

高 岳. 应用宏基因组技术从微生物中获得活性物质的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 5-8.

# 应用宏基因组技术从微生物中获得活性物质的研究进展

高 岳

(苏州农业职业技术学院, 江苏苏州 215008)

**摘要:**采用传统培养的筛选方法,地球上 99% 以上的微生物还未能被人类开发生产活性物质,这使得自然界中微生物资源的开发利用受到极大限制。宏基因组文库技术的应用避开了微生物纯培养的问题,极大拓展了微生物资源的利用空间,目前被广泛应用于各种新的酶及活性物质的研究。在重点介绍宏基因组文库的构建及筛选方法等,以及宏基因组技术在微生物活性物质筛选中应用的基础上,对宏基因组研究存在的问题进行了探讨。

**关键词:**宏基因组文库;微生物;活性物质;筛选

**中图分类号:** Q789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0005-03

环境当中有超过 99% 的微生物不能进行人工培养,大多数微生物还未能被人类用来开发生产可能的有用产物<sup>[1-2]</sup>。用传统的微生物学方法没有办法对不可培养微生物的酶及其产物进行分析鉴定,但是,通过“宏基因组学”研究方法,可以直接从环境样品中提取微生物 DNA,让微生物 DNA 在易培养宿主中克隆表达<sup>[3]</sup>。从自然界微生物群落中直接提取 DNA 后建立宏基因组文库,然后进行克隆筛选,目前被广泛应用于各种新的酶及活性物质的研究。

## 1 宏基因组学的概念

1998 年, Handelsman 等首次提出了宏基因组 (metagenome) 的概念,是指特定环境中全部微生物基因的总和。宏基因组学 (metagenomics) 是一种新的微生物研究方法,它以环境样品中微生物群体基因组为研究对象,通过基因筛选和序列分析等手段,来研究环境微生物的功能活性、多样性、种群结构、进化关系,以及它们与环境之间的关系。宏基因组文库包含了可培养和不可培养微生物基因的总和,不需要使用传统的微生物纯培养技术,极大地拓宽了微生物资源的利用空间,为获得新的酶及生物活性物质提供了更广阔的平台。

## 2 宏基因组文库的构建

### 2.1 DNA 提取

DNA 提取方法主要有 2 种:一种是直接(原位)裂解法,直接裂解环境样品中的微生物细胞进行 DNA 抽提。这种方法操作简单、成本较低、DNA 获得率比较高,也更具有代表性;但提出的 DNA 片段较小(1~50 kb),且用这种方法容易残留环境样品中的杂质,如腐殖酸、棕黄酸等,这些杂质对后续的 PCR 扩增等操作会产生强烈的影响。另一种是间接(异位)裂解法,即先采用差速离心等物理手段,将微生物细胞从环境样品中分离出来,再用较温和的方法来对 DNA 进行抽提。这种方法的优点是可以获得大片段 DNA (20~500 kb),

而且纯度高、杂质残留少;但这种方法操作繁琐,成本较高, DNA 获得率比较低,且用此法抽提到的 DNA 主要来自于和土壤颗粒附着力较弱的微生物个体。因此,要根据研究手段及目的基因的大小,选择合适的提取方法。Liles 等证明了用甲酰胺高盐溶液处理的样品能够提取大片段 DNA,并能有效地提高宏基因组文库的构建效率,这为获取完整的大片段 DNA 提供了可借鉴的方法<sup>[4]</sup>。

### 2.2 文库构建

从环境样品中提取 DNA,用于构建宏基因组文库,进而筛选各种活性物质。在构建文库时,应根据自身的研究目的和获得的 DNA 的量、纯度、片段大小等来选择载体和宿主。

载体的选择需要考虑载体的大小、载体拷贝数、插入片段的大小、所用宿主及筛选方法等因素<sup>[5]</sup>。常用的克隆载体包括质粒(plasmid,插入片段 10 kb 以下)、黏粒(cosmid,插入片段 40 kb 左右)和细菌人工染色体(BAC,插入片段可达 350 kb)等,可满足不同的插入片段大小要求。BAC 载体可以克隆大片段的 DNA,增加了获得完整的指导大分子活性物质合成途径的编码基因或基因簇的机会,在宏基因组克隆表达中具有一定的优势。Gillespie 等用细菌人工染色体载体 pBeloBAC II 构建了 2 个土壤样品的宏基因组 BAC 文库,获得了 2 个具有广谱抗菌作用的新抗生素 turbomycin A 和 turbomycin B 及其合成酶基因簇<sup>[6]</sup>。

宿主菌株的选择主要考虑转化效率、重组载体在宿主细胞中的稳定性、外源基因的表达、目标性状筛选等因素<sup>[5]</sup>。研究表明,不同微生物种类所产生的活性物质类型有明显差异,因此,可根据不同研究目标选择不同的宿主菌株,如 70% 的抗生素来源于放线菌,若寻找抗菌、抗肿瘤活性物质,应选择链霉菌为宿主菌,而大肠杆菌则主要用于新型酶的筛选等<sup>[7]</sup>。大肠杆菌作为成熟的基因克隆表达受体细胞,仍然是研究宏基因组的首选宿主菌,如紫色杆菌素(violacein)C 等在大肠杆菌中的成功表达<sup>[8]</sup>。链霉菌属编码次生代谢产物合成的基因以基因簇的形式存在,表达受到细胞信号交流和信号转导的调控,具备天然抗生素产生机制<sup>[9]</sup>。

## 3 活性物质文库的筛选

采用传统方法进行生物活性物质筛选时,一般都是获得

收稿日期:2013-05-24

作者简介:高 岳(1979—),男,江苏苏州人,博士,讲师,从事生物工程及微生物天然产物研究。Tel: (0512) 66098727; E-mail: gaoyue0605@163.com。

相应的混合物,然后还需要进行活性化合物分离、提纯和鉴定等一系列后续处理。高品质的活性物质分析需要培养或发酵,产生某种活性物质的细菌,在发酵时其合成能力可能会降低,甚至丧失。应用宏基因组技术进行筛选时,由于合成该物质的基因携带在一定载体上,其功能基本不会丢失。活性物质文库筛选是细菌之间通用某些功能基因及其表达调控子,克服了发酵限制,优越于传统筛选。基于环境宏基因组的高度复杂性,必须有高通量、高灵敏度的方法来筛选和鉴定文库中的目标基因或活性分子。应用宏基因组技术筛选活性物质时,根据目的不同,可从以下不同水平设计不同的筛选方案。

3.1 序列驱动筛选

序列驱动筛选是指根据已知的基因或基因表达产物的保守序列设计探针或 PCR 引物,通过核酸杂交或 PCR 扩增,筛选具有目标序列的克隆子,以获得某一类结构或功能类似的蛋白质新分子或其编码基因<sup>[10-11]</sup>。来自海绵具有药用价值的天然产物大多数是复杂的聚酮类化合物,海绵宏基因组编码许多指导不同途径的聚酮合成酶 (polyketide synthase, PKS)<sup>[12-13]</sup>。PKS 包括 1 个或多个模块,每个模块都至少包括 3 个结构域:酮体合成酶 (ketosynthase, KS)、酰基转移酶 (acyl transferase, AT)、酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP),其中,KS 编码区同源性最高,因此,可以根据 KS 结构域的保守序列设计 PCR 引物<sup>[12-14]</sup>,从海绵宏基因组文库中筛选携带 PKS 基因的克隆。Courtoi 等构建了 1 个可以在大肠杆菌和链霉菌间转移的穿梭 Cosmid 载体,并以此构建了 1 个土壤宏基因组文库,通过序列驱动筛选获得了新的抗肿瘤活性物质聚酮的合成酶基因簇<sup>[15]</sup>。序列筛选法的优点是不必依赖外源基因在宿主中的表达,但它无法筛选宏基因组文库中那些和现有基因序列完全不同的新基因,因此较难发现新的活性物质。不过,Gupta 等认为,当宏基因组文库基因的保守序列与数据库中已知基因的保守序列相似度低于 40% 时,基于序列的筛选策略也可能筛选到新的功能产物<sup>[16]</sup>。

3.2 功能驱动筛选

功能驱动筛选主要通过化学等手段,从宏基因组文库中检测表达目标活性物质的克隆子,这种方法具有较高灵敏度,产色素的阳性克隆在平板上呈现的颜色不同,可以被快速筛选出来,如 Huang 等从构建的中国南海深海沉积物 Fosmid 宏基因组文库中筛选到了产黑色素 (melanin) 的克隆<sup>[17]</sup>;或是基于异源基因的宿主菌株与其突变体在选择性条件下功能互补生长的特性进行筛选<sup>[18]</sup>。Hu 等在 1 个南极荒漠土壤宏基因组文库中,使用含有底物甘油三酸酯三丁酸甘油酯的琼脂平板筛选到 1 种新的酯酶<sup>[19]</sup>。Neveu 等从戈壁和死亡谷沙漠宏基因组文库中,在用脱脂牛奶作为底物的平板上分离到 2 个丝氨酸蛋白酶<sup>[20]</sup>。这种方法的优点是能找到各种新的酶及活性物质,但它受限于基因必须能在宿主中表达,表达产物能够正常溶解,并且产生的蛋白质要能够正确地折叠。然而,很多克隆的外源基因并不能在新的遗传背景中实现表达。

3.3 功能筛选法的改进

宏基因组文库在进行功能筛选时,存在诸多问题,需要对宿主及载体系统进行改造及完善,改进表达系统,从而解决宏基因组基因在多宿主系统中的表达问题,如:可采用穿梭载体,使其在不同宿主中进行目的基因的表达,或是对大肠杆菌

进行改造,扩大它对基因的表达范围。目前,宏基因组文库的构建常采用的表达系统是大肠杆菌和链霉菌,可以通过综合考虑宿主的天然生物合成能力和它对外源启动子的倾向性,拓展新的宿主菌用于宏基因组的研究。Craig 等以 *R. metallidurans* 为克隆宿主,成功获得了土壤 eDNA 的编码产物,其中有 2 个是新天然产物,他们还进一步验证了获得的产物在大肠杆菌中不能表达或无法被检测到表达,进而证明了 *Ralstonia metallidurans* 可以作为宏基因组学文库新的模式系统,用于发现新产物<sup>[21]</sup>。另外,还可结合其他相关技术来改进功能筛选法,如在克隆前运用超速离心法、密度梯度离心法、稳定同位素示踪技术等<sup>[22-23]</sup>,对样品中感兴趣的基因或基因组进行富集,从而提高阳性克隆的比例。将亲和筛选技术和噬菌体表面展示表达产物结合起来分离 DNA,是一个高效易控制的高通量筛选方法,在宏基因组文库中即使是稀少的 DNA 序列也可得到富集,有利于文库中稀有 DNA 序列的表达<sup>[24]</sup>。

4 部分微生物活性物质筛选情况

利用宏基因组技术筛选活性物质被证实是一种行之有效的方法,其效率远远超过其他方法并且具有广阔的前景,是基因工程研究的一个主要方向。目前,研究人员已经利用功能和序列为基础的方法通过宏基因组筛选,鉴定了比较多的新型酶及抗菌活性物质 (表 1),潜在的工业开发利用价值很大。

表 1 宏基因组文库筛选的活性物质

活性物质	文献
$\beta$ -半乳糖苷酶	Wang 等 <sup>[25]</sup> , 2010
鞣酸酶	Yao 等 <sup>[26]</sup> , 2011
$\alpha$ -淀粉酶	Liu 等 <sup>[27]</sup> , 2012
内切葡聚糖酶	Pang 等 <sup>[28]</sup> , 2009
内酯酶	Schipper 等 <sup>[29]</sup> , 2009
DNA 聚合酶	Simon 等 <sup>[30]</sup> , 2009
ATP 酶	de la Iglesia 等 <sup>[31]</sup> , 2010
糖肽基因	Banik 等 <sup>[32]</sup> , 2008
核糖体环肽	Sivonen 等 <sup>[33]</sup> , 2010
抗癌物 patellamide 基因	Long 等 <sup>[34]</sup> , 2005
II 型聚酮合成酶基因	King 等 <sup>[35]</sup> , 2009
抗癌物 ET-743 基因	Rath 等 <sup>[36]</sup> , 2011
阿普拉毒素	Grindberg 等 <sup>[37]</sup> , 2011
异氰化物	Brady 等 <sup>[38]</sup> , 2005
靛红、靛蓝	Lim 等 <sup>[39]</sup> , 2005
低温脂肪酶	Jeon 等 <sup>[40]</sup> , 2009
耐盐纤维素酶	Voget 等 <sup>[41]</sup> , 2006
多酚氧化酶	Beloqui 等 <sup>[42]</sup> , 2006
羧酸酯酶	Rashamuse 等 <sup>[43]</sup> , 2009
双加氧酶	Suenaga 等 <sup>[44]</sup> , 2007

5 展望

运用宏基因组学技术,有可能挖掘和利用 99% 以上的不可培养微生物,这些微生物蕴藏着巨大的基因多样性,提供了丰富的研究资源。虽然采用宏基因组技术获得的活性物质目前并不是很多,但它改变了我们解决很多问题的思路,丰富和拓展了对微生物世界多样性的认识,加速了新基因的发现。随着未来研究手段的不断进步,细菌遗传学、分子生物学、基

因组学、生物信息学、合成生物学和天然产物化学等学科和领域的发展,必将使我们能从各类环境基因组文库中获得更多具有高价值的新酶、抗生素和其他活性产物,宏基因组学技术也必将发挥越来越大的作用,造福人类。

#### 参考文献:

- [1] Torsvik V, Goksoyr J, Daae F L. High diversity in DNA of soil bacteria [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1990, 56(3): 782–787.
- [2] Rappe M S, Giovannoni S J. The uncultured microbial majority [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 369–394.
- [3] Handelsman J, Rondon M R, Brady S F, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products [J]. *Chemistry & Biology*, 1998, 5(10): 245–249.
- [4] Liles M R, Williamson L L, Rodbummer J, et al. Recovery, purification, and cloning of high – molecular – weight DNA from soil microorganisms [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2008, 74(10): 3302–3305.
- [5] 钮旭光, 韩梅, 韩晓日. 宏基因组学: 土壤微生物研究的新策略 [J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 576–579.
- [6] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D, et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2002, 68(9): 4301–4306.
- [7] Lämmler K, Zipper H, Breuer M, et al. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning [J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(4): 575–592.
- [8] Beja O. To BAC or not to BAC; Marine ecogenomics [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(3): 187–190.
- [9] Martín J F. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR – PhoP system: an unfinished story [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(16): 5197–5201.
- [10] Daniel R. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(3): 199–204.
- [11] Knetsch A, Bowien S, Whited G, et al. Identification and characterization of coenzyme B12 – dependent glycerol dehydratase – and diol dehydratase – encoding genes from metagenomic DNA libraries derived from enrichment cultures [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, 69(6): 3048–3060.
- [12] Schirmer A, Gadkari R, Reeves C D, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta* [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2005, 71(8): 4840–4849.
- [13] Fieseler L, Hentschel U, Grozdanov L, et al. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2007, 73(7): 2144–2155.
- [14] Kim T K, Fuerst J A. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture – dependent and culture – independent approaches [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(8): 1460–1470.
- [15] Courtois S, Cappellano C M, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, 69(1): 49–55.
- [16] Gupta R, Beg Q K, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(1): 15–32.
- [17] Huang Y, Lai X, He X, et al. Characterization of a deep – sea sediment metagenomic clone that produces water – soluble melanin in *Escherichia coli* [J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 124–131.
- [18] 贺纪正, 张丽梅, 沈菊培, 等. 宏基因组学 (Metagenomics) 的研究现状和发展趋势 [J]. *环境科学学报*, 2008, 28(2): 209–218.
- [19] Hu X P, Heath C, Taylor M P, et al. A novel, extremely alkaliphilic and cold – active esterase from Antarctic desert soil [J]. *Extremophiles*, 2012, 16(1): 79–86.
- [20] Neveu J, Regeard C, DuBow M S. Isolation and characterization of two serine proteases from metagenomic libraries of the gobi and death valley deserts [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91(3): 635–644.
- [21] Craig J W, Chang F Y, Brady S F. Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans* [J]. *ACS Chemical Biology*, 2009, 4(1): 23–28.
- [22] Urbach E, Vergin K L, Giovannoni S J. Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65(3): 1207–1213.
- [23] Borneman J. Culture – independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1999, 65(8): 3398–3400.
- [24] Cowan D, Meyer Q, Stafford W, et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future [J]. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(6): 321–329.
- [25] Wang K, Li G, Yu S Q, et al. A novel metagenome – derived beta – galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(1): 155–165.
- [26] Yao J, Fan X J, Lu Y, et al. Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(8): 3812–3818.
- [27] Liu Y, Lei Y, Zhang X, et al. Identification and phylogenetic characterization of a new subfamily of  $\alpha$  – amylase enzymes from marine microorganisms [J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(3): 253–260.
- [28] Pang H, Zhang P, Duan C J, et al. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase [J]. *Current Microbiology*, 2009, 58(4): 404–408.
- [29] Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, et al. Metagenome – derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2009, 75(1): 224–233.
- [30] Simon C, Herath J, Rockstroh S, et al. Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function – based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice [J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2009, 75(9): 2964–2968.
- [31] De la Iglesia R, Valenzuela – Heredia D, Pavissich J P, et al. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P – type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(6): 552–562.

刘瑞显, 李国锋, 徐立华, 等. 棉花生产技术创新系统的耗散结构分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 8-10.

# 棉花生产技术创新系统的耗散结构分析

刘瑞显<sup>1</sup>, 李国锋<sup>1</sup>, 徐立华<sup>1</sup>, 承泓良<sup>2</sup>

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 江苏省农业委员会, 江苏南京 210036)

**摘要:**作为系统论的新发展, 耗散结构理论主要研究一个系统从无序向有序、从低序向高序转化的机理、条件和规律。在简要介绍耗散结构理论的基础上, 分析了棉花生产技术创新系统所具备的耗散结构特征, 讨论了耗散结构理论对实施棉花生产技术创新的启示。

**关键词:**棉花; 生产技术创新系统; 耗散结构

**中图分类号:** S562.04      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0008-03

技术创新是人类财富之源, 是推动经济增长的根本动力。棉花生产技术创新的目的就是要不断提高棉花生产系统的有序性, 实现棉花生产整体功能的可持续发展, 满足市场对棉花的需求和促进棉农的增收, 而耗散结构理论作为系统论的新发展, 主要研究一个系统从无序向有序、从低序向高序转化的机理、条件和规律。因此, 探讨耗散结构理论在棉花生产技术创新系统中的应用具有时代和现实意义。

收稿日期: 2013-05-29

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)3034]; 江苏省农业三新工程专项资金[编号: SXGC(2012)S321400-1]; 江苏省农业综合开发科技推广项目(编号: 2013KJ-37)。

作者简介: 刘瑞显(1980—), 男, 山东潍坊人, 博士, 副研究员, 主要从事棉花栽培技术及生理研究。E-mail: liuruixian2008@163.com。

## 1 耗散结构理论的基本原理

“耗散结构”理论是 1977 年诺贝尔化学奖得主普里戈金(Prigogine)教授经过 20 多年对非平衡热力学的潜心研究而创立的。该理论认为, 一个开放系统(可以是物理的、力学的、生物的、化学的系统)在达到远离平衡态的非线性区时, 一旦系统的某个参量的变化达到一定阈值, 通过涨落, 系统可能发生突变, 由原来的无序的混乱状态转变到一种时间、空间或功能有序的新状态, 这种有序状态需要不断地与外界交换物质和能量才能保持, 并保持一定的稳定性, 不因外界的微小扰动而消失。普里戈金把这种在远离平衡态的非线性区域形成的新的稳定有序结构称为耗散结构<sup>[1]</sup>。耗散结构理论指出, 系统从无序状态过渡到这种耗散结构必须具备 4 个条件。

- [32] Banik J J, Brady S F. Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(45): 17273-17277.
- [33] Sivonen K, Leikoski N, Fewer D P, et al. Cyanobactins - ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(5): 1213-1225.
- [34] Long P F, Dunlap W C, Battershill C N, et al. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production[J]. ChemBiochem, 2005, 6(10): 1760-1765.
- [35] King R W, Bauer J D, Brady S F. An environmental DNA-derived type II polyketide biosynthetic pathway encodes the biosynthesis of the pentacyclic polyketide erdacin[J]. Angewandte Chemie, 2009, 48(34): 6257-6261.
- [36] Rath C M, Janto B, Earl J, et al. Meta-omic characterization of the Marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743[J]. ACS Chemical Biology, 2011, 6(11): 1244-1256.
- [37] Grindberg R V, Ishoev T, Brinza D, et al. Single cell genome amplification accelerates identification of the apratoxin biosynthetic pathway from a complex microbial assemblage[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18565.
- [38] Brady S F, Clardy J. Cloning and heterologous expression of isocya-

nide biosynthetic genes from environmental DNA[J]. Angewandte Chemie, 2005, 44(43): 7063-7065.

- [39] Lim H K, Chung E J, Kim J C, et al. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*[J]. Applied and Environment Microbiology, 2005, 71(12): 7768-7777.
- [40] Jeon J H, Kim J T, Kim Y J, et al. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 81(5): 865-874.
- [41] Voget S, Steele H L, Streit W R. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126(1): 26-36.
- [42] Beloqui A, Pita M, Polaina J, et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(32): 22933-22942.
- [43] Rashamuse K, Magomani V, Ronneburg T, et al. A novel family VIII carboxylesterase derived from a leachate metagenome library exhibits promiscuous beta-lactamase activity on nitrocefin[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(3): 491-500.
- [44] Suenaga H, Ohnuki T, Miyazaki K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(9): 2289-2297.