

# 具有 ACC 脱氨酶活性的细菌的分离和鉴定

卫 军 潘其林 张永清 邱并生 蔡妙英

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 在以 ACC( $\alpha$ -氨基环丙烷羧酸)为唯一氮源的选择性培养基上,对土壤来源的细菌菌株进行了筛选。通过生长测定、对 ACC 降解的分析,确定了菌株 ACC 脱氨酶的活性,并对菌株进行了系统鉴定。

**关键词** ACC 脱氨酶, 分离, 鉴定, 假单胞菌

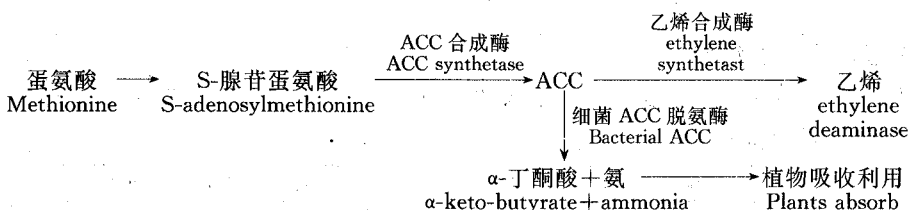
**Isolation and Identification of soil bacteria containing ACC deaminase/Wei Jun, Pan Qilin, Zhang Yongqing, Qiu Bingsheng, Cai Miaoying//CHINESE BIODIVERSITY. — 1994, 2(1): 29~32**

Some strains of soil bacteria were isolated by their ability to grow on ACC as a sole nitrogen source. ACC deaminase activity of these strains were determined by growth assaying, confirmed by chromatographically identifying to decrease of ACC in the medium. Then systematic identification was done.

**Author's Address** Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing, 100080

**Key words** ACC deaminase, isolation, identification, *Pseudomonas* sp.

乙烯是存在于所有高等植物中的一种内源激素,在调节植物的生长发育过程如叶、花的衰败和果实的成熟起重要的作用<sup>[1]</sup>。实践表明降低储存环境中的乙烯浓度可以延长果实的储存期和保鲜期<sup>[2]</sup>。乙烯在植物体内的合成途径如下:



对乙烯合成途径的研究发现: $\alpha$ -氨基环丙烷羧酸(ACC)是乙烯合成的关键中间前体<sup>[3]</sup>。

有些土壤微生物在以 ACC 为唯一氮源的培养基上可诱导产生 ACC 脱氨酶,分解 ACC 为  $\alpha$ -丁酮酸和氨。细菌 ACC 脱氨酶基因在高等植物的表达<sup>[4]</sup>可有效降解 ACC,抑制乙烯合成,从而达到对水果、蔬菜、花卉的保鲜作用。

作为培育具保鲜意义的转基因植物的前期工作,我们对具有 ACC 脱氨酶活性的细菌进行了筛选和鉴定。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株及培养基

1.1.1 菌株来源:菜田、河畔等土样。

1.1.2 培养基:

1.1.2.1 PYG 培养基:葡萄糖 20g,蛋白胨 5g,酵母粉 3g,蒸馏水 1000ml,pH $\pm$ 7.0,8 磅/30 分钟灭菌

1.1.2.2 A<sup>#</sup> 培养基:蔗糖 10.0g,ACC1.0g,无机盐溶液 1000ml(注:无机盐溶液 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>10%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.1%,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.05%,CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O0.013%,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.0013%,pH7.0)

1.1.2.3 B<sup>#</sup>培养基:不加 ACC,其余同 A<sup>#</sup>。

1.2 菌株的筛选:

1.2.1 菌株的分离和纯化:

根据文献<sup>[5]</sup>,对土样进行稀释、分离和纯化。镜检选择革兰氏阴性菌株。

1.2.2 菌株 ACC 脱氨酶活性的确定:

1.2.2.1 初筛:菌株在选择性培养基上的生长

菌株纯化后接种于 3mlPYG 液体培养基中,30℃摇床培养 40 小时,离心收集菌体,用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5)洗两次,然后用无菌水制成菌悬液,分别取 5—10 $\mu$ l 接种于 1.5mlA<sup>#</sup>和 B<sup>#</sup>培养基中,30℃摇床培养,观察生长情况,测定 660nm 的 O.D 值。

1.2.2.2 复定:层析分析菌株对 ACC 的降解

对不同时间在 A<sup>#</sup> 中培养液,10 000rpm30 秒离心取上清。以 0.1mol/LACC、0.1mol/L $\alpha$ -氨基丁酸和 0.1mol/L 丙氨酸为对照,加样量 5 $\mu$ l。溶媒系统:正丁醇:甲酸:水(v/v/v)=75:15:10 饱和时间:2 小时 推展时间:14 小时 显色剂:0.1%茚三酮 显色:80℃烘烤 5 分钟

1.2.2.3 ACC 脱氨酶活性的测定:根据 Honma<sup>[3]</sup>方法进行。

1.3 菌株的鉴定:根据《伯杰氏系统细菌学手册》(第九版)<sup>[6]</sup>进行。

## 2 结果与讨论

2.1 菌株在选择性培养基上的生长情况

培养 120 小时后肉眼观察,选出在 A<sup>#</sup> 培养基中生长较 B<sup>#</sup> 明显混浊的 5 株菌,以 A<sup>#</sup>、B<sup>#</sup> 培养基为对照,分别测定在 660nm 的吸光度值。

	A30	A98	2C9	8B6	8C2
A <sup>#</sup>	0.653	0.340	0.295	0.236	0.214
B <sup>#</sup>	0.093	0.055	0.020	0.016	0.013

2.2 菌株对 ACC 的分解

A30 等 5 株菌接种于 A<sup>#</sup> 培养基,摇床培养,每隔 24 小时取一次样,至 120 小时。层析结果见下页图 1—2。

2.3 菌株的鉴定

2.3.1 菌株 A30

革兰氏阴性杆菌,0.4~0.5 $\times$ 1.5~4 $\mu$ ,单根极生鞭毛。细胞内积累聚  $\beta$ -羟基丁酸盐颗粒。接触酶阳性,氧化酶阳性,对葡萄糖氧化型产酸,精氨酸双水解酶阴性,41℃不生长,H<sub>2</sub> 自养生阴性,不水解明胶,亚硝化反应阴性,不水解淀粉,卵磷脂酶阴性,脂酶(Tween 80)阳性,可利用葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、核糖、丙二酸盐、乙醇,不利用蔗糖。鉴定为德氏假单胞菌(*Pseudomonas delafieldii*)。

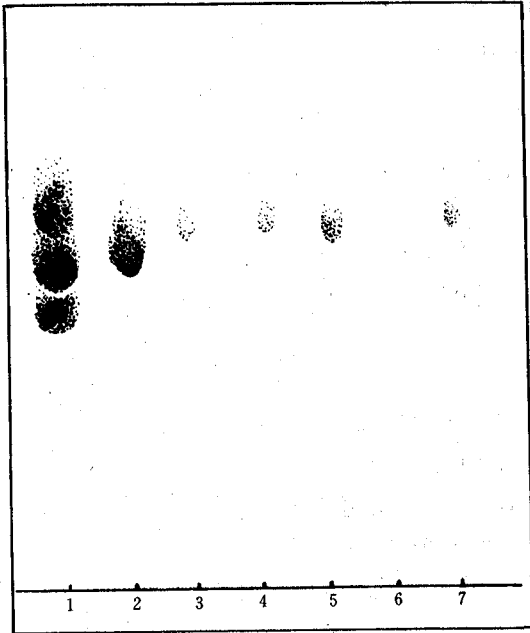


图 1 A30 等 5 株菌在 A<sup>#</sup>培养基上生长 120 小时的层析结果

①标准样品(0.1%丙氨酸,0.1%ACC,0.1%α-氨基丁酸)②空白 A<sup>#</sup>培养基③菌株 A98④菌株 2C9⑤菌株 8B6⑥菌株 A30⑦菌株 2C9

Fig. 1 Paper Chromatogram of ACC in A<sup>#</sup> media after growing for 120 hours

①Standard Sample (0.1% alanine; 0.1% ACC; 0.1% α-aminobutyric acid). ②A<sup>#</sup> media ③A98 ④2C9 ⑤8B6 ⑥A30 ⑦2C9

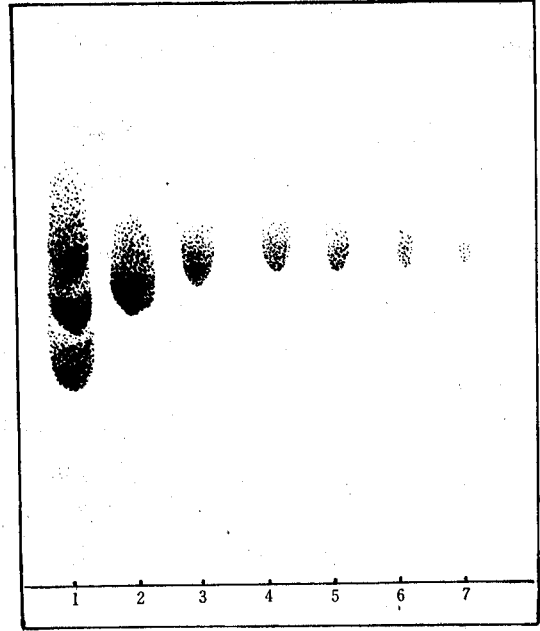


图 2 菌株 A30 在 A<sup>#</sup>培养基上不同生长时间的层析结果

①标准样品(0.1%丙氨酸,0.1%ACC,0.1%α-氨基丁酸)②空白 A<sup>#</sup>培养基③12 小时④20 小时⑤32 小时⑥72 小时⑦120 小时

Fig. 2 Paper Chromatogram of ACC in A<sup>#</sup> media when strain A30 growing in different hours

①Standard sample (0.1% alanine; 0.1% ACC; 0.1% α-aminobutyric acid) ②A<sup>#</sup> media ③12 hours ④20 hours ⑤32 hours ⑥72 hours ⑦120 hours

### 2.3.2 菌株 A98

革兰氏阴性杆菌,0.6×1.5—2.5μ,极生鞭毛。产荧光色素,细胞内不积累聚β-羟基丁酸盐颗粒。接触酶阳性,氧化酶阳性,对葡萄糖氧化型产酸,精氨酸双水解酶阳性,41℃不生长,不水解明胶,反硝化反应阴性,不水解淀粉,卵磷脂酶阴性,脂酶(Tween 80)阳性,可利用葡萄糖、丙酸盐、柠檬酸盐,不利用肌醇。鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

### 2.3.3 菌株 2C9

革兰氏阴性杆菌,0.3×1.0—2.5μ,极生 1—2 根鞭毛。接触酶阳性,氧化酶阳性,兼性厌氧,对葡萄糖发酵型产酸,可还原硝酸盐到亚硝酸盐,ONPG 阳性,脲酶阴性,脂酶(Tween 80)阳性,水解七叶灵、明胶,鸟氨酸、赖氨酸脱羧酶阳性,可利用组氨酸、精氨酸、柠檬酸盐、阿拉伯糖,对蔗糖、甘露醇产酸,肌醇不产酸。鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)。

### 2.3.4 菌株 8B6、8C3

革兰氏阴性杆菌,  $0.6 \times 1.2 - 2.5 \mu\text{l}$ , 稀周生鞭毛。产荧光色素, 接触酶阳性, 氧化酶阴性, 兼性厌氧, 对葡萄糖发酵型产酸, V-P 反应阳性, M. R 反应阴性, 吡啶反应阴性, 水解明胶, 精氨酸双水解酶阴性, 鸟氨酸, 赖氨酸脱羧酶阳性, 脂酶(Tween 80)阳性, 脲酶阳性。鉴定为产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*。

#### 2.4 菌株 A30 ACC 脱氨酶活性的测定

Honma 等<sup>[3]</sup>规定了 ACC 脱氨酶的单位酶活: 为在测酶体系中每分钟形成  $1 \mu\text{mol}$   $\alpha$ -氨基丁酸的活性。

$50 \mu\text{l}$  A30 的细胞抽提物在测酶体系中作用 1 小时,  $A_{560}$  为 0.176。根据  $\alpha$ -氨基丁酸浓度与  $A_{560}$  吸光度的标准曲线, 相当于每分钟产生  $5.17 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$   $\alpha$ -氨基丁酸。细胞抽提物湿重为  $5.47 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 所以细胞抽提物的酶活为  $0.0189 \text{u}/\text{mg}$ 。

#### 2.5 讨论

2.5.1 确定了 5 株菌的 ACC 脱氨酶活性后, 将其中酶活最高的菌株 A30 与菌株 ACP 相比较, 粗酶活性基本达到了同一数量级(分别为  $0.0506 \text{u}/\text{mg}$  和  $0.0189 \text{u}/\text{mg}$ )。

2.5.2 Honma. M 等<sup>[3]</sup>对 ACC 脱氨酶研究时, 发现具有 ACC 脱氨酶活性的一株产荧光假单胞菌和一株汉氏酵母菌。随后应用 ACC 脱氨酶基因多用菌株 ACP. Klee 等曾在土壤中分离到两株具 ACC 脱氨酶活性的产荧光假单胞菌, 但未有系统鉴定。我们经过系统鉴定发现: 在土壤细菌中具有 ACC 脱氨酶活性的菌株除假单胞菌外还在肠杆菌属、气单胞菌属中发现。另外分离过程中还发现有霉菌、放线菌亦可在选择性培养基上生长。

### 参 考 文 献

- 1 Adams D O, S F Yang, Ethylene biosynthesis; identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, **76**:170~174
- 2 Yang S F, The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In: W W Thomason, E A Nothnagel, R C Huffaker, eds, *Plant senescence: its biochemistry and physiology*, Rockville: The American Society of Plant Physiology, 1987, 156~166
- 3 Honma M, T Shimomura, Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem*, 1978 **42**: 1825~1831
- 4 Van Der Streten D, Van Wiemeersch L, Goodman H, et al., Cloning and sequence of two different cDNA encoding ACC synthase in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**:4859~4863
- 5 Gerhardt P (ed), *Manual of Methods for General Bacteriology*. Washington: The American Society of Microbiology, 1981
- 6 Krieg N R, Holt J G, *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Williams: 1984, **1**:140~211