

综述

不依赖微生物培养的纤维素降解酶及基因资源的挖掘

朱永涛, 刘巍峰, 王禄山, 陈冠军

山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

摘要: 自然界降解纤维素的微生物及其降解策略呈现多样性的特点。除了获得纯培养的纤维素降解微生物外, 自然环境中还有大量不可培养的微生物, 这些微生物蕴藏着丰富的纤维素酶和基因资源。环境基因组学和蛋白组学的出现为挖掘这些未知资源提供了必要的技术手段, 并且已经取得了一定的成果。以下综述了相关的研究进展, 并从群落系统微生物学角度, 对天然生境中纤维素的降解机制的研究进行了展望。

关键词: 纤维素, 纤维素酶, 环境基因组学, 环境蛋白组学, 系统生物学

Culture-independent digging of cellulases and genes from natural environments

Yongtao Zhu, Weifeng Liu, Lushan Wang, and Guanjun Chen

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: There is a great diversity for cellulolytic microbes in nature and the strategies they use to digest cellulose. In addition to the cultured cellulolytic microbes, there are still a great number of microbes being not readily culturable in natural environments, which may represent great potential for identifying novel cellulases and their encoding genes. The rise of metagenomics and metaproteomics provides essential technologic tools to dig up these resources and significant progress has been made so far. This review gives an insight into some relative results that have arisen from the meta-genomic or proteomic analysis of definitive uncultured microbe communities. Their potential role in elucidating the process and mechanisms of cellulose degradation in natural environment from the point of "community system microbiology" is also discussed.

Keywords: cellulose, cellulases, metagenomics, metaproteomics, system biology

随着石油、煤炭等非可再生的化石能源与资源的逐渐枯竭, 探讨和开发可再生能源已经成为人们迫切的需求, 其中生物质能源的开发已受到科学家和各国政府的高度重视。以纤维素为主要成分的植物生物质是地球上含量最丰富的可再生资源, 每年

通过光合作用而产生的生物质高达 1400~1800 亿吨^[1]。生物质既是可再生能源, 可以为人类提供能量, 也是可再生资源, 为人类提供物质性生产, 且生产及使用过程与环境友好。因此, 可以利用微生物技术对纤维素类可再生资源进行高效转化, 生产乙醇

Received: October 8, 2009; **Accepted:** October 28, 2009

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2004CB719702), National Natural Science Foundation of China (Nos. 30870045, 30970051), Science and Technology Program of Shandong Province (No. 2007JY02).

Corresponding author: Weifeng Liu. Tel: +86-531-88364324; E-mail: weifliu@sdu.edu.cn

Guanjun Chen. Tel: +86-531-88364324; E-mail: guanjun@sdu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2004CB719702), 国家自然科学基金(Nos. 30870045, 30970051), 山东省科技计划项目(No. 2007JY02)资助。

等产品作为替代能源或其他化工原料, 具有极其重要的现实意义和广阔的发展前景。

生物质的光合合成与微生物对其的降解构成了地球生物圈最大的物质循环。虽然植物生物质在自然界中可以被微生物降解和转化, 但长期的自然进化过程使得植物生物质的结构和成分复杂, 形成了抵御微生物和酶类攻击的天然屏障。对于纤维素组分而言, 由于其线性分子链间大量的氢键及范德华力的存在, 使其相互聚集形成包含基元纤丝、微纤丝和纤丝的多层次、不均一的结晶结构, 即纤维素的超分子结构^[2-3], 这种异质性的超分子结构是导致微生物对纤维素的降解过程往往呈现酶解种类多样性和酶解反应不均一性以及复杂性的主要原因。在纤维素酶解过程中, 目前已知的纤维素降解酶系的降解转化效率均较低, 酶解时间长。在实际应用过程中, 往往是纤维素酶的用量大, 导致生产成本较高, 这是限制纤维素酶解相关过程推广应用的主要因素。由此可以说, 如何提高纤维素酶的转化效率、降低纤维素酶的成本是提高生物乙醇竞争力的关键因素^[4]。因此发掘新的纤维素降解微生物和新的纤维素酶资源具有重大意义。

1 纤维素降解微生物及其纤维素降解策略的多样性

自然界有很多微生物可以利用纤维素或半纤维素作为碳源和能源, 维持了碳元素的循环。纤维素降解微生物具有多样性, 这为从自然界中筛选纤维素降解菌株提供了现实依据。自 Pringsheim 等 1912 年首次从土壤中分离出纤维素分解菌以来, 降解纤维素的微生物及其产生的纤维素酶的研究取得了很大的进展, 大量纤维素降解微生物及其所产生的纤维素酶被分离和纯化。纤维素酶分布广泛, 很多真菌、细菌、放线菌等在一定条件下均可产生纤维素酶^[5], 近年来陆续在古菌中也发现了纤维素酶的存在^[6-7]。这些纤维素降解微生物对纤维素的降解作用因微生物的不同而呈现降解策略的多样性。

1.1 木霉型非复合体纤维素酶系

好氧丝状真菌是人们熟知的纤维素降解微生物的主要类别。这些真菌产生的纤维素酶系为分泌型非复合体复合纤维素酶系, *Trichoderma*、*Aspergillus* 和

Penicillium 属的许多种, 属于产生这类纤维素降解酶系的代表菌株。其产生的纤维素酶对木材的降解能力很强, 已经被深入研究^[8], 可称为微生物降解纤维素的第一种策略。目前研究最为详细的模式微生物是 *Hypocrea jecorina* (即过去被人们熟知的 *Trichoderma reesei*)。已报道该菌可产生多达 10 个酶组分的纤维素降解酶系和多种半纤维素降解酶组分, 其纤维素降解酶系主要包括内切-1,4- β -葡聚糖酶、外切-1,4- β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶, 由这些酶系中的各组分通过协同作用共同降解结晶纤维素^[1]。研究发现这些丝状真菌分泌的这种游离的胞外复合纤维素酶系中, 其外切酶活力对于结晶纤维素的降解至关重要。研究还发现某些好养细菌也分泌这类非复合体的纤维素降解酶系, 如 *Cellulomonas fimi* 等细菌^[1]。

1.2 厌氧细菌型复合体纤维素降解酶系

多年来, 人们认为降解纤维素的微生物主要由上述游离的非复合体型或非结构化的纤维素复合酶系协同降解纤维素^[9]。1983 年, Lamed 等^[10]在可降解纤维素的厌氧细菌嗜热梭菌(*Clostridium thermocellum*)培养物中分离纯化得到了一种与纤维素降解有关的蛋白复合物, 即纤维小体(Cellulosome)。之后, 陆续有人在梭菌属其他细菌如 *Clostridium papyrosolvens* C7^[11]、*Clostridium cellulovorans*^[12]以及厌氧真菌 *Piromyces*^[13]中发现了纤维小体结构。研究发现, 纤维小体位于细胞表面, 是由各种纤维素酶和半纤维素降解酶等相关酶亚基通过脚手架蛋白组装起来的结构化的多酶复合物^[9], 这在具有纤维素降解功能的厌氧微生物中是普遍存在的。纤维小体可同时实现吸附纤维素底物和降解纤维素两种功能。纤维小体型的纤维素降解系统对纤维素的降解作用, 被称为微生物降解纤维素的第二种策略, 其发现和研究丰富了自然界中纤维素的降解理论。

1.3 细胞结合型非复合体纤维素降解酶系

相关研究发现, 哈氏嗜纤维素菌(*Cytophaga hutchinsonii*)和产琥珀酸拟杆菌(*Fibrobacter succinogenes*)等细菌对纤维素的降解作用与上述两种策略均不相同。该类菌的主要纤维素降解酶活与细胞相关联, 既不分泌游离的纤维素酶系又不形成明显的纤维小体结构, 其对纤维素的降解作用可能主要应为细胞表面非游离酶组分的作用, 这应是一

种独特新颖的纤维素降解策略^[14-15]。这两株菌的基因组测序工作已经完成,通过对二者基因组的信息进行分析,发现在所有编码与纤维素降解有关酶的基因中,缺少明显的外切-1,4- β -葡聚糖酶基因和可持续性降解的内切纤维素酶基因^[14,16]。而此类纤维素酶组分在前两种纤维素降解策略中具有重要地位,其在纤维素的降解过程中,尤其对结晶区的破坏发挥着关键作用^[17]。

上述的哈氏嗜纤维素菌是一种好氧革兰氏阴性菌,最初由 Walker 和 Warren 从土壤中分离得到^[18]。该菌具有高效的纤维素降解能力,能够迅速彻底地降解滤纸。由此可以看出,哈氏嗜纤维素菌可能存在一种独特而高效的纤维素降解酶系。哈氏嗜纤维素菌在降解纤维素的过程中胞外不积累还原糖,这一点明显不同于多数降解纤维素的真菌。该菌对结晶纤维素的高效降解需要底物与菌体的紧密接触,细胞结合型纤维素酶在纤维素降解过程中可能起到关键作用。该类新型的纤维素降解机制尚未得到研究,本课题组已经对该菌开展了系列的研究,对该菌的部分纤维素酶进行了分离纯化和异源表达。对该菌纤维素酶系与纤维素降解机理的深入研究对于生物质资源的有效利用将具有重要的理论意义。

上述不同微生物降解策略的差异也暗示着自然界中可能存在着多种多样的纤维素微生物降解模式。

2 新纤维素酶及其基因资源的寻找策略

自然界中存在的微生物种类约在 $10^5\sim 10^6$ 之间^[19],但由于人们的认识水平与实验条件的限制,基于特定的选择性培养基和培养条件的传统方法可分离鉴定的微生物仅占环境中总数的 1%,环境中还存在大量不可培养的微生物^[20-21]。对天然纤维素的生物降解来讲,天然纤维素就是在已知的纤维素降解菌和大量未知的纤维素降解菌的共同作用下被降解的。目前通过传统的微生物筛选方法,已越来越难以筛选到新的高效降解纤维素的菌种和酶组分。同时,在通过对现有纤维素酶的分子改造获得更高效的新酶方面也存在着效率低等许多问题。除了已经获得纯培养的纤维素降解菌株外,自然生境中还存在着很多可以高效降解纤维素的菌群,蕴藏着丰富的纤

维素酶资源。环境基因组学和环境蛋白质组学的兴起和发展为寻找与纤维素降解有关的新基因或新酶提供了新思路。

针对特定生境中不可培养的物种,研究其遗传物质的系统发生或活性物质的多样性,寻找新基因或新蛋白,可以大大扩展微生物基因资源的利用空间,这就是环境基因组学(Metagenomics)和环境蛋白质组学(Metaproteomics)的研究思路^[22-23]。

2.1 环境基因组技术及其在寻找新纤维素酶基因中的应用

环境基因组技术的出现,使得不依赖于微生物培养而直接从自然生境或特定环境中寻找特定序列或功能的基因成为可能^[24]。其基本策略是在不进行相关微生物培养分离的情况下,直接从环境中提取所有微生物的全部遗传物质,构建环境基因组文库,进一步对基因组文库进行分析找出编码某种活性产物的基因。对基因组文库的分析有两种途径:一种是基于功能的分析,一种是基于序列的分析^[25-26]。前者主要通过生化方法(如测定相关酶活力等)筛选活性克隆,虽然快速直观,但需要相关基因或基因簇在宿主细胞中得以活性表达,因此这种途径得到活性克隆的几率较低;后者通过根据已知的保守 DNA 序列设计杂交探针或 PCR 引物来从基因组文库中获取感兴趣的基因,这种途径某种程度上避免了前者存在的缺陷,但是同时限制了获得编码新功能蛋白基因的几率^[27],并且该途径建立在对现有基因组注释信息完全信赖的基础上^[28],因此也有其潜在的弊端。虽然环境基因组技术有其自身的缺点,但已经把对单一微生物的研究提升到了对微生物群体的研究,尤其在对不可培养微生物的研究中显示了其优越性。利用环境基因组技术寻找新纤维素酶基因的基本研究思路如图 1 所示。

从文献报道可了解到,通过宏基因组文库的构建,已经在天然环境中筛选到了许多种活性蛋白基因。如醇类氧化还原酶基因^[29]、脂肪酶基因^[30]、几丁质酶基因^[31]和抗生素合成基因^[32]等,对于纤维素酶新基因的发现也有很多报道。Healy 等^[33]通过构建由木质纤维素富集后的微生物混合培养物基因组文库,最终筛选到 4 个具有纤维素酶活力的克隆。对其中一个克隆的 DNA 序列测定后发现,由该基因

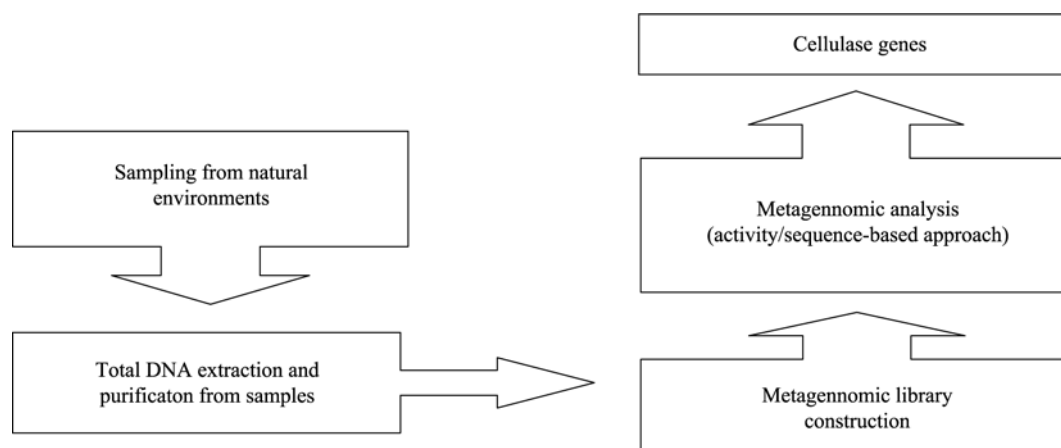


图 1 环境基因组学技术从天然环境中筛选纤维素酶基因的流程

Fig. 1 Procedure of screening cellulase genes from natural environments by metagenomic strategy.

编码的内切-1,4- β -葡聚糖酶(CelA)和 β -葡萄糖苷酶(CelB)明显不同于已报道的同源体。Voget 等^[34-35]通过构建土壤微生物基因组文库,筛选到 8 个具有内切-1,4- β -葡聚糖酶活力的克隆,并对其中一个克隆表达的新纤维素酶 Cel5A 的相关性质进行了深入研究。Feng 等^[36]从兔盲肠环境基因组文库中筛选到 4 个内切-1,4- β -葡聚糖酶和 7 个 β -葡萄糖苷酶克隆,通过对这些克隆进行亚克隆和序列分析发现其编码产物与数据库中的纤维素酶序列一致性低于 50%,相似性低于 70%。本课题组以 λ 噬菌体为载体构建了森林土壤、牛瘤胃液、亚洲象排泄物以及腐烂木材等环境的基因组文库,得到了 5 个内切-1,4- β -葡聚糖酶基因和 2 个 β -葡萄糖苷酶基因。基因序列显示,它们与 GenBank 中已知的纤维素基因不仅在核苷酸水平上没有明显的同源性,而且其编码产物与已知的纤维素酶在氨基酸水平上的序列一致性也低于 50%,相似性低于 70%,说明筛选到的纤维素酶基因为新的纤维素基因^[37]。

上述研究充分证明了环境基因组学研究方法在筛选新纤维素酶基因,尤其是未培养微生物来源的纤维素酶方面具有可行性。

2.2 环境蛋白组学及其在寻找新纤维素酶及非酶因子中的应用

基于 DNA 水平的基因组学研究手段只显示微生物潜在的遗传能力,并不能展示其在天然生态系统中基因的真实表达状况^[38-39],而环境蛋白组学弥补了这种不足。环境蛋白组学主要研究在不同环境

中基因组表达产物蛋白质的组成及活性,这是天然生境中微生物活性的直接反映,着眼于微生物群落的功能及活性物质的分析^[22, 40-41]。环境蛋白质组学分析方法可识别并确证复杂群落中水解酶的作用靶位以及一系列蛋白的表达模式。

通过环境蛋白组技术研究天然环境中的功能蛋白,首先需要从要研究的环境中得到一个较完整的蛋白库。理想情况下,这个库中的蛋白要有足够的浓度和纯度来满足现有分析手法的需要,并且要具有代表性^[26]。另外,由于环境样品种类繁多并且成分复杂,现在还没有统一的方法来从不同样品中获得理想的蛋白库。目前,有关环境蛋白组的研究手段还尚不完善,但也已经有学者做了很多有益的探索。Benndorf 等^[42]建立了碱和酚提取土壤蛋白组的方法,采用电泳和质谱技术分析其中的蛋白成分,并采用该方法分析了被氯苯污染的地下水样中可能参与污染物降解的微生物种类。Ram 等^[42]采用环境蛋白组学策略研究了位于酸性矿山废水中的生物膜微生物群落,对群落中微生物基因的表达和关键活性蛋白进行了评估和鉴定,由此对该群落各种代谢功能进行了研究和分析。环境蛋白组技术在寻找新纤维素酶的应用研究尚处于起步阶段,相关报道较少。其基本研究思路如图 2 所示。

利用环境蛋白组学技术进行纤维素酶的分离和分析研究,也已有报道。通过高效层析或二维电泳技术展示纤维素降解微生物所分泌的蛋白,进而可获得克隆所需的有效序列信息,可用于指导环境基因

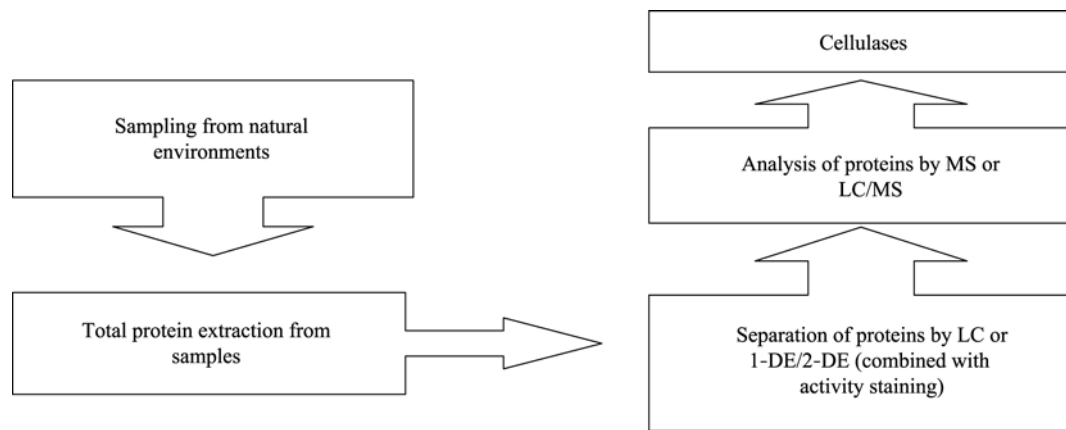


图 2 环境蛋白组学技术筛选纤维素酶的流程

Fig. 2 Procedure of identifying cellulases from natural environments through metaproteomic strategy.

组有效基因的分选, 确定新型纤维素降解酶类与非酶因子, 认识纤维素降解的相关作用机制。Yu 等^[43]以腐烂青贮为材料, 浸泡提取样品中的蛋白, 经过一系列的纯化和浓缩步骤, 采用二维电泳结合刚果红活性染色技术得到 5 个内切-1,4- β -葡聚糖酶组分。Toyoda 等^[44]从羊瘤胃内含物中筛选出多个与纤维素吸附相关的蛋白(CBPs), 这些吸附蛋白在某些微生物对纤维素底物降解的初始阶段起到关键作用, 其中有 4 个来源于产琥珀酸拟杆菌, 说明该菌在羊瘤胃中纤维素的降解过程中可能起到重要作用。另外, 还有些 CBPs 显示出内切-1,4- β -葡聚糖酶活性。这些实验的成功, 为人们探索天然环境纤维素的降解作用开启了一个新的方向。本课题组也已经开展了宏蛋白质组纤维素酶组分的分析研究, 初步建立了纤维素酶的肽指纹图谱库, 这对于宏蛋白组中纤维素酶组分的质谱分析奠定了技术基础。

3 展望

自然界中可以降解纤维素的微生物及其对纤维素的降解策略都呈现出高度的多样性。同时, 还必须注意到在自然生态系统中, 微生物种群的交替是一种普遍现象。在木质纤维素降解微生物群落中, 纤维素降解微生物与非降解微生物间也存在着分类学与功能多样性的变化, 而且这种酶或微生物群落的多样性与其所降解的生物物质类型及环境因素间存在某种必然的联系。因此, 为深入了解自然生境木质纤维素的降解过程及机制, 其研究必须将单一微生物、单一酶或单一基因水平的研究与基于各种组

学技术的研究紧密结合, 从“群落系统生物学”的角度整合凝练各种组学, 包括环境基因组学、转录组学、环境蛋白质组学、代谢组学及流量组学数据信息, 以充分阐述木质纤维素降解微生物群落的结构及各种微生物/降解酶间的复杂相互作用, 还原构建植物细胞壁碳循环的自然过程。在此基础上, 不仅可以从中挖掘未知的纤维素基因与酶, 还可以建立全新的生物物质降解转化策略, 最终实现纤维素这一巨大自然资源的高效利用。

REFERENCES

- [1] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, **66**(3): 506-577.
- [2] Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, *et al.* Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(α) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(47): 14300-14306.
- [3] Zhang YH, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(7): 797-824.
- [4] Sheehan J, Himmel M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(5): 817-827.
- [5] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 2002, **83**(1): 1-11.
- [6] Ando S, Ishida H, Kosugi Y, *et al.* Hyperthermostable endoglucanase from *Pyrococcus horikoshii*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 430-433.
- [7] Kashima Y, Udaka S. High-level production of hyperthermophilic cellulase in the *Bacillus brevis* expression and secretion system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**(1): 235-237.

- [8] Carlile M, Watkinson S. *The Fungi*. N.Y.1. New York: Academic Press, 1997: 269–275.
- [9] Bayer EA, Shimon LJ, Shoham Y, *et al.* Cellulosomes-structure and ultrastructure. *J Struct Biol*, 1998, **124**(2/3): 221–234.
- [10] Lamed R, Setter E, Bayer EA. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol*, 1983, **156**(2): 828–836.
- [11] Pohlschroder M, Leschine SB, Canale-Parola E. Multicomplex cellulase-xylanase system of *Clostridium papyrosolvens* C7. *J Bacteriol*, 1994, **176**(1): 70–76.
- [12] Doi RH, Goldstein M, Hashida S, *et al.* The *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Crit Rev Microbiol*, 1994, **20**(2): 87–93.
- [13] Fanutti C, Ponyi T, Black GW, *et al.* The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J Biol Chem*, 1995, **270**(49): 29314–29322.
- [14] Xie G, Bruce DC, Challacombe JF, *et al.* Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(11): 3536–3546.
- [15] Wilson DB. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, **1125**: 289–297.
- [16] Morrison M, Pope PB, Denman SE, *et al.* Plant biomass degradation by gut microbiomes: more of the same or something new? *Curr Opin Biotechnol*, 2009, **20**(3): 358–363.
- [17] Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, *et al.* Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, **8**(5): 548–557.
- [18] Walker E, Warren FL. Decomposition of cellulose by Cytophaga. I. *Biochem J*, 1938, **32**(1): 31–43.
- [19] Allsopp D, Colwell PR, Hawksoworth DL. *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. Wallingford, UK: CAB International, 1995.
- [20] Streit WR, Schmitz RA. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*, 2004, **7**(5): 492–498.
- [21] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**(1): 143–169.
- [22] Wilmes P, Bond PL. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends Microbiol*, 2006, **14**(2): 92–97.
- [23] Langer M, Gabor EM, Liebeton K, *et al.* Metagenomics: an inexhaustible access to nature's diversity. *Biotechnol J*, 2006, **1**(7/8): 815–821.
- [24] Valenzuela L, Chi A, Beard S, *et al.* Genomics, metagenomics and proteomics in biomineralizing microorganisms. *Biotechnol Adv*, 2006, **24**(2): 197–211.
- [25] Schloss PD, Handelsman J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, **14**(3): 303–310.
- [26] Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, *et al.* Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, **33**(1): 236–255.
- [27] Ferrer M, Beloqui A, Timmis KN, *et al.* Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2009, **16**(1/2): 109–123.
- [28] Hallin PF, Binnewies TT, Ussery DW. The genome BLASTatlas—a GeneWiz extension for visualization of whole-genome homology. *Mol Biosyst*, 2008, **4**(5): 363–371.
- [29] Kniesch A, Waschowitz T, Bowien S, *et al.* Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(3): 1408–1416.
- [30] 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.
- [31] Cottrell MT, Moore JA, Kirchman DL. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6): 2553–2557.
- [32] Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(9): 4301–4306.
- [33] Healy FG, Ray RM, Aldrich HC, *et al.* Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, **43**(4): 667–674.
- [34] Voget S, Leggewie C, Uesbeck A, *et al.* Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(10): 6235–6242.
- [35] Voget S, Steele HL, Streit WR. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol*, 2006, **126**(1): 26–36.
- [36] 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. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **75**(2): 319–328.
- [37] Wang F, Li F, Chen G, *et al.* Isolation and characterization of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in different environmental niches. *Microbiol Res*, 2009.
- [38] DeLong EF. Archaeal mysteries of the deep revealed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(17): 6417–6418.
- [39] Rodriguez-Valera F. Environmental genomics, the big picture? *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **231**(2): 153–158.
- [40] Wilmes P, Bond PL. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environ Microbiol*, 2004, **6**(9): 911–920.
- [41] Ram RJ, Verberkmoes NC, Thelen MP, *et al.* Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science*, 2005, **308**(5730): 1915–1920.
- [42] Benndorf D, Balcke GU, Harms H, *et al.* Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *Isme J*, 2007, **1**(3): 224–234.
- [43] Yu R, Wang L, Duan X, *et al.* Isolation of cellulolytic enzymes from moldy silage by new culture-independent strategy. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(7): 1037–1043.
- [44] Toyoda A, Iio W, Mitsumori M, *et al.* Isolation and identification of cellulose-binding proteins from sheep rumen contents. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(6): 1667–1673.