方法的误差较大, 而本研究使用 UPLC-MS 检测 GABA 的含量具有高度的精确性。

酵母菌具有生产多种活性物质的潜力, 例如产生细胞壁多糖、多肽和多种氨基酸等物质^[20], 因此, 生产 GABA 的酵母可以和其他活性物质联合生产, 提高综合利用价值。另外, 利用可生产 GABA 的酵母也可生产功能食品, 比如文献报道用产 GABA 的酵母酿造富含 GABA 的果酒和奶酪等^[37-38]。本研究分离的酵母来自姜果实, 后续可进一步探究该菌株在 GABA 和其他活性物质联产, 以及在食品和化妆品等生产领域的更多应用。

内生酵母目前的研究多集中在其与植物的相互作用、对植物抗逆性的促进作用以及药用价值的探索等^[9], 内生酵母的应用相关研究还比较有限。本研究对分离自西藏姜果实的内生酵母生产 GABA 的菌株进行了研究, 后续可以进一步优化发酵条件, 或者利用遗传改造进一步提高菌株的性能, 还可以挖掘其关键酶基因和调控基因, 有希望进一步提高 GABA 产量。值得指出的是, 目前对维克汉姆酵母(*W. rabaulensis*)的应用研究非常少, 本研究为国内外首次报道该菌种能够生产 GABA, 为进一步开发利用维克汉姆酵母和其他更多的非常规酵母资源提供了借鉴。

参考文献

- [1] 王有智, 马超, 蒋思萍. 西藏微生物研究的若干领域[J]. 西藏科技, 2011, 2011(8): 75-77.
WANG YZ, MA C, JIANG SP. Several fields research of microorganism in Tibet[J]. Tibet's Science and Technology, 2011, 2011(8): 75-77 (in Chinese).
- [2] 郭小芳, 德吉, 龙琦炜, 白斌锦, 王豪杰, 曹亚璞. 西藏拉鲁湿地水体酵母菌多样性及其与理化因子相关性[J]. 微生物学报, 2018, 58(7): 1167-1181.
GUO XF, DEJI, LONG QW, BAI BJ, WANG HJ, CAO YP. Spatial dynamics of yeast community and its relationship with environmental factors in Lhalu Wetland, Tibet[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(7): 1167-1181 (in Chinese).
- [3] HU H, WISNIEWSKI ME, ABDELFATTAH A, ZHENG XD. Biocontrol activity of a cold-adapted yeast from Tibet against gray mold in cherry tomato and its action mechanism[J]. Extremophiles: Life Under Extreme Conditions, 2017, 21(4): 789-803.
- [4] HU H, YAN FJ, WILSON C, SHEN Q, ZHENG XD. The ability of a cold-adapted *Rhodotorula mucilaginosa* strain from Tibet to control blue mold in pear fruit[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2015, 108(6): 1391-1404.
- [5] MENG L, LI ZY, LIU LZ, CHEN XH, JUNJUNWU, LI W, ZHANG XH, DONG MS. Lead removal from water by a newly isolated *Geotrichum candidum* LG-8 from Tibet kefir milk and its mechanism[J]. Chemosphere, 2020, 259: 127507.
- [6] WANI ZA, ASHRAF N, MOHIUDDIN T, RIYAZ-UL-HASSAN S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 2955-2965.
- [7] DENG ZJ, CAO LX. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review[J]. Chemosphere, 2017, 168: 1100-1106.
- [8] 杨志军, 邓毅, 曼琼, 杨秀娟, 杨延泽. 内生菌在天然药物研究中的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(5): 593-596.
YANG ZJ, DENG Y, MAN Q, YANG XJ, YANG YZ. Progress in search for endophytes associated with natural medicine[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 34(5): 593-596 (in Chinese).
- [9] NISA H, KAMILI AN, NAWCHOO IA, SHAFI S, SHAMEEM N, BANDH SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive

- natural products: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59.
- [10] GUL JAN F, HAMAYUN M, HUSSAIN A, JAN G, IQBAL A, KHAN A, LEE IJ. An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize[J]. *BMC Microbiology*, 2019, 19(1): 3.
- [11] PETROFF OAC. GABA and glutamate in the human brain. *The Neuroscientist: a Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 2002, 8(6): 562-573.
- [12] NGO DH, VO TS. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid[J]. *Molecules*, 2019, 24(15): 2678.
- [13] CHEN S, TAN B, XIA YY, LIAO SM, WANG MW, YIN J, WANG J, XIAO H, QI M, BIN P, LIU G, REN WK, YIN YL. Effects of dietary gamma-aminobutyric acid supplementation on the intestinal functions in weaning piglets[J]. *Food & Function*, 2019, 10(1): 366-378.
- [14] HAN SM, LEE JS. Production and its anti-hyperglycemic effects of γ -aminobutyric acid from the wild yeast strain *Pichia silvicola* UL6-1 and *Sporobolomyces carnicolor* 402-JB-1[J]. *Mycobiology*, 2017, 45(3): 199-203.
- [15] JINGBAI W. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for cellulosic glutamic acid and γ -aminobutyric acid fermentation[J]. East China University of Science and Technology, 2019.
- [16] 肖婧, 徐亚男, 李琦, 张彦位, 刘研, 史学伟. 高产 γ -氨基丁酸酵母菌的筛选、鉴定及优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(10): 1093-1099.
- XIAO J, XU YN, LI Q, ZHANG YW, LIU Y, SHI XW. Screening, identification and optimizing of γ -aminobutyric acid production in yeast[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2016, 35(10): 1093-1099 (in Chinese).
- [17] 郝娜. 产 γ -氨基丁酸毕赤酵母的筛选、鉴定及发酵条件优化[D]. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2016.
- HAO N. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of *Pichia Pastoris* producing γ -aminobutyric acid[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [18] PERPETUINI G, TITTARELLI F, BATTISTELLI N, SUZZI G, TOFALO R. Γ -aminobutyric acid production by *Kluyveromyces marxianus* strains[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 129(6): 1609-1619.
- [19] 徐晓波. 产生 GABA 酵母菌资源多样性和分子系统学研究[D]. 浙江师范大学硕士学位论文, 2010.
- XU XB. Resource diversity and molecular systematic studies on yeasts which produce GABA[D]. Jinhua: Master's Thesis of Zhejiang Normal University, 2010 (in Chinese).
- [20] 范婷婷, 王慕瑶, 李俊, 王凤楼, 章漳, 赵心清. 酵母生物多样性开发及工业应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 806-815.
- FAN TT, WANG MY, LI J, WANG FL, ZHANG Z, ZHAO XQ. Exploration of yeast biodiversity and development of industrial applications[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 806-815 (in Chinese).
- [21] PATRA P, DAS M, KUNDU P, GHOSH A. Recent advances in systems and synthetic biology approaches for developing novel cell-factories in non-conventional yeasts[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 47: 107695.
- [22] WU ZW, BAI FY. ITS sequence and electrophoretic karyotype comparisons of *Candida ethanolica* with *Pichia deserticola* and *Candida odintsovae* with *Pichia rabaulensis*[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2005, 51(5): 319-322.
- [23] CADETE RM, MELO-CHEAB MA, DUSSÁN KJ, RODRIGUES RCLB, da SILVA SS, GOMES FCO, ROSA CA. Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(5): 1203-1213.
- [24] PALLADINO F, RODRIGUES RCLB, CADETE RM, BARROS KO, ROSA CA. Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2021, 15(3): 690-702.
- [25] GARCIA-GONZALEZ L, GEERAERD AH, MAST J, BRIERS Y, ELST K, GINNEKEN LV, van IMPE JF, DEVLIEGHERE F. Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment[J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(4): 541-549.

- [26] 赵炜彤. 高产 γ -氨基丁酸酵母菌株的筛选、诱变及发酵条件优化[D]. 吉林农业大学硕士学位论文, 2015.
ZHAO WT. The study on screening and mutation breeding of high-yield γ -aminobutyric acid yeast strains and optimization of its fermentation conditions[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [27] 王贵双. 青藏高原酵母多样性研究[D]. 西藏大学硕士学位论文, 2021.
WANG GS. Study on diversity of yeast in Qinghai-Tibet Plateau[D]. Nyingchi: Master's Thesis of Tibet University, 2021 (in Chinese).
- [28] SARASA SB, MAHENDRAN R, MUTHUSAMY G, THANKAPPAN B, SELTA DRF, ANGAYARKANNI J. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(4): 534-544.
- [29] ZHAO XQ, XIONG L, ZHANG MM, BAI FW. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 215: 84-91.
- [30] GENG P, ZHANG L, SHI GY. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(5): 94.
- [31] GUARAGNELLA N, BETTIGA M. Acetic acid stress in budding yeast: from molecular mechanisms to applications[J]. *Yeast*, 2021, 38(7): 391-400.
- [32] ELEUTHERIO E, de ARAUJO BRASIL A, FRANÇA MB, de ALMEIDA DSG, RONA GB, MAGALHÃES RSS. Oxidative stress and aging: learning from yeast lessons[J]. *Fungal Biology*, 2018, 122(6): 514-525.
- [33] BACH B, MEUDEEC E, LEPOUTRE JP, ROSSIGNOL T, BLONDIN B, DEQUIN S, CAMARASA C. New insights into γ -aminobutyric acid catabolism: evidence for γ -hydroxybutyric acid and polyhydroxybutyrate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(13): 4231-4239.
- [34] LEE JW, YOOK S, KOH H, RAO CV, JIN YS. Engineering xylose metabolism in yeasts to produce biofuels and chemicals[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 67: 15-25.
- [35] ZHANG MM, CHEN HQ, YE PL, WATTANACHAISAEEREEKUL S, BAI FW, ZHAO XQ. Development of robust yeast strains for lignocellulosic biorefineries based on genome-wide studies[J]. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 2019, 58: 61-83.
- [36] 赵心清, 张明明, 徐桂红, 许建韧, 白凤武. 酿酒酵母乙酸耐性分子机制的功能基因组进展[J]. *生物工程学报*, 2014, 30(3): 368-380.
ZHAO XQ, ZHANG MM, XU GH, XU JR, BAI FW. Advances in functional genomics studies underlying acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2014, 30(3): 368-380 (in Chinese).
- [37] LI S, ZHANG Y, YIN PP, ZHANG KL, LIU Y, GAO YY, LI YD, WANG T, LU SL, LI BK. Probiotic potential of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing yeast and its influence on the quality of cheese[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(6): 6559-6576.
- [38] ZHANG Q, SUN Q, TAN X, ZHANG SM, ZENG L, TANG J, XIANG WL. Characterization of γ -aminobutyric acid (GABA)-producing *Saccharomyces cerevisiae* and coculture with *Lactobacillus plantarum* for mulberry beverage brewing[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(4): 447-453.