

奶牛瘤胃微生物元基因组文库中脂肪酶的筛选与酶学性质

赵圣国^{1,2}, 王加启¹, 刘开朗¹, 朱雅新³, 卜登攀¹, 李旦^{1,2}, 于萍¹

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193

2 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070

3 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080

摘要: 利用含有三油酸甘油酯的脂肪酶选择性筛选培养基, 从奶牛瘤胃微生物元基因组文库 15 360 个克隆中, 筛选得到了 18 个脂肪酶阳性克隆, 其插入片段大约为 60 kb, 并且各个克隆的插入片段各不一样。利用 p-NPP 法对脂肪酶克隆的脂肪酶活性分析, 表明均具有大小不等的脂肪酶活性。底物特异性分析表明 Lipase6、Lipase7 和 Lipase8 分别对 C16 底物(对硝基苯棕榈酸酯)、C12 底物(对硝基苯月桂酸酯)和 C16 底物(对硝基苯棕榈酸酯)水解能力最强。Lipase 6、Lipase 7、Lipase 8 的脂肪酶最适 pH 为 7.5; Lipase8 的脂肪酶活性半衰期随反应温度的升高而缩短, 70°C 时能达到 30 min。本研究筛选的脂肪酶具有不同的底物特异性和较好的热稳定性, 这对于工业化生产具有一定的应用潜力。

关键词: 瘤胃微生物, 元基因组文库, 脂肪酶, 底物特异性, 最适 pH, 热稳定性

Screening and characterization of lipase from a metagenome library of dairy rumen microflora

Shengguo Zhao^{1,2}, Jiaqi Wang¹, Kailang Liu¹, Yaxin Zhu³, Dengpan Bu¹, Dan Li^{1,2}, and Ping Yu¹

1 State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

3 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract: Using lipase segregation agar containing trioleoylglycerol, we obtained 18 lipase positive clones by screening from a metagenome library of dairy rumen microflora containing 15 360 clones. The average insert size of lipase positive clones was about 60 kb. Lipase enzyme activity analysis by p-NPP method indicated that Lipase6, Lipase7 and Lipase8 had higher lipolytic activities to substrates of p-nitrophenyl palmitate (C16), p-nitrophenyl alaurate (C12) and p-nitrophenyl palmitate (C16) respectively. The optimum pH of Lipase 6, Lipase 7 and Lipase 8 were 7.5. The halflife period of Lipase 8 with the value of 15 min in 70°C decreased with the increase of temperature. In conclusion, the lipases screened in this study had different substrates specificity and good thermo stability, which laid a basis for large-scale industrial application.

Keywords: rumen bacterium, metagenome library, lipase, substrate, optimum pH, thermo stability

Received: February 9, 2009; **Accepted:** April 14, 2009

Supported by: National Science and Technology Pillar Program (No. 2006BAD04A03).

Corresponding author: Jiaqi Wang. Tel: +86-10-62890458; E-mail: wang-jia-qi@263.net

国家科技支撑计划(No. 2006BAD04A03)资助。

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一类重要酯键水解酶,能催化如下反应:甘油三酯+水→甘油+游离脂肪酸,脂肪酶的最适反应底物为长链脂肪酸(C₁₀)形成的酯,而酯酶的最适反应底物为短链脂肪酸(C₈)形成的酯。由于脂肪酶具有很好的有机溶剂稳定性、较宽的底物范围、对映异构选择性等特点,使得它在食品、化工和医药行业有着广泛的应用^[1]。因此,有必要利用各种技术方法筛选和分离新的脂肪酶。传统的分离脂肪酶的方法是通过纯培养微生物和活性筛选的方式来寻找新的脂肪酶。但在自然环境中,只有1%的微生物可以纯培养,所以纯培养的方法得到的脂肪酶是很有限的^[2]。

元基因组是指某一特定的环境中全部微生物的总DNA,元基因组技术是将样品中的总DNA提取出来后,利用适宜的载体克隆到宿主细胞中以构建成元基因组文库,再从中筛选新的活性物质或基因的技术^[3]。目前已利用元基因组技术筛选到了新的脂肪酶/酯酶、蛋白酶、淀粉酶、氧化酶、几丁质酶、核酸酶、色素、抗菌及抗肿瘤活性物质等,而且这些新的生物活性物质已部分用于工业化生产中^[4]。

在元基因组技术中,文库的建立有很多种方法,其中细菌人工染色体(BAC)文库具有插入片段大、转化效率高的优点,可将复杂的基因或基因家族,包括基因的远程顺式作用元件一并转入受体生物中,所以不仅使转化的基因在一定范围内接近于在自然菌株中的状态,减少了转化基因沉默的可能性,而且可以进行基因时空表达的研究,有可能找到相互作用的基因簇,从而对未培养微生物的代谢和相互作用有一个更加深入的认识^[5]。

本研究利用中国荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组BAC文库,从中筛选具有水解三油酸甘油酯的脂肪酶克隆,最终得到了18个脂肪酶克隆,并对脂肪酶克隆的酶学性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Escherichia coli TransforMax EPI300 贮存于中国科学院微生物所;对硝基苯酚(p-NP)、对硝基苯乙酸酯(C2)、对硝基苯月桂酸酯(C12)、对硝基苯豆蔻酸酯(C14)、对硝基苯棕榈酸酯(C18)(p-NPP)和对硝基苯硬脂酸酯(C18)均购自于Sigma;三油酸甘油酯

购自于Fluka;Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自于Bio-Rad;Hind III、Not I、EcoR I 购自于TaKaRa。

奶牛瘤胃微生物BAC文库由本研究室与中国科学院微生物所联合构建。该文库是提取2 Mb 荷斯坦奶牛瘤胃微生物DNA后,经Hind III不完全酶切获得50~100 kb DNA片段,将其连接在pCC1BAC载体上,转化*E. coli* EPI300后而得到的。该文库的平均插入片段54.5 kb,共保存15 360个克隆,空载体率小于2%,库容837 Mb^[6]。

1.2 筛选脂肪酶阳性克隆

1.2.1 脂肪酶选择性筛选培养基^[7]

LB固体培养基配制好后加入1%三油酸甘油酯,利用均质器进行乳化,待三油酸甘油酯形成微滴后,经121°C、20 min 高温高压灭菌后,再加入经无菌过滤后的0.001%罗丹明B和12.5 μg/mL 氯霉素。

1.2.2 筛选^[8]

将保存在384板上的BAC克隆,分别影印到脂肪酶选择性筛选培养平板上。37°C恒温培养24~48 h后,将平板放在254 nm的紫外灯上观察,有荧光的菌落判断为脂肪酶阳性克隆,并以*Escherichia coli* TransforMax EPI300作为阴性对照。

1.2.3 脂肪酶阳性克隆插入片段大小的鉴定

利用碱裂解法分别少量提取18个脂肪酶阳性克隆质粒,用限制性内切酶Hind III完全酶切,酶切体系为:5 μL BAC质粒DNA,2 μL 10×Hind III酶切缓冲液,2 μL 0.1% BSA,0.5 μL 10 U/μL Hind III,加水至20 μL,37°C温育4 h,1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 脂肪酶阳性克隆限制性酶切图谱

利用限制性内切酶Not I对18个脂肪酶阳性克隆的质粒进行酶切分析,并利用限制性内切酶EcoR I对Lipase4和Lipase9进行酶切分析,酶切体系同上。37°C温育4 h,1%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 脂肪酶活性测定

1.3.1 脂肪酶提取

挑取18个脂肪酶阳性克隆,分别接种到50 mL LB液体培养基中,37°C过夜培养。10 000×g,4°C离心5 min,弃上清,用50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0,含10 mmol/L CaCl₂)清洗2次后,加入4 mL 50 mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0,含10 mmol/L CaCl₂)将菌体重悬,冰上超声破碎(300 W,超声4 s,间隔4 s,总共10 min)。将超声后菌液离心(12 000 × g, 2 min, 4°C),收集上清,一部分用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测

蛋白含量, 另一部分分装后置于 -80°C 中保存。

1.3.2 对硝基苯棕榈酸酯法测定脂肪酶活性^[9]

用 Tris-HCl 缓冲液配制 8 mmol/L 对硝基苯棕榈酸酯(p-NPP), 取 980 μL 加到 2 mL 离心管中, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 中保温 5 min, 加入 20 μL 脂肪酶提取液, 继续保温 5 min, 然后加入 0.5 mL 3 mol/L HCl 终止反应, 离心后取出 333 μL 上清液, 加入到 1 mL 2 mol/L NaOH 溶液中, 用分光光度计测定 405 nm 波长下吸光值。利用煮沸后的上清液作为空白对照。以对硝基苯酚(p-NP)稀释不同倍数做标准曲线。脂肪酶活性: 1 U/mg 相当于 1 mg 脂肪酶 1 min 释放 1 μmol p-NP。

1.4 脂肪酶的底物特异性^[10]

根据测得的阳性克隆脂肪酶活性数据, 挑取酶活性高中低 3 个克隆, 即 Lipase6、Lipase7、Lipase8, 分别以对硝基苯乙酸酯(C2)、对硝基苯月桂酸酯(C12)、对硝基苯豆蔻酸酯(C14)、对硝基苯棕榈酸酯(C16)和对硝基苯硬脂酸酯(C18)作为水解的底物, 代替 1.3.2 脂肪酶测定方法中的 p-NPP, 来测定脂肪酶活性。

1.5 脂肪酶的最适 pH

选取阳性克隆 Lipase6、Lipase7 和 Lipase8, 分别以 0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 5.0、6.0、7.0、8.0), 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5)和 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.5、10.5)作为酶反应的缓冲液, 利用 p-NPP 法测定酶活性。

1.6 脂肪酶的热稳定性

挑取 Lipase8, 在不同温度(50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 和 70 $^{\circ}\text{C}$) 中保温 0 min、15 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min 后取样, 迅速冷却至室温, 利用 p-NPP 法测定脂肪酶活性。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶的筛选

2.1.1 脂肪酶阴性克隆表型

利用脂肪酶选择性筛选培养基, 根据荧光颜色的变化, 从瘤胃微生物 BAC 文库的 15 360 个克隆中

筛选得到了 18 个脂肪酶阳性克隆, 定义为 Lipase1~Lipase18, 见图 1。重新利用脂肪酶选择性筛选培养基复筛上述 18 个克隆, 均具有稳定的水解底物的能力。

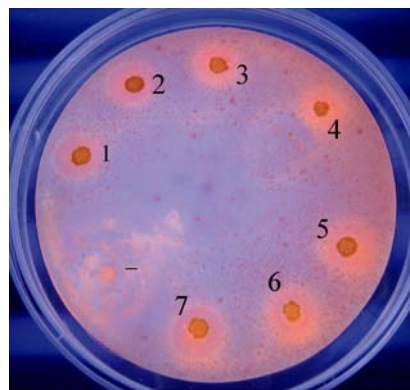


图 1 部分脂肪酶阳性克隆的荧光图

Fig. 1 Partial lipase positive clones. “-”: negative control; “1-7”: Lipase1-Lipase7.

2.1.2 脂肪酶克隆插入片段大小

对筛选得到脂肪酶阳性克隆, 少量提取质粒, 经限制性内切酶 *Hind* III 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定插入片段大小。脂肪酶克隆的质粒提取量比较少, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 见图 2。18 个脂肪酶克隆插入片段大小均为 60 kb 左右。

2.1.3 脂肪酶阳性克隆酶切图谱

利用限制性内切酶 *Not* I 对 18 个脂肪酶阳性克隆的质粒进行酶切分析, 并利用限制性内切酶 *Eco*R I 对 Lipase4 和 Lipase9 进行酶切分析(图 3)。从 *Not* I 酶切图谱 A 可以看出, 除 Lipase4 和 Lipase9 外, 其他克隆均具有不同的酶切图谱, 各个克隆间具有不同的 DNA 片段。从 *Eco*R I 酶切图谱 B 看出, Lipase4 和 Lipase9 的酶切图谱不同, 这些结果表明共筛选得到了 18 个不同的脂肪酶克隆。

2.2 脂肪酶酶活性

利用 p-NPP 法测定 18 个脂肪酶阳性克隆酶活性, 结果见图 4, Lipase7 酶活性最高, 达到 1069.55 U/mg; Lipase8 酶活性次之; 依次是 Lipase17、Lipase18、

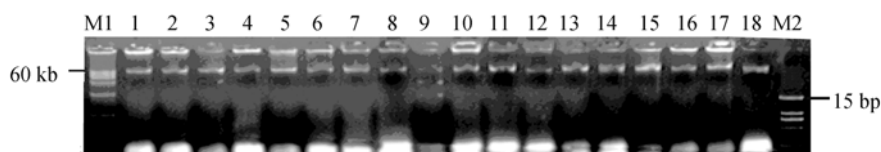


图 2 脂肪酶阳性克隆插入片段电泳分析

Fig. 2 Electropherogram of lipase positive clones' insert. M1, M2: DNA markers; 1-18: Lipase1-Lipase18.

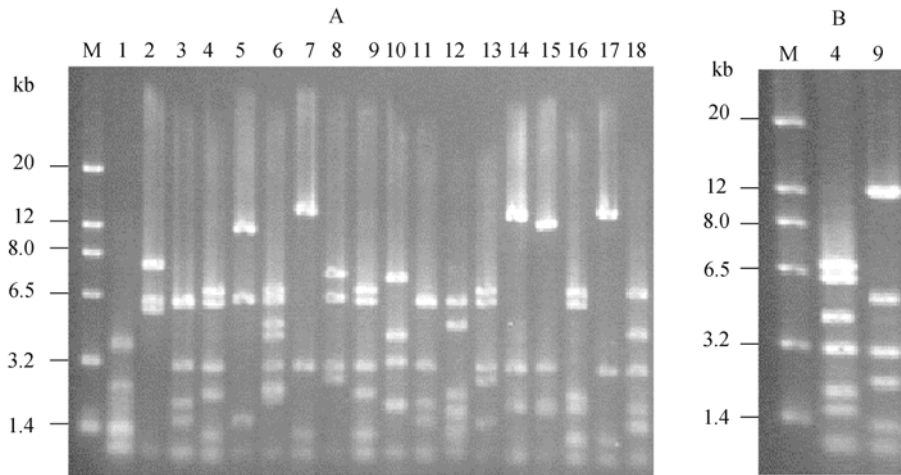


图3 脂肪酶阳性克隆限制性酶切图谱

Fig. 3 Electropherogram of digested lipase positive clones. (A) *Not* I enzyme digested maps. (B) *Eco*R I enzyme digested maps. M: DNA marker; 1-18: Lipase1-Lipase18.

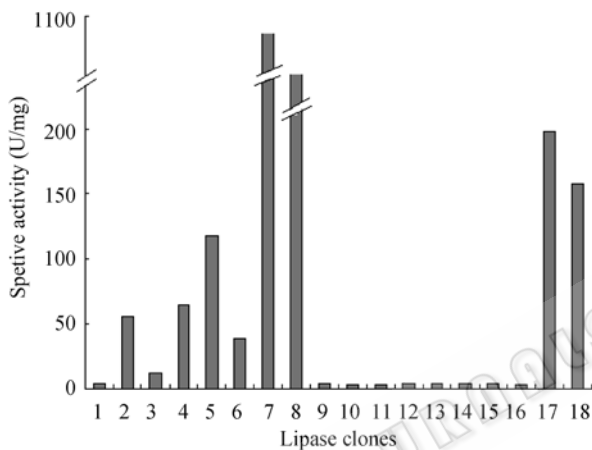


图4 脂肪酶阳性克隆酶活性

Fig. 4 Enzyme activities of lipase positive clones.

Lipase5、Lipase4、Lipase2 和 Lipase6, 而其他的脂肪酶克隆活性都较低, 但仍具有不同程度的酯键水解能力。

2.3 脂肪酶的底物特异性

利用含不同脂肪酸碳链长度的酯类作为反应的底物, 测定脂肪酶活性, 见图5。Lipase6 对 C16 的底物(对硝基苯棕榈酸酯)水解能力最强, 能达到 1933.42 U/mg, 其次是 C12(对硝基苯月桂酸酯)、C14(对硝基苯豆蔻酸酯)和 C18(对硝基苯硬脂酸酯)的底物; Lipase7 对 C12 的底物水解能力最强, 酶活性达到 3782.49 U/mg, 其次是 C16、C14、C18 和 C2 的底物; Lipase8 对 C16 的底物水解能力最强, 酶活性能达到 2309.02 U/mg, 其次是 C12、C14 和 C18 的底物。这3种脂肪酶克隆对 C2 的底物(对硝基苯

乙酸酯)水解能力很小或几乎没有水解能力。

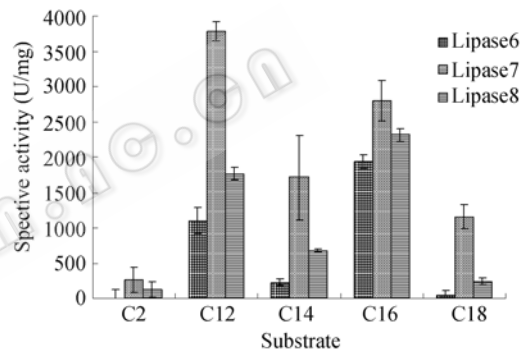


图5 脂肪酶阳性克隆的底物特异性

Fig. 5 Substrate specificity of Lipase positive clones.

2.4 脂肪酶的最适 pH

选择脂肪酶阳性克隆 Lipase6、Lipase7 和 Lipase8, 利用不同 pH 的缓冲液体系测定酶活性, 见图6。当 pH 在 6.0~10.0 之间时, 各个克隆均具有水解酯的能力, 而脂肪酶克隆的最适 pH 均为 7.5。

2.5 脂肪酶热稳定性

选择 Lipase8 在 50°C、60°C 和 70°C 下, 保温 0~120 min 后测定酶活性, 结果见图7。随着温度的升高, 脂肪酶活性逐渐降低, 酶半衰期逐渐缩短。温度在 50°C 时, 脂肪酶的半衰期为 80 min; 温度在 70°C 时, 脂肪酶酶活性能维持 120 min, 半衰期为 30 min。

3 讨论

元基因组学技术是一种不依赖于微生物纯培养的方法, 利用此技术能筛选到大量的新的酶类、抗

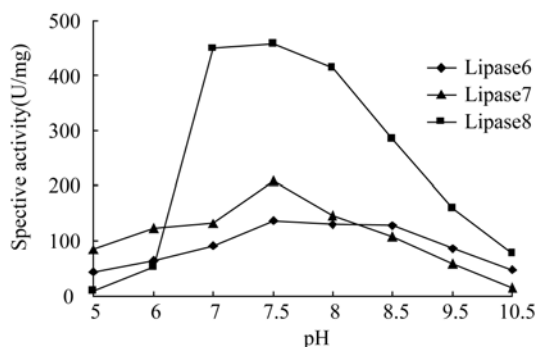


图 6 脂肪酶阳性克隆最适 pH

Fig. 6 Optimum pH of lipase positive clones.

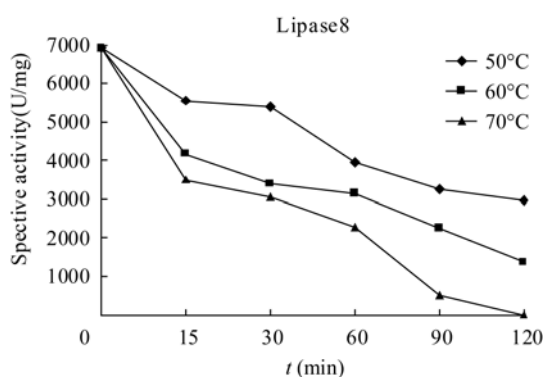


图 7 脂肪酶克隆的温度稳定性

Fig. 7 Thermo stability of Lipase clones.

生素和其他有价值的活性物质。近年来,越来越多的研究者利用此方法来发掘新的脂肪酶。Ranjan 等以 pUC19 载体构建了池塘微生物元基因组文库,平均插入片段 3.8 kb,筛选得到 11 个脂肪酶阳性克隆^[11]。Lee 等利用 fosmid 载体构建了森林表层土微生物元基因组文库,该文库有 33 700 个克隆,平均插入片段 35 kb,从中筛选后得到了 8 个具有脂肪酶特性的克隆子^[12]。本研究利用前期构建的瘤胃微生物 BAC 文库(平均插入片段 54.5 kb, 15 360 个克隆),通过三油酸甘油酯平板筛选得到了 18 个脂肪酶阳性克隆。与其他文库中筛选的脂肪酶克隆相比,本研究筛选得到的脂肪酶克隆,含有更大的插入片段(约 50 kb),这对于后续的脂肪酶基因簇、基因调控和基因间的相互作用的研究至关重要。

Tirawongsaroj 等从一个泰国热泉微生物元基因组文库中筛选得到了一个脂肪水解酶(EST1)克隆,底物特异性分析表明其对脂肪酸短链(C4 和 C5)和长链(C14 和 C16)酯类均具有水解活性^[13]。本研究筛选得到的脂肪水解酶对 C12 和 C16 长度的酯类具有很强的特异性。与 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111^[14]和

Bacillus pumilus B26^[15]分泌的脂肪酶相比,底物范围更广。

最适 pH 和温度稳定性是酶学性质中重要的测试指标。本研究筛选得到的脂肪酶 pH 范围广, pH 6~10 之间均具有活性,但最适 pH 7.4,说明本研究筛选得到的是中性脂肪酶,与 *Pseudomonas putida* ATCC 795 相同^[16]。脂肪酶的热稳定性的判断常根据某一温度下酶活性丧失所用的时间或酶活性丧失一半时所用的时间即半衰期来判断。嗜冷枯草芽孢杆菌脂肪酶在 60°C 下保温 30 min 丧失活性,半衰期为 15 min^[17],芽孢杆菌属分泌的脂肪酶在添加乙二醇、山梨醇等稳定剂的情况下,在 70°C 时活性能维持 150 min^[18]。本研究筛选得到的 Lipase8 在不加稳定剂的情况下,50°C 条件下能保持大于 120 min 的活性,半衰期为 80 min。70°C 条件下仍能保持长达 120 min 的活性,半衰期能达到 30 min,这些性质更有利于应用到工业热加工生产中。

REFERENCES

- [1] Arpigny JL, Jaeger KH. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochem J*, 1999, **343**(1): 177-183.
- [2] Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(6): 190-197.
- [3] Katrin L, Hubert Z, Michael B, et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *J Biotechnol*, 2007, **127**(4): 575-592.
- [4] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(5): 955-962.
- [5] Wild J, Szybalki W. Copy-control pBAC/oriV vectors for genomic cloning. *Methods Mol Biol*, 2004, **267**: 145-154.
- [6] Zhu YX, Wang JQ, Ma RL, et al. Construction and analysis of rumen bacterial artificial chromosome library from a dairy cow rumen microflora. *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(2): 213-216.
- [7] 朱雅新, 王加启, 马润林, 等. 荷斯坦奶牛瘤胃微生物元基因组 BAC 文库的构建与分析. *微生物学报*, 2007, **47**(2): 213-216.
- [8] Tirawongsaroj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, et al. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J Biotechnol*, 2008, **133** (1): 42-49.
- [9] Kouker G, Jaeger KE. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol*, 1987, **53**(1):

- 211–213.
- [9] Ryu HS, Kim HK, Choi WC, *et al.* New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **70**(3): 321–326.
- [10] Kim YJ, Choi GS, Kim SB, *et al.* Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expr Purif*, 2006, **45**(2): 315–323.
- [11] Ranjan R, Grover A, Kapardar RK, *et al.* Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **335**(1): 57–65.
- [12] Lee SW, Won K, Lim HK, *et al.* Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **65**(6): 720–726.
- [13] Tirawongsaraj P, Sriprang R, Harnpicharnchai P, *et al.* Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *J Biotechnol*, 2008, **133** (1): 42–49.
- [14] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, *et al.* Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(9): 4064–4069.
- [15] Kim HK, Choi HJ, Kim MH, *et al.* Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1583**(2): 205–212.
- [16] Pabai F, Kermasha S, Morin A, *et al.* Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 1995, **11**: 669–677.
- [17] Hu B, Wu S, Yang L, *et al.* Purification and enzymatic characters of low-temperature lipase from *Bacillus phychrophilus*. *Microbiol*, 2007, **34**(3): 524–527.
胡泊, 吴胜, 杨柳, 等. 嗜冷枯草芽孢杆菌低温脂肪酶纯化与酶学性质研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(3): 524–527.
- [18] Nawani N, Kaur J. Purification, characterization and thermostability of a lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Mol Cell Biochem*, 2000, **206**(1–2): 91–96.

© 2009 Science Press. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of Science Press.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

食品安全学导论

魏益民 主编 潘家荣 郭波莉 副主编

978-7-03-024574-8 ¥48.00 2009年5月出版

本书以联合国粮食及农业组织/世界卫生组织及国际食品法典委员会的相关文件和指南为基础,介绍了食品安全学的基本概念、基本原理、管理原则、基本方法,以及与其他相关学科的关系。全书的章节构成和内容安排以食品安全风险分析的三大要素(风险评估、风险管理和风险交流)为核心内容和出发点,论述了三大要素的科学基础、相互关系及技术体系,同时选编了部分案例和参考资料。

作为一部指导管理实践、提高知识水平和满足消费者需求的学术性兼知识性论著,本书适合于从事食品质量与安全研究的科教人员、负责食品安全监管的行政管理人员、食品加工与流通企业的管理人员阅读;也可作为食品质量与安全专业本科生及硕士研究生的教材,或博士研究生及专业培训班的参考书籍。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>