

宏基因组学在纤维素酶研究中的应用进展

戴利铭¹ 熊彩云¹ 黄遵锡^{1,2,3,4} 李俊俊^{1,2,3,4} 唐湘华^{1,2,3,4} 杨云娟^{1,2,3,4} 许波^{1,2,3,4*}

(1. 云南师范大学 生命科学学院 云南 昆明 650500)

(2. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南 昆明 650500)

(3. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室 云南 昆明 650500)

(4. 云南师范大学 酶工程重点实验室 云南 昆明 650500)

摘要: 纤维素酶能降解纤维素, 被广泛应用于生物修复、食品加工、化工合成等领域, 开发高活力、广底物、耐高温高碱等极端条件的新型纤维素酶具有重要意义。宏基因组学以特定环境样品中微生物的基因组总和为研究对象, 避开传统的微生物分离培养过程, 为基因资源的开发、利用提供了新技术。文中结合本课题组的研究工作, 综述了利用宏基因组学获取纤维素酶的策略, 同时着重介绍利用宏基因组学从动物胃肠道、土壤等环境中获取纤维素酶的研究。

关键词: 宏基因组学, 纤维素酶, 高通量筛选, 未培养微生物

Metagenomics in studying cellulase

DAI Li-Ming¹ XIONG Cai-Yun¹ HUANG Zun-Xi^{1,2,3,4} LI Jun-Jun^{1,2,3,4}
TANG Xiang-Hua^{1,2,3,4} YANG Yun-Juan^{1,2,3,4} XU Bo^{1,2,3,4*}

(1. School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

(2. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Kunming, Yunnan 650500, China)

(3. Key Laboratory of Yunnan for Biomass Energy and Biotechnology of Environment, Kunming, Yunnan 650500, China)

(4. Key Laboratory of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China)

Abstract: Cellulases can degrade cellulose and widely applied in bioremediation, food processing, chemical synthesis and other fields. Therefore, it is really significant to develop new types of cellulases that have high activity, broad substrate spectrum, high temperature and alkali resistance, and other anti-extreme-conditions capacity. The metagenomic technology focuses on the sum of microbial genomes in environmental samples, avoiding traditional process of microbial isolation and culture, and provides a new technology for the development and utilization of genetic resources. Combined with our own findings, this paper summarizes the strategies of gaining cellulases by use of metagenomic technology, and highlights advances in studying cellulases from animal gastrointestinal tract, soil and other environment with metagenomics.

Keywords: Metagenomics, Cellulases, High-throughput screening, Uncultured microorganisms

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160229, 31360268)

*通讯作者: Tel: 86-871-65920952; ✉: xubo128028@163.com

收稿日期: 2014-08-29; 接受日期: 2014-10-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-14

纤维素是地球上最丰富的可再生资源之一,由植物光合作用产生,在解决能源和环境危机中起到重要的作用,但纤维素需被降解为葡萄糖后才能更好的利用^[1]。纤维素的降解由内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶协同作用完成,而微生物是纤维素酶的主要来源,因此分离微生物是获取纤维素酶的首要步骤,一直以来研究者多利用纯培养技术预先从环境样品中分离出能够利用纤维素的微生物,再从其体内提取相关的酶。由于纯培养技术的限制,自然界中大部分微生物未能获得纯培养^[2],因此从可培养微生物中筛选出的纤维素酶种类单一、重复率高、新颖性不足,严重阻碍人们对其认识及利用。近年发展起来的宏基因组学避开传统的微生物分离培养过程,直接研究特定环境中的基因组 DNA,借助新一代测序技术和生物信息学平台,挖掘利用大量过去无法获得的新基因资源,如编码苯酚羟化酶、蛋白酶、木聚糖酶等活性物质的基因^[3-5]。宏基因组学的出现对了解复杂环境中的微生物群落组成及其代谢功能具有重要意义,也为人类研究和开发微生物基因资源开辟了新途径。

1 纤维素酶的组成和来源

纤维素是吡喃-D-葡萄糖以 β -1,4糖苷键连接而成的直链状大分子,重复单位是纤维二糖,分子式为 $(C_6H_{10}O_5)_n$,不溶于水和一般有机溶剂^[6]。纤维素酶分解纤维素产生寡糖和纤维二糖最终水解为葡萄糖,可分为三类^[7-8]:内切-1,4- β -D-葡聚糖酶(Endo- β -1,4-glucanases, EC3.2.1.4, 简称 EG)、外切-1,4- β -D-葡聚糖酶(Exo- β -1,4-glucanases, EC3.2.1.91, 简称 CBH I; EC3.2.1.176, 简称 CBH II)和 β -葡萄糖苷酶(β -1,4-Glucosidases, EC3.2.1.21, 简称 BG)。内切酶主要作用纤维素的非结晶区,随机水解纤维素链中的糖苷键,把纤维素长链切成短链,暴露出新末端;外切酶I(CBH I)、外切酶II(CBH II)分别从纤维素分子还原端、非还原端降解结晶纤维素,每次切下一个纤维二糖分子; β -葡萄糖苷酶切割纤维二糖和纤维寡糖的非还原端生成葡萄糖

分子。目前很多真菌、细菌、放线菌被证实能产纤维素酶^[9],真菌中产纤维素酶的微生物种类很多,已发现多达 68 个属,其中主要有绿色木霉、里氏木霉、黑曲霉、球毛壳、斜卧青霉、米曲霉等;细菌主要有假单胞菌属、杆菌属、梭菌属等;放线菌主要有高温放线菌、诺卡氏菌、节杆菌、小单孢菌、链霉菌属等。

2 利用宏基因组学获取纤维素酶及其基因的策略

传统纤维素酶研究主要是从木质纤维素活跃降解的环境中分离能产生纤维素酶的微生物,然后再进行基因的克隆、表达和鉴定。宏基因组学避开了传统微生物分离培养过程,为纤维素酶的开发提供崭新的方法。目前利用宏基因组学获取纤维素酶及其基因的方法主要有 3 种:(1) 将宏基因组 DNA 构建宏基因组文库,从文库中筛选纤维素酶;(2) 同源克隆,即依赖氨基酸或者核酸序列的保守性,设计纤维素酶简并引物获得基因片段,然后通过 TAIL-PCR、反转 PCR 等方式获得全长基因;(3) 直接将基因组进行测序。

2.1 宏基因文库筛选法

构建宏基因文库是从环境样品中直接提取微生物基因组 DNA,经纯化及片段化后连接合适的载体,如 λ 噬菌体、Fosmid 和 BAC (Bacterial artificial chromosome)等,并转化到大肠杆菌等宿主中进而对文库进行筛选。由于环境样品中的微生物种类繁多、取样环境复杂,宏基因组文库容量较大,所以活性克隆子的筛选是获取新活性物质的关键,需要通过高通量和高灵敏度的方法来筛选和鉴定文库,目前纤维素酶常用的筛选方法有活性筛选(Activity screening)和序列筛选(Sequence screening)。

2.1.1 活性筛选:活性筛选以活性测定为基础,将文库中的克隆涂布于目的基因发挥活性的底物筛选平板,能够表达外源活性蛋白的克隆周围会出现比较明显的变化,如透明圈、颜色变化等,或者利用生物化学手段分析其表达产物的物理特性(如荧

光)进行目标克隆的筛选,得到含有目的基因的克隆,再通过亚克隆等方法获得目的基因。外切纤维素酶活性克隆的筛选多采用 Heptinstall 的方法^[10]。4-Methylumbelliferyl- β -D-cellobioside (4-MUC)是一种荧光物质近年来被广泛用来筛选外切纤维素酶, Geng 等^[11]采用该物质从库容为 1×10^5 的 Fosmid 文库中获得 121 个荧光活性菌株。

β -葡萄糖苷酶可与许多底物作用并显色,很多研究者利用这一特性筛选出大量的阳性克隆。(1) Wierzbicka-Wos 等^[12]利用 X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indogluco-pyranoside)为底物,从平板上获得一个具有蓝色水解圈的 β -葡萄糖苷酶克隆;(2) Bao 等^[13]用 pNPG (p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside)为底物,显现黄色水解圈的鉴定为阳性克隆;(3) β -葡萄糖苷酶筛选最常用的底物是七叶苷^[14],七叶苷被 β -葡萄糖苷酶分解生成七叶素,七叶素和柠檬酸铁铵中铁离子发生反应形成黑色化合物。

内切葡聚糖酶活性克隆筛选多采用羧甲基纤维素钠-刚果红染色法^[15],产生水解圈的即为目的克隆,也可直接在筛选平板中添加刚果红,测序分析具有水解圈的克隆排除淀粉酶、色素水解酶等假阳性,此外还有报道采用 AZCL-HE cellulose 作为检测底物,产生蓝色水解圈的克隆具有内切酶活性^[16]。

由于功能基因或基因产物在外源宿主中不能表达或表达后没有活性,导致活性筛选效率较低,为增加活性筛选的灵敏度,可用氯仿熏蒸对克隆进行破壁处理,使大肠杆菌中的蛋白质释放,提高筛选效率; Nimchua 等^[16]使用 ENZhance 细胞透化剂来促进胞内酶释放,避免细胞的破碎过程从而对文库进行快速筛选。

2.1.2 序列筛选: 序列筛选根据已知相关功能基因的保守区序列设计探针或 PCR 引物通过杂交或 PCR 扩增筛选出阳性克隆,或者鉴于第二代 DNA 测序技术直接对所构建宏基因组文库中的克隆子进行测序,获得目的基因信息。序列筛选法不需要基因表达即可从文库中筛选到目的基因,操作简

单,便于筛选大量文库。Berlemont 等^[17]同时运用功能筛选和序列筛选从南极土壤构建的 BAC 文库中获得 11 个纤维素酶基因,为低温环境中纤维素酶的基因多样性和酶的分布增加了一个新的视点。Ohtoko 等^[18]利用白蚁后肠共生微生物为样品构建 cDNA 文库,经 PCR 扩增获得丰富的 GH45 家族纤维素酶基因。

2.2 同源克隆法

同源克隆法通过目标基因的保守区设计特异的简并引物,利用该简并引物直接从环境宏基因组中获得目标基因的部分信息,以获得的基因片段信息构建文库分析多样性,为发掘具有应用潜力的纤维素酶提供基础认识,此后从片段文库中选择具有代表性的基因通过 TAIL-PCR、反转 PCR 等方式获得全长基因,序列经 BLAST 比对后初步确定序列的新颖性,从而提高获得新颖活性蛋白的可能性^[19]。该方法建立在数据库序列的基础上,随着蛋白数据库的几何式扩增,此方法越来越受到人们的关注。Edwards 等^[20]根据真菌来源的 GH7 家族纤维素外切酶(CBH I)的保守区设计简并引物,以土壤总 DNA 为模板扩增 GH7 家族纤维素酶基因并进行分析; Xiong 等^[21]设计了 3 对 GH9 家族纤维素酶引物,采用土壤的 DNA 为模板,经多重 PCR 获得 127 个同源基因;李劲亭等^[22]从荷斯坦奶牛瘤胃中获得大量核苷酸序列相似性在 58.65%–100%之间的 GH48 家族的纤维素酶基因。

2.3 宏基因组直接测序

基因组测序能够较为全面的揭示基因组遗传信息,以 454、Solexa 和 Solid 技术为标志的新一代测序技术降低测序成本,提高测序速度。近年来大量文献报道利用测序技术分析动物胃肠道微生物的宏基因组,如山羊^[23]、驯鹿^[24]、骆驼^[25]、猪^[26]、牛^[27]等。为高效分析宏基因组测序产生的海量数据,生物信息学平台成为宏基因组学研究的重要手段,数据组装、基因预测、功能注释等相关的计算系统和软件平台不断开发,被大量用于环境样品微

生物宏基因组的物种分类和功能组成研究^[28]。

3 宏基因组学在不同环境样品中获取纤维素酶的研究

3.1 宏基因组学用于动物胃肠道微生物中纤维素酶的研究

随着分子生物学技术的迅速发展,宏基因组学技术成为肠道微生物多样性研究和群落结构分析的重要手段,动物胃肠道微生物在长期摄食与环境相互作用的过程中进化成独特肠道菌群,不同的动物体由于饮食、环境、遗传、疾病等影响使其进化过程中形成与自身协调发展的肠道微生物,并具有

编码相应酶类的基因以适应生活状态。国内外研究者通过构建动物胃肠道微生物宏基因组文库筛选到大量糖苷水解酶,且大多来自反刍动物瘤胃和一些植食性动物的胃肠道。

3.1.1 宏基因组学用于瘤胃微生物中纤维素酶的研究:反刍动物的瘤胃是消化植物纤维素的器官,其中栖息着复杂多样的微生物如真菌、细菌、原生动物和古细菌等,能分泌各种纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等水解酶类。目前国内外很多学者通过构建瘤胃微生物宏基因组文库成功筛选到大量纤维素酶基因(表 1)。Gong 等^[29]提取牛瘤胃内容物构建大片段文库,采用功能筛选法获得 25 个纤维素

表 1 利用宏基因组学从瘤胃中获得的纤维素酶
Table 1 Identifying cellulase from the metagenome of animal rumen

样品 Sample	筛选对象 Screening target	文库类型 Library type	筛选方法 Screening method		筛选效率 Screening efficiency	参考文献 Reference
Yak rumen	β-Glucosidase	Cosmid library	Activity screening	pNPG	2/4 000	[13]
Cow rumen	Endoglucanase	BAC library		CMC	25/6 000	[29]
Goat rumen	Endoglucanase/ β-Glucosidase	BAC library		CMC/EH-FAC	2/5 000	[31]
Cow rumen	Cellulase/Xylanase	BAC library		CMC	26/15 360	[32]
Bovine rumen	Endoglucanase	Cosmid library		CMC/MUC	1/8 000	[33]
Cow rumen	Endoglucanase	λ Phage library		OBR-HEC	7/14 000	[34]
Cow rumen	Multifunctional glycosyl hydrolase	λ Phage library		AZO-xylan	1/50 000	[35]
Bovine rumen	β-Glucosidase	Cosmid library		EH-FAC	118/126 000	[36]
Buffalo rumen	Endoglucanase/ β-Glucosidase	Cosmid library		CMC/EH-FAC	61/15 000	[37]
Buffalo rumen	Endoglucanase/ β-Glucosidase	Cosmid library		MUC	46/15 600	[38]
Calf rumen	Multifunctional glycosyl hydrolase	Fosmid library		CMC	1/12 288	[39]
Goat rumen	Xylanase/Glucanase	Fosmid library		CMC	10/9 500	[40]
Buffalo rumen	Endoglucanase	Fosmid library		AZCL-HEC	93/10 000	[41]
Buffalo rumen	Cellulase	Metagenomic DNA	Sequence screening	PCR	2/—	[42]
Bovine rumen	Cellulase	Fosmid library		454 pyrosequencing	2/70 000	[43]
Bovine rumen	Endoglucanase/ β-Glucosidase	Metagenomic DNA			809/—	[44]

Note: CMC: Carboxymethylcellulose; MUC: 4-Methylumbelliferyl-β-D-cellobioside; EH-FAC: Esculin hydrate and ferric ammonium citrate; PASC: Phosphoric-acid-swollen cellulose; OBR-HEC: Ostazin brilliant red-hydroxyethyl cellulose; pNPG: p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside; X-gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside; AZCL-HEC: AZCL-HE-Cellulose; DNP-C: 2,4-Dinitrophenyl-β-cellobioside; —: Not reported.

酶活性克隆, 亚克隆分析获得 10 个具有 β -葡萄糖苷酶活性的基因, 进一步研究基因 *Cell14b22* 的表达产物发现在 pH 4.0–10.0 范围内较稳定, 能水解 β -1,3 和 β -1,4 键连接的多糖, 对微晶纤维素和滤纸表现出一定的活性。许发芝等^[30]构建山羊瘤胃宏基因组文库, 通过活性筛选获得 10 个具有 β -葡萄糖苷酶活性的克隆, 对阳性克隆 pET-6 进一步亚克隆得到基因 *umcel6X*, 其编码产物与来自 *Dictyoglomus thermophilum* H-6-12 的 β -葡萄糖苷酶序列相似性仅为 55%。

多功能糖苷水解酶对木质纤维素的高效利用具有重要意义, 因此近年来利用宏基因组学获取双功能和多功能纤维素水解酶成为研究热点。Bao 等^[13]采用 pNPG 和 pNPX 为底物, 从牦牛瘤胃宏基因组文库中筛选到一个表现 β -葡萄糖苷酶和木糖苷酶活性的基因, 其重组蛋白能有效水解纤维低聚糖。Rashamuse 等^[43]从牛瘤胃宏基因组文库中获得同时具有纤维素内切酶和木聚糖酶活性的基因 *cel5A* 和 *cel5B*, 酶学性质研究表明其具有强耐碱和耐热性, 能分解 β -1,4 键连接的纤维素和半纤维素。Gruninger 等^[45]利用功能筛选法从奶牛瘤胃宏基因组文库中获得一个兼具 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶和 α -阿拉伯糖苷酶活性的基因。

为进一步提高宏基因组文库的筛选效率, 研究者开始关注将高通量筛选和新一代测序技术结合起来筛选新的纤维素酶基因。2013 年, Ko 等^[46]利用机械化高通量筛选系统(Robotic-high-throughput screening system)从韩国奶牛瘤胃和土壤微生物文库中获得 4 个外切纤维素酶基因, 其中 *CelEx-BR12* 具有外切纤维素酶、内切纤维素酶和木聚糖酶活性, 在生物技术领域具有广泛的应用前景^[47]。

此外, 宏基因组学还被用于分析不同动物瘤胃样品中的微生物群落和水解酶, Moon 等^[48]通过比较荷斯坦奶牛、韩国本地奶牛、韩国本地山羊和杂交绵羊瘤胃中的微生物群落和 3 种多糖降解酶(葡聚糖酶、木聚糖酶和淀粉酶)的活性, 发现山羊瘤胃中的细菌和真菌数目明显高于其它反刍动物, 且所

含葡聚糖酶、木聚糖酶和淀粉酶活性最高, 表明不同物种反刍动物瘤胃中微生物的组成及多糖降解酶的活性不相同。Dai 等^[49]采用牦牛瘤胃内容物构建 BAC 文库, 通过功能筛选获得 223 个纤维素酶克隆并将其进行焦磷酸测序和功能注释, 发现其胃肠道中存在丰富的 GH5、GH9 家族的纤维素基因, 却缺少多数微生物纤维素酶系中重要组成成分 GH48。

3.1.2 宏基因组学用于非反刍动物胃肠道微生物中纤维素酶的研究: 对瘤胃微生物纤维素酶进行了大量研究之后, 研究者开始关注非瘤胃植食性动物, 目前利用宏基因组学从非瘤胃动物胃肠道中已获取多种糖苷水解酶类(表 2)。

Feng 等^[50]在国际上首次采用未培养方法从兔子盲肠宏基因组文库中筛选到 4 个内切-1,4- β -葡聚糖酶和 7 个 β -葡萄糖苷酶的活性克隆, 进一步亚克隆和序列分析发现基因编码产物与数据库中已有纤维素酶序列一致性低于 50%。Chandrasekharaiah 等^[53]以斑马粪宏基因组为模板, 设计寡核苷酸引物扩增纤维素酶基因, 获得同时具有外切纤维素酶活性和内切纤维素酶活性的基因, 其重组蛋白表现出较好的温度稳定性和 pH 稳定性, 在农业废弃物转变为燃料、化工原料等方面具有潜在的应用价值。

Tasse 等^[54]运用功能性宏基因组学对人体肠道微生物膳食纤维分解酶进行分析, 为人体肠道功能性营养链认识提供了新的视野, 并从中获得内切纤维素分解酶基因。白蚁是自然界纤维素的天然降解者, Wang 等^[59]构建黄球白蚁宏基因组文库并从中筛选到一个 GH1 家族的耐热 β -葡萄糖苷酶新基因, 重组酶在 90 °C 条件下半衰期为 1 h, 因此在生物燃料、食品、饲料加工等领域具有较大地应用潜力。Wang 等^[60]通过构建猪前肠和盲肠内容物宏基因组文库, 经活性筛选获得 12 个纤维素酶基因, 其中包括纤维二糖磷酸化酶基因。

动物胃肠道存在着大量的微生物群落, 构成了动物消化道微生物区系, 这些微生物群落是动物长期进化的结果。非人灵长类动物与人类在系统进化

表2 利用宏基因组学从非瘤胃动物胃肠道中获得的纤维素酶
Table 2 Identifying cellulase from the metagenome of monogastric animal gastrointestinal tract

样品 Sample	筛选对象 Screening target	文库类型 Library type	筛选方法 Screening method	筛选效率 Screening efficiency	参考文献 Reference
Rabbit cecum	β -Glucanase/ Endoglucanase	Cosmid library	Activity screening	CMC MUC	11/32 500 [50]
Abalone gut	Cellulase	Fosmid library		CMC	1/90 000 [51]
Mice large-bowel	β -Glucanase	BAC library		lichenin	3/5 760 [52]
Batocera horsfieldi gut	Cellulases	Metagenomic DNA	Sequence screening	TAIL-PCR	11/- [19]
Burchelli fecal	Exo- β -1,4-glucanase	Metagenomic DNA		PCR	1- [53]
Reindeer rumen	Cellulases	Metagenomic DNA	454 pyrosequencing		406/- [24]
Human gut	Endoglucanase	Fosmid library			11/704 000 [54]
Termite hindgut	Endoglucanase	Metagenomic DNA			35/- [55]
Foregut contents of wallaby	Glycoside hydrolases	Shotgun library			557/- [56]
Snail	Cellulases	Metagenomic DNA			57/- [57]
Fecal samples of giant panda	Glycoside hydrolases	Metagenomic DNA			448/- [58]

上关系较近,因此研究其胃肠道微生物组成对于进一步认识和了解人类及其胃肠道微生物的进化具有重要意义。然而目前对非人灵长类动物胃肠道微生物的研究较少,因此本实验室以植食性的非人灵长类动物滇金丝猴为研究对象,利用宏基因组 Shotgun 测序对其粪便微生物的多样性及其中存在的木质纤维素降解酶类进行了全面研究(结果待发表)。测序分析表明,滇金丝猴粪便微生物中涵盖 79 个糖苷水解酶家族的木质纤维素降解酶基因,其中以 GH13、GH2、GH3、GH43 为主。通过与驯鹿^[24]、白蚁^[55]、袋鼠^[56]、牛^[44,61]的胃肠道宏基因组数据比较,发现滇金丝猴与奶牛、驯鹿、白蚁相似,胃肠道微生物中 GH5 纤维素酶数量明显高于 GH9;同时,我们还发现在滇金丝猴粪便微生物中存在丰富的 GH28 家族的半纤维酶基因,而该家族的水解酶在其他食草动物中数量较少。

上述研究证实了利用宏基因组学从动物胃肠道中获取新型纤维素酶的可行性,也表明动物胃肠道内蕴藏着大量潜在的纤维素分解酶基因资源,为新型纤维素分解酶类的研究开发提供了丰富资源。

然而,目前从动物胃肠道中所获得的纤维素酶主要集中在 GH5、GH9、GH44、GH26、GH1、GH3 等家族,其中以 GH5 家族居多,至今还未见采用功能筛选法从宏基因组文库中获得 GH6、GH7、GH48 家族外切纤维素酶的报道。此外,不同植食性动物由于摄食种类不同,其胃肠道内植物生物物质降解酶的种类也存在一定差异(表 3),如其他动物中很少存在的 GH45 在奶牛瘤胃中却较为丰富;奶牛瘤胃中的 GH7 和蜗牛中的 GH6 在其他植食性动物中并不存在;而 GH48 只少量存在于奶牛、蜗牛、驯鹿中。

3.2 宏基因组学用于土壤微生物中纤维素酶的研究

土壤微生物的代谢物不仅能为植物提供营养成分,而且会对土壤的理化性质产生影响,土壤中的木质纤维素资源在微生物的协同作用下充分降解,研究者利用这一特性从土壤微生物宏基因组中筛选到大量纤维素酶基因(表 4)。

红树林土壤具有沼泽化和盐渍化等特征,其植物凋落物丰富造就特色微生物资源,Thompson 等^[62]对巴西红树林土壤微生物进行宏基因组测序

表 3 不同植食性动物胃肠道内的纤维素酶
Table 3 Identifying cellulase from the gastrointestinal tract of different herbivorous animals

家族 Family	驯鹿瘤胃 Reindeer rumen ^[24]	牦牛瘤胃 Yak rumen ^[49]	牛瘤胃 Bovine rumen ^[44]	白蚁 Termite ^[55]	奶牛瘤胃 Cow rumen ^[61]	袋鼠 Wallaby ^[56]	蜗牛 Snail ^[57]
GH5	287	12	8	56	1 451	10	36
GH6	0	0	0	0	0	0	4
GH7	0	0	0	0	1	0	0
GH9	109	7	7	9	795	0	15
GH44	5	0	0	6	—	0	0
GH45	0	1	0	4	115	0	0
GH48	5	0	0	0	3	0	2
Total	406	20	15	75	2 365	10	57

表 4 利用宏基因组学从土壤获得的纤维素酶
Table 4 Identifying cellulase from the metagenome of soil

样品 Sample	筛选对象 Screening target	文库类型 Library type	筛选方法 Screening method		筛选效率 Screening efficiency	参考文献 Reference
Mangrove soil	β -Glucanase	Plasmid library	Activity screening	EH-FAC	1/—	[63]
Soil	β -Glucosidase	Fosmid library		EH-FAC	11/90 000	[64]
Soil	Endoglucanase	Cosmid library		CMC	8/1 700	[65]
Soil	β -Glucosidase	Plasmid library		EH-FAC	2/3 000	[66]
Karst soil	β -Glucanase	Shotgun library		EH-FAC	3/—	[67]
Alkaline soil	β -Glucanase	Plasmid library	Sequence screening	EH-FAC	1/30 000	[68]
Mangrove soil	β -Glucanase	—		EH-FAC	1/20 000	[69]
Grassland soil	Endo- β -1,4-glucanase	Fosmid library		EH-FAC	1/4 600	[70]
Red soil	Endo- β -1,4-glucanase	BAC library		CMC	1/3 024	[71]
Agricultural soil	Alkaline β -glucosidases	Plasmid library		EH-FAC	2/45 000	[72]
Wetland soil	β -Glucanase	Fosmid library		MUC	5/14 000	[73]
Soil	Endoglucanase	Fosmid library		DNP-C	1/96 144	[74]
Soil	Cellulase	Metagenomic DNA		PCR	127/—	[21]

获得大量多环芳烃降解酶和糖苷水解酶基因。Li 等^[63]在红树林土壤微生物文库中发现具有大豆异黄酮糖苷水解能力和高浓度葡萄糖耐受性的新型 β -葡萄糖苷酶基因。麦志茂等^[75]利用功能筛选从红树林土壤微生物文库中获得 17 个具有 β -葡萄糖苷酶活性的克隆, 通过进一步亚克隆获得 2 个新的

β -葡萄糖苷酶基因, 后续研究从该文库中获得的 GH44 家族内切葡聚糖酶基因, 氨基酸序列与其他已知的内切葡聚糖酶相似性低于 50%^[76]。

陆坚等^[64]采用宏基因组技术首次构建高糖土壤微生物文库, 从库中获得 11 个具有 β -葡萄糖苷酶活性的克隆, 对两个表达高活性的克隆进行亚克

隆分析获得两个编码新型 β -葡萄糖苷酶的基因 *unbgl3A* 和 *unbgl3B*, 在核苷酸水平上发现两基因与已知数据库中的 β -葡萄糖苷酶基因没有任何相似性, 后续进一步研究 *unbgl3A* 发现其产物对葡萄糖和 NaCl 有很高的耐受性^[77]。虽然对木质纤维素降解菌及酶类的研究广泛, 但是对于古生菌降解结晶纤维素研究报道却很少, Graham 等^[78]首次报道从热泉土壤微生物中获取强耐热性且具有纤维素降解能力的古细菌, 宏基因组技术分析其结构域和重组蛋白活性, 发现其最适温度为 109 °C, 具有较强的洗涤剂抗性、耐盐性和金属离子抗性。

3.3 宏基因组学用于堆肥和沉积物微生物中纤维素酶的研究

堆肥和沉积物也是纤维素广泛降解的环境, 利用宏基因组学研究者从中也获得了相关的纤维素酶及其基因(表 5)。Sae-Lee 等^[79]用猪粪、水果、废弃蔬菜等 45 种材料制作堆肥建立文库, 筛选到一个 GH43 家族的嗜酸性纤维素克隆, 重组酶兼具内切纤维素酶和内切木聚糖酶活性, 在生物乙醇发酵领域具有巨大的应用潜力。Yeh 等^[80]首次以稻秆堆肥为研究对象, 从宏基因组文库中筛选到一个 GH12 家族的新内切葡聚糖酶基因, 其与 *Micromonospora aurantiaca* 和 *Thermobispora* sp. 来源的内切葡聚糖酶基因相似性仅为 70%。Uchiyama 等^[81]首次报道从堆肥微生物文库中获得兼具高葡萄糖耐受性和转糖基活性的 GH1 家族 β -葡萄糖苷

酶。Geng 等^[11]从沼气池沉积物宏基因文库中获得一个内切 β -1,4-葡聚糖酶基因(GH5), 并成功实现了该基因在真菌 *Trichoderma reesei* 中的异源表达, 后续研究采用功能筛选和 454 测序技术从库中获得了 21 个相似性在 39%–72%之间的糖苷水解酶基因^[82]。

3.4 宏基因组学用于水体微生物中纤维素酶的研究

复杂多变的海洋环境赋予了海洋微生物在物种资源、基因功能和生态功能的生物多样性, 宏基因组学丰富了人们对于海洋微生物群体生态和进化的认识, 提供了人类从海洋天然宝库寻找新型功能生物活性物质和工业酶制剂的新方法。Grant 等^[86]从埃及富含苏打的湖水文库中获得 16 个内切葡聚糖酶基因, 并对来源于 GH9 和 GH79 家族的两个基因做了详细研究。Ress 等^[87]利用水体微生物建立文库, 筛选到 3 个 GH9 家族内切葡聚糖酶基因, 这 3 个基因的蛋白产物与已报道的 *Clostridium thermocellum*、*C. cellulovorans*、*Fusobacterium mortiferum* 的内切葡聚糖酶的相似性仅为 26%–29%。房伟等^[88]从中国南海海洋表层海水微生物宏基因组文库中筛选到 6 个 β -葡萄糖苷酶克隆, 对其中活性较强的克隆进一步亚克隆和序列分析后获得一个新型耐盐 β -葡萄糖苷酶基因, 能较好地用于中性或弱碱性酶制剂的开发, 是首次报道来自海洋微生物 GH1 家族的 β -葡萄糖苷酶基因, 后续研究从同一文库再次获得一个 GH1 家族的耐盐

表 5 利用宏基因组学从沉积物和堆肥中获得的纤维素酶
Table 5 Identifying cellulase from the metagenome of sediment and compost

样品 Sample	筛选物 Screening target	文库类型 Library type	筛选方法 Screening method	筛选效率 Screening efficiency	参考文献 Reference
Sediment	Cellulase	Fosmid library	Activity screening	4-MUC	121/100 000
Rice straw compost	Endoglucanase	λ Phage library	CMC	1/12 739	[80]
Compost	β -Glucosidase	Fosmid library	X-gal	1/–	[81]
Sediment	Endoglucanase	Fosmid library	CMC	21/100 000	[82]
Compost	Cellulase	Fosmid library	CMC	2/12 380	[83]
Vermicompost	Endoglucanase	Fosmid library	CMC	18/89 000	[84]
Switchgrass compost	β -Glucosidase	Metagenomic DNA	454 pyrosequencing	1/–	[85]

β -葡萄糖苷酶基因^[89]。Wierzbicka-Wos 等^[12]采用 X-gal 为底物对海水微生物文库进行筛选,获得一个 GH1 家族嗜冷活性的多功能基因,它同时具有半乳糖苷酶、葡萄糖苷酶、 β -岩藻糖苷酶活性,且能水解荧光底物和 β 键连接的寡糖。

4 总结与展望

自 1995 年 Healy 首次采用宏基因组技术从沼气沉积物中获得 GH5 家族的新颖纤维素酶基因,此后宏基因组学被广泛应用于各种环境中纤维素酶的研究,本文综述了利用宏基因组学从动物胃肠道、土壤、自制堆肥、水体环境微生物中获取纤维素酶的研究。目前已报道了上千种纤维素酶新基因,且报道的多数纤维素酶活性、金属离子抗性、耐盐性和耐热性等性质都使其具有进一步应用的潜力,从而证实了利用宏基因组学从环境样品中发现和筛选新基因及生物活性物质的可行性。

然而利用宏基因组学来获取纤维素酶及其基因还存在着不少“瓶颈”问题有待解决:(1) 目前获得的纤维素酶及其基因多数是内切葡聚糖和 β -葡萄糖苷酶,而外切葡聚糖酶及其基因报道较少。外切酶主要存在于真菌中,由于真菌基因启动子和内含子不被大肠杆菌所识别,无法在大肠杆菌中表达,因此,分离环境样品中的 RNA 构建宏基因组 cDNA 文库来获取外切纤维素酶可能成为未来的研究热点。(2) 利用宏基因组学获取的纤维素酶基因有的不能编码蛋白质或者纤维素酶的表达、分泌较弱,所以将宏基因组学与体外定向化技术结合改造基因以获得高性能纤维素酶具有重要意义。(3) 国内外构建的宏基因文库主要是插入片段较小的文库,研究工作也主要集中在新的单个基因或酶的筛选及其异源表达和酶学性质等方面。纤维素由多种化学键连接而成,需要多种酶协同作用才能破坏复杂的分子结构,而相关酶的编码基因有时通过基因簇的方式来作用,因此构建大片段文库(如 BAC 文库)有可能获得降解酶基因簇的完整信息。此外,利用宏基因组学研究纤维素酶及其基因有一定的历

史,但对纤维素的降解机制尚不清楚,将宏基因组学、转录组学和代谢组学等多种组学技术相结合将会是未来解决该问题的有力工具。

参考文献

- [1] Kyu KL, Pason P, Mori Y, et al. Isolation and characterization of endocellulase-free multienzyme complex from newly isolated thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum strain NOI-1[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 21(3): 284-292
- [2] Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics-the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498
- [3] Silva CC, Hayden H, Sawbridge T, et al. Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery waste water[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61811
- [4] Pushpam PL, Rajesh T, Gunasekaran P. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome[J]. AMB Express, 2011, 1(1): 3-10
- [5] Cheng F, Sheng J, Dong R, et al. Novel xylanase from a holstein cattle rumen metagenomic library and its application in xylooligosaccharide and ferulic acid production from wheat straw[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(51): 12516-12524
- [6] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577
- [7] Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(7): 797-824
- [8] Wang S, Chen GJ, Zhang HQ, et al. Carbohydrate-active enzyme (CAZY) database and its new prospect[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2014, 12(1): 102-108 (in Chinese) 王帅, 陈冠军, 张怀强, 等. 碳水化合物活性酶数据库(CAZY)及其研究趋势[J]. 生物加工过程, 2014, 12(1): 102-108
- [9] Duan CJ, Feng JX. Mining metagenomes for novel cellulase genes[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(12): 1765-1775
- [10] Heptinstall J, Stewart JC, Seras M. Fluorimetric estimation of exo-cellobiohydrolase and β -D-glucosidase activities in cellulase from *Aspergillus fumigatus* Fresenius[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1986, 8(2): 70-74
- [11] Geng A, Zou G, Yan X, et al. Expression and characterization of a novel metagenome-derived cellulase *Exo2b* and its application to improve cellulase activity in *Trichoderma reesei*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 96(4): 951-962
- [12] Wierzbicka-Wos A, Bartasun B, Cieslinski H, et al. Cloning and characterization of a novel cold-active glycoside hydrolase family 1 enzyme with β -glucosidase, β -fucosidase and β -galactosidase activities[J]. BMC Biotechnology, 2013, 13(1): 22-34
- [13] Bao L, Huang Q, Chang L, et al. Cloning and characterization of two β -glucosidase/xylosidase enzymes from yak rumen metagenome[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(1): 72-86
- [14] Kwon KS, Lee J, Kang HG, et al. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate[J].

- Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(12): 4584-4586
- [15] Teather RM, Wood PJ. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(4): 777-780
- [16] Nimchua T, Uengwetwanit T, Eurwilachit L, et al. Metagenomic analysis of novel lignocellulose-degrading enzymes from higher termite guts inhabiting microbes[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(4): 462-469
- [17] Berlemont R, Delsaute M, Angiono F, et al. Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements[J]. Revista Argentina de Microbiologia, 2011, 43(2): 94-103
- [18] Ohtoko K, Ohkuma M, Moriya S, et al. Diverse genes of cellulose homologues of glycosyl hydrolase family 45 from the symbiotic protists in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus*[J]. Extremophiles, 2000, 4(6): 343-349
- [19] Zhou JP. Preliminary study on cellulases and hemicellulases from symbiotic harbored in the gut of *Batocra Horsfieldi* Larvae[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese)
周峻沛. 云斑天牛胃肠道内共生细菌来源的纤维素酶和半纤维素酶的初步研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2010
- [20] Edwards IP, Upchurch RA, Zak DR. Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(11): 3481-3489
- [21] Xiong X, Yin X, Pei X, et al. Retrieval of glycoside hydrolase family 9 cellulase genes from environmental DNA by metagenomic gene specific multi-primer PCR[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(5): 875-882
- [22] Li JT, Su XY, Tian Y, et al. Gene diversity of the bacterial 48 family glycosidehydrolase (GH48) in rumen environment[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(1): 53-61 (in Chinese)
李劲亭, 苏小运, 田彦, 等. 瘤胃细菌 GH48家族糖苷水解酶基因多样性[J]. 微生物学报, 2014, 54(1): 53-61
- [23] Lim SY, Seo J, Choi H, et al. Metagenome analysis of protein domain collocation within cellulase genes of goat rumen microbes[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2013, 26(8): 1144-1151
- [24] Pope PB, Mackenzie AK, Gregor I, et al. Metagenomics of the Svalbard reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization loci[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38571
- [25] Bhatt VD, Dande SS, Patil NV, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiome in the forestomach fluid from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*)[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(4): 3363-3371
- [26] Lamendella R, Domingo JW, Ghosh S, et al. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1): 103-120
- [27] Li RW, Connor EE, Li C, et al. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools[J]. Environmental Microbiology, 2012, 14(1): 129-139
- [28] Xu B, Yang YJ, Li JJ, et al. Metagenomics in studying gastrointestinal tract microorganism[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(12): 1721-1735 (in Chinese)
许波, 杨云娟, 李俊俊, 等. 宏基因组学在人和动物胃肠道微生物研究中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1721-1735
- [29] Gong X, Gruninger RJ, Qi M, et al. Cloning and identification of novel hydrolase genes from a dairy cow rumen metagenomic library and characterization of a cellulase gene[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(1): 566-576
- [30] Xu FZ, Li BH, Li LM, et al. Screen and analysis of enzymic property of β -glucosidase from metagenome of goat rumen[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(11): 1345-1350 (in Chinese)
许发芝, 李炳华, 李吕木, 等. 山羊瘤胃宏基因组文库中 β -葡萄糖苷酶筛选及性质研究[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(11): 1345-1350
- [31] Yuan J. Research of constructing metagenomic library and diversity of black goat gastrointestinal tract[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
袁静. 黑山羊胃肠微生物宏基因组文库构建及多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2012
- [32] Zhao S, Wang J, Bu D, et al. Novel glycoside hydrolases identified by screening a Chinese Holstein dairy cow rumen-derived metagenome library[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6701-6705
- [33] Tan WX, Liu L, Hu YL, et al. Cloning and expression of a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene *umcel5K* and characterization of translated product[J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 2008, 27(1): 7-13 (in Chinese)
谭婉新, 刘利, 胡亚林, 等. 一个新的内切葡聚糖酶基因 *umcel5K* 的克隆, 表达及其表达产物的酶学特性[J]. 广西农业生物科学, 2008, 27(1): 7-13
- [34] Ferrer M, Golyshina OV, Chernikova TN, et al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(12): 1996-2010
- [35] Palackal N, Lyon CS, Zaidi S, et al. A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(1): 113-124
- [36] Guo H, Feng Y, Mo XC, et al. Cloning and expression of a β -glucosidase gene *umcel3G* from metagenome of buffalo rumen and characterization of the translated product[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2): 232-238 (in Chinese)
郭鸿, 封毅, 莫新春, 等. 水牛瘤胃宏基因组的一个新的 β -葡萄糖苷酶基因 *umcel3G* 的克隆、表达及其表达产物的酶学特性[J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 232-238
- [37] Duan CJ, Xian L, Zhao GC, et al. Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107(1): 245-256
- [38] Liu L, Feng Y, Duan CJ, et al. Isolation of a gene encoding endoglucanase activity from uncultured microorganisms in buffalo rumen[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(6): 1035-1042
- [39] Ferrer M, Ghazi A, Beloqui A, et al. Functional metagenomics unveils a multifunctional glycosyl hydrolase from the family 43 catalysing the breakdown of plant polymers in the calf rumen[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38134
- [40] Leng YY. Isolation and characterization of cellulases and xylanases from a goat rumen-derived metagenome library[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2012 (in Chinese)

- 冷圆圆. 山羊瘤胃宏基因组中葡聚糖酶/木聚糖酶的筛选与性质分析[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2012
- [41] Nguyen NH, Maruset L, Uengwetwanit T, et al. Identification and characterization of a cellulase-encoding gene from the buffalo rumen metagenomic library[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 76(6): 1075-1084
- [42] Cheema TA, Jirajaronrat K, Sirinarumit T, et al. Isolation of a gene encoding a cellulolytic enzyme from swamp buffalo rumen metagenomes and its cloning and expression in *Escherichia coli*[J]. *Animal Biotechnology*, 2012, 23(4): 261-277
- [43] Rashamuse KJ, Visser DF, Hennessy F, et al. Characterisation of two bifunctional cellulase-xylanase enzymes isolated from a bovine rumen metagenome library[J]. *Current Microbiology*, 2013, 66(2): 145-151
- [44] Brulc JM, Antonopoulos DA, Miller ME, et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(6): 1948-1953
- [45] Gruninger RJ, Gong X, Forster RJ, et al. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 3003-3012
- [46] Ko KC, Han Y, Cheong DE, et al. Strategy for screening metagenomic resources for exocellulase activity using a robotic, high-throughput screening system[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 94(3): 311-316
- [47] Ko KC, Lee JH, Han Y, et al. A novel multifunctional cellulolytic enzyme screened from metagenomic resources representing ruminal bacteria[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 441(3): 567-572
- [48] Moon YH, Ok JU, Lee SJ, et al. A comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant[J]. *Animal Science Journal*, 2010, 81(6): 642-647
- [49] Dai X, Zhu Y, Luo Y, et al. Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40430
- [50] Feng Y, Duan CJ, Pang H, et al. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(2): 319-328
- [51] Kim D, Kim SN, Baik KS, et al. Screening and characterization of a cellulase gene from the gut microflora of abalone using metagenomic library[J]. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(1): 141-145
- [52] Walter J, Mangold M, Tannock GW. Construction, analysis, and β -glucanase screening of a bacterial artificial chromosome library from the large-bowel microbiota of mice[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(5): 2347-2354
- [53] Chandrasekharaiah M, Thulasi A, Bagath M, et al. Identification of cellulase gene from the metagenome of *Equus burchelli* fecal samples and functional characterization of a novel bifunctional cellulolytic enzyme[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(1): 132-141
- [54] Tasse L, Bercovici J, Pizzut-Serin S, et al. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes[J]. *Genome Research*, 2010, 20(11): 1605-1612
- [55] Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, et al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite[J]. *Nature*, 2007, 450(7169): 560-565
- [56] Pope PB, Denman SE, Jones M, et al. Adaptation to herbivory by the Tammar wallaby includes bacterial and glycoside hydrolase profiles different from other herbivores[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(33): 14793-14798
- [57] Cardoso AM, Cavalcante JJ, Cantão ME, et al. Metagenomic analysis of the microbiota from the crop of an Invasive snail reveals a rich reservoir of novel genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e48505
- [58] Zhu L, Wu Q, Dai J, et al. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(43): 17714-17719
- [59] Wang Q, Qian C, Zhang XZ, et al. Characterization of a novel thermostable β -glucosidase from a metagenomic library of termite gut[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 51(6): 319-324
- [60] Wang W, Archbold T, Kimber MS, et al. The porcine gut microbial metagenomic library for mining novel cellulases established from growing pigs fed cellulose-supplemented high-fat diets[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(Supplement 4): 400-402
- [61] Hess M, Sczyrba A, Egan R, et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen[J]. *Science*, 2011, 331(6016): 463-467
- [62] Thompson CE, Beys-da-Silva WO, Santi L, et al. A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves[J]. *AMB Express*, 2013, 3(1): 65-83
- [63] Li G, Jiang Y, Fan X, et al. Molecular cloning and characterization of a novel β -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 15-22
- [64] Lu J, Du LQ, Pang H, et al. Construction of metagenomic library of microbes from sugar enriching soil and identification of β -glucosidase genes[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(1): 30-35 (in Chinese)
- 陆坚, 杜丽琴, 庞浩, 等. 高糖土壤微生物宏基因组文库的构建及 β -葡萄糖苷酶基因鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(1): 30-35
- [65] Voget S, Steele HL, Streit WR. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 126(1): 26-36
- [66] Jiang C, Li SX, Luo FF, et al. Biochemical characterization of two novel β -glucosidase genes by metagenome expression cloning[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3272-3278
- [67] Tang J, Su D, Yuan S, et al. Cloning and enzymatic characteristics of three new β -glucosidases in soil metagenomic library[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2013, 41(4): 14-18 (in Chinese)
- 唐婧, 苏迪, 袁帅, 等. 土壤宏基因组文库中3个新 β -葡萄糖苷酶基因的克隆及其酶学特性[J]. *贵州农业科学*, 2013, 41(4): 14-18
- [68] Jiang C, Ma G, Li S, et al. Characterization of a novel β -glucosidase-like activity from a soil metagenome[J]. *The Journal of Microbiology*, 2009, 47(5): 542-548
- [69] Zhang LP. Gene cloning, overexpression and characterization of

- a novel β -glucosidase derived from metagenomic library of mangrove soil[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Sun Yat-Sen University, 2012 (in Chinese)
- 张丽萍. 红树林土壤宏基因组文库中新型 β -葡萄糖苷酶的筛选及其酶学性质研究[D]. 广州: 中山大学硕士学位论文, 2012
- [70] Nacke H, Engelhaupt M, Brady S, et al. Identification and characterization of novel cellulolytic and hemicellulolytic genes and enzymes derived from German grassland soil metagenomes[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(4): 663-675
- [71] Liu J, Liu W, Zhao X, et al. Cloning and functional characterization of a novel endo- β -1,4-glucanase gene from a soil-derived metagenomic library[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(4): 1083-1092
- [72] Biver S, Stroobants A, Portetelle D, et al. Two promising alkaline β -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(3): 479-488
- [73] Kim SJ, Lee CM, Kim MY, et al. Screening and characterization of an enzyme with beta-glucosidase activity from environmental DNA[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(6): 905-912
- [74] Mewis K, Taupp M, Hallam SJ. A high throughput screen for biomining cellulase activity from metagenomic libraries[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011, 1(48): 2461-2465
- [75] Mai ZM, Su HF, Li LZ, et al. Construction of a mangrove soil metagenome library and identification of two novel β -glucosidase genes[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(6): 168-172 (in Chinese)
- 麦志茂, 苏宏飞, 李丽珍, 等. 红树林土壤微生物宏基因组文库的构建及两种新颖的 β -葡萄糖苷酶基因的鉴定[J]. *生物技术通报*, 2014(6): 168-172
- [76] Mai Z, Su H, Yang J, et al. Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(8): 1701-1709
- [77] Lu J, Du L, Wei Y, et al. Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2013, 45(8): 664-673
- [78] Graham JE, Clark ME, Nadler DC, et al. Identification and characterization of a multidomain hyperthermophilic cellulase from an archaeal enrichment[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 375-384
- [79] Sae-Lee R, Boonmee A. Newly derived GH43 gene from compost metagenome showing dual xylanase and cellulase activities[J]. *Folia Microbiologica*, 2014, 59(5): 409-417
- [80] Yeh YF, Chang SC, Kuo HW, et al. A metagenomic approach for the identification and cloning of an endoglucanase from rice straw compost[J]. *Gene*, 2013, 519(2): 360-366
- [81] Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K. Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(25): 18325-18334
- [82] Yan X, Geng A, Zhang J, et al. Discovery of (hemi-) cellulase genes in a metagenomic library from a biogas digester using 454 pyrosequencing[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 8173-8182
- [83] Kwon EJ, Jeong YS, Kim YH, et al. Construction of a metagenomic library from compost and screening of cellulase-and xylanase-positive clones[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2010, 53(6): 702-708
- [84] Yasir M, Khan H, Azam SS, et al. Cloning and functional characterization of endo-beta-1,4-glucanase gene from metagenomic library of vermicompost[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(3): 329-335
- [85] McAndrew RP, Park JJ, Heins RA, et al. From soil to structure a novel dimeric β -glucosidase belonging to glycoside hydrolase family 3 isolated from compost using metagenomic analysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(21): 14985-14992
- [86] Grant S, Sorokin DY, Grant WD, et al. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures[J]. *Extremophiles*, 2004, 8(5): 421-429
- [87] Rees HC, Grant S, Jones B, et al. Detecting cellulase and esterase enzyme activities encoded by novel genes present in environmental DNA libraries[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(5): 415-421
- [88] Fang W, Fang ZM, Liu JJ, et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine Metagenome[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(12): 1914-1920 (in Chinese)
- 房伟, 方泽民, 刘娟娟, 等. 新型海洋微生物 β -葡萄糖苷酶基因的克隆, 表达及重组酶性质[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1914-1920
- [89] Fang Z, Fang W, Liu J, et al. Cloning and characterization of a beta-glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(9): 1351-1358