

XG32 菌株产 ACC 脱氨酶的培养条件和酶活影响因素

沈 萍, 刘维红, 闫淑珍, 陈双林

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 为了明确具 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate ACC)脱氨酶活性细菌菌株 XG32 的产酶条件和酶活影响因素, 以 ACC 为底物, 研究了诱导培养基中底物的浓度、温度、pH 对该菌株产酶的影响及产酶的时程. 分别在不同温度、不同 pH 及添加 8 种金属离子的条件下测定了酶的活力和稳定性. 结果表明: 菌株 XG32 在有底物 ACC 存在时才能被诱导产酶, 温度上升至 5℃ 及 pH > 5.5 时酶活性才开始被诱导, 在 25℃ 和 pH 7.0~8.0 时酶活性最高; 诱导初始至 24 h 内是酶产生的上升期, 24 h 后酶产生呈下降趋势. 酶的最适反应温度为 30℃, 高于 35℃ 酶的活力下降, 在 65℃ 酶的活力趋于零; 该酶在 pH 7.5~9.5 之间有较好的稳定性; 金属 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对 ACC 脱氨酶有激活作用, 而 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 则有抑制作用. 因此, 认为 ACC 脱氨酶活性的出现对底物的存在非常敏感, 在自然界中少量的酶就可以催化 ACC 的分解. 但酶活力受条件影响较大, 仅能在一定的范围内保持酶活的稳定性.

[关键词] 细菌, ACC 脱氨酶, 产酶条件

[中图分类号] Q 557+.3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)01-0104-05

Culture Conditions and Character of Extracellular Enzyme ACC Deaminase Excreted by Bacterium Strain XG32

Shen Ping, Liu Weihong, Yan Shuzhen, Chen Shuanglin

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract In order to investigate optimal culture conditions and the character of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase excreted by bacterium strain XG32, experiments were done to determine the effect on the enzymatic activity under different conditions, including concentration of inducer ACC in culture medium, culture temperature and pH, while time process of ACC deaminase was also assayed. Then we measured the activity and stability of the enzyme under different temperatures, pH and metals. The results indicated that the ACC deaminase could be induced only when the inducer existed and the temperature was above 5℃, and pH was above 5.5. The enzymatic yield reached the highest when the culture temperature was 25℃ and culture pH was 7.0 to 8.0. The enzymatic yield constantly increased in 24 hours after inducer was added, and then declined. As for activity, the optimal temperature of ACC deaminase was 30℃ approximately. The enzymatic activity almost disappeared when it was 65℃. The enzyme had a preferable stability at pH 7.5~9.5. Moreover, ions Cu^{2+} and Zn^{2+} could activate the ACC deaminase, while Hg^{2+} and Ag^{+} could inhibit the enzyme activity. In conclusion, the ACC deaminase is sensitive to the substance. That means a little of this kind of enzyme can decompose ACC in natural environment. However, the enzyme is sensitive to the circumstance, and its stability is only at a certain extension.

Key words bacterium, ACC deaminase, enzymatic activity

乙烯是存在于所有高等植物中的一种内源激素. 植物一生大部分生长发育阶段只需很低水平的乙烯, 只有在接近成熟和衰老阶段才大量合成乙烯. 当植物在生长发育阶段遇到不良环境因素 (如淹水、高温等)、机械损伤或病虫害侵袭时会产生大量乙烯, 作为植物对环境的一种生理应激反应. 这种应激乙烯的过量产生会导致植物生长发育受阻或死亡. 在多数农作物生产中, 大量乙烯的产生将导致农业生产遭受严

收稿日期: 2007-03-09

基金项目: 江苏省基础 Research 计划 (BK2007222) 资助项目.

作者简介: 沈萍 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 土壤微生物应用. E-mail: spf163@163.com

通讯联系人: 闫淑珍 (1963-), 女, 副教授, 研究方向: 微生物的应用. E-mail: yanshuzhen@njnu.edu.cn

重的经济损失. 已有研究表明植物根际部分细菌可分泌 ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 脱氨酶, 可将植物乙烯前体 ACC 分解为 α -丁酮酸和氨^[1,2], 以阻止植物过量产生乙烯, 促进植物的生长发育. 因此认为 ACC 脱氨酶是植物根际细菌促生的主要物质之一^[2,3].

XG32 菌株是来自植物根际, 且其 ACC 脱氨酶活性较高又对辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 有拮抗^[4], 并被鉴定为荧光假单胞菌生物型 IV (*P. fluorescens* biovar IV). 为了明确该菌株的产酶条件和影响酶活的因素, 研究如下.

1 材料和方法

1.1 菌种和 ACC 的来源

菌株 XG32 由南京师范大学微生物工程重点实验室分离自番茄植株根部. ACC 购于德国 Merck 公司.

1.2 培养方法

XG32 菌株在 TSB 培养基^[4]平板上 28℃ 纯化 24 h 后, 挑取单菌落接种到 TSB 培养基斜面, 28℃ 下培养 24 h 后接种于 50 mL (250 mL 摇瓶) TSB 液体培养基中, 置 28℃ 200 r/min 条件下培养 24 h, 以活化菌株. 再取 10 μ L 菌液至 15 mL TSB 液体培养基中在 28℃ 200 r/min 条件下培养至对数期晚期.

1.3 ACC 脱氨酶的诱导及酶液的提取

将菌株在 TSB 培养液中 24 h 的纯培养物 4℃ 离心收集, 用 DF 培养基^[3]母液洗涤 2 次, 菌体悬浮于 ADF^[3]培养液, 在 28℃ 200 r/min 的条件下培养 24 h 以诱导产生 ACC 脱氨酶.

4℃ 离心收集菌体加入 ADF 培养基中培养产酶 24 h, 4℃ 离心收集菌体, 用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.6) 洗涤离心 2 次, 重悬浮于 600 μ L 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 中, 加入 30 μ L 甲苯并迅速振荡 30 s 以破碎细胞, 得含甲苯的细胞提取物.

1.4 酶活的测定

ACC 脱氨酶活性的测定方法参照 Horma^[5]和 Saleh^[6]的方法, 于 540 nm 下测 OD 值. ACC 脱氨酶的单位酶活为在测酶体系中以 1 μ mol/min 的速率形成 α -丁酮酸的活性.

蛋白质测定采用 Bradford 比色法, 以牛血清白蛋白作为标准物.

比活力 (U/mg) 为单位酶活除酶蛋白浓度. 各菌株酶活性测定均扣除样品对照中自发产物后计算.

1.5 菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的培养条件试验

1.5.1 培养基中 ACC 的浓度对 XG32 产酶的影响

在以 pH 7.5 的 ADF 培养基中加入 ACC 至终浓度分别为 0 μ mol/L、0.3 μ mol/L、3 μ mol/L、30 μ mol/L、300 μ mol/L、3000 μ mol/L (其中底物 ACC 浓度为 0 μ mol/L 时采用 DF 培养基), 28℃ 200 r/min 的条件下培养 24 h, 取样测酶活.

1.5.2 温度变化对 XG32 产酶的影响

在 pH 7.5 的诱导培养基中, 分别在温度为: 0℃、5℃、20℃、25℃、28℃、30℃、35℃、40℃ 下振荡培养, 在培养 24 h 时取样测酶活力.

1.5.3 pH 对 XG32 产酶的影响

采用 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系, 调节 ADF 诱导培养基的起始 pH 值约为 5.5、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 培养 24 h 时测定酶活力.

1.5.4 诱导时间对 XG32 产酶的影响

在 pH 7.5 的 ADF 培养基中, 分别设诱导时间为: 0、6、12、18、24、30、36、42、50 h 取样测定酶活.

1.6 ACC 脱氨酶酶活影响因素的测定

1.6.1 温度对酶活的影响

制取的酶液分别在温度为: 5℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、55℃、65℃ 条件下加入底物反应 15 min 测定酶活力.

1.6.2 酶的热稳定性

制取的酶液在温度为: 5℃、15℃、25℃、30℃、35℃、45℃、55℃、65℃ 条件下处理 30 min 后, 置于 25℃

条件下加入底物 ACC, 反应 15 m in, 测定酶活力.

1. 6. 3 pH 对酶活的影响

设置 pH 值范围为 5. 0 6. 0 6. 5 7. 0 7. 5 8. 0 8. 5 9. 0 9. 5 10. 0 11. 0 的处理, 采用缓冲体系为: pH 5. 0~ 6. 0 为磷酸氢二钠 – 柠檬酸缓冲液; pH 6. 5~ 7. 5 为磷酸氢二钠 – 磷酸二氢钠缓冲液 (0. 2 mol/L); pH 8. 0~ 9. 0 为 Tris– 盐酸缓冲液; pH 9. 5~ 11. 0 为碳酸钠 – 碳酸氢钠缓冲液 (0. 1 mol/L). 分别以不同 pH 值的缓冲液配制底物和酶液, 测定酶活力.

1. 6. 4 酶的酸碱稳定性

制取的酶液调节 pH 值为 6. 0 6. 5 7. 0 7. 5 8. 0 8. 5 9. 0 9. 5 10. 0 11. 0 在 30℃ 下保温 6 h, 加入底物 ACC, 反应测定酶活力.

1. 6. 5 金属离子对酶稳定性的影响

在酶液中分别加入 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ag^{+} 金属离子, 溶液至终浓度为 5 mmol/L, 在 30℃ 保温 15 m in, 以未加金属离子的酶液为对照, 加入底物 ACC, 测定酶活力.

2 结果与分析

2. 1 菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的培养条件

2. 1. 1 培养基中 ACC 的浓度对 XG32 产酶的影响

在 DF 培养基中 (即底物 ACC 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时) 几乎检测不到 XG32 的 ACC 脱氨酶酶活力, 说明无底物 ACC 时, 菌株 XG32 不产生 ACC 脱氨酶; 认为该细菌产生的 ACC 脱氨酶是一种诱导酶. 菌株 XG32 的 ACC 脱氨酶酶活力随着培养基中 ACC 浓度的增加而上升 (图 1). 虽然在培养基中 ACC 的浓度为 0. 05 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下产酶的量可用于分辨酶活力的大小, 但在 3 mmol/L 时酶活相对稳定, 在实验中为了减少底物用量和分辨菌株的酶活力, ACC 浓度采用 3 mmol/L, 作为诱导培养基的底物浓度为适宜.

2. 1. 2 温度变化对 XG32 产酶的影响

温度在 5℃ 以下, 虽然培养基中有 ACC 存在, 但 XG32 的 ACC 脱氨酶基本不产生. 在 5℃ 以上, 该酶迅速被诱导, 酶活力随着温度的上升不断提高, 在 25℃ 左右酶活力达到峰值, 30℃ 以上酶活力显著下降, 40℃ 基本检测不出酶活力. 在诱导培养温度低于 5℃ 高于 35℃ 时, 菌株 XG32 的 ACC 脱氨酶诱导受到强烈抑制. 由此, 菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的适宜培养温度为 20~ 30℃, 最适诱导培养温度为 25℃ (图 2).

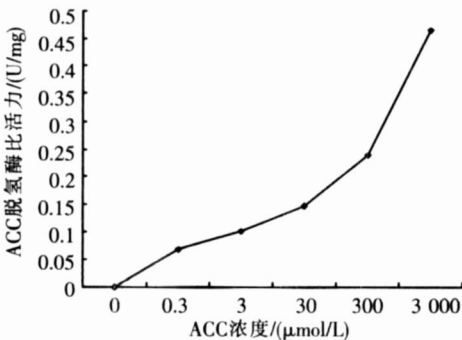


图 1 诱导培养基中 ACC 浓度对菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的影响

Fig.1 ACC deaminase activities of the stain XG32 under different concentrations of ACC in the medium

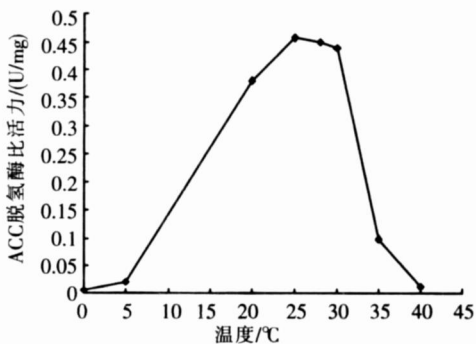


图 2 培养温度对菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的影响

Fig.2 Effect of culture temperatures on ACC deaminase production of the stain XG32

2. 1. 3 pH 对 XG32 产酶的影响

当诱导培养基中 $\text{pH} < 5. 5$ 时不能诱导 XG32 产酶. 在 pH 为 5. 5 时酶开始被诱导, $\text{pH} > 8. 5$ 时酶产生被抑制. 根据酶活力判断, XG32 的诱导培养基在 7. 0~ 8. 0 的 pH 范围内产酶量基本稳定 (图 3).

2. 1. 4 诱导时间对 XG32 产酶的影响

从诱导初始至培养 24 h 内, ACC 脱氨酶的酶活力呈上升趋势, 24 h 后 ACC 脱氨酶活力趋于平缓, 说

明 XG32 的 ACC 脱氨酶不断产生, 至 24 h 酶的诱导基本完成, 此后酶活力上升缓慢, 42 h 后酶活力开始缓慢下降. 所以菌株 XG32 最佳产酶时间为 24 h. 可以认为其最佳测酶活力时间在 24~42 h 内 (图 4).

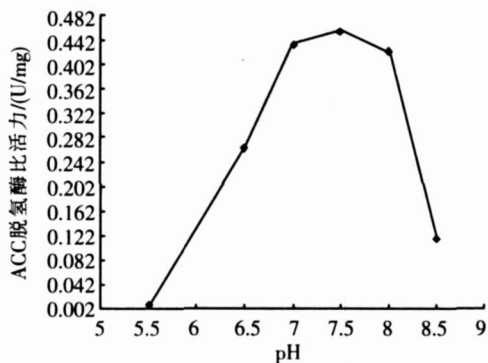


图 3 诱导培养基中 pH 变化对菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶的影响
Fig.3 Effect of initial pH value of medium on ACC deaminase production of the stain XG32

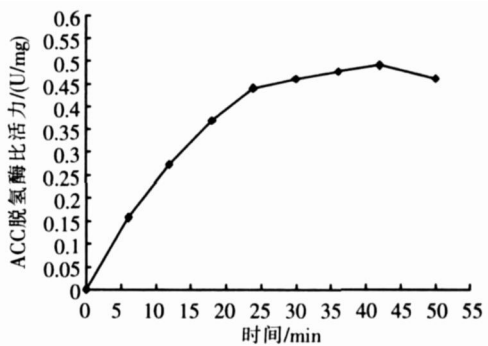


图 4 诱导时间对菌株 XG32 产 ACC 脱氨酶活力的影响
Fig.4 Effect of induced time on ACC deaminase activity of the stain XG32

2.2 ACC 脱氨酶酶活力影响因素

2.2.1 温度对酶活力及其稳定性的影响

ACC 脱氨酶和底物反应时温度的变化对 ACC 脱氨酶的活力影响较大, 在 30℃ 时酶活力最大. 高于 35℃ 酶的活力迅速下降, 达到 65℃ 时酶的活力趋于零. 制取的酶液 (见图 6), 经 5℃ ~ 65℃ 梯度保温 30 min 后, 在 5℃ ~ 35℃ 时酶的活性基本保持不变, 在 35℃ 以上酶活力开始下降, 随着处理的温度升高, 酶活力呈快速下降趋势, 说明在 35℃ 以内 ACC 脱氨酶都具有较好的稳定性, 高于 35℃, 酶被破坏, 于 65℃ 处理 30 min 酶活性近乎完全丧失, 说明此时酶已变性.

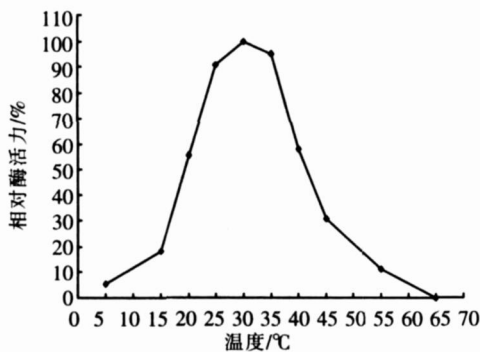


图 5 温度对 ACC 脱氨酶活力影响
Fig.5 Effect of different temperatures on ACC deaminase activity

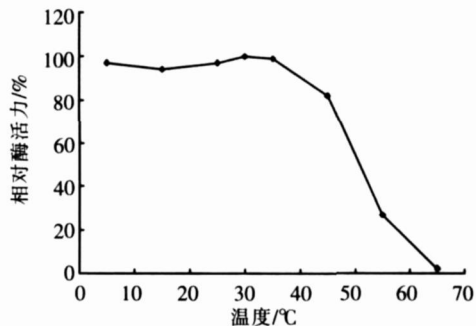


图 6 ACC 脱氨酶在不同温度下处理 30 min 后的酶活力
Fig.6 Effect of different temperatures on ACC deaminase stability after treated with 30 minutes

2.2.2 pH 对酶活力及其稳定性的影响

在 30℃ 的测酶体系中改变不同 pH 值, 结果 (图 7A) 表明在 pH 8.0 时能测到较高的酶活力, pH > 8.0 或 pH < 8.0 时对 ACC 脱氨酶的活力都有不同程度的影响. 酶活在不同的 pH 缓冲液中 30℃ 下保温 6 h 该酶在 pH 7.5~9.5 之间有较好的稳定性 (图 7B), 说明 ACC 脱氨酶在酸性条件下不稳定, 而在偏碱性条件下有一定适应范围.

2.2.3 金属离子对酶稳定性的影响

表 1 表明, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对酶活力有明显的激活作用, 而 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 对酶有较强的抑制作用. Ca^{+} 、 Mg^{+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活影响较小.

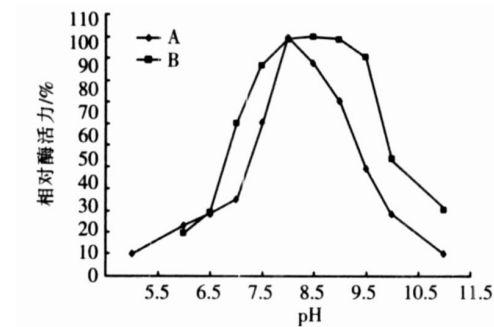


图 7 pH 对 ACC 脱氨酶活力影响(A)和 ACC 脱氨酶的酸碱稳定性(B)

Fig.7 Effect of different pH values(A) on ACC deaminase activity and stability(B)

3 讨论

在诱导培养基中,当无底物 ACC 存在时,菌株 XG32 不产 ACC 脱氨酶,表明细菌来源的 ACC 脱氨酶是诱导酶,且 ACC 脱氨酶对底物是非常敏感的,仅少量的底物 (0.1 μmol/L)^[7] 就可以诱导 ACC 脱氨酶的产生. Penrose 等^[8] 曾报道所有已被纯化的 ACC 脱氨酶在高温 (> 35℃) 下均会出现受抑制现象,实验中,在 35℃ 时,仅能检测到微弱的 ACC 脱氨酶活力,说明环境中的温度条件 (特别是高温) 对 ACC 脱氨酶有很大影响.

菌株 XG32 的 ACC 脱氨酶最适 pH 为 8.0 这与 Horma 等^[5] 报道的 *P. sp* ACP 的 ACC 脱氨酶最适 pH 为 8.5 略有差异,但仍说明在偏碱性条件下酶活力较强. 在初次探讨几种金属离子对酶活力的影响试验中,认为 Cu²⁺、Zn²⁺ 对酶活力有激活作用,而 Hg²⁺、Ag⁺ 对酶有较强的抑制作用,这可能与菌株 XG32 的 ACC 脱氨酶分子结构有关. XG32 是能够定殖于植物根际的细菌,植物正常生长的温度范围为 20~ 30℃ 之间. 实验结果认为具有 ACC 脱氨酶活性的细菌,定殖于植物根际在一定的范围内能调节乙烯的产生. 在番茄苗期,由于 XG32 的调节乙烯促进生长的作用已被证实^[4]. 因此,深入研究该酶的特性和环境条件影响因素,对该菌株的应用意义重大. 但环境条件对 ACC 脱氨酶的酶活影响因素除本试验涉及内容外,还有许多,特别是自然环境中 ACC 脱氨酶发挥作用来调节植物乙烯的水平范围有待于深入研究.

[参考文献]

[1] Glick B R, Karaturovic D M, Newell P C. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads [J]. Can J Microbiol 1995, 41(2): 533-536

[2] Ma W, Penrose D M, Glick B R. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation [J]. Can J Microbiol 2002, 48(11): 947-954

[3] Glick B R, Jacobson C B, Schwarze M K, et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation [J]. Can J Microbiol 1994, 40: 911-915

[4] 刘维红, 闫淑珍, 杨启银, 等. ACC 脱氨酶活性细菌筛选及其对番茄初生苗生长的影响 [J]. 江苏农业科学, 2006 2(6): 80-84

[5] Horma M, Shimamura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid [J]. Agric Biol Chem, 1978, 42(10): 1825-1831

[6] Saleh S S, Glick B R. Involvement of gacS and gacA in enhancement of the plant growth-promoting capabilities Enterobacter cloacae CA12 and UW4 [J]. Can J Microbiol 2001, 47: 698-705

[7] Jacobson C B, Pasternak J J, Glick B R. Partial purification and characterization of the enzyme ACC deaminase from the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 [J]. Can J Microbiol 1994 40(2): 1019-1025

[8] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Phytologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15

[责任编辑: 孙德泉]