

從水牛瘤胃微生物多源基因庫篩選新穎脂解酵素基因⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 吳明哲⁽²⁾ 李佳音⁽³⁾ 程梅萍⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：101 年 2 月 20 日；接受日期：101 年 7 月 20 日

摘要

本研究目的在以多源基因體學方式建構水牛瘤胃多源基因庫，再以功能導向的篩選方式分離出含有脂解活性的株系。水牛瘤胃中細菌之多樣性頗為豐富，以質體系統建構由水牛瘤胃液樣品萃取 DNA 之基因庫，利用活性篩選的方式，直接從基因庫中篩選出具脂解活性之株系 4 株，經 DNA 定序與比對後，此 4 株系的插入片段具有 4 個完整相對應脂解酵素基因的 ORFs。且此 4 個預測的脂解蛋白質序列經與資料庫比對分析後，發現其相同性介於 27 - 59%，依據 Arpigny & Jaeger 之細菌脂解酵素分類，其中 EstR1 屬於第七類，EstR3 比較明顯屬於第八類，EstR4 可能屬於第六類，而 EstR2 則可能成為新的類別。依據培養盤上之功能分析，此 4 個預測的脂解酵素應為酯酶而非脂肪酶，又以資料庫比對分析結果顯示，其中 EstR1 與 EstR2 可能另具有聚醣分解能力。

關鍵詞：脂解酵素基因、多源基因庫、瘤胃微生物、水牛。

緒言

在自然界，微生物含有非常豐富的遺傳資源可供開發與利用，但傳統上利用微生物的遺傳資源是先從該環境中將菌株分離出來，再進行菌株的培養，以生產特定的酵素或其他自然物質。囿於目前標準的菌株分離技術，超過 99% 的微生物是無法透過實驗室而單獨分離 (Amann *et al.*, 1995; Torsvik and Øvreås, 2002)，而目前新興的研究技術，可不用分離培養菌株即可篩選標的基因，此種學門稱為多源基因體學 (Handelsman *et al.*, 1998)。利用多源基因學方式，可建構與保存環境微生物基因庫，其後利用適當的分離方式，如活性表現或 DNA 序列特性，篩選出所需的標的株系。目前已經有許多的研究，

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1757 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 國立台灣大學農業化學系。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(5) 通訊作者，E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw。

發現了一些可供利用的新物質 (amylase: Yun *et al.*, 2004, lipase: Henne *et al.*, 2000; Ranjan *et al.*, 2005, protease: Waschowitz *et al.*, 2009, dehydrogenase: Wexler *et al.*, 2005, diol dehydratase: Knietsch *et al.*, 2003, reductase: Eschenfeldt *et al.*, 2001, antibiotics: Lim *et al.*, 2005)。

瘤胃為反芻動物重要的消化器官，亦為一特殊複雜的厭氧環境，內含之微生物包括細菌、古細菌、真菌、原蟲及噬菌體，且其中之 85 – 95% 微生物尚未能以人工分離培養 (Tajima *et al.*, 2001, Whitford *et al.*, 1998, Shin *et al.*, 2004)。脂解酵素在許多的工業用途上扮演重要的生物催化劑角色，包括食物與飼料、清潔劑、化學合成、化妝品與香水、藥物合成等 (Bornscheuer, 2002; Jaeger and Eggert, 2002)。脂肪酶 (lipase, 酵素分類 EC 3.1.1.3) 與酯酶 (esterase, 酵素分類 EC 3.1.1.1) 都是屬於脂解酵素，可分別用來水解與合成長鍊與短鍊甘油酯 (Arpigny and Jaeger, 1999)。此外，脂解酵素具有非常特別的性質，寬廣受質專一性、有機溶劑穩定性、位置專一性及立體專一性等 (Bornscheuer, 2002)。由於多源基因體學的蓬勃發展，在多種不同動物的瘤胃中發現很多新穎酵素，如纖維素分解酶 (cellulases)、環狀糊精分解酶 (cyclodextrinase)、內聚醣分解酶 (endoglucanases)、脂解酵素 (lipolytic enzymes) 及三氯吡啶醇分解酶 (3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme) (Duan *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009; Math *et al.*, 2010)。

在先前之研究得知，臺灣水牛瘤胃所含之細菌多樣性相當豐富 (廖等, 2009)，由建構細菌 16S rRNA 基因庫株系的 DNA 序列分析比對結果，絕大部分的株系 (大於 90%) 是屬於未被培養者或是未被鑑定者。因此，本研究利用質體系統建構水牛瘤胃多源基因庫，以活性篩選方式成功分離出 4 株具有脂解活性的株系，可供進一步的研究與利用。

材料與方法

I. 瘤胃內容物樣品

本研究所使用之臺灣水牛瘤胃內容物，由畜產試驗所花蓮種畜繁殖場提供。經測定其 pH 值為 5.6，將樣品凍存於 -70°C 超低溫冷凍庫中，並將樣品冷凍乾燥，以備微生物 DNA 萃取之用。

II. 瘤胃微生物 DNA 之快速萃取

利用商業化套組 (PowerSoil DNA Isolation Kit, MOBIO) 進行瘤胃內容物中微生物 DNA 之萃取，並依照廠商所提供的操作步驟進行萃取，僅小幅修改陶瓷珠撞擊步驟，使用陶瓷珠高速碰撞裂解樣品以釋放出所含微生物 DNA，陶瓷珠撞擊步驟採用 MagNA Lyser (Roche)，在 5,000 rpm 撞擊 20 秒，最後即可得到品質良好的較小分子量的 DNA 溶液。

III. 瘤胃微生物多源基因庫建構與脂解活性株系篩選

將萃取出來的瘤胃微生物 DNA 溶液，以限制酶 *Hind*III (Roche) 進行部分分切反應 (partial digestion)，於 37°C 下作用 10 min 後，終止反應。再以 1% 瓊脂膠體電泳部分分離分切的 DNA，並將大小約介於 2 – 9 kb 之 DNA 利用套組回收 (Agarose Gel DNA Extraction Kit, Roche)。基因庫建構所使用的載體為 pBluescript II (Stratagene)，以限制酶 *Hind*III 作用後再以鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, Roche) 去除磷酸根，續之以套組純化後備用。載體與回收 DNA 片段的比例約為 1:3，在 14°C 下以 T4 DNA 連接酶 (ligase, Roche) 作用過夜，以進行接合作用。其後將接合溶液進行去鹽作用，最後利用電衝擊方式 (electroporation) 將接合之重組質體送入勝任細胞 (TransforMax EPI300 *E. coli*, Epicentre)，所使用的條件如下：電衝管縫隙為 2 mm，電壓 2.5 kV，電容 25 μ F，電阻 201 Ω ，時間為 5 ms。將電衝擊過之勝任細胞於 1 ml SOC 中於 35°C 下培養 1 h 後，取 400 μ L 之菌液塗抹於篩選培養基 spirit blue agar (配方 g/L)：casein enzymic hydrolysate, 10.00; yeast extract, 5.00; spirit blue, 0.15; Agar, 17.00, Sigma-Aldrich) 添加 1% (v/v) 三丁酸甘油酯 (tributyrin, Merck)、

0.05% (v/v) Tween 80 (Merck) 及 ampicillin (100 µg/mL, Sigma-Aldrich)。於 35°C 下培養 2 至 5 天後，挑選具有脂解活性菌株。初步篩選出具脂解活性之菌株皆重新在篩選培養基上劃線培養，以確認其活性。

IV. 脂解活性株系 DNA 定序與分析

個別培養具有脂解活性之株系，萃取其重組質體，將少量重組質體以限制酶 *Hind*III (Roche) 作用，後以瓊脂膠體電泳分離分切之重組質體，初步估算 DNA 插入片段之大小。以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) 進行定序反應，並以引子移步法 (primer walking) 的方式定序處理，之後以 ABI 3730 DNA 自動定序儀 (Applied Biosystems) 解序，各個片段以 Vector NTI Suite 10.3.0 (Invitrogen) 套裝軟體中 ContigExpress 程式組合，完成整段插入片段之 DNA 序列解析。將所得之 DNA 序列利用 NCBI 網頁上之線上分析軟體 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)，分析整段 DNA 可能所含之 ORFs (open reading frame)。ORF 之預測功能則以 NCBI 網站 BLASTP 搜尋 NCBI non-redundant protein database (Altschul *et al.*, 1997) 資料庫中最接近之蛋白質與微生物。

V. 脂解酵素演化樹狀圖分析

脂解酵素胺基酸序列與細菌脂解酵素參考序列 (Arpigny and Jaeger, 1999) 分別以程式 Clustal X 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) 與 MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) 建立演化樹狀圖。演化樹狀圖之建立採用 neighbor-joining 分析模式，自引分析 (bootstrap analysis) 採用 1,000 次重複數，以確認樹狀圖之堅實性 (robustness)。

結果與討論

I. 具脂解活性株系篩選

在化學合成與醫藥科學等工業，對脂肪酶與酯酶需求漸增 (Bornscheuer, 2002; Jaeger and Eggert, 2002)，由適當來源開發大量新穎脂肪分解酵素供生物技術產業應用，是當務之急。因此，本研究採用水牛瘤胃微生物 DNA 進行接合後，重組質體以電衝擊方式轉形入大腸桿菌勝任細胞，再將這些細胞塗抹在含 1% 三丁酸甘油酯的篩選培養基上，在 35°C 下培養 2 天以上。在培養盤上發現有 4 個菌落表現出脂解活性，再將這 4 個株系重新在相同的篩選培養基劃線培養，並確認其脂解活性，這些株系分別命名為 TWBRL1、TWBRL2、TWBRL3 及 TWBRL4，於 4 個株系中，TWBRL1 與 TWBRL2 的脂解活性較強，菌落周圍具有較大的透明圈 (clear zone)，且在篩選培養基上呈現藍色狀態 (圖 1)。然而，將這些株系劃線培養於在含 1% 橄欖油的培養基時，皆未能在菌落周圍出現清楚的透明圈。這個結果顯示所篩選具脂解酵素活性的株系可能產生酯酶而非脂肪酶。

II. 脂解酵素基因分子學分析

為瞭解各株系 DNA 插入片段的長度大小，將各株的重組質體經由限制酶 *Hind*III 作用後以瓊脂膠體電泳分離，發現其大小介於 2 – 6 kb 之間 (圖 2)，同時為瞭解所篩選的脂解活性株系的分子學特性，將 4 個株系 (TWBRL1 – TWBRL4) 之插入 DNA 序列皆由其兩端以引子移步法完整定序，並以電腦程式進行分子學分析 (表 1)。序列分析結果指出這些插入 DNA 的分子大小範圍由 2,388 – 5,499 bp；而其 G + C 含量則介於 49.1 – 65.6%。然而，以 ORF finder 與 BLASTP alignment 程式分析結果，在 4 個株系中有 4 個預測為脂解酵素基因的完整 ORFs。進一步而言，以預測之胺基酸序列分析結果，沒有一個預測的基因產物與資料庫中已知或預測之蛋白質完全相同，僅有低至中度 (27 – 59%) 相同性 (identity)。

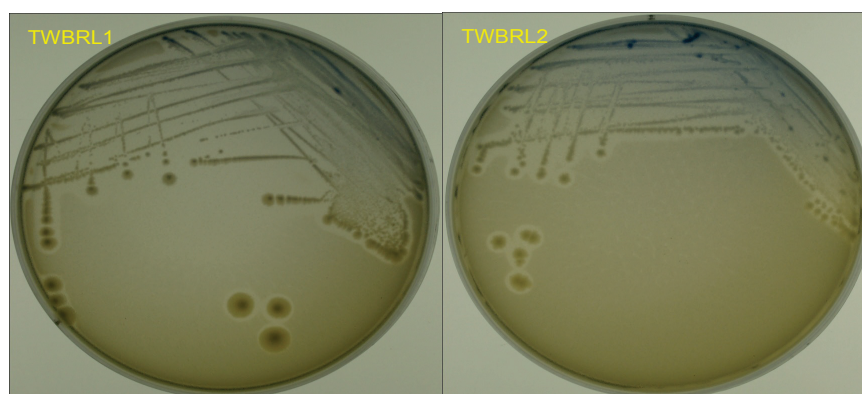


圖 1. 自臺灣水牛瘤胃微生物多源基因庫篩選之兩株系脂解活性表現。

Fig. 1. Lipolytic activity of two clones isolated from a metagenomic library of rumen microflora in Taiwan Water Buffalo.

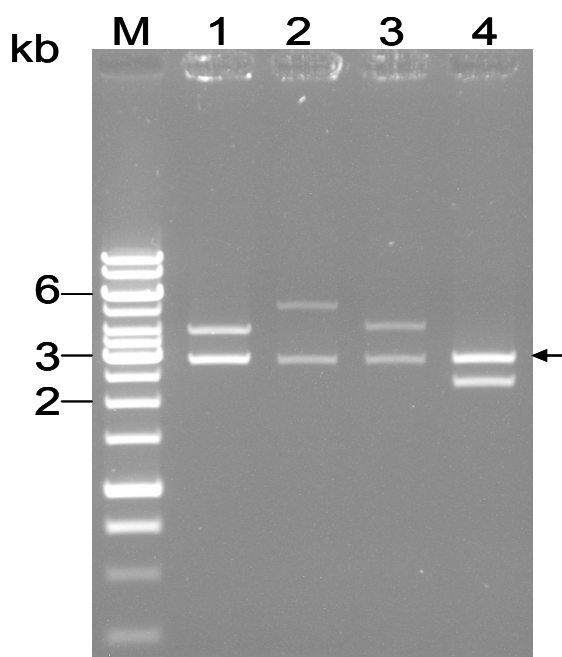


圖 2. 自臺灣水牛瘤胃微生物多源基因庫篩選具脂解活性株系插入 DNA 片段之限制酶分析。脂解活性株系之重組質體以限制酶 *Hind*III 作用與電泳分離後以評估插入片段大小，Lane 1：TWBRL1，Lane 2：TWBRL2，Lane 3：TWBRL3，Lane 4：TWBRL4，箭頭所指的位置為選殖載體 pBluescript II KS(+)，M：DNA 大小標記。

Fig. 2. Restriction analysis of insert size of the 4 lipolytic clones from a metagenomic library of rumen microflora in Taiwan Water Buffalo. The recombinant plasmids of four lipolytic clones were selected for insert size estimation with *Hind*III digestion. Lane 1: TWBRL1, lane 2: TWBRL2, lane 3: TWBRL3, and lane 4: TWBRL4. The arrow indicates the plasmid vector of pBluescript II KS(+) (2.9kb). M, size markers (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermentas).

表 1. 四株系預測脂解活性基因之分子分析

Table 1. Molecular analysis of predicted lipolytic genes identified from 4 clones

Plasmid (bp)	ORF	G+C (%)	Size (aa ^a)	Closest protein and accession no.	Microorganism	% Id /Sim ^b	Score ^c	E value ^d
pTWBRL1 (4,068)	EstR1	62.6	296	Hypothetical protein (ZP_03477680)	<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	42/58	205	3e-62
pTWBRL2 (5,459)	EstR2	63.9	407	Esterase (ADY36651)	<i>Bacteroides salanitronis</i> DSM 18170	59/75	496	2e-173
pTWBRL3 (4,250)	EstR3	65.6	384	Beta-lactamase (YP_004643483)	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> KNP414	39/58	263	1e-82
pTWBRL4 (2,388)	EstR4	49.1	293	Hypothetical protein (ZP_01622142)	<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	27/45	158	4e-09

^a Length of predicted ORF in amino acids.^b % Identity / Similarity.^c Bit score of alignment using BLAST.^d The value is a parameter that describes the number of hits one can "expect" to see by chance when searching a database of a particular size.

在 pTWBRL1 重組質體的 DNA 插入片段長 4,068 bp，含有一個能轉譯成長 296 aa (amino acid) 的蛋白質，將其命名為 EstR1，預測分子量為 32.5 kDa (表 1)，*pI* (isoelectric point) 則為 5.48。此段蛋白質胺基酸序列中含脂解酵素特有之五胺基酸胜肽序列 (GX SXG) 之 GFSAG，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為 *Parabacteroides johnsonii* DSM 18315 推測出來的 hypothetical protein PRABACTJOHN_03370 (accession number: ZP_03477680)，比對分數為 205，相同性為 42%，期望值則為 3e - 62，次相近者為自 *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 轉譯出之 xylanase (accession number: ZP_01461202)，再者為自 *Chthoniobacter flavus* Ellin428 轉譯出之 xylanase (accession number: ZP_03132271)，其餘相近的蛋白質亦多註解為 xylanase。由此推測，EstR1 可能為具酯酶與木聚酶兩種功能的蛋白質。

在 pTWBRL2 重組質體的 DNA 插入片段長 5,459 bp，含有一個 ORF 能轉譯成長 407 aa 的蛋白質，將其命名為 EstR2，預測分子量為 44.9 kDa (表 1)，*pI* 則為 5.73。胺基酸序列中含有脂解酶之特徵五胺基酸胜肽序列 (GX SXG) 之 GLSMG，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 *Bacteroides salanitronis* DSM 18170 註解出來之 esterase (accession number: ADY36651)，比對分數為 496，相同性為 59%，期望值則為 2e - 173，次相近者為自 *Bacteroides uniformis* ATCC8492 轉譯出之 hypothetical protein BACUNI_00920 (accession number: ZP_02069506)，再者為自 *Bacteroides* sp. D20 與 *Bacteroides* sp. 4_1_36 分別轉譯出之 conserved hypothetical protein (accession number: ZP_06201072) 與 hypothetical protein HMPREF1007_00161 (accession number: ZP_07937045)，其餘相近的蛋白質大部分註解為酯酶或糖基水解酶 (glycosyl hydrolase)。

在 pTWBRL3 重組質體的 DNA 插入片段長 4,250 bp，含有一個 ORF 能轉譯成長 384 aa 的蛋白質，將其命名為 EstR3，預測分子量為 42.6 kDa (表 1)，*pI* 則為 5.31。此段蛋白質胺基酸序列中含有 beta-lactamase 具有之特徵 SXXK 序列之 SMTK，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414 推測出來的 beta-lactamase (accession number: YP_004643483)，比對分數為 263，相同性為 39%，期望值則為 1e - 82，次相近者為自 *Paenibacillus polymyxa* E681 轉譯出之 beta-lactamase class C and other penicillin binding protein (accession number:

YP_003868781)，其餘相近的蛋白質絕大部分被註解為 beta-lactamase。

在 pTWBRL4 重組質體的 DNA 插入片段長 2,388 bp，含有一個 ORF 能轉譯成長 293 aa 的蛋白質，將其命名為 EstR4，預測分子量為 33.2 kDa（表 1），pI 則為 5.99。此段蛋白質胺基酸序列中含脂解酵素具有之特徵五胺基酸胜肽序列（GX SXG）之 GGSQG，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 *Lyngbya* sp. PCC 8106 推測出來的 hypothetical protein L8106_02362（accession number: ZP_01622142），比對分數為 158，相同性為 27%，期望值則為 $4e-09$ ，次相近者為自 *Microcoleus chthonoplastes* PCC7420 轉譯出之 diene lactone hydrolase family（accession number: ZP_05029280），其餘相近的蛋白質多被註解為 peptidase S9。

雖然由與 NCBI 資料庫比對結果得知，與此 4 個預測脂解基因最接近的蛋白質是來自可培養且已知的細菌，但是這些蛋白質序列為由全基因組（whole genome）序列資料轉譯而來，並無實體的蛋白質之生化特性分析，來證實其活性。此外，大部分預測的脂解基因僅有低至中度（27 – 59%）與可培養且已知的細菌相對蛋白質相同性。由此可得知，藉由建構多源基因庫再以功能導向的篩選方法，可以求得新穎之脂解酵素。此外，與本研究所預測的 4 個脂解酵素基因最接近的細菌，分別屬於 *Bacteroidetes*、*Firmicutes* 及 *Cyanobacteria*（表 1），這個結果則大致與水牛瘤胃細菌多樣性分析結果（廖等，2009）相符合。

III. 脂解酵素之分類

本研究所預測的 4 個脂解酵素基因之胺基酸序列皆不相同，且分別相似於不同之脂解酵素家族（family）（圖 3）。在 4 個脂解酵素基因中，有 2 個比較明顯分屬於 Family VII（EstR1）與 Family VIII（EstR3），EstR4 可能屬於 Family VI，而 EstR2 則可能為新的一類。通常而言，由不同的環境樣品以多源基因庫方式篩選，可能獲得多種的脂解酵素基因（Ferrer *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2010; Lämmle *et al.*, 2007）。EstR1 與蛋白質資料庫比對後，發現與其相近者被註解為聚醣分解能力的酵素 xylanase，然在本研究的結果呈現 EstR1 為具脂解活性的蛋白質，而 EstR2 與蛋白質資料庫比對後亦發現相近者為酯酶或糖基水解酶。事實上，瘤胃微生物在反芻動物消化營養中扮演非常重要的角色，且反芻動物的主要食物為乾草含有大量的纖維素等聚醣化合物，因此，在瘤胃發現具脂解活性之酵素亦可能另具醣分解能力（Ferrer *et al.*, 2005; Pai *et al.*, 2010），此部分需要進一步的酵素大量表現與純化後，再進行特性分析予以證明。

結論

本研究藉由建構水牛瘤胃微生物多源基因庫的方式，配合以功能導向的篩選方式，成功地分離出新穎的脂解酵素基因。未來將進一步探究這些新穎酵素的特性，期以能應用於生物技術研究或產業。

致謝

感謝本所花蓮種畜繁殖場提供水牛瘤胃內容物，得以讓本研究進行。

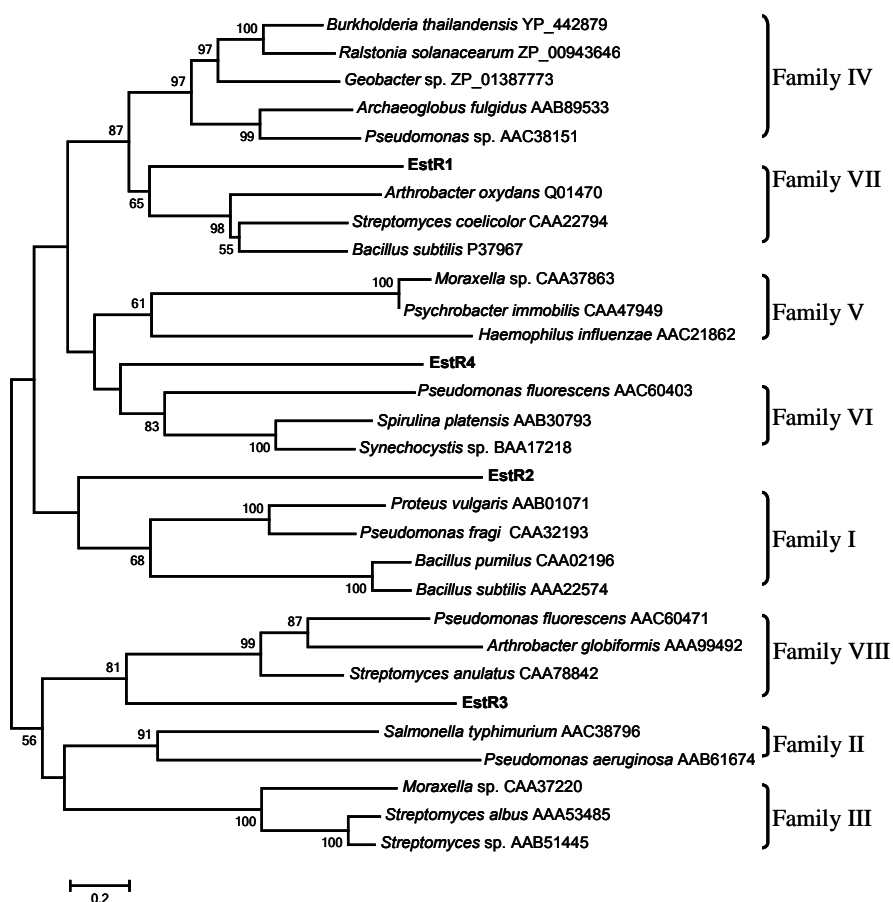


圖 3. 脂解酵素與相近蛋白質之演化類源分析。此分析以 Clustal X and MEGA 4.0 程式完成，本研究所得之脂解酵素以粗體字表示，自引分析數值採用 1,000 次重複數超過 50% 才會顯示，刻度條長度代表每個胺基酸的變異度為 0.2。

Fig. 3. Phylogenetic analysis of lipolytic enzymes and closely related proteins. Phylogenetic analysis was performed using the programs Clustal X and MEGA 4.0. The lipolytic enzymes found in this study are shown in bold type. Only bootstrap values higher than 50% were shown. The scale bar represents 0.2 changes per amino acid.

參考文獻

- 廖仁寶、黃文瑛、吳明哲、李佳音、程梅萍。2009。台灣水牛瘤胃微生物多樣性分析。畜產研究 42：171-178。
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

- Amann, R. I., W. Ludwig and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Arpigny, J. L. and K. H. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 73-81.
- Duan, C. J., L. Xian, G. C. Zhao, Y. Feng, H. Pang, X. L. Bai, J. L. Tang, Q. S. Ma and J. X. Feng. 2009. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J. Appl. Microbiol.* 107: 245-256.
- Eschenfeldt, W. H., L. Stols, H. Rosenbaum, Z. S. Khambatta, E. Quate-Randall, S. Wu, D. C. Kilgore, J. D. Trent and M. I. Donnelly. 2001. DNA from uncultured organisms as a source of 2,5-diketo-D-gluconic acid reductases. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4206-4214.
- Ferrer, M., O. V. Golyshina, T. N. Chernikova, A. N. Khachane, D. Reyes-Duarte, V. A. Santos, C. Strompl, K. Elborough, G. Jarvis, A. Neef, M. M. Yakimov, K. N. Timmis and P. N. Golyshin. 2005. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.* 7: 1996-2010.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy and R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: 245-249.
- Henne, A., R. A. Schmitz, M. Bomeke, G. Gottschalk and R. Daneil. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3113-3116.
- Hong, K. S., H. K. Lim, E. J. Chung, E. J. Park, M. H. Lee, J. C. Kim, G. J. Choi, K. Y. Cho and S. W. Lee. 2007. Selection and characterization of forest soil metagenome genes encoding lipolytic enzymes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1655-1660.
- Hu, Y., C. Fu, Y. Huang, Y. Yin, G. Cheng, F. Lei, N. Lu, J. Li, E. J. Ashforth, L. Zhang and B. Zhu. 2010. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72: 228-237.
- Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Knietsch, A., S. Bowien, G. Whited, G. Gottschalk and R. Daniel. 2003. Identification and characterization of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase- and diol dehydratase-encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3048-3060.
- Lämmle, K., H. Zipper, M. Breuer, B. Hauer, C. Buta, H. Brunner and S. Rupp. 2007. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J. Biotechnol.* 127: 575-592.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lim, H. K., E. J. Chung, J. C. Kim, G. J. Choi, K. S. Jang, Y. R. Chung, K. Y. Cho and S. W. Lee. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7768-7777.

- Liu, K., J. Wang, D. Bu, S. Zhao, C. McSweeney, P. Yu and D. Li. 2009. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385: 605-611.
- Math, R. K., S. M. Asraful Islam, K. M. Cho, S. J. Hong, J. M. Kim, M. G. Yun, J. J. Cho, J. Y. Heo, Y. H. Lee, H. Kim and H. D. Yun. 2010. Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library. *Biodegradation* 21: 565-573.
- Pai, C. K., Z. Y. Wu, M. J. Chen, Y. F. Zeng, J. W. Chen, C. H. Duan, M. L. Li and J. R. Liu. 2010. Molecular cloning and characterization of a bifunctional xylanolytic enzyme from *Neocallimastix patriciarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 1451-1462.
- Ranjan, R., A. Grover, R. K. Kapardar and R. Sharma. 2005. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 57-65.
- Shin, E. C., K. M. Cho, W. J. Lim, S. Y. Hong, C. L. An, E. J. Kim, Y. K. Kim, B. R. Choi, J. M. An, J. M. Kang, H. Kim and H. D. Yun. 2004. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Appl. Microbiol.* 97: 378-383.
- Tajima, K., T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and R. I. Aminov. 2001. Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 67-72.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Torsvik, V. and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Waschkowitz, T., S. Rockstroh and R. Daniel. 2009. Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2506-2516.
- Wexler, M., P. L. Bond, D. J. Richardson and A. W. Johnston. 2005. A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ. Microbiol.* 7: 1917-1926.
- Whitford, M. F., R. J. Foster, C. E. Beard, J. Gong and R. M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* 4: 153-163.
- Yun, J., S. Kang, S. Park, H. Yoon, M. J. Kim, S. Heu and S. Ryu. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7229-7235.

Screening of novel lipolytic genes from a metagenomic library of rumen microflora in Taiwan Water Buffalo ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw⁽²⁾ Jo-Ching Chen⁽²⁾ Ming-Che Wu⁽²⁾

Chia-Yin Lee⁽³⁾ and Mei-Ping Cheng⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: Feb. 20, 2012; Accepted: Jul. 20, 2012

Abstract

The purpose of this study was to construct a metagenomic library from the rumen contents of a Taiwan Water Buffalo and to screen for lipolytic clones using activity based screening methods. By screening the metagenomic library of rumen microflora of Taiwan Water Buffalo, a total of 4 unique clones conferring lipolytic activities were obtained using tributyrin plate assay. DNA analysis revealed that there were 4 putative lipolytic ORFs of 4 clones. Based on the BLASTP analysis, the 4 putative lipolytic enzymes showed 27–59% identity to the closest matches in protein database. According to the classification of bacterial lipolytic enzymes proposed by Arpigny & Jaeger, EstR1 and EstR3 might belong to Family VII and Family VIII, respectively. EstR2 might be classified into Family VI, and EstR4 might represent a new family. On the base of the plate assay with different substrates of tributyrin and olive oil, the lipolytic enzymes may be recognized as esterases not lipases. Moreover, EstR1 and EstR2 might be suggested to be bifunctional enzymes with lipolytic and polysaccharide degrading activities after comparison with the protein database.

Keywords: Lipolytic genes, Metagenomic library, Rumen microflora, Water buffalo.

(1) Contribution No. 1757 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C

(3) Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan, R. O. C

(4) Livestock Management Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw