

乙醇对屎肠球菌全细胞谷氨酸脱羧酶表观活力的促进作用

杨胜远*, 徐小丽, 梁永祥

岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东 湛江 524048

杨胜远, 徐小丽, 梁永祥. 乙醇对屎肠球菌全细胞谷氨酸脱羧酶表观活力的促进作用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 758-768.

YANG Shengyuan, XU Xiaoli, LIANG Yongxiang. Ethanol improves the apparent activity of whole-cell glutamate decarboxylase in *Enterococcus faecium*[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 758-768.

摘要:【背景】细胞内外物质的交换速率对全细胞转化活力具有重要影响。【目的】探讨乙醇对全细胞谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD)表观活力的影响, 提高屎肠球菌全细胞转化法合成 γ -氨基丁酸的产量。【方法】通过比较乙醇对GAD纯酶和全细胞GAD酶学特性、细胞结构、细胞膜通透性等的影响, 探究乙醇对全细胞GAD活力的促进机制。【结果】低浓度乙醇对全细胞GAD活力有显著促进作用, 最适浓度为7.5%; 在该浓度下, 全细胞GAD表观活力提升41.63%, 乙醇对全细胞GAD最适反应pH无影响, 但降低了全细胞GAD活力对胞外pH变化的敏感性, 减小了米氏常数(K_m); 7.5%乙醇对GAD纯酶影响不显著($P>0.05$), 未造成GAD外泄和细胞破损, 仅在与细胞共存的反应体系才具有促进作用。结果表明, 7.5%乙醇可改变细胞的透性, 提升细胞传质速率, 从而促进全细胞GAD的表观活力。【结论】乙醇价格低廉、安全性高, 对全细胞GAD的促进作用在GABA工业上具有很好的应用前景。

关键词: 乙醇; 谷氨酸脱羧酶; 生物转化; γ -氨基丁酸; 促进作用; 屎肠球菌

资助项目: 广东省重点建设学科科研能力提升项目(2022ZDJS079); 广东省普通高校特色创新项目(2022KTSCX073); 广东省本科高校教学质量与教学改革工程特色专业项目(粤教高函[2020] 19号); 岭南师范学院教学质量与教学改革工程特色专业项目(岭师教务[2020] 228号)

This work was supported by the Key Construction Discipline Research Capacity Enhancement Project of Guangdong Province (2022ZDJS079), the Ordinary University Characteristic Innovation Project of Guangdong Province (2022KTSCX073), the Characteristic Specialty Project of Teaching Quality and Teaching Reform Engineering in Universities of Guangdong Province ([2020] 19), and the Characteristic Specialty Project of Teaching Quality and Teaching Reform Engineering of Lingnan Normal University ([2020] 228).

*Corresponding author. E-mail: yangsy1972@163.com

Received: 2023-10-27; Accepted: 2023-11-21; Published online: 2024-01-08

Ethanol improves the apparent activity of whole-cell glutamate decarboxylase in *Enterococcus faecium*

YANG Shengyuan^{*}, XU Xiaoli, LIANG Yongxiang

College of Food Science and Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong, China

Abstract: [Background] The exchange rate of substances inside and outside cells has a significant effect on the transformation activity of whole-cells. [Objective] To increase the yield of γ -aminobutyric acid (GABA) synthesized by whole-cell transformation, we investigated the improving effect of ethanol on the apparent activity of whole-cell glutamate decarboxylase (GAD) in *Enterococcus faecium*. [Methods] We explored the mechanism of ethanol in improving the apparent activity of whole-cell GAD by comparing the effects of ethanol on the enzymatic properties of pure GAD and whole-cell GAD, cell structure, and membrane permeability. [Results] Low-concentration ethanol significantly promoted the activity of whole-cell GAD with the optimal concentration of 7.5%. At this concentration, the apparent activity of whole-cell GAD was increased by 41.63%, and the optimal reaction pH of whole-cell GAD did not change. However, the sensitivity of whole-cell GAD to the changes of extracellular pH and the Michaelis constant (K_m) of whole-cell GAD were both reduced. This concentration of ethanol had no significant effect on pure GAD ($P>0.05$), and did not cause GAD leakage or cell damage. In addition, 7.5% ethanol increased the activity of GAD only when it coexisted with the cells in reaction system. The results indicated that 7.5% ethanol altered the cell permeability and enhanced the mass transfer rate of cells, thereby improving the apparent activity of whole-cell GAD. [Conclusion] Due to the low price and high safety, ethanol demonstrates great potential of application in the improvement of whole-cell GAD activity for the industrial production of GABA.

Keywords: ethanol; glutamate decarboxylase; biotransformation; γ -aminobutyric acid; improving effect; *Enterococcus faecium*

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)具有降血压^[1]、镇静^[2]、改善睡眠^[2-3]、增强免疫力^[4]、预防心血管疾病^[5]、调节新陈代谢^[6]、改善氧化应激与甲状腺功能^[7]和抑癌^[8-9]等多种生理功能,已成为一种新型功能性因子。GABA合成主要有化学合成法和生物合成法,化学合成法由于化学原料具有毒性和腐蚀性,反应条件剧烈,副产物多,缺乏安全性,不适宜作为食品添加剂,而生物合成法是利用谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD, EC 4.1.1.15)催

化L-谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu)发生 α -脱羧作用而生成GABA,反应条件温和、安全性高,以生物合成法生产食品或医药级GABA是一条较理想的途径^[10]。

GAD广泛存在于微生物、植物和动物细胞^[11],利用植物和微生物源GAD催化内源或外源L-Glu转化生产GABA已得到极大关注^[12-22]。相对于植物,微生物具有生长繁殖快、代谢过程特殊和易培养等特点,利用微生物生产产品不受资源、环境和空间限制,因此利用微生物合

成 GABA 更具优势。微生物合成法主要有细胞转化法^[14-15]、游离酶或固定化酶催化反应法^[16-18]和发酵法^[19-22]。GAD 是微生物合成 GABA 的关键酶,因此细胞转化法、游离酶或固定化酶催化反应法和发酵法的实质都是利用 GAD 催化 L-Glu 转化为 GABA。由于发酵法的培养基组分和代谢产物多,因此 GABA 提纯较难;游离酶或固定化酶法均需要细胞破碎提取细胞内 GAD,酶提取纯化难度大、成本高;全细胞转化法是直接利用微生物细胞进行转化反应,可以减少酶提取工艺过程,并且微生物细胞较游离酶更易从反应液中分离去除,转化反应体系成分较少,利于改善下游提取和纯化工艺,因此利用微生物细胞转化生产 GABA 在工艺和生产成本方面均具有显著优势。然而,由于 GAD 是胞内酶,全细胞转化反应与游离酶催化反应存在较大差别,催化效率普遍低于游离酶,因此如何提升催化效率是全细胞转化法亟待解决的重要课题。细胞膜是影响细胞小分子物质的传质速率的主要结构,为提高全细胞的通透性,一些文献采用表面活性剂(如 Triton X-100)^[23]或有机溶剂(如正丁醇、二甲苯)^[24-25]对细胞进行透性化处理,破坏细胞膜的完整性,增加细胞的渗透性。表面活性剂或二甲苯对生物酶的稳定性和活力具有一定影响,因此对透性化处理剂的浓度、透性化处理的时间等条件要求苛刻,透性化处理后需要及时离心分离和洗涤细胞,工艺过程烦琐,细胞透性化程度难以控制,而且正丁醇和二甲苯安全性低,其残留将影响 GABA 在食品或医药中应用的安全性。乙醇的安全性高、价格低廉,但关于乙醇对微生物细胞膜的破坏性及对胞内 GAD 的影响效应尚鲜见报道。

作为乳酸菌的一种,屎肠球菌繁殖快、易培养,细胞具有很强的 GAD 活力,在细胞转化

法生产 GABA 方面具有很好的应用前景^[18,26-31]。为提高屎肠球菌转化效率、降低 GABA 生产成本,作者前期探索性研究发现低浓度乙醇对细胞转化活力具有很强的促进作用,但其促进机制及量效关系尚不清楚。本试验主要探讨乙醇对屎肠球菌全细胞 GAD 表现活力的促进作用及其机制,以期乙醇在全细胞转化法合成 GABA 中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) GDMCC 60203 从泡菜中分离获得,保藏于广东省微生物菌种保藏中心^[28]。

屎肠球菌 GAD 纯酶参照文献[26]自行制备,通过 SDS-PAGE 电泳检验呈现单一条带,达到电泳纯。

1.2 培养基

Peptone sucrose beef extract (PSB)培养基参照文献[27]配制。

1.3 主要试剂和仪器

异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC), Sigma-Aldrich 公司;其余试剂为国产市售色谱纯、分析纯试剂或生化试剂。

热场发射扫描电子显微镜,电子株式会社;高效液相色谱仪,大连依利特分析仪器有限公司;电子分析天平,岛津公司;台式高速冷冻离心机,盐城市凯特实验仪器有限公司。

1.4 屎肠球菌细胞悬液的制备

挑取 4 °C 斜面保藏的屎肠球菌 GDMCC 60203 接种至 PSB 培养基,37 °C 静置培养 24 h,再按 1%的接种量转接 PSB 培养基,37 °C 静置培养 24 h 作为种子液。将种子液按 2%的接种量接种至 PSB 培养基,37 °C 静置培养 36 h 作为发酵醪。于 4 °C、8 500 r/min 离心 15 min 收集菌

体, 用菌体湿质量 30 倍的生理盐水重悬洗涤细胞, 再次离心收集菌体。按照 1 g/5 mL 的比例将菌体与生理盐水混合, 在小于 100 mL 混合液中视体积适当加入 3-10 粒直径约 5 mm 的玻璃珠, 在常温下于 80 r/min 振荡 20 min, 制成均匀分散的细胞悬液。

1.5 GAD 活力测定

GAD 纯酶活力和全细胞 GAD 活力测定方法分别参照文献[26]和[28]进行, 并略作修改。

GAD 纯酶活力测定: 取 GAD 纯酶 0.5 mL, 加入 0.2 mol/L 谷氨酸一钠(monosodium glutamate, MSG)溶液(溶于 0.2 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液, pH 5.0) 1 mL、试验因子 0.5 mL, 混匀, 40 °C 水浴反应 30 min, 以无水乙醇终止反应并定容至 10 mL, 混匀, 于 8 500 r/min 离心 15 min, 吸取上清液测定 GABA。以 0.2 mol/L 乙酸-乙酸盐缓冲液(pH 5.0) 1 mL 替代 MSG 溶液按相同操作作为空白。

全细胞 GAD 活力测定: 取菌悬液 0.5 mL 加入 0.2 mol/L MSG 溶液(溶于 0.4 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液, pH 4.2) 1 mL、试验因子 0.5 mL, 混匀, 40 °C 水浴反应 3 h, 以无水乙醇终止反应并定容至 10 mL, 混匀, 于 8 500 r/min 离心 15 min, 吸取上清液测定 GABA。以 0.4 mol/L 乙酸-乙酸盐缓冲液(pH 4.2) 1 mL 替代 MSG 溶液按相同操作作为空白。

活力单位定义: 测定条件下 1 h 生成 1 μ mol GABA 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。除设置了对照组的试验以对照组平均 GAD 活力为 100%外, 其余均以活力最高的试验组平均 GAD 活力为 100%计算相对酶活(%)。

1.6 GABA 分析

参照文献[29]采用 HPLC 测定 GABA 含量。

1.7 不同试剂对全细胞 GAD 活力的影响

分别以 40%乙醇、1.6%吐温-80 作为试验因

子, 即反应体系乙醇终浓度为 10%、吐温-80 终浓度为 0.4%, 按照全细胞 GAD 活力测定方法与屎肠球菌全细胞进行共反应, 考察不同试剂对全细胞转化活力的影响。以蒸馏水代替试验因子按相同操作作为对照。

1.8 乙醇浓度对全细胞 GAD 活力的影响

分别以 10%、20%、30%、40%、50%、60% 和 70%的乙醇作为试验因子, 即反应体系乙醇终浓度分别为 2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%、15.0%和 17.5%, 按照全细胞 GAD 活力测定方法与屎肠球菌全细胞进行共反应, 考察不同乙醇浓度对全细胞转化活力的影响。以蒸馏水代替试验因子按相同操作作为对照。

1.9 乙醇对全细胞 GAD 的 pH 依赖性的影响

分别以 pH 值为 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0 和 5.2 的 0.2 mol/L MSG 溶液(溶于 0.4 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液)为底物, 以 30%的乙醇作为试验因子, 即反应体系中乙醇终浓度为 7.5%, 按照全细胞 GAD 活力测定方法与屎肠球菌全细胞进行共反应, 考察乙醇对全细胞 GAD 的 pH 依赖性的影响。以蒸馏水代替试验因子按相同操作作为对照。

1.10 乙醇对全细胞 GAD 动力学常数的影响

分别以 4、6、9、14、20、30、46、57、71、89、111、139、174 和 217 mmol/L MSG 溶液(以 0.4 mol/L 乙酸-乙酸钠缓冲液配置, pH 4.4) 为底物, 即反应体系中 MSG 溶液终浓度分别为 2.0、3.0、4.5、7.0、10.0、15.0、23.0、28.5、35.5、44.5、55.5、69.5、87.0 和 108.5 mmol/L; 以 30%的乙醇作为试验因子, 即乙醇终浓度为 7.5%。按照全细胞 GAD 活力测定方法与屎肠球菌全细胞进行共反应, 考察乙醇对全细胞 GAD 动力学常数的影响。以蒸馏水代替试验因子按相同操作作为对照。选择试验组和对照组的底物浓度和反应速度均呈一级反应关系的前 5 个连续

底物浓度梯度(4.5、7.0、10.0、15.0和23.0 mmol/L)的实验结果,通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算全细胞 GAD 的 K_m 与 V_{max} 。

1.11 乙醇对游离 GAD 纯酶活性的影响

按照 GAD 纯酶活力测定方法,以 30%的乙醇作为试验因子,测定 GAD 纯酶在乙醇终浓度为 7.5%的反应体系中的活力。以蒸馏水代替试验因子按相同操作作为对照。

1.12 乙醇对细胞结构的影响

1.12.1 GAD 外泄分析

按照 1 g/5 mL 的比例将菌体与含 7.5%乙醇的生理盐水混合,在小于 100 mL 混合液中视体积适当加入 3-10 粒直径约 5 mm 的玻璃珠,在常温下于 80 r/min 振荡 20 min,制成均匀分散的细胞悬液,4 °C、8 500 r/min 条件下离心 15 min,分别收集上清液和菌体。以蒸馏水代替 1.5 中的试验因子,按照 GAD 纯酶活力测定方法测定上清液 GAD 活力;按照 1 g/5 mL 的比例将菌体与生理盐水混合制成均匀的细胞悬液,以蒸馏水代替 1.5 中的试验因子,按照全细胞 GAD 活力测定方法测定细胞 GAD 活力。

1.12.2 细胞结构完整性分析

按照 1 g/5 mL 的比例将菌体分别与生理盐水(A)、含 7.5%乙醇的生理盐水(B)混合,在小于 100 mL 混合液中视体积适当加入 3-10 粒直径约 5 mm 的玻璃珠,在常温下于 80 r/min 振荡 20 min,制成均匀分散的细胞悬液,4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,将 1 g 菌体与 20 mL 磷酸缓冲液戊二醛固定液(0.1 mol/L, pH 7.2)混合,搅拌均匀分散菌体,室温浸泡 24 h,4 °C、8 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入去离子水重悬洗涤菌体,4 °C、8 000 r/min 离心收集菌体,重复洗涤菌体 3 次。将菌体于 -30 °C 冷冻过夜后进行冷冻干燥。采用热场发射扫描电子显微镜表征菌体形态结构,工作电

压 10 kV,放大倍数 15 000 倍。

1.12.3 乙醇对细胞膜透性的影响

按照 1 g/5 mL 的比例将菌体与含 7.5%乙醇的生理盐水混合,在小于 100 mL 混合液中视体积适当加入 3-10 粒直径约 5 mm 的玻璃珠,在常温下于 80 r/min 振荡 20 min,制成均匀分散的细胞悬液,4 °C、8 500 r/min 离心 15 min,收集菌体,再次按照 1 g/5 mL 的比例将菌体与生理盐水混合,制成均匀分散的细胞悬液,记为透性化细胞悬液。以生理盐水代替含 7.5%乙醇的生理盐水按相同操作制成均匀分散的细胞悬液,记为原细胞悬液。以蒸馏水代替 1.5 中的试验因子,按照全细胞 GAD 活力测定方法分别测定透性化细胞悬液和原细胞悬液细胞 GAD 活力。以 30%的乙醇作为试验因子,按照全细胞 GAD 活力测定方法测定原细胞悬液在乙醇终浓度为 7.5%的反应体系中的活力。

1.13 统计分析

通过 IBM SPSS Statistics 19.0 软件,运用单因素方差分析(ANOVA)的最小显著差数法(least significant difference, LSD)进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同试剂对全细胞 GAD 活力的影响结果

如图 1 所示,当反应体系含 10%乙醇时,屎肠球菌全细胞 GAD 的转化活力较对照组显著提高($P<0.05$),全细胞 GAD 相对酶活为 $129.66\% \pm 10.61\%$,而 0.4%吐温-80 对屎肠球菌全细胞 GAD 的转化活力略有抑制,但与对照组无显著性差异($P>0.05$)。结果表明,10%乙醇对屎肠球菌全细胞具有显著促进作用。

2.2 乙醇浓度对全细胞 GAD 活力的影响结果

从图 2 可见,随着全细胞反应体系中乙醇浓度的增加,全细胞 GAD 转化活力呈现先增后降的趋势,当反应体系中乙醇浓度为 7.5%时,屎肠

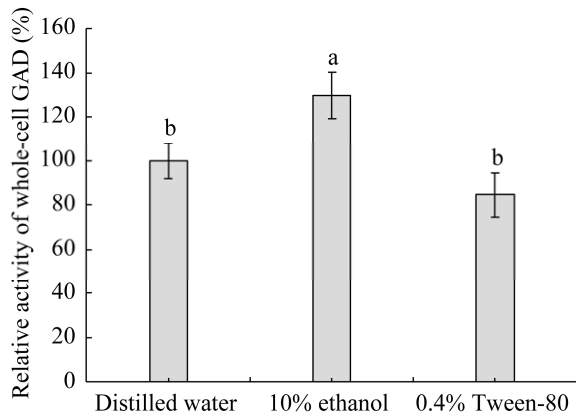


图 1 不同试剂对全细胞 GAD 活力的影响 标注于数据点处的不同字母表示两组间差异显著 ($P<0.05$). 下同

Figure 1 Effect of different reagents on the activity of whole-cell GAD. Different letters marked at the data points indicate significant differences between the two groups ($P<0.05$). The same below.

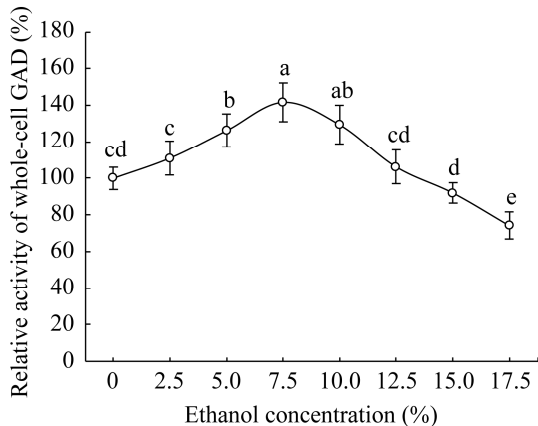


图 2 乙醇浓度对全细胞 GAD 活力的影响

Figure 2 Effect of ethanol concentration on the activity of whole-cell GAD.

球菌全细胞的 GAD 的转化活力最高, 全细胞 GAD 相对酶活较无乙醇的对照组提高 41.63%。因此, 乙醇对全细胞转化活力的适宜促进浓度为 7.5%。

2.3 乙醇对全细胞 GAD 的 pH 依赖性的影响结果

图 3 表明 7.5%乙醇对屎肠球菌全细胞 GAD 的最适反应 pH 无影响, 仍然为 pH 4.4; 但是从峰形变化可见, 当存在 7.5%乙醇时, 全细胞 GAD 活力曲线随 pH 变化更为平缓, 说明全细

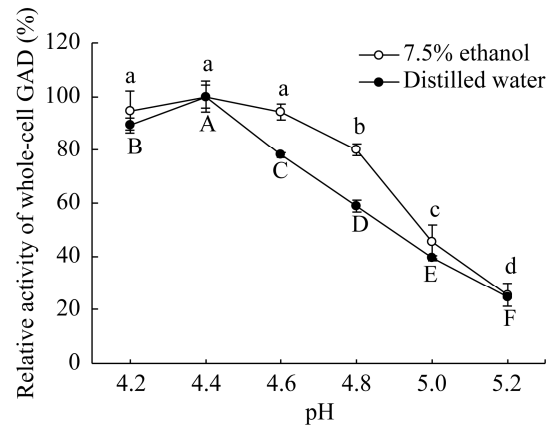


图 3 乙醇对全细胞 GAD 的 pH 依赖性的影响

Figure 3 Effect of ethanol on the pH dependence of whole-cell GAD.

胞 GAD 活力相对于无乙醇的反应体系受 pH 的影响更小。当反应 pH 值为 4.8 时, 含 7.5%乙醇组的全细胞 GAD 活力为最适反应 pH 4.4 时的 $80.05\% \pm 2.21\%$, 而无乙醇组的全细胞 GAD 活力仅为最适反应 pH 4.4 时的 $58.77\% \pm 2.19\%$ 。结果表明, 7.5%乙醇可改善全细胞 GAD 对 pH 的依赖性, 促进全细胞转化活力。

2.4 乙醇对全细胞 GAD 动力学常数的影响结果

从图 4 可见, 7.5%乙醇试验组和无乙醇对照组的反应速度均先随着 MSG 浓度增加而增加, 然后逐渐趋于平缓。7.5%乙醇试验组在 MSG 浓度 4.5–55.5 mmol/L 呈一级反应, 在 MSG 浓度 55.5–69.5 mmol/L 呈混合级反应, 在 MSG 浓度高于 69.5 mmol/L 时呈零级反应; 无乙醇对照组在 MSG 浓度 4.5–44.5 mmol/L 呈一级反应, 在 MSG 浓度 44.5–55.5 mmol/L 呈混合级反应, 在 MSG 浓度高于 55.5 mmol/L 时呈零级反应。结果表明全细胞 GAD 催化反应符合 Michaelis-Menten 的快速平衡学说。

图 4 显示无论是否存在乙醇, 反应体系均未见底物抑制现象。相对于无乙醇的反应体系, 7.5%乙醇组的表观反应速度增加的幅度更大。由此表明, 7.5%乙醇能提高屎肠球菌细胞 GAD 的转化反应速度, 从而增加 GABA 产量。

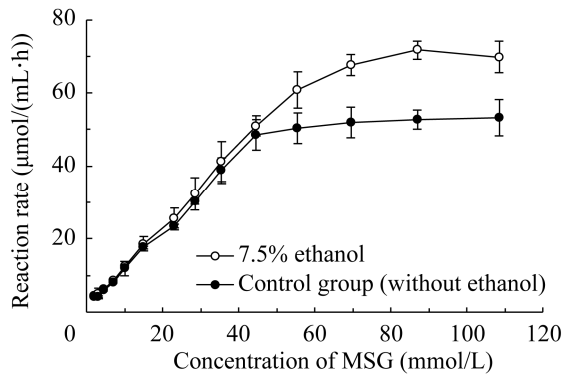


图4 底物浓度对反应速度的影响

Figure 4 Effect of substrate concentration on reaction rate.

依据 Michaelis-Menten 的快速平衡学说, 以呈一级反应的底物浓度和反应速度采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图(图5), 7.5%乙醇组全细胞 GAD 的 K_m 和 V_{max} 分别为 74.98 mmol/L 和 106.38 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{h})$, 无乙醇对照组的 K_m 和 V_{max} 分别为 77.84 mmol/L 和 106.38 $\mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ 。

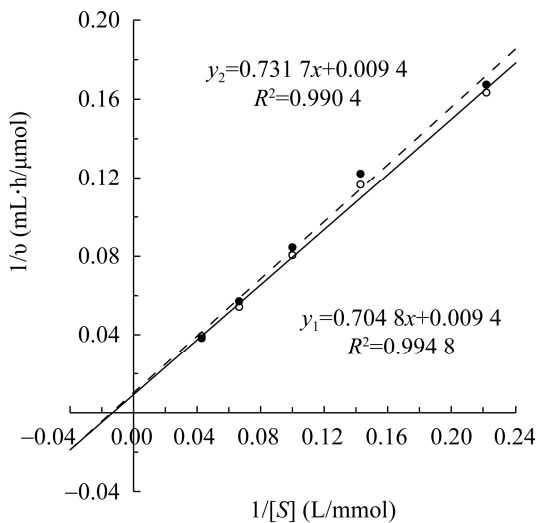


图5 全细胞 GAD 动力学常数 Lineweaver-Burk 图 y_1 为 7.5%乙醇试验组线性回归方程; y_2 为无乙醇的对照组线性回归方程

Figure 5 Lineweaver-Burk plot of the kinetic constants of whole-cell GAD. y_1 is the linear regression equation of the 7.5% ethanol experimental group; y_2 is the linear regression equation for the control group without ethanol.

结果表明, 乙醇不影响全细胞 GAD 的最大反应速度, 但米氏常数略变小, 说明全细胞 GAD 对 MSG 亲和力略有增强。

2.5 乙醇对游离 GAD 纯酶活性的影响结果

图 6 显示 7.5%乙醇组与无醇对照组的活力无显著性差异($P>0.05$), 结果表明 7.5%乙醇对 GAD 纯酶的活力无影响。

2.6 乙醇对细胞结构的影响结果

对经 7.5%乙醇浸泡屎肠球菌细胞的浸泡液进行 GAD 活力分析, 结果浸泡液未检出 GAD 活力; 对经 7.5%乙醇浸泡的屎肠球菌全细胞 GAD 活力进行测定, 结果细胞的 GAD 活力为 (32.20 ± 0.71) U/mL。结果表明, GAD 仍存在于细胞内, 未泄漏到浸泡液。

经对扫描电镜的视野进行仔细全面搜索观察, 采用 7.5%乙醇处理和无醇处理的细胞形态基本一致, 差异不明显, 均仅在一个视野中发现有少量的细胞破裂(图 7)。由于试验细胞不是同步细胞, 细胞破裂可能是衰老细胞或冷冻处理所造成。结合细胞 GAD 外泄情况分析和形态观察结果表明, 7.5%乙醇未造成细胞膜溶解和胞内 GAD 外泄。

2.7 乙醇对细胞膜透性的影响结果

图 8 显示, 经 7.5%乙醇浸泡处理的细胞的

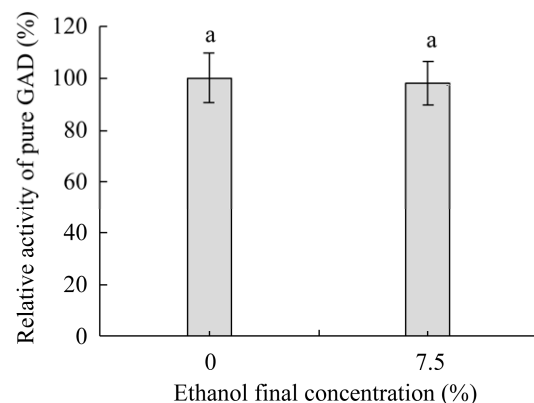


图6 乙醇对 GAD 纯酶活力的影响

Figure 6 Effect of ethanol on the activity of pure GAD.

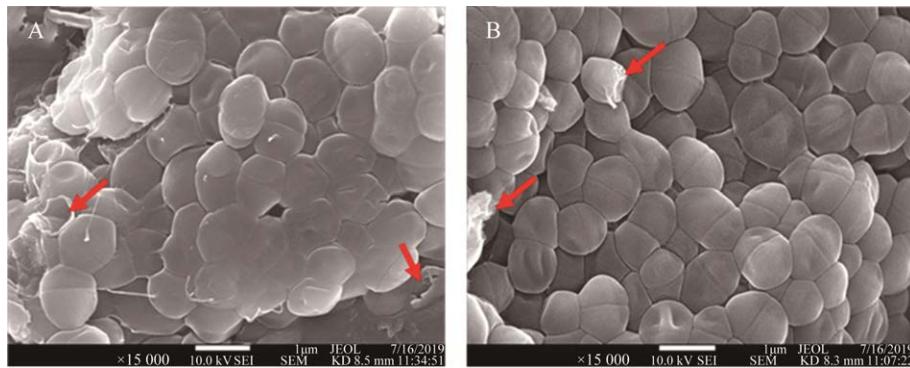


图 7 乙醇对屎肠球菌细胞结构的影响 A: 7.5%乙醇处理试验组. B: 生理盐水处理对照组. 箭头所示细胞为破裂细胞

Figure 7 Effect of ethanol on the cell structure of *Enterococcus faecium*. A: 7.5% ethanol treatment experimental group. B: Physiological saline treatment control group. The cells indicated by the arrow were the ruptured cells.

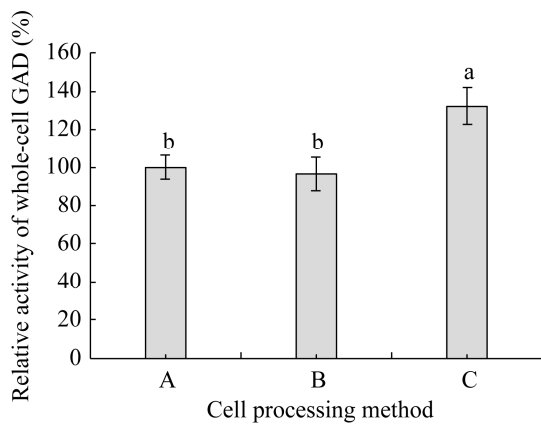


图 8 乙醇对细胞膜透性的影响 A: 原细胞悬液, 无醇转化反应体系. B: 7.5%乙醇透性化细胞悬液, 无醇转化反应体系. C: 原细胞悬液, 7.5%乙醇转化反应体系

Figure 8 Effect of ethanol on the membrane permeabilization of whole-cell. A: The original cell suspension, without alcohol conversion reaction system. B: Cell suspension permeabilized by 7.5% ethanol, without alcohol conversion reaction system. C: The original cell suspension, 7.5% ethanol conversion reaction system.

GAD 活力与未用乙醇处理的原细胞的 GAD 活力基本一致, 无显著性差异($P>0.05$), 但显著低于原细胞与 7.5%乙醇共存的转化反应体系的

GAD 活力($P<0.05$)。结果表明, 乙醇并未造成细胞膜形成稳定的孔洞, 乙醇仅在其与细胞共存的反应体系才能促进全细胞转化活力。

3 讨论与结论

在细胞壁和细胞膜的保护下, 全细胞胞内酶较游离酶更稳定, 但细胞传质屏障对酶的催化效率具有显著影响, 亟须高效促进全细胞转化活力的技术。本研究发现低浓度乙醇对屎肠球菌全细胞 GAD 表观活力具有显著促进作用(图 1、图 2), 但 7.5%乙醇对全细胞 GAD 表观活力的促进机制并非作用于 GAD (图 6)。文献表明, 采用物理^[32]或化学方法^[23-25]破坏细胞膜的完整性, 可提高全细胞的催化活力。然而, 本研究表明 7.5%乙醇处理的细胞未产生孔洞(图 7、图 8), 7.5%乙醇处理的细胞浸泡液也未检测到 GAD 催化活性, 仅在与细胞共存的反应条件下, 7.5%乙醇对全细胞转化活力才具有促进作用(图 8), 结果表明乙醇未破坏细胞的完整性。

有机溶剂可以破坏细胞膜上脂类物质之间的相互作用, 导致细胞膜通透性发生改变^[33]。邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷是胞内酶 β -半乳糖

昔酶的底物, 已被分别用于干酪乳杆菌^[34]和大肠杆菌^[35]细胞膜的透性分析。基于 β -半乳糖昔酶对乙醇的稳定性考虑, 本研究直接测定胞内 GAD 对外源 L-Glu 的催化活性, 反映不同条件下细胞膜的透性。结果表明, 7.5%乙醇仅在与细胞共存反应条件下才能发挥其促进作用, 推测其促进机制是由于乙醇与细胞膜脂类物质之间发生相互作用, 导致细胞膜的透性增加, 从而提高细胞的转化活力。

微生物通过 GAD 催化 L-Glu 发生 α -脱羧作用而消耗质子, 提高细胞微环境的 pH, 这是微生物的耐酸机制之一^[36]。由于细胞屏障作用, H^+ 不能及时得到补充, 细胞内因转化反应产生的碱不能及时被中和, 将造成细胞微环境 pH 上升^[23,25,30], 从而降低 GAD 活力。酶与底物的亲和力与底物的解离状态相关, 而底物解离状态受微环境的 pH 影响, H^+ 得不到及时补充将影响底物(L-Glu)的解离, 从而影响底物与 GAD 的亲和力。细胞透性增加可提高细胞内外 H^+ 、L-Glu 和 GABA 的传递速度, 稳定胞内微环境的 pH, 从而提高反应速率。7.5%乙醇改善全细胞 GAD 的 pH 依赖性(图 3)和降低米氏常数(K_m), 可能与 H^+ 交换速度提高有关, 说明细胞膜的透性增强。

综上所述表明, 乙醇促进全细胞 GAD 表现活力的途径是通过提高细胞膜透性而实现的, 但乙醇提高细胞膜透性的机制尚有待进一步研究。乙醇价格低廉, 安全性高, 对全细胞 GAD 的促进作用显著, 在 GABA 绿色制造领域将具有很好的应用前景。

REFERENCES

- [1] WANG WH, YAMAGUCHI S, KOYAMA M, NAKAMURA K. Evaluation of the antihypertensive activity of eggplant acetylcholine and γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats[J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2835.
- [2] OKADA T, SUGISHITA T, MURAKAMI T, MURAI H, SAIKUSA T, HORINO T, ONODA A, KAJIMOTO O, TAKAHASHI R, TAKAHASHI T. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2000, 47(8): 596-603.
- [3] YAMATSU A, YAMASHITA Y, PANDHARIPANDE T, MARU I, KIM M. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2016, 25(2): 547-551.
- [4] ABDOU AM, HIGASHIGUCHI S, HORIE K, KIM M, HATTA H, YOKOGOSHI H. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans[J]. *BioFactors (Oxford, England)*, 2006, 26(3): 201-208.
- [5] UMAR MU, ISHAKA A, OOI DJ, ZAMRI NDM, SAREGA N, ISMAIL M, ESA NM. Germinated brown rice regulates hepatic cholesterol metabolism and cardiovascular disease risk in hypercholesterolaemic rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 8: 193-203.
- [6] MENG FT, HAN Y, SRISAI D, BELAKHOV V, FARIAS M, XU Y, PALMITER RD, BAASOV T, WU Q. New inducible genetic method reveals critical roles of GABA in the control of feeding and metabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(13): 3645-3650.
- [7] XIE ZX, XIA SF, LE GW. Gamma-aminobutyric acid improves oxidative stress and function of the thyroid in high-fat diet fed mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 8: 76-86.
- [8] SONG LH, DU AY, XIONG Y, JIANG J, ZHANG Y, TIAN ZF, YAN HL. γ -aminobutyric acid inhibits the proliferation and increases oxaliplatin sensitivity in human colon cancer cells[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(11): 14885-14894.
- [9] SCHULLER HM, AL-WADEI HAN, MAJIDI M. Gamma-aminobutyric acid, a potential tumor suppressor for small airway-derived lung adenocarcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10): 1979-1985.
- [10] 周丽亚, 牛玉杰, 郑晓冰, 姜艳军, 马丽, 白敬, 贺莹. 谷氨酸脱羧酶的分子改造及酶学性质研究[J].

- 中国生物工程杂志, 2023, 43(5): 24-36.
- ZHOU LY, NIU YJ, ZHENG XB, JIANG YJ, MA L, BAI J, HE Y. Molecular modification and enzymatic properties of glutamate decarboxylase[J]. China Biotechnology, 2023, 43(5): 24-36 (in Chinese).
- [11] 孙磊, 王苑, 柏映国, 罗会颖, 姚斌, 涂涛. 谷氨酸脱羧酶结构及催化机制的研究概述[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2236-2244.
- SUN L, WANG Y, BAI YG, LUO HY, YAO B, TU T. Structure and catalytic mechanism of glutamate decarboxylase: a review[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2236-2244 (in Chinese).
- [12] YANG RQ, HUI QR, FENG XY, FENG L, GU ZX, WANG P. The mechanism of freeze-thawing induced accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(3): 1099-1105.
- [13] SUN Y, JI DY, MA HL, CHEN XM. Ultrasound accelerated γ -aminobutyric acid accumulation in coffee leaves through influencing the microstructure, enzyme activity, and metabolites[J]. Food Chemistry, 2022, 385: 132646.
- [14] HAM S, BHATIA SK, GURAV R, CHOI YK, JEON JM, YOON JJ, CHOI KY, AHN J, KIM HT, YANG YH. Gamma aminobutyric acid (GABA) production in *Escherichia coli* with pyridoxal kinase (pdxY) based regeneration system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2022, 155: 109994.
- [15] SHI XF, CHANG CY, MA SX, CHENG YB, ZHANG J, GAO Q. Efficient bioconversion of L-glutamate to γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* resting cells[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2017, 44(4/5): 697-704.
- [16] LIU SJ, WEN BT, DU GM, WANG YL, MA XC, YU HY, ZHANG JJ, FAN SL, ZHOU H, XIN FJ. Coordinated regulation of *Bacteroides thetaiotaomicron* glutamate decarboxylase activity by multiple elements under different pH[J]. Food Chemistry, 2023, 403: 134436.
- [17] LEE SJ, LEE HS, LEE DW. Production of γ -aminobutyric acid using immobilized glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*[J]. Microbiology and Biotechnology Letters, 2015, 43(3): 300-305.
- [18] YANG SY, LIU SM, WU YY, LIN Q, LIANG GL, LIU JF, LIANG ZZ, LIANG JR. Immobilization and enzymatic properties of glutamate decarboxylase from *Enterococcus faecium* by affinity adsorption on regenerated chitin[J]. Amino Acids, 2020, 52(11/12): 1479-1489.
- [19] KIM MJ, LIM T, KIM J, JI GE, LEE H, LEE K, KIM RH, HWANG KT. γ -aminobutyric acid and oxalic acid contents and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of spinach juices cofermented with *Levilactobacillus brevis* GABA100 and other lactic acid bacteria[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(10): 6722-6729.
- [20] CHITTRAKHANI C, SONGSERMPONG S, TREVANICH S, SUKOR R. Effect of *Levilactobacillus brevis* TISTR 860 and *Lactiplantibacillus plantarum* TISTR 951 on gamma-aminobutyric acid content in fermented rice flour and rice noodles (Kanomjeen)[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2022, 57(6): 3410-3418.
- [21] DAT LAI Q, DOAN NTT, NGUYEN HD, NGUYEN TXN. Influence of enzyme treatment of rice bran on gamma-aminobutyric acid synthesis by *Lacto bacillus*[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56(9): 4722-4729.
- [22] FALAH F, VASIEE A, ALIZADEH BEHBAHANI B, TABATABAEE YAZDI F, ALI MORTAZAVI S. Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology[J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(6): 3317-3326.
- [23] 陈琳, 张充, 吕凤霞, 别小妹, 赵海珍, 陆兆新. 重组谷氨酸脱羧酶大肠杆菌合成 γ -氨基丁酸条件的优化[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 158-163.
- CHEN L, ZHANG C, LÜ FX, BIE XM, ZHAO HZ, LU ZX. Optimization of conversion conditions for biosynthesizing γ -aminobutyric acid by recombinant glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2015, 36(1): 158-163 (in Chinese).
- [24] 赵伟睿, 柯丕余, 胡升, 黄俊, 彭春龙, 梅乐和, 姚善泾. 有机溶剂透性化处理谷氨酸脱羧酶工程菌制备 γ -氨基丁酸的研究[J]. 高校化学工程学报, 2015, 29(1): 138-144.
- ZHAO WR, KE PY, HU S, HUANG J, PENG CL, MEI LH, YAO ST. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid using organic solvent-permeabilized and glutamate decarboxylase expressing recombinant *Escherichia coli* cells[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2015, 29(1): 138-144 (in Chinese).
- [25] GANGARAJU D, RAGHU AV, SIDDALINGAIYA GURUDUTT P. Green synthesis of γ -aminobutyric acid using permeabilized probiotic *Enterococcus faecium* for

- biocatalytic application[J]. *Nano Select*, 2022, 3(10): 1436-1447.
- [26] 杨胜远, 林谦, 刘淑敏, 苏巧云, 黄慧玲. 屎肠球菌源谷氨酸脱羧酶的制备及其酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(5): 28-34.
YANG SY, LIN Q, LIU SM, SU QY, HUANG HL. Preparation and characterization of glutamate decarboxylase from *Enterococcus faecium*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(5): 28-34 (in Chinese).
- [27] 杨胜远, 李云. 双向单因素与田口法优化屎肠球菌产谷氨酸脱羧酶培养基[J]. *食品科学*, 2018, 39(4): 90-98.
YANG SY, LI Y. Optimization of fermentation medium for glutamate decarboxylase production by *Enterococcus faecium* by bidirectional one-factor-at-a-time and taguchi methods[J]. *Food Science*, 2018, 39(4): 90-98 (in Chinese).
- [28] 杨胜远, 郭文怡, 李紫君, 苏巧云, 黄慧玲, 曾婵, 彭罗慧. 732 阳离子交换树脂对全细胞谷氨酸脱羧酶活性的促进机制[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 105-111.
YANG SY, GUO WY, LI ZJ, SU QY, HUANG HL, ZENG C, PENG LH. Mechanism of 732 cation-exchange resins on the promotion of whole cells' glutamate decarboxylase activity[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(20): 105-111 (in Chinese).
- [29] 杨胜远, 林谦, 赖丽萍, 黄婷婷. 屎肠球菌纤维素结合域谷氨酸脱羧酶构建及其酶学性质[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(21): 22-30.
YANG SY, LIN Q, LAI LP, HUANG TT. Construction and characteristics of recombinant cellulose-binding domain-glutamate decarboxylase of *Enterococcus faecium*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(21): 22-30 (in Chinese).
- [30] YANG SY, LIU SM, JIANG M, WANG BS, PENG LH, ZENG C. Enhancing effect of macroporous adsorption resin on gamma-aminobutyric acid production by *Enterococcus faecium* in whole-cell biotransformation system[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(5): 771-780.
- [31] 杨胜远, 韦锦, 曾婵, 彭罗慧. 732 阳离子交换树脂对屎肠球菌谷氨酸脱羧酶活性的促进作用[J]. *食品科学*, 2018, 39(14): 151-157.
YANG SY, WEI J, ZENG C, PENG LH. Enhancing effect of 732 cation-exchange resins on the activity of glutamate decarboxylase in *Enterococcus faecium*[J]. *Food Science*, 2018, 39(14): 151-157 (in Chinese).
- [32] 王琦. 透性化完整细菌细胞水解和异构化糖的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2021.
WANG Q. Study on hydrolysis and isomerization of sugar by permeable intact bacterial cells[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [33] LI DX, NI KK, PANG HL, WANG YP, CAI YM, JIN QS. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2015, 28(5): 620-631.
- [34] 吴重德, 何桂强, 张娟, 周荣清, 堵国成, 陈坚. 酸胁迫对干酪乳杆菌细胞膜生理特性的影响[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(5): 122-125.
WU CD, HE GQ, ZHANG J, ZHOU RQ, DU GC, CHEN J. Effect of acid stress on membrane characteristics of *Lactobacillus casei*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(5): 122-125 (in Chinese).
- [35] LEHRER RI, BARTON A, GANZ T. Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1988, 108(1/2): 153-158.
- [36] de BIASE D, TRAMONTI A, BOSSA F, VISCA P. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 32(6): 1198-1211.