

乳牛瘤胃細菌多樣性分析與新穎脂解酵素基因篩選⁽¹⁾

廖仁寶⁽²⁾ 陳若菁⁽²⁾ 吳明哲⁽²⁾ 李佳音⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：105 年 11 月 16 日；接受日期：106 年 1 月 12 日

摘 要

本研究目的在探討乳牛瘤胃細菌多樣性與以多源基因體學方式篩選脂解酵素基因。乳牛瘤胃內容物以陶瓷珠震盪方式萃取多源基因體 DNA，利用細菌 16S rRNA 基因專一引子進行 PCR 增幅放大，產物選殖於 TA 選殖載體，以形成 16S rRNA 基因庫，並進行細菌多樣性分析。株系序列以 BLASTN 與 Genbank 核酸資料庫進行比對，用以確認株系可能代表之菌種身分，結果顯示所有株系皆屬於未被分離培養或未被鑑定者且與瘤胃微生物相關，而所屬菌門則有 *Bacteroidetes* (33/52)、*Firmicutes* (18/52) 及 *Fibrobacteres* (1/52)。同時，以多源基因體學方式建構多源基因庫，再以功能導向的篩選方式分離出含有脂解活性的株系。結果篩選出 3 株具脂解活性的株系，經 DNA 定序、open reading frame 分析及序列比對後發現，此 3 株系的插入片段具有 3 個完整脂解酵素基因 (LipoR1、LipoR2 及 LipoR3)。3 個預測的脂解酵素胺基酸序列經與資料庫比對分析後，發現具最高比對分數之相同性百分比分別為 39、86 及 62%，依據 Arpigny & Jaeger 之細菌脂解酵素分類，其中 LipoR1 可能屬於第一類，LipoR3 介於第四類與第七類，而 LipoR2 則成為新的類別成員 (第十五類)。

關鍵詞：脂解酵素基因、多源基因庫、瘤胃微生物、乳牛。

緒 言

自然界中微生物含有非常豐富的遺傳資源可供挖掘與利用，但傳統上利用微生物遺傳資源是先從該環境中將菌株單獨分離出來，再進行菌株的培養，以生產特定的酵素或其他自然物質。但因受限於目前菌株分離技術，超過 99% 的微生物是無法透過實驗室而能被單獨分離培養 (Amann *et al.*, 1995; Torsvik and Øvreås, 2002)，故為開發與利用絕大多數微生物的遺傳資源，即採取不用分離培養菌株而能直接篩選標的基因的策略，此種學門稱之為多源基因體學 (Handelsman *et al.*, 1998)。利用多源基因體學方式，即可建構、保存及分析環境微生物基因庫，爾後可利用適當的篩選方式，如活性表現或 DNA 序列特性，篩選出所需的標的株系。目前已經有眾多的多源基因體學相關研究發表，找到了許多可供研究與利用的新物質，包括酵素與抗生素 (如 amylase: Lopes *et al.*, 2015; Vester *et al.*, 2015、lipase: Alnoch *et al.*, 2015; Privé *et al.*, 2015、protease: Biver *et al.*, 2013; Devi *et al.*, 2016, antibiotics: Lim *et al.*, 2005 與 metatranscriptome: Iqbal *et al.*, 2016)。

瘤胃為反芻動物重要的消化器官，內含豐富多樣的微生物，且處於厭氧狀態下。由前人的研究結果得知，其中的 85% – 95% 微生物尚未能以人工分離培養 (Tajima *et al.*, 1999, Whitford *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2004)。近年來，有許多以多源基因體學方式篩選不同草食動物瘤胃微生物酵素基因的研究，且可找到一些有產業發展潛力的酵素基因。常見的酵素即包括纖維素分解酶 (cellulase)、環狀糊精分解酶 (cyclodextrinase)、內聚醣分解酶 (endoglucanase)、脂解酵素 (lipolytic enzyme) 及三氯吡啶醇分解酵素 (3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme) (廖等, 2012; Ferrer *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2009; Math *et al.*, 2010; Privé *et al.*, 2015)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2540 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(3) 國立臺灣大學農業化學系。

(4) 通訊作者，E-mail：cleee@ntu.edu.tw。

脂解酵素在許多工業用途上扮演非常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)。脂解酵素包含脂肪酶 (lipase, 酵素分類 EC 3.1.1.3) 與酯酶 (esterase, 酵素分類 EC 3.1.1.1)，可分別用來水解與合成長鏈與短鏈甘油酯 (Arpigny and Jaeger, 1999)。此外，脂解酵素具有非常特別的性質，如寬廣受質專一性、有機溶劑穩定性、位置專一性及立體專一性等 (Bornscheuer, 2002)，故能應用於特殊產物的產製。

有研究指出草食動物的飼糧 (乾基) 中含有 2% – 10% 的脂質 (Harfoot and Hazlewood, 1997)，且瘤胃中脂質的代謝對肉或牛奶的品質有很重要的影響 (Lourenço *et al.* 2010; Shingfield *et al.* 2013)，而瘤胃脂質的消化必須倚賴其中的微生物完成，故理論上應能從瘤胃樣品中篩選新穎的脂解酵素。因此，本研究目的即在於分析乳牛瘤胃微生物多樣性與篩選脂解酵素基因，經過 16S rRNA 基因序列比對後，發現大部分的株系屬於未被培養者或是未被鑑定者。同時，利用質體系統建構乳牛瘤胃多源基因庫，以活性篩選方式成功分離出 3 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

本研究所使用之瘤胃內容物 (含液體與固體)，取自畜產試驗所產業組畜一股瘤胃開窗乳牛。以酸鹼度計測量樣品的 pH 值後，將樣品凍存於 -70°C 超低溫冷凍櫃中，選取部分樣品進行多源基因體 DNA 萃取之用。

II. 瘤胃多源基因體 DNA 之快速萃取

利用商業化套組 (PowerSoil® DNA Isolation Kit, MOBIO) 進行瘤胃內容物中多源基因體 DNA 之萃取，小幅修改陶瓷珠撞擊步驟，並依照廠商提供之操作步驟處理樣品，最後即可得品質良好的 DNA 溶液。操作步驟簡述如下：取冷凍乾燥之瘤胃內容物樣品 80 mg 置入含陶瓷珠緩衝液之微量管，加入 60 µL C1 緩衝液 (含 SDS 之試劑，用以溶解細胞)，震盪混勻 5 s。以組織均質機 (MagNA Lyser, Roche) 在 5,500 rpm 條件下，作用 25 s。在 10,000 × g 下離心 30 s，吸取上清液至新的微量離心管。依序以不同的緩衝液 (C2 – C6：C2 含特定試劑以沉澱非 DNA 之有機與無機物質，C3 含特定試劑以沉澱額外的非 DNA 之有機與無機物質，C4 為高濃度鹽溶液，C5 為含乙醇之溶液，C6 為洗提溶液) 與旋轉過濾管進行 DNA 純化步驟，最後可得 100 µL DNA。

III. 瘤胃細菌多樣性分析

以細菌 16S rRNA 基因專一引子對 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA G-3', Edwards *et al.*, 1989) 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3', Wilson *et al.*, 1990)，增幅多源基因體 DNA 之 16S rRNA 基因片段，選殖於 TA 選殖載體 (pCR2.1-TOPO, Invitrogen) 上，並利用熱衝擊方式轉形至勝任細胞 *Escherichia coli* TOP10，將勝任細胞塗抹於培養基上 (Luria-Bertani (LB) broth, 1.5% agar, 100 µg/mL ampicillin, 1 µg/mL X-gal)，於 35°C 培養箱中培養過夜。翌日，隨機挑選 96 株白色菌落至 96 孔培養盤中，每孔含有 1 mL LB 培養液 (含 100 µg/mL ampicillin)。振盪過夜培養後，以選殖載體上設計的引子對 M13F 與 M13R 進行 DNA 插入片段的 PCR 增幅，再利用 PCR 產物純化套組回收增幅片段。PCR 反應總體積為 20 µL，其組成分有 2 µL 菌液、0.4 mM dNTP、0.25 µM 每個引子、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl 和 1 U (單位) *Taq* 與 0.5 U *Pfu* 聚合酶。反應條件第一步變性：94°C、5 min；第二步循環增幅 35 次：94°C、30 s，55°C、45 s，72°C、45 s；第三步延長：72°C、10 min。純化後的 PCR 片段以定序試劑 BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) 進行定序反應，所使用之定序引子包括 M13F、M13R、27F、519F (5'-GTGCCSGCMGCCGCGGTAA-3', Lane *et al.*, 1985)、519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3', Lane *et al.*, 1985) 及 1492R，之後以 DNA 自動定序儀 (3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) 解序，各個片段以 Vector NTI Suite 11.0 (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。將所得之各株系 16S RNA 基因序列轉貼於 NCBI 網頁 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上，以 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997) 進行比對，用以確認株系可能代表之菌種身分，並至 Ribosomal Database Project (RDP) 網頁 (<http://rdp.cme.msu.edu>) 利用線上程式 Classifier (Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.0, Wang *et al.*, 2007) 分析各株系 16S rRNA 基因可能歸屬之細菌分類。

IV. 瘤胃微生物多源基因庫建構與脂解活性株系篩選

將萃取出來的瘤胃多源基因體 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。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，再以套組純化後備用。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 1 h，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 μ g/mL, Amresco)。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。同時，亦將此等重組質體轉形至其他的宿主細胞 *E. coli* DH5 α (ECOSTMX, Yeastern) 觀察其脂解活性表現情形。

V. 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，之後以 ABI 3730 DNA 自動定序儀 (Applied Biosystems) 解序，各個片段以 Vector NTI Suite 11.0 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 可能含有的 ORFs。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。利用 SignalP 4.0 線上分析工具 (Petersen *et al.*, 2011)，分析 3 個酵素的胺基酸序列，藉以判別酵素是否含有訊息勝肽 (signal peptide)，以得知酵素屬胞內型或胞外型。

VI. 脂解酵素序列比對與演化樹狀圖分析

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 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) 進行多重序列比對與建立演化樹狀圖。演化樹狀圖之建立採用 neighbor-joining 分析模式，引導式再取樣分析 (bootstrap analysis) 採用 2,000 次重複數，以確認樹狀圖之堅實性 (robustness)。

結果與討論

I. 細菌多樣性分析

乳牛瘤胃內容物樣品經測定後得知其 pH 值為 6.8，與理論上理想 pH 值 6.8 相同 (Rode, 2000)，因此可推測，所採集樣品的瘤胃開窗乳牛飼糧配方適當，符合乳牛的生理需求。瘤胃微生物中細菌多樣性分析結果，如表 1。52 株系中分屬於 3 個菌門 *Bacteroidetes* (33/52, 63.5%)、*Firmicutes* (18/52, 34.6%) 及 *Fibrobacteres* (1/52, 1.9%)。株系在 *Bacteroidetes* 菌門下的分布，主要屬 *Bacteroidia* (31/52) 菌綱，*Bacteroidales* (31/52) 菌目，菌屬則以 *Prevotella* (11/52) 為多數；株系在 *Firmicutes* 菌門下之分布，則以 *Clostridia* (18/52) 菌綱為主，菌目分布大多數為 *Clostridiales* (18/52)。Whitford *et al.* (1998) 發現乳牛瘤胃細菌株系以 *Firmicutes* 菌門為主 (55%)，*Bacteroidetes* 菌門次之 (30%)，與本研究相較，在菌門的種類相似，但株系所佔菌門百分比則不同。廖等 (2009) 研究臺灣水牛瘤胃細菌多樣性時，發現株系於菌門之分布最多者為 *Bacteroidetes* (65.5%)，*Firmicutes* (20.2%) 次之，此外尚發現其他 5 種菌門與尚未分類的細菌。An *et al.* (2005) 研究不同牛種 (犛牛: *Bos grunniens* 與 Jinnan cattle: *Bos taurus*) 瘤胃微生物多樣性分析，其中犛牛瘤胃細菌所屬菌門為 54.1% 之 LGCGPB (low G+C Gram-positive bacteria) 與 30.9% 之 *Bacteroidetes*，Jinnan 牛瘤胃細菌所屬菌門則分別為 *Bacteroidetes* (39.6%)， γ -*Proteobacteria* (26.9%) 及 LGCGPB (22.3%)。在同種牛隻瘤胃中所測得之細菌所屬菌門佔不同百分比，可能原因為餵飼之飼糧不同或採集瘤胃內容物樣品的時間不同或飼養環境不同；在不同種牛瘤胃中細菌種類和所屬菌門不同，則可能原因為牛種不同，飼料與飼養環境不同，故造成瘤胃中的細菌菌相亦不同。

II. 具脂解活性株系篩選

在醫藥製造、化學合成、綠能生產等工業，對脂肪酶與酯酶需求漸增 (Bornscheuer, 2002; Jaeger and Eggert, 2002)，由適當來源與先進技術開發大量的新穎脂肪分解酵素，可供生物技術產業應用。本研究採用功能性多源基因體學技術，建構與篩選乳牛瘤胃多源基因庫，將轉形之大腸桿菌塗抹於含 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 3 個菌落外有透明圈 (clear halo)，此即表示株系具脂解活性，再將這 3 個株系重新在篩選培養基上劃線培養，並確認其脂解活性，這些株系分別命名為 RL1、RL2 及 RL3 (圖 1)。3 個株系中，以 RL2 的脂解活性較強，菌落周圍具有較大的透明圈，且在篩選培養基上呈現藍色狀態。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。此結果顯示，所篩選具脂解酵素活性的株系可能產生酯酶而非脂肪酶。

表 1. 乳牛瘤胃細菌分布

Table 1. Distribution of bacteria within dairy cattle rumen

Phylum	Number of clones	% of clones	Major Class (number of clones)	Major Order (number of clones)
<i>Bacteroidetes</i>	33	63.5	<i>Bacteroidia</i> (31)	<i>Bacteroidales</i> (31)
<i>Firmicutes</i>	18	34.6	<i>Clostridia</i> (18)	<i>Clostridiales</i> (18)
<i>Fibrobacteres</i>	1	1.9	<i>Fibrobacteria</i> (1)	<i>Fibrobacterales</i> (1)
Total	52	100.0		

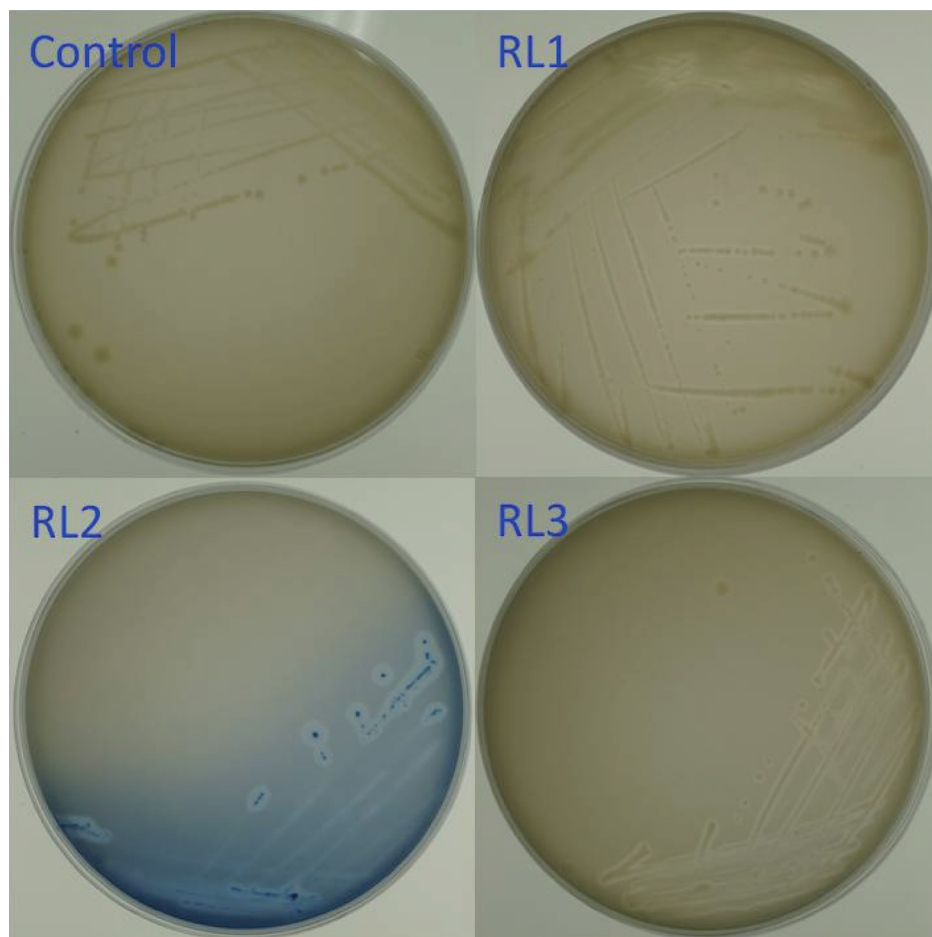


圖 1. 自乳牛瘤胃微生物多源基因庫篩選之 3 株系脂解活性表現。菌株培養於 35°C 下 2 天，但 RL3 則多置於室溫下 1 天。對照組為含選殖載體 pBluescript II KS(+) 的宿主細胞 *E. coli* DH5α (ECOS™X)。

Fig. 1. Lipolytic activity of three clones isolated from a metagenomic library of dairy cow rumen microflora. The isolates were grown at 35°C for two days except that RL3 stayed at room temperature for one more day. The control was that the host *E. coli* DH5α (ECOS™X) harbored the vector pBluescript II KS(+).

III. 脂解酵素基因分子學分析

為得知各株系 DNA 插入片段的長度大小，將 3 個株系 (RL1、RL2、RL3) 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 – 5 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 3 個株系之插入 DNA 序列以兩端引子移步法進行完整定序，並以電腦軟體程式進行分子分析 (表 2)。

序列分析結果指出這些插入 DNA 的分子大小分別為 2,317、3,709 及 4,752 bp；而其 G+C 含量則分別為 56.4、51.7、47.8%。然而，以 ORF finder 與 BLASTP alignment 程式分析結果，在 3 個株系中有 3 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 (表 2)。

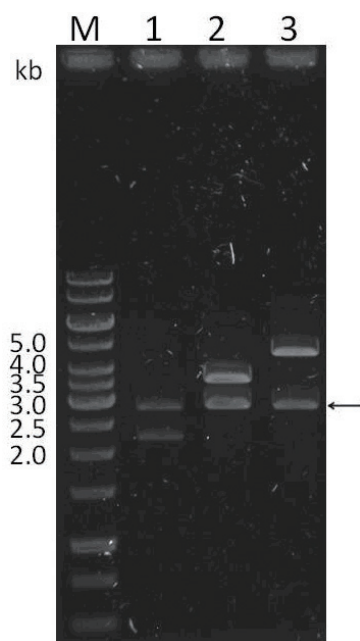


圖 2. 自乳牛瘤胃微生物多源基因庫篩選具脂解活性株系插入 DNA 片段之限制酶分析圖。

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：pRL1，Lane 2：pRL2，Lane 3：pRL3，箭頭所指的位置為選殖載體 pBluescript II KS(+) (281 kb)，M：DNA 大小標記。

Fig. 2. Restriction analysis of insert size of the 3 lipolytic clones from a metagenomic library of dairy cow rumen microflora. The recombinant plasmids of 3 lipolytic clones were selected for insert size estimation with *Hind*III digestion. Lane 1: pRL1, lane 2: pRL2 and lane 3: pRL3. The arrow indicates the plasmid vector of pBluescript II KS(+) (2.9 kb). M, size markers (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, Fermenta).

表 2. 三個株系預測脂解活性基因之分子分析

Table 2. Molecular analysis of predicted lipolytic genes identified from 3 clones

Plasmid (bp)	ORF (bp)	G+C (%)	Size (aa ^a)	Closest protein (accession no.)	Microorganism	% Id /Sim ^b	Score ^c	E value ^d
pRL1 (2,317)	LipoR1 (1,155)	58.7	384	Triacylglycerol lipase (CDA19491)	<i>Ruminococcus</i> sp. CAG:488	39/54	263	6e-81
pRL2 (3,709)	LipoR2 (960)	54.5	319	EstGK1 (ADE28719)	Uncultured bacterium	86/92	583	0.0
pRL3 (4,752)	LipoR3 (966)	45.1	321	Putative esterase/lipase (CAJ19128)	Unidentified microorganism	62/76	413	2e-142

^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 pRL1 重組質體的 DNA 插入片段長 2,317 bp，含有一個長 1,155 bp 的 ORF 能轉譯成長 384 aa (amino acid) 的蛋白質，將其命名為 LipoR1，預測分子量為 43.7 kDa (表 2)，pI (isoelectric point) 則為 6.74。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 (GXSGX) 之 GHSFG，經由 BLASTp 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 *Ruminococcus* sp. CAG: 488 DNA 序列註解而得的 triacylglycerol lipase (GenBank: CDA19491)，比對分數為 263 分，相同性為 39%，期望值則為 6e-81；次相近者為自 *Clostridium* sp. CAG: 413 DNA 序列註解之 triacylglycerol lipase (GenBank: CDC09885)，再者為自 *Ruminococcus* sp. CAG: 563 DNA 序列

註解之 triacylglycerol lipase (GenBank : CDA89032)，前 3 菌皆分離自人類消化道且都屬於 *Firmicutes* 菌門，其餘相近的蛋白質亦多註解為 lipase。

在 pRL2 重組質體的 DNA 插入片段長 3,709 bp，含有一個長 960 bp ORF 能轉譯成長 319 aa 的蛋白質，將其命名為 LipoR2，預測分子量為 35.8 kDa (表 2)，pI 則為 5.03。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 GHSQG，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 uncultured bacterium 註解出來之 EstGK1 (GenBank : ADE28719) (Bayer *et al.*, 2010)，比對分數為 583，相同性為 86%，期望值則為 0.0，次相近者為自 *Oribacterium* sp. NK2B42 轉譯出之 hypothetical protein (GenBank : WP_044931439)，再者為自 uncultured bacterium 轉譯出之 EstZ3 (GenBank : ADE28720)，其餘相近的蛋白質大部分被註解為 hypothetical protein，少部分被註解為酯酶。

在 pRL3 重組質體的 DNA 插入片段長 4,752 bp，含有一個長 966 bp 的 ORF 能轉譯成長 321 aa 的蛋白質，將其命名為 LipoR3，預測分子量為 36.3 kDa (表 2)，pI 則為 6.16。此段蛋白質胺基酸序列中含脂解酶具有之特徵五胺基酸胜肽序列 (GX SXG) 之 GDSAG，經由 BLASTP 的比對分析，與此蛋白質最相近者為自 unidentified microorganism DNA 序列推測出來的 putative esterase/lipase (GenBank : CAJ19128.1)，比對分數為 413，相同性為 62%，期望值則為 $2e-142$ ，次相近者為自 uncultured bacterium DNA 序列推測出來的 esterase/lipase (GenBank : AFQ23781)，其餘相近的蛋白質多被註解為 esterase 或 alpha/beta hydrolase。

3 個脂解酶經過 SignalP4.0 的分析，皆未含有訊息胜肽 (signal peptide)，因而可能不屬於胞外酵素。另將此 3 個預測脂解酶與 NCBI 資料庫比對結果得知，其中與 LipoR2 和 LipoR3 最接近的蛋白質是來自未培養的細菌或未鑑定的微生物，與 LipoR2 最相近者為 EstGK1，相同性高達 86%，該基因來自綿羊瘤胃多源基因體，雖然動物種類不同，但兩酵素卻如此類似 (Bayer *et al.*, 2010)。當以 *lipoR2* 基因的 DNA 序列進行 BLASTn 比對時，發現最相近的基因為 *estGK1* 基因 (GU738019)，兩者的相同性達 83%，稍低於胺基酸序列的比對結果。此外，LipoR1 和 LipoR3 與可培養且已知細菌相對應蛋白質僅呈中度 (39%、62%) 相同性。故可得知，藉由功能性多源基因體學技術，可以篩得新穎之脂解酶。

IV. 脂解酶之分類

將本研究所得之 3 個預測脂解酶與細菌脂解酶參考家族 (Arpigny and Jaeger, 1999) 進行家族 (family) 分類，3 個脂解酶中，LipoR1 可能歸類於 Family I，LipoR3 介於 Family IV & VII，而 LipoR2 則成為新的一類 (圖 3)。Privé *et al.* (2015) 對自乳牛瘤胃多源基因體篩得之 14 個脂解酶進行分類，結果如下：5 個屬 Family I、1 個屬 Family II、2 個屬 Family IV 及 6 個屬 Family VII。Rodríguez *et al.* (2015) 自乳牛瘤胃多源基因體篩得一個新穎鹼性酯酶 Est10，其特徵五胺基酸胜肽序列為 GHSQG，與其相近的蛋白質有 EstZ3 (ADE28720)、EstGK1 (ADE28719) 及 Est5S (ABI17943)，此結果與本研究中之 LipoR2 類似，而該作者進行分類分析後，將 Est10 與上述相近的 3 個脂解酶歸類成新的家族 Family XV，因此，本研究的 LipoR2 亦應屬於 Family XV。廖等 (2012) 自水牛瘤胃多源基因體篩得 4 個脂解酶，其中 EstR1 屬於 Family VII，EstR3 比較明顯屬於 Family VIII，EstR4 可能屬於 Family VI，而 EstR2 則可能屬於新的類別，此結果與本研究所得的脂解酶家族分類差異頗大。

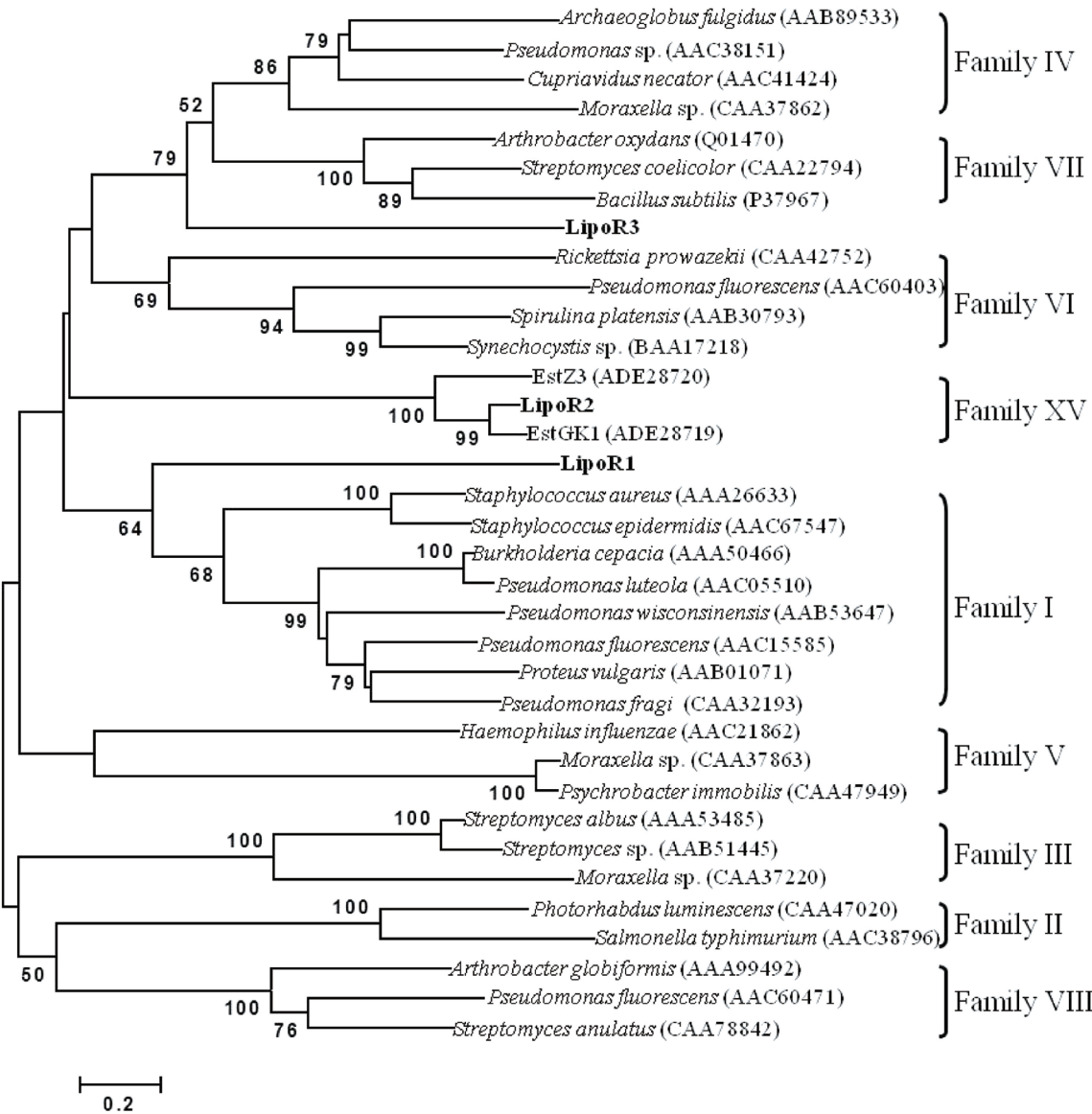


圖 3. 脂解酵素與相近蛋白質之演化樹分析。
此分析以 Clustal X and MEGA 6.0 程式完成，本研所得之脂解酵素以粗體字表示，引導式再取樣分析數值採用 2,000 次，數值超過 50% 才會顯示，刻度條長度代表每個胺基酸的變異度為 0.2。

Fig. 3. Phylogenetic analysis of lipolytic enzymes and closely related proteins.
Phylogenetic analysis was performed using the programs Clustal X and MEGA 6.0. The lipolytic enzymes found in this study are shown in bold type. Only bootstrap values higher than 50% are shown (2,000 replications). The scale bar represents 0.2 changes per amino acid.

結 論

本研究藉由多源基因體學技術，可以瞭解乳牛瘤胃細菌多樣性，亦可配合以功能導向的篩選方法，成功地從乳牛瘤胃多源基因體中分離出新穎的脂解酵素基因。未來將進一步個別選殖、表現及純化這些新穎脂解酵素，並探討這些酵素的生物化學特性，期以能應用於生物技術研究或產業。

誌 謝

承蒙畜產試驗所產業組蕭宗法研究員與蔡新興先生慷慨協助乳牛瘤胃樣品採樣工作，本研究始得以完成，謹致萬分謝忱。

參考文獻

- 廖仁寶、黃文瑛、吳明哲、李佳音、程梅萍。2009。臺灣水牛瘤胃微生物多樣性分析。畜產研究 42：171-178。
- 廖仁寶、陳若菁、吳明哲、李佳音、程梅萍。2012。從水牛瘤胃微生物多源基因庫篩選新穎脂解酵素基因。畜產研究 45：265-274。
- Alnoch, R. C., V. P. Martini, A. Glogauer, A. C. Costa, L. Piován, M. Muller-Santos, E. M. de Souza, F. de Oliveira Pedrosa, D. A. Mitchell and N. Krieger. 2015. Immobilization and characterization of a new regioselective and enantioselective lipase obtained from a metagenomic library. PLoS One. 10: e0114945.
- 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.
- An, D., X. Dong and Z. Dong. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. Anaerobe 11: 207-215.
- Arpigny, J. L. and K. H. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 343: 177-183.
- Bayer, S., A. Kunert, M. Ballschmiter and T. Greiner-Stoeffele. 2010. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 18: 181-187.
- Biver, S., D. Portetelle and M. Vandenbol. 2013. Characterization of a new oxidant-stable serine protease isolated by functional metagenomics. Springerplus 2: 410.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiol. Rev. 26: 73-81.
- Devi, S. G., A. A. Fathima, M. Sanitha, S. Iyappan, W. R. Curtis and M. Ramya. 2016. Expression and characterization of alkaline protease from the metagenomic library of tannery activated sludge. J. Biosci. Bioeng. 122: 694-700.
- 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.
- 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.
- Harfoot, C. G. and G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: The rumen microbial ecosystem. eds. Hobson, P. N. and Stewart, C. S. Blackie Academic and Professional Publishers, London, pp. 382-426.
- Iqbal, H. A., L. Low-Beinart, J. U. Obiajulu and S. F. Brady. 2016. Natural product discovery through improved functional metagenomics in streptomyces. J. Am. Chem. Soc. 138: 9341-9344.
- Jaeger, K. E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 13: 390-397.
- 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.
- Lopes, L. D., A. O. de Souza Lima, R. G. Taketani, P. Darias, L. R. da Silva, E. M. Romagnoli, H. Louvandini, A. L. Abdalla and R. Mendes. 2015. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. Antonie Van Leeuwenhoek 108: 15-30.
- Lourenço, M., E. Ramos-Morales and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. Animal 4: 1008-1023.
- 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.
- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne and H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8: 785-786.
- Privé, F., C. J. Newbold, N. N. Kaderbhai, S. G. Girdwood, O. V. Golyshina, P. N. Golyshin, N. D. Scollan and S. A. Huws. 2015. Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 5475-5485.
- Rode, L. M. 2000. Maintaining a healthy rumen - an overview. *Adv. Dairy Tech.* 12: 101-108.
- 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.
- Shingfield, K. J., M. Bonne and N. D. Scollan. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7: 132-162.
- 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., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Torsvik, V. and L. Øvreås. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Vester, J. K., M. A. Glaring and P. Stougaard. 2015. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and alkaline environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 717-727.
- Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje and J. R. Cole. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5261-5267.
- 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.

Analysis of bacterial diversity and screening of novel lipolytic genes of dairy cattle rumen microflora ⁽¹⁾

Ren-Bao Liaw ⁽²⁾ Jo-Ching Chen ⁽²⁾ Ming-Che Wu ⁽²⁾ and Chia-Yin Lee ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Nov. 16, 2016; Accepted: Jan. 12, 2017

Abstract

The purposes of this study were to analyze the bacterial diversity of dairy cattle rumen microflora and to screen for lipolytic clones of a metagenomic library constructed from the dairy cattle rumen contents using function-driven approach. The metagenomic DNA was extracted from dairy cattle rumen contents using bead-beating method. The 16S rRNA genes of bacteria from rumen contents were amplified with bacterial specific sets of primers by PCR. The amplicons were ligated into TA cloning vectors to construct 16S rRNA gene libraries for DNA sequencing and bacterial diversity analyses. The clones were identified by comparing their sequences and GenBank database with BLASTn tool. The results showed that all the clones were recognized as uncultured and identified rumen bacteria. The rumen microbiome was dominated by *Bacteroidetes* (33/52), *Firmicutes* (18/52) and *Fibrobacteres* (1/52). By functional screening the metagenomic library of dairy cattle rumen microflora, a total of 3 unique clones conferring lipolytic activities were obtained using tributyrin plate assay. The DNA analysis revealed that there were 3 putative lipolytic ORFs of 3 clones. Based on the BLASTp analysis, the 3 putative lipolytic enzymes (LipoR1, LipoR2 and LipoR3) showed 39, 86 and 62% identity to the closest matches in the protein database, respectively. According to the classification of bacterial lipolytic enzymes proposed by Arpigny & Jaeger, LipoR1 might belong to Family I, LipoR3 was classified into the position between Family IV & VII and LipoR2 represented a new member of a new family (Family XV).

Keywords: Lipolytic genes, Metagenomic library, Rumen microflora, Dairy cattle.

(1) Contribution No. 2540 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

(4) Corresponding author, E-mail: clee@ntu.edu.tw.