

# 从植物根际定向批量筛选广谱有机溶剂 耐受性脂肪酶产生菌

舒正玉<sup>1,2,3\*\*</sup> 林瑞凤<sup>1,2,3\*\*</sup> 江 欢<sup>1,2,3\*\*</sup> 张岩峰<sup>1,2,3</sup> 黄建忠<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福建 福州 350108)

(2. 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)

(3. 福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

**摘 要:** 洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶是一类具有重要工业应用价值的优良脂肪酶之一。根据已公布的洋葱伯克霍尔德菌基因组信息,在传统的洋葱伯克霍尔德菌选择性培养基中添加适量的氨苄青霉素和卡那霉素,从植物根际的土壤中筛选洋葱伯克霍尔德菌。对获得的单菌落再用含罗丹明 B 指示剂的产脂肪酶定性检测平板检测,从 4 个根际土壤中筛选到 35 株产脂肪酶的洋葱伯克霍尔德菌,阳性率达到 65%。其中 15 株对体积浓度为 10% 的苯、己烷和正庚烷同时具有耐受性。用 *recA* 基因分子鉴定上述 15 株菌种,全部属于洋葱伯克霍尔德菌菌群。

**关键词:** 定向筛选, 脂肪酶, 洋葱伯克霍尔德菌, 有机溶剂耐受性, 根际

## A Rapid and Efficient Method for Directed Screening of Lipase-producing *Burkholderia cepacia* Complex with Organic Solvent Tolerance from Plant Rhizosphere

SHU Zheng-Yu<sup>1,2,3\*\*</sup> LIN Rui-Feng<sup>1,2,3\*\*</sup> JIANG Huan<sup>1,2,3\*\*</sup> ZHANG Yan-Feng<sup>1,2,3</sup>  
HUANG Jian-Zhong<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(3. Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fuzhou, Fujian 350108, China)

**Abstract:** Lipase from *Burkholderia cepacia* complex is one of the most versatile biocatalyst and is used widely in many biotechnological application fields including detergent additives, the resolution of racemic compounds, etc. Based on the known whole genomic information of *B. cepacia*, both ampicillin and kanamycin were added to the TB-T media, the traditional selective media, to screen *B. cepacia* complex strains from rhizosphere soil samples. The single colonies on the plates with the modified TB-T media were then qualitatively determined the ability to produced the extracellular lipase in the rhodamine B-olive oil agar plates. Thirty-five strains of lipolytic pseudo-*B. cepacia* complex were isolated and the positive rate of

基金项目: 国家 863 计划资助项目(No. 2007AA100703); 国家自然科学基金资助项目(No. 30870545); 福建省科技平台资助(No. 2005Q007)

\*\*第一作者、第二作者和第三作者在本文中有同等贡献

\* 通讯作者: Tel: 86-591-22868212; E: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2008-11-02; 接受日期: 2009-01-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

lipolytic bacteria was 65%. Among them, 15 pseudo-*B. cepacia* complex strains with the tolerance to benzene, *n*-hexane and *n*-heptane at the concentration of 10% (V/V) were selected and identified by the *recA* gene sequence. All of the 15 lipolytic bacteria belonged to the *B. cepacia* complex.

**Keywords:** Directed screening, Lipase, *Burkholderia cepacia* complex, Organic solvent tolerance, Rhizosphere

脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)又名三酰甘油酯水解酶,是一类具有油-水界面激活独特特征的水解酶类,在油水界面能高效地催化三酰甘油酯的水解(或合成)。广泛应用于精细化工、有机合成、油脂深加工、新型生物材料、生物传感器、去污剂添加剂等领域<sup>[1]</sup>。

利用有机溶剂耐受性细菌作为全细胞催化剂,在非水相系统中催化生物转化,具有重要的工业应用价值<sup>[2]</sup>。从土壤、海底沉积物及深海等环境中已分离出一批具有有机溶剂耐受性的细菌,从已有的报道来看,这些细菌主要集中在*Pseudomonas* sp.、*Bacillus* sp. 和 *Rhodococcus* sp. 等 3 大类<sup>[3]</sup>。许多有机溶剂耐受性细菌还能分泌产生具有有机溶剂耐受性的脂肪酶<sup>[4,5]</sup>。通过细胞表面展示技术,将具有有机溶剂耐受性的脂肪酶固定于有机溶剂耐受性细菌表面,开发出极具应用价值的新型全细胞催化剂,将具有良好的工业应用前景。

洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia* complex)脂肪酶在有机溶剂中具有优良的稳定性,极强的对映体拆分能力,是在有机合成领域应用得最为广泛的脂肪酶酶种之一<sup>[6-8]</sup>。利用传统的选择性培养基筛选脂肪酶产生菌时,由于对土样(或水样)进行梯度稀释,导致土样(或水样)中的非优势菌群不能检出而漏筛。宏基因组技术虽然可以部分解决这个问题,但花费昂贵而且费时。本文以产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌为例,介绍利用基因组信息技术,建立起快速从植物根际高通量定向批量筛选到具有广谱有机溶剂耐受性的产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌的新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样采集及处理

从福建省闽侯县上街镇周围农田中采集处于花期的芝麻、玉米、豆角及空心菜的根际土壤。用质量浓度为 0.9%的氯化钠溶液 10 倍稀释,250 r/min 室温振荡 30 min,静置 10 min,取上清涂布洋葱伯克

霍尔德菌选择性培养基筛选平板。

### 1.2 洋葱伯克霍尔德菌菌株的分离筛选

取上述处理的土壤悬浊液 200  $\mu$ L 直接涂布修改的洋葱伯克霍尔德菌选择性筛选培养基(TB-T)平板<sup>[9]</sup>。洋葱伯克霍尔德菌选择性筛选培养基组成成分为(g/L): 琼脂 20, 葡萄糖 2, L-天冬氨酸 1, NaHCO<sub>3</sub> 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, 台盼蓝 0.05, 四环素 0.02, 氨苄青霉素 0.06, 卡那霉素 0.05, 制霉菌素 0.05, pH 5.5。28℃培养 3 d~4 d。根据土样的来源对每个平板上的菌落进行编号。来自芝麻根际土壤的菌落编号为SIBX; 来自玉米根际土壤的菌落编号为ZMBX; 来自豆角根际土壤的菌落编号为VSBX; 来自空心菜根际土壤的菌落编号为IABX。X为平板上的菌落数。

### 1.3 洋葱伯克霍尔德菌菌株产脂肪酶定性鉴定

将上述平板上的单菌落用牙签点接到脂肪酶定性鉴定平板上。脂肪酶定性鉴定平板培养基组成成分为(g/L): 琼脂 20, 蔗糖 2, 酵母膏 1, 蛋白胨 2, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 12 mL 橄榄油乳化液, 3 mL 质量浓度为 0.1%的罗丹明B溶液。30℃培养 4 d, 挑取有明显变色圈的菌落在LB培养基上划线, 挑取单菌落, 进行下列实验。

### 1.4 洋葱伯克霍尔德菌菌株产脂肪酶能力的复筛

挑取上述有明显变色圈的单菌落在LB液体培养基中37℃过夜培养。过夜培养物按体积浓度为2%的接种量接种发酵培养基。发酵培养基的组成成分为(g/L): 糊精 3, 牛肉膏 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.75, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.4, 豆油 12.5 mL, pH 8.11。30℃、250 r/min 培养 24 h。收集发酵液, 12000 r/min 离心, 收集上清液测定酶活力。

### 1.5 产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌菌株的有机溶剂耐受性检验

将定性检测有明显变色圈的单菌落接种 LB 液体培养基, 37℃ 过夜培养。过夜培养物按体积浓度为 1%的接种量重新转接 LB 液体培养基, 并同时添加占总体积 10%的各种有机溶剂到 LB 液体培养基

中, 37°C 培养 1 d~2 d, 每组有机溶剂耐受性实验均设立对照(不接入种子菌体)。与对照组相比, 培养基明显变浑浊作为生长的定性指标。

### 1.6 具有广谱有机溶剂耐受性的产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌菌株的分子鉴定

洋葱伯克霍尔德菌基因组 DNA 的提取方法参照文献[10]。recA 基因的 PCR 扩增参照文献[11]。正向和反向引物分别为 5'-GAA(G)AAGCAGTTCCGCAA-3'和 5'-GAGTCGATGACGATCAT-3'。PCR 扩增程序为 95°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 25 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 阳性克隆交上海生物工程公司进行序列测定。

### 1.7 脂肪酶活力测定

脂肪酶活力测定采用碱性滴定法<sup>[12]</sup>。45°C, pH 8.0 的条件下, 每毫升发酵液每分钟催化橄榄油水解产生 1  $\mu$ mol 游离脂肪酸, 定义为 1 个脂肪酶活力单位(U)。

## 2 结果与分析

### 2.1 改良筛选技术的筛选效果

随着对微生物脂肪酶的深入研究, 大部分微生物脂肪酶的催化性质已有基本了解。根据实验目的和需要, 有必要从环境中定向筛选特定脂肪酶产生菌。传统的脂肪酶产生菌选择性培养基选择性差(仅用罗丹明 B 作为产生脂肪酶的定性指示剂), 而且要对土样和水样进行梯度稀释, 导致样品中的非优势菌群不能检出。本实验中, 结合洋葱伯克霍尔德菌选择性筛选培养基和脂肪酶产生菌选择性筛选培养基, 有效地提高了定向筛选效率。

NCBI 基因组数据库中, 已登录有超过 21 个洋葱伯克霍尔德菌菌株的全基因组序列。在所有已公布的基因组序列中, 在第 2 条染色体上, 均有编码脂肪酶的基因序列, 因此, 理论分析, 所有洋葱伯克霍尔德菌菌株均有分泌脂肪酶的潜力。同时, 在所有菌株的基因组序列中, 均有编码内酰胺酶(氨苄青霉素抗性)和氨基糖苷磷酸转移酶(卡那霉素抗性)的基因序列。因此, 用 TB-T 选择性培养基筛选洋葱伯克霍尔德菌时, 在原有成分的基础上, 再添加 60  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素和 50  $\mu$ g/mL 的卡那霉素。

TB-T 选择性培养基上长出的单菌落, 用含罗丹明 B 的脂肪酶的定性检测平板检测结果表明: 大部

分菌株都能分泌产生脂肪酶(图 1)。用不含氨苄青霉素和卡那霉素的 TB-T 选择性培养基初筛洋葱伯克霍尔德菌, 其单菌落在脂肪酶定性检测平板上的阳性率为 36%; 而用含氨苄青霉素和卡那霉素的 TB-T 选择性培养基初筛洋葱伯克霍尔德菌, 阳性率达 65%。这一比率明显高于其他筛选方法<sup>[13]</sup>。实验结果也发现, 不同植物根系的阳性检出率有很大的差异。本实验中, 以芝麻根系的阳性率最高。



图 1 拟-洋葱伯克霍尔德菌在脂肪酶定性检测平板上的检测结果

Fig. 1 Production of lipases by pseudo-Burkholderia cepacia complex strains on the selective media for lipolytic activity

注: 图中\*标示的菌落为阴性菌落。

Note: Only a colony marked with \* hadn't the ability to hydrolyze olive oil.

### 2.2 不同菌株产脂肪酶能力的比较

通过罗丹明 B 定性检测平板检出的阳性菌落发酵产脂肪酶实验结果如表 1。从根系土壤中筛选到的 35 株拟-洋葱伯克霍尔德菌, 除 SIB034 和 IAB003 菌株的发酵液未能测定到脂肪酶外, 其他菌株均能分泌产生脂肪酶。与对照菌株 ZYB002(本实验室从油污土壤中筛选得到)相比, 植物根系菌株产脂肪酶的能力明显优于对照菌株, 最高达 5 倍(SIB005 菌株)。SIB034 和 IAB003 菌株发酵液未能检测到脂肪酶, 可能是在该培养条件下, 脂肪酶的产量过低, 而碱性滴定法检测的灵敏度没有罗丹明 B 定性检测法检测的灵敏度高的缘故。

### 2.3 不同菌株有机溶剂耐受性差异检验

在已公布的洋葱伯克霍尔德菌全基因组信息中, 均有编码 AcrAB-TolC 外排泵(Efflux pump)等多种与有机溶剂耐受性相关蛋白质的基因序列<sup>[14]</sup>, 因此, 理论上洋葱伯克霍尔德菌对各种有机溶剂均有一定

表 1 不同拟-洋葱伯克霍尔德菌菌株产脂肪酶能力的比较

Table 1 The lipase activity of the fermentation broth from *Burkholderia* sp. ZYB002 and pseudo-*B. cepacia* complex strains

菌株 Strains	脂肪酶活性 Lipase activity (U/mL)	菌株 Strains	脂肪酶活性 Lipase activity (U/mL)	菌株 Strains	脂肪酶活性 Lipase activity (U/mL)
ZYB002	7.0	SIB012	10.1	ZMB003	15.4
SIB001	7.4	SIB013	10.3	ZMB004	12.1
SIB002	15.7	SIB014	11.8	ZMB005	11.1
SIB003	10.4	SIB034	0	ZMB007	4.2
SIB004	15.7	VSB001	11.0	ZMB007-2	10.4
SIB005	35.1	VSB003	13.8	ZMB008	6.4
SIB006	15.8	VSB006	3.1	ZMB009	12.9
SIB007	12.6	VSB012	13.5	ZMB010	9.5
SIB008	6.8	VSB013	13.8	ZMB011	3.8
SIB009	16.5	VSB017	7.0	IAB001	4.4
SIB010	7.7	ZMB001	10.4	IAB003	0
SIB011	11.7	ZMB002	6.2	IAB004	1.8

表 2 拟洋葱伯克霍尔德菌菌株有机溶剂耐受能力的比较

Table 2 The tolerance of different pseudo-*B. cepacia* complex strains to various organic solvents

菌株 Strains	甲醇 Methanol (-0.82)	正戊醇 Pentanol (1.3)	苯 Benzene (2.0)	辛醇 Octanol (2.9)	己烷 Hexane (3.5)	正庚烷 n-Heptane (4.0)
ZYB002	-	-	+	-	+	+
SIB001	-	-	+	-	+	+
SIB002	-	-	+	-	-	+
SIB003	-	-	-	-	+	+
SIB004	-	-	+	-	-	+
SIB005	-	-	+	-	+	+
SIB006	-	-	+	-	+	+
SIB007	-	-	-	-	+	+
SIB008	-	-	-	-	+	+
SIB009	-	-	-	-	-	+
SIB010	-	-	-	-	+	+
SIB011	-	-	+	-	+	+
SIB012	-	-	+	-	+	+
SIB013	-	-	+	-	+	+
SIB014	-	-	+	-	+	+
SIB034	-	-	+	-	-	+
VSB001	-	-	-	-	+	+
VSB003	-	-	+	-	-	+
VSB006	-	-	+	-	+	+
VSB012	-	-	+	-	+	+
VSB013	-	-	-	-	+	+
VSB017	-	-	+	-	+	+
ZMB001	-	-	-	-	+	+
ZMB002	-	-	-	-	+	+
ZMB003	-	-	-	-	+	+
ZMB004	-	-	+	-	+	+
ZMB005	-	-	+	-	+	+
ZMB007	-	-	-	-	+	+
ZMB007-2	-	-	-	-	+	+
ZMB008	-	-	+	-	+	+
ZMB009	-	-	+	-	+	+
ZMB010	-	-	+	-	+	+
ZMB011	-	-	-	-	+	+
IAB001	-	-	-	-	+	-
IAB003	-	-	-	-	+	+
IAB004	-	-	+	-	-	-

注: 括号内的数字为该有机溶剂对应的 log $P$  值。Note: The number in the bracket denotes the log $P$  value of the organic solvent.

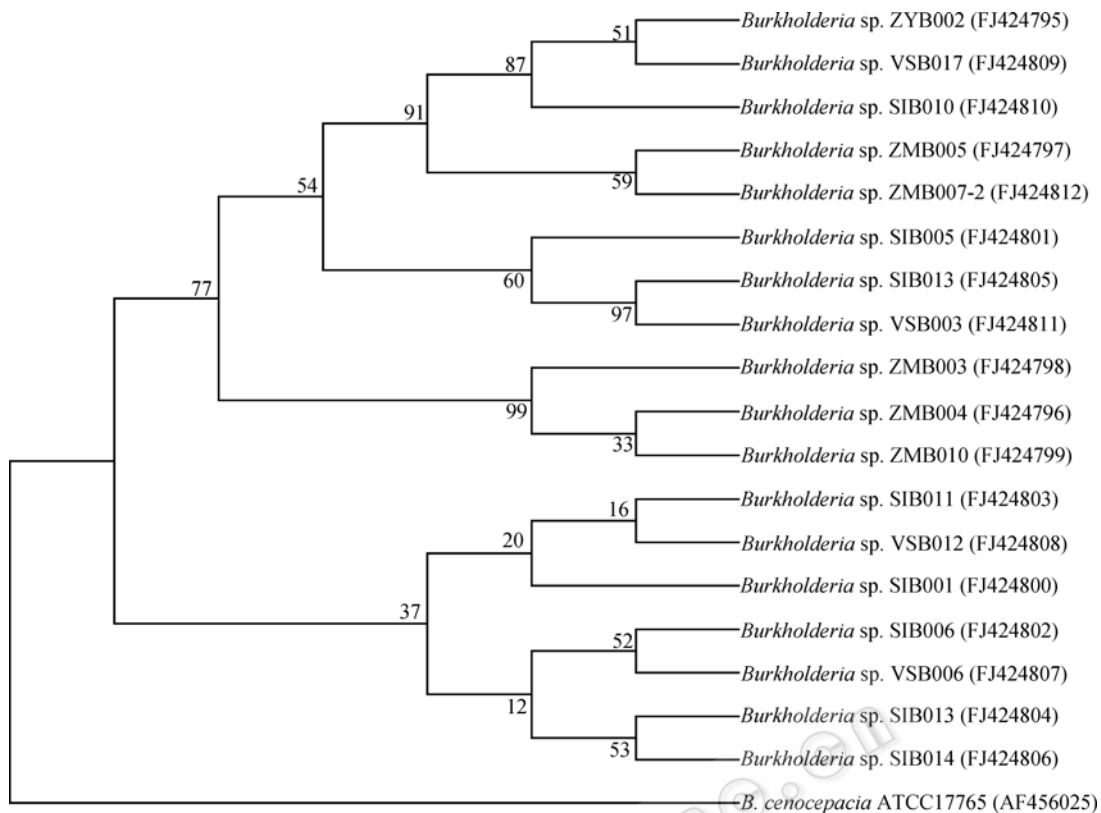


图2 拟-洋葱伯克霍尔德菌菌株 *recA* 基因序列聚类分析结果

**Fig. 2 Phylogenetic analysis of the pseudo-*Burkholderia cepacia* complex with lipolytic activity using *Burkholderia recA* sequences**

注: 括号内数字为 GenBank 登录号; 分支点数字为 bootstrap 的支持率。

Note: The number in the bracket denotes the GenBank accession number and the number at every node denotes the value of bootstrap support.

程度的耐受性。不同拟-洋葱伯克霍尔德菌菌株对各种有机溶剂的耐受性检测结果如表 2。不同菌株对各种有机溶剂的耐受性存在显著的差异。对醇类有机物, 所有的菌株都没有耐受性; 而大部分菌株对苯、己烷和正庚烷都表现出一定的耐受性。实验还发现, 有机溶剂的极性值(log*P*)大小与对细胞的毒性大小并没有直接的对应关系。

#### 2.4 具有广谱有机溶剂耐受性的产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌菌株的分子鉴定

对苯、己烷及正庚烷同时具有耐受性的 16 株拟-洋葱伯克霍尔德菌用 *recA* 基因进行鉴定, 并随机挑选另外 3 个菌株(SIB010, VSB003 和 ZMB007-2)作为对照。上述 18 个菌株的 *recA* 基因序列(ZMB009 的 *recA* 基因序列未能获得), 对照标准菌株 *B. cenocepacia* ATCC17765 的 *recA* 基因序列聚类分析结果如图 2。从图 2 可以看出, 被鉴定的所有菌株均属于 *Burkholderia* sp. 菌株。

### 3 讨论

本文以洋葱伯克霍尔德菌为例, 介绍了利用全

基因组信息, 修改传统的选择性培养基, 从环境中高通量定向批量筛选广谱有机溶剂耐受性的产脂肪酶洋葱伯克霍尔德菌。随着越来越多的微生物基因组全序列的注释, 这种技术可以应用到所有特定目标菌群(全基因组信息已注释的菌群)的高通量筛选, 有效减少筛菌的工作量。

不同微生物耐受有机溶剂的机制<sup>[3,15]</sup>、不同有机溶剂对有机溶剂耐受性相关基因的诱导作用均存在很大的差异<sup>[16]</sup>。实验中观察到的不同洋葱伯克霍尔德菌菌株对各种有机溶剂的耐受性差异及不同洋葱伯克霍尔德菌菌株对各种有机溶剂的耐受性与有机溶剂的极性值(log*P*)无明显的对应关系, 可能与上述因素有关。

### 参 考 文 献

- [1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**(2): 235–251.
- [2] Sardesai YN, Bhosle S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnology Progress*, 2004,

- 20(3): 655–660.
- [3] Isken S, de Bont JA. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 1998, **2**(3): 229–238.
- [4] Hun CJ, Rahman RNZA, Salleh AB, *et al.* A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **15**(2): 147–151.
- [5] Fang YW, Lu ZX, Lv FX, *et al.* A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Current Microbiology*, 2006, **53**(6): 510–515.
- [6] Pencreac'h G, Baratti JC. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* in organic media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, **52**(2): 276–280.
- [7] Tomić S, Ramek M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, **38**(3–6): 139–147.
- [8] Yu LJ, Xu Y, Wang XQ, *et al.* Highly enantioselective hydrolysis of DL-menthyl acetate to L-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, **47**(3–4): 149–154.
- [9] Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR, *et al.* A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, **53**(9): 2265–2268.
- [10] Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, *et al.* Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, **34**(5): 1129–1135.
- [11] Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, *et al.* Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(7): 3917–3927.
- [12] Saxena RK, Davidson WS, Sheoran A, *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 2003, **39**(2): 239–247.
- [13] Ko WH, Wang IT, Ann PJ. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, **37**(3): 597–599.
- [14] Tsukagoshi N, Aono R. Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump. *Journal of Bacteriology*, 2000, **182**(17): 4803–4810.
- [15] 王庆利, 何丹, 郑晓冬, 等. 有机溶剂对细胞的毒害及细胞的耐受性机制. *微生物学通报*, 2002, **29**(4): 81–85.
- [16] Kieboom J, Dennis JJ, Zylstra GJ, *et al.* Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(24): 6769–6772.

## 稿件书写规范

### 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名：菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写，其余小写，属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体，首字母大写。

限制性内切酶：前3个字母用斜体，后面的字母和编码正体平排，例如：*Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I等。

氨基酸和碱基的缩写：氨基酸缩写用3个字母表示时，仅第一个字母大写，其余小写，正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体，蛋白质符号首字母大写，用正体。