

## TEKNIK PENINGKATAN PERFORMA ENZIM ASAL MIKROBA LAUT YANG TIDAK DAPAT DIKULTUR

Agustinus Robert Uria, Dewi Seswita Zilda dan Yusro Nuri Fawzya

Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi  
Kelautan dan Perikanan

### PENDAHULUAN

Mikroba laut dapat hidup di semua kondisi lingkungan alami. Bahkan penyebarannya menjangkau habitat-habitat ekstrim yang tidak mendukung kehidupan organisme lain pada umumnya, seperti kondisi suhu, pH, tekanan, dan kandungan oksigen yang terlampaui rendah atau tinggi. Keanekaragamannya sungguh mencengangkan, yaitu sekitar 10.000 spesies yang berbeda untuk tiap gram tanah atau sedimen (Streit *et al.*, 2004). Kelimpahannya diperkirakan berada dalam kisaran  $10^4$  sampai  $10^7$  sel per mL air. Kandungan karbonnya mencapai 50-100% dari total karbon pada semua tumbuhan darat (Whitman *et al.*, 1998). Adanya upaya pendataan komunitas mikroba laut dunia hingga tahun 2020 oleh *The International Census of Marine Microbes (ICoMM)* tentunya akan menambah catatan panjang tentang keanekaragaman dan kelimpahannya.

Tingginya keanekaragaman dan kelimpahan mikroba laut menunjukkan potensinya sebagai sumber paling menjanjikan untuk penemuan produk alami yang bernilai industri. Di antara berbagai bentuk produk alami, enzim termasuk paling diminati dalam dunia industri baik dalam industri kimia, farmasi maupun makanan. Hal ini berkenaan dengan peranannya sebagai katalis yang ramah lingkungan, ekonomis dan bersih (Wahler & Reymond, 2001).

Eksplorasi enzim dari mikroba laut biasanya ditempuh dengan cara mengisolasi dan menumbuhkan mikroba dalam bentuk biakan murni. Kemudian dilakukan seleksi terhadap mikroba penghasil enzim, diikuti dengan optimasi produksinya di bioreaktor untuk pelipatgandaan jumlahnya. Namun sayangnya pendekatan yang dikenal dengan sebutan *cultivation-dependent approach* ini dibatasi oleh kenyataan bahwa sebagian besar mikroba (lebih dari 99,8% dalam hal keanekaragamannya) tidak dan belum dapat dikultur dengan menggunakan teknik-teknik kultivasi konvensional yang ada (Riesenfeld *et al.*, 2004).

Kemajuan bioteknologi molekuler yang ditandai dengan lahirnya metagenomika memungkinkan untuk mengakses enzim dari mikroba laut tanpa perlu mengkulturnya (Arnold, 2001; Handelsman, 2004). Pendekatan metagenomika ini telah diterapkan untuk penemuan sejumlah enzim dari mikroba yang tidak dikultur seperti lipase, esterase (Henne *et al.*, 2000), amilase (Rondon *et al.*, 2000), kitinase (Cottrel *et al.*, 1999) dan alkohol dehidrogenase (Knietsch *et al.*, 2003). Pendekatan ini juga sedang diterapkan oleh kelompok peneliti bioteknologi di Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B) untuk memperoleh enzim protease disamping berbagai enzim lainnya dari mikroba laut yang tidak dikultur yang berasal dari spons.

Walaupun penemuan berbagai enzim unik dan baru dari mikroba laut sangat terbuka lebar, namun ketika suatu enzim alami direkrut untuk aplikasi industri, seringkali performanya tidak memenuhi selera industri. Dengan kata lain, enzim alami seringkali memperlihatkan sifat-sifat yang kurang cocok untuk proses industri, seperti labil selama periode waktu yang lama, tidak aktif pada pelarut yang tidak cair, dan tidak dapat menerima substrat spesifik (Van der Oost & de Graaff, 2002). Untuk itu diperlukan suatu sentuhan molekuler guna membuatnya tampil lebih prima. Sentuhan ini dikenal dengan sebutan mutagenesis.

Dengan mutagenesis, serangkaian sifat fungsional enzim seperti stabilitas panas, aktivitas katalisis dan spesifitas substrat berhasil ditingkatkan (Arnold, 2001). Tulisan ini akan memaparkan bagaimana enzim dari mikroba laut yang tidak dapat dikultur dapat diutak-atik pada tingkat gen untuk membuatnya tampil lebih prima secara fungsional.

### Dari Metagenomika ke Evolusi Laboratorium

Metagenomika merupakan cabang genetika yang secara khusus ditujukan untuk mengumpulkan gen-gen langsung dari suatu lingkungan, diikuti dengan menguak informasi genetika yang terkandung di dalamnya (Riesenfeld *et al.*, 2004). Aplikasi pendekatan ini untuk penemuan enzim dari mikroba laut

(i) Metagenomika



Sumber Mikroba laut yang tidak dapat dikultur

Konstruksi pustaka metagenomika



Skrining pustaka metagenomika



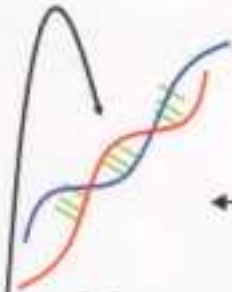
Enzim alami



Gen alami

Ekspresi

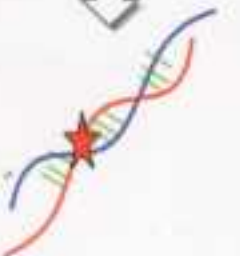
(ii) Evolusi laboratorium



Konstruksi pustaka mutasi



Skrining pustaka mutasi



Gen mutasi



Enzim mutasi

Ekspresi

Gambar 1. Perpaduan metagenomika dan evolusi laboratorium untuk meningkatkan penampikan enzim dari mikroba laut yang tidak dapat dikultur.

yang tidak dapat dikultur melibatkan (i) konstruksi pustaka metagenomika, (ii) penapisan pustaka metagenomika, dan (iii) analisis dan ekspresi gen (Gambar 1).

Konstruksi pustaka metagenomika dari suatu lingkungan laut dapat didasarkan pada teknologi kloning gen *shotgun* (Handelsman, 2004). Teknologi ini melibatkan isolasi DNA (*deoxyribonucleic acid*) langsung dari sampel lingkungan laut, umumnya diikuti dengan pemotongan DNA tersebut secara parsial. Potongan-potongan DNA yang relatif besar dikloning ke dalam sel-sel bakteri, biasanya *Escherichia coli*. Hasil kloning tersebut berupa sekumpulan klon yang disebut pustaka metagenomika.

Pustaka metagenomika kemudian diskriming untuk mendeteksi klon-klon pembawa enzim yang diinginkan (Uria *et al.*, 2006).

Gen yang diperoleh melalui metagenomika dapat diutak-atik melalui mutagenesis untuk menghasilkan gen mutan unggul. Apabila gen mutan tersebut diekspresikan, terbentuklah enzim dengan sifat unggul. Mutagenesis biasanya diawali dengan menelusuri gen yang berperan di balik munculnya satu atau lebih sifat yang tidak dikehendaki. Kemudian informasi genetik yang terkandung dalam gen bersangkutan diungkap dan dianalisis untuk mengetahui faktor penentu sifat. Faktor itu kemudian dimanipulasi secara spesifik pada urutan basa nukleotidnya guna menghasilkan gen mutan yang diinginkan. Gen mutan ini selanjutnya diekspresikan untuk membentuk enzim mutan dengan sifat-sifat yang diinginkan. Strategi seperti ini secara khusus disebut disain protein rasional atau disain rasional. Strategi ini cukup rumit dan memakan waktu lama karena selain membutuhkan informasi

tentang struktur enzim juga tentang hubungan antara urutan, struktur dan fungsi/mekanisme kerja enzim (Bornscheuer & Pohl, 2001).

Akhir-akhir ini telah berkembang suatu strategi yang mampu mengubah performa enzim dalam waktu yang relatif singkat. Strategi ini cukup sederhana karena tidak memerlukan dukungan informasi mengenai struktur dan hubungan struktur-fungsi enzim. Prinsip kerjanya adalah menghasilkan berbagai gen mutan dari suatu gen alami dan mengekspresikannya di inang bakteri yang sesuai. Kemudian produk ekspresi, dalam hal ini sekumpulan enzim mutan, diskriming untuk mendapatkan enzim mutan dengan sifat-sifat yang diinginkan. Karena prinsip kerjanya menyerupai teori evolusi Darwin dan berlangsung di laboratorium di bawah campurtangan dan kendali manusia, maka strategi ini lebih populer disebut evolusi laboratorium. Sejumlah peneliti menyebutnya dengan istilah evolusi langsung atau evolusi molekuler. Dengan strategi ini, suatu molekul enzim dapat dimanipulasi pada tingkat gen untuk 'melahirkan' turunan unggul. Bahkan dua atau lebih enzim dengan keunggulan yang berbeda dapat 'dikawinsilangkan' untuk melahirkan suatu turunan mutan yang mewarisi semua sifat unggul dari induknya. Kelebihan-kelebihan ini telah menempatkannya sebagai strategi mutagenesis paling efektif di abad milenium ini.

Evolusi laboratorium mencakup sejumlah tahap (Gambar 1). Pada tahap pertama yang disebut **konstruksi pustaka mutan**, suatu gen dimanipulasi secara acak untuk menghasilkan berbagai mutannya. Gen-gen mutan itu kemudian dikloning dan diekspresikan ke dalam *E. coli*, sehingga menghasilkan kumpulan klon yang disebut pustaka fenotip mutan. Pada tahap kedua yang disebut **skrining pustaka mutan**, pustaka mutan

diskriming untuk menyeleksi klon penghasil enzim mutan dengan fenotip yang diinginkan. Misalnya, untuk memperoleh klon penghasil enzim mutan tahan panas, aktivitas enzim diuji pada suhu yang tinggi. Kemudian gen mutan yang diinginkan dapat disekuens dan data sekuens dianalisis untuk mengetahui perubahan informasi genetik yang terjadi.

### Konstruksi Pustaka Mutan

Konstruksi pustaka mutan dalam evolusi laboratorium, sebagaimana yang digambarkan di atas, melibatkan produksi berbagai mutan dari suatu gen alami, diikuti dengan kloning dan ekspresi gen-gen mutan ke dalam inang *E. coli*. Hal ini dapat dilakukan melalui mutasi titik (*point mutation*) dan rekombinasi (*recombination*). Mutasi titik dan rekombinasi yang paling populer adalah *error prone PCR* dan *DNA shuffling*. Kedua teknik ini didasarkan pada penerapan PCR (*polymerase chain reaction*) untuk memodifikasi urutan nukleotida pada gen.

### Prinsip Dasar PCR

Teknik PCR pertama kali diusulkan secara teoritis oleh H. Ghobind Khorana pada tahun 1970. Lima belas tahun kemudian Kary Mullis dan rekan-rekannya di Cetus Corporation mengimplementasikan teori itu melalui eksperimennya tentang penggandaan gen-gen mamalia secara *in vitro* dengan menggunakan DNA polymerase I dari *E. coli* (Sambrook & Russel, 2001). Sejak saat itu penggunaan teknik PCR berkembang dengan sangat pesat dan bahkan sekarang telah dapat dilakukan secara otomatis dengan menggunakan mesin *thermal cycler* atau lebih dikenal dengan sebutan mesin PCR (Sambrook & Russel, 2001; Karp, 2005). Dengan mesin PCR, daerah target pada DNA dapat diperbanyak sebesar  $10^5$  kali

melalui 25 siklus dalam waktu paling kurang 57 menit (Prescott, *et al.*, 2002). Salinan DNA yang dihasilkan dapat digunakan untuk tujuan kloning, sekuensing dan mutagenesis (Madigan *et al.*, 2000).

Dalam prakteknya, reaksi PCR dilakukan dengan cara mencampurkan sampel DNA dengan komponen-komponen berikut: DNA polimerase, keempat deoksiribonukleotida (dNTPs), kofaktor  $MgCl_2$  dan sepasang oligonukleotida yang disebut primer. Dalam hal ini, enzim DNA polimerase yang digunakan bersifat tahan panas seperti *Taq polymerase* dan kedua primer komplemen dengan ujung 3' pada daerah DNA yang akan digandakan. Campuran PCR tersebut ditempatkan pada mesin PCR dan kondisi siklus PCR diset untuk sejumlah siklus yang dikehendaki. Setiap siklus mencakup tiga tahap utama. Pada tahap pertama yang disebut denaturasi, campuran PCR

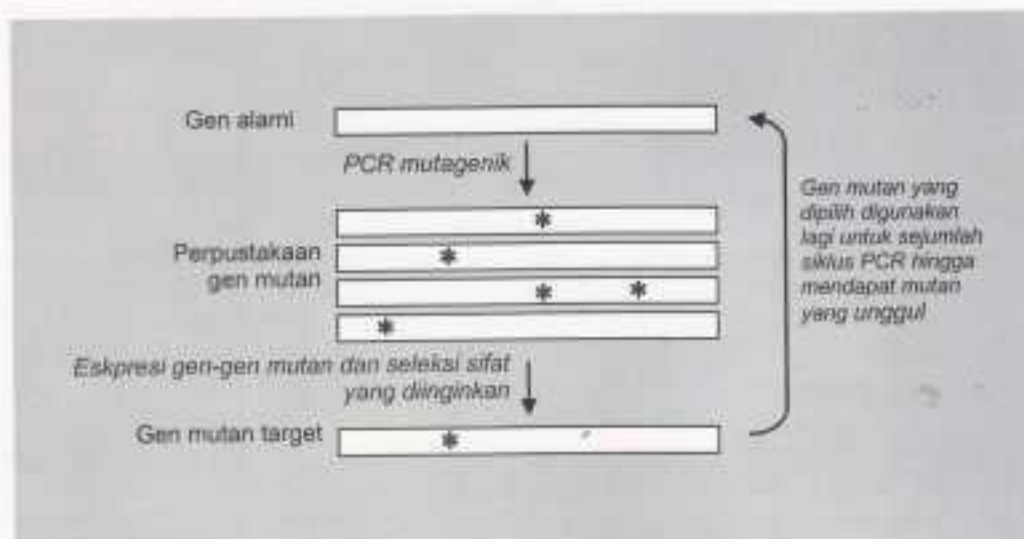
diturunkan hingga 60°C untuk memungkinkan primer berikatan atau menempel pada setiap untai tunggal DNA. Pada tahap ketiga yang disebut *elongation*, suhu dinaikkan hingga sekitar 72°C untuk memungkinkan *Taq polymerase* menambahkan dNTPs ke ujung 3' dari primer hingga membentuk untai tunggal baru pada untai tunggal sebelumnya. Siklus seperti ini diulangi berkali-kali sehingga hanya dalam beberapa jam, miliaran salinan dari suatu daerah tertentu pada DNA dapat dihasilkan (Madigan *et al.*, 2000; Karp, 2005).

Dewasa ini aplikasi PCR telah menyusup ke hampir semua bidang ilmu dasar maupun terapan. Dalam bioteknologi, teknik PCR digunakan untuk rekayasa protein atau mutagenesis dan analisis keanekaragaman mikroorganisme. Dalam dunia kedokteran, PCR digunakan untuk mendiagnosa berbagai penyakit manusia baik yang

digunakan sebagai bagian dari teknologi sidik jari DNA untuk membantu mengungkap kasus-kasus kriminal (Prescott *et al.*, 2002). Dalam bidang perikanan dan pertanian, PCR diterapkan untuk mendeteksi parasit pada ikan dan tanaman.

#### Aplikasi PCR untuk Produksi Gen Mutan

PCR dapat diterapkan untuk mengubah satu atau lebih basa nukleotida pada salinan dari suatu gen alami. Aplikasi PCR untuk tujuan ini disebut mutasi titik melalui *error prone PCR*. Hal ini dapat dilakukan melalui penggantian kation seperti  $Mg^{2+}$  dengan  $Mn^{2+}$  untuk tujuan mereduksi kondisi optimal dalam reaksi PCR. Cara alternatif adalah menggunakan *DNA polymerase* yang tidak mempunyai kemampuan *proofreading* (membaca urutan

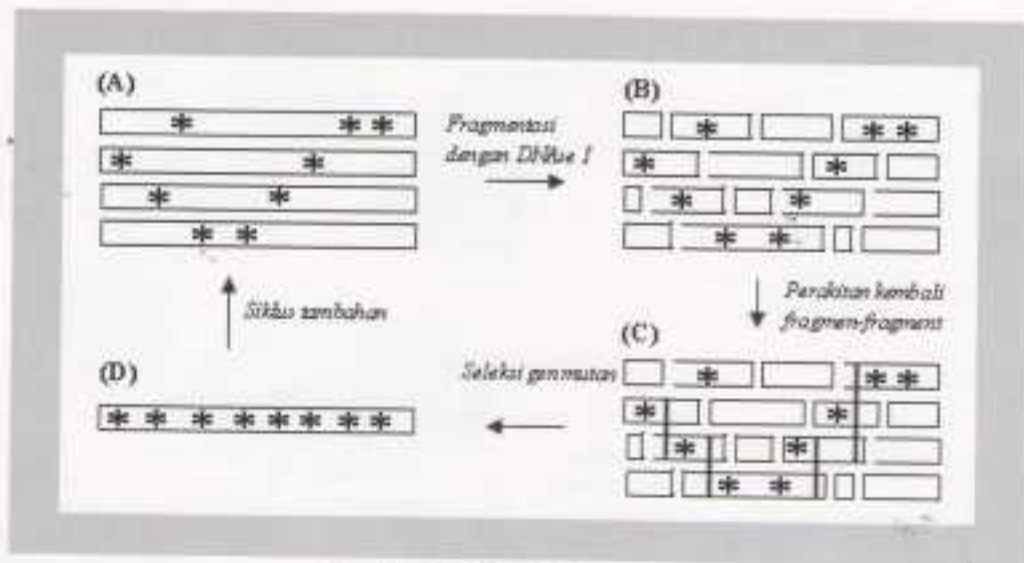


Gambar 2. *Error prone PCR*, yang melibatkan produksi berbagai mutan secara acak dari suatu gen alami (Digambar kembali dari Van der Oost & de Graff, 2002).

diinkubasi pada 93°C untuk memisahkan untai ganda DNA target menjadi dua untai tunggal. Pada tahap selanjutnya yang disebut *annealing*, suhu reaksi

disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti hepatitis, tuberkulosis, AIDS, maupun penyakit genetik (turunan) seperti anemia. Dalam ilmu forensik, PCR

nukleotida yang salah dan memperbaikinya). Enzim ini lebih dikenal dengan nama *high error-rate polymerase* (Arnold, 2001; Van der Oost & de Graff, 2002).



Gambar 3. Siklus DNA shuffling.

Dalam proses *error prone PCR* sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 2, suatu gen alami digunakan sebagai cetakan dalam suatu reaksi PCR untuk menghasilkan sekumpulan gen mutan dengan perubahan pada satu atau beberapa nukleotida. Gen-gen mutan itu kemudian diekspresikan pada strain *E. coli* yang sesuai dan diskriming untuk sifat atau fenotip yang dikehendaki. Jika sifat yang diinginkan belum optimal, maka gen mutan target dapat diterapkan lagi dalam sejumlah siklus *error prone PCR* hingga dijumpai sifat unggul yang diinginkan.

Aplikasi PCR lainnya yang sangat menarik dalam evolusi laboratorium adalah mengawinsilangkan dua atau lebih enzim yang homolog untuk melahirkan suatu turunan mutan yang mewarisi semua sifat unggul dari parentalnya. Aplikasi PCR yang dikenal dengan sebutan *DNA shuffling* ini mula-mula diimplementasikan oleh Stemmer (1994). Teknik *DNA shuffling* biasanya melibatkan fragmentasi beberapa gen homolog, diikuti dengan perakitan kembali fragmen-fragmen DNA melalui aplikasi PCR. Dalam prakteknya (Gambar 3), sejumlah

gen homolog dengan sifat-sifat yang berbeda dipotong dengan menggunakan enzim DNase I. Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan kemudian diterapkan dalam suatu reaksi PCR. Dalam reaksi PCR, suatu fragmen dapat berperan sebagai primer yang menempel pada fragmen homolog lainnya. Dengan demikian, rekombinasi terjadi ketika fragmen-fragmen dari suatu gen melakukan polimerisasi terhadap salinan gen lainnya (Stemmer, 1994).

Dengan menggunakan *DNA shuffling*, gen-gen dari strain mikroba yang berbeda atau bahkan dari spesies yang berbeda dapat dikawinsilangkan satu sama lain untuk menghasilkan gen hibrid baru (Arnold, 2001).<sup>6</sup> Gen mutan ini dapat mewarisi semua sifat unggul dari gen-gen induknya. Untuk alasan ini, metode ini dipertimbangkan sebagai cara yang sangat ampuh dalam menghasilkan enzim mutan yang tidak ditemukan di alam. Keuntungan metode ini dibanding dengan metode-metode mutagenesis lainnya adalah tingginya jumlah siklus evolusi molekuler yang dilakukannya (Stemmer, 1994).

### Kloning dan Ekspresi Gen Mutan

Gen-gen mutan yang dihasilkan baik melalui *error-prone PCR* maupun *DNA shuffling* perlu dikloning dan diekspresikan untuk membentuk perpustakaan fenotip mutan. Kloning dan ekspresi gen memerlukan sistem mikroba yang sesuai. Di antara sistem mikroba yang ada, *E. coli* masih merupakan salah satu inang yang paling diminati dan digunakan secara luas. Ada beberapa alasan utama untuk hal ini, seperti kemampuannya untuk tumbuh dengan cepat pada substrat yang tidak mahal, genetika dan fisiologinya yang telah diketahui dengan baik, ketersediaan sejumlah vektor kloning yang tepat, dan meningkatnya jumlah strain mutannya (Banex, 1999).

Di antara berbagai sistem ekspresi *E. coli*, sistem pET yang dikomersialisasikan oleh Novagen termasuk sistem yang paling baik untuk ekspresi protein rekombinan. Sistem ini menawarkan enam kombinasi inang-vektor dan salah satunya adalah vektor pET24d dan inang *E. coli* BLD21(DE3) ([www.novagen.com](http://www.novagen.com)). Kombinasi ini telah sukses digunakan untuk

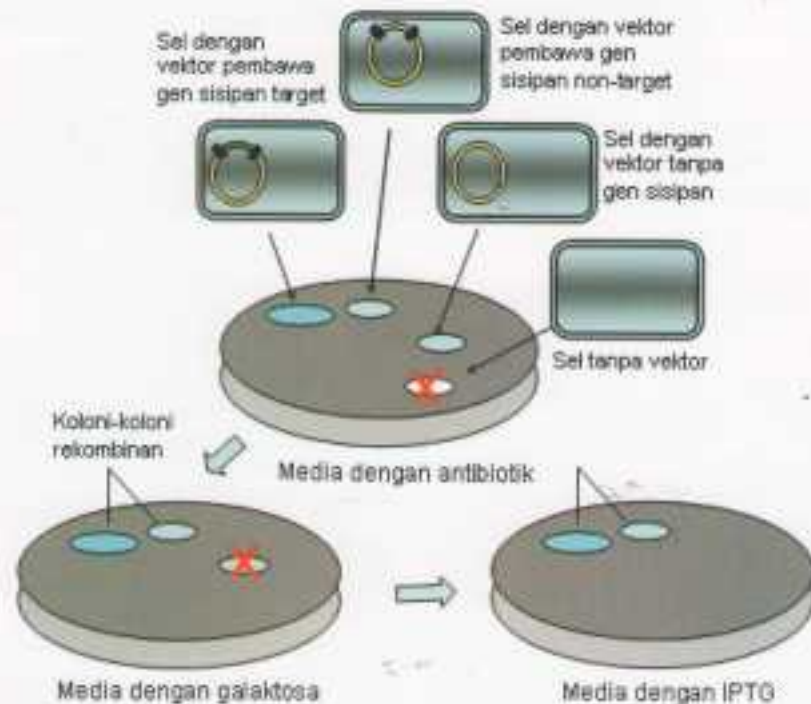
ekspresi sejumlah enzim rekombinan, seperti alkohol dehidrogenase sebagaimana yang dilaporkan oleh Machielsen *et al.* (2006) dan Üria *et al.* (2006). Klon-klon pembawa gen mutan yang aktif secara fungsional dapat diseleksi berdasarkan keberadaan penanda resisten antibiotik dan gen *lac I* pada vektor (Gambar 4).

### Skrining Pustaka Mutan

Pustaka fenotip mutan selanjutnya perlu diskriminasi untuk mendapatkan klon-klon penghasil enzim mutan dengan sifat-sifat yang diinginkan. Ini memerlukan metode-metode yang relatif praktis, tidak mahal dan cepat (Wahler & Reymond, 2001). Metode yang digunakan tergantung pada sifat enzim yang ingin diubah.

Metode-metode skrining yang relatif sederhana didasarkan pada seleksi enzim terhadap parameter lingkungan yang diinginkan seperti tahan panas atau dingin, tahan pH rendah atau tinggi. Sebagai contoh, protease subtilisin direkayasa melalui evolusi laboratorium dan diskriminasi untuk sifat tahan atau stabil pada kondisi dingin, sebagaimana yang dilaporkan oleh Taguchi *et al.*, 1998. Dalam hal ini, pustaka mutan dibuat replikanya pada media yang mengandung substrat *skim milk* dan diinkubasi semalaman pada 37°C untuk membentuk klon-klon. Setelah inkubasi tambahan pada 10°C selama dua hari, zona bening nampak jelas di sekitar beberapa klon yang menunjukkan bahwa *skim milk* dihidrolisis pada kondisi dingin.

Pustaka mutan dapat ditujukan untuk menyeleksi enzim mutan dengan enansioselektivitas tertentu. Sebagai contoh, deteksi enzim golongan aldolase terhadap substrat dengan gugus karbonil sebagaimana yang dilaporkan oleh Reymond (2001). Ekspresi enzim



Gambar 4. Seleksi terhadap klon-klon pembawa gen mutan yang aktif secara fungsional. Penambahan antibiotik tertentu ke dalam media pertumbuhan akan memungkinkan hanya klon-klon pembawa vektor tetap hidup. Kemudian adanya  $\alpha$ -galaktosa dalam media padat memungkinkan pendeteksian klon-klon pembawa gen sisipan. Keberadaan *isopropyl- $\alpha$ -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) di dalam media menginduksi ekspresi gen-gen mutan. Kumpulan klon-klon pembawa gen mutan yang aktif secara fungsional ini disebut perpustakaan fenotip mutan.

ini oleh klon dapat dideteksi karena kemampuannya mengubah substrat dengan berbagai enansioselektivitas menjadi *umbelliferone*. *Umbelliferone* adalah produk fluoresen yang dihasilkan melalui eliminasi senyawa-karbonil. Skrining ini dapat juga diterapkan untuk seleksi alkohol dehidrogenase dengan stereo dan enansioselektivitas tertentu.

Gen mutan target yang diperoleh selanjutnya dapat disekuens (ditentukan urutan nukleotidanya) dan data sekuensnya dianalisis untuk mengetahui secara spesifik perubahan yang terjadi pada urutan asam amino yang disandinya.

Teknik sekuensing yang telah digunakan secara luas adalah pendekatan enzimatik yang dikemukakan oleh Sanger dan Coulson dari MRC-Cambridge, Inggris. Dewasa ini, sekuensing telah dilakukan dengan menggunakan mesin sekuensing (*sequencer*) yang bekerja otomatis (Karp, 2005). Untuk sekuensing suatu gen, hasilnya dapat diperoleh dalam waktu yang sangat singkat dengan *sequencer* otomatis.

### KESIMPULAN

Tingginya keanekaragaman dan kelimpahan mikroba laut menunjukkan potensinya sebagai

sumber paling menjanjikan untuk penemuan produk alami baru yang bernilai industri. Enzim termasuk produk alami yang paling diminati dalam dunia industri karena reputasinya sebagai katalis yang ramah lingkungan, ekonomis dan bersih. Dengan menggunakan pendekatan metagenomika, berbagai enzim unik dan baru dapat diakses dari mikroba laut yang tidak dapat dikultur.

Walaupun demikian, enzim alami seringkali tidak menunjukkan performa yang sesuai dengan selera industri, seperti labil selama periode waktu yang lama, tidak aktif pada pelarut tertentu, dan tidak dapat menerima substrat spesifik. Untuk itu diperlukan suatu sentuhan molekuler yang disebut mutagenesis guna membuatnya tampil lebih prima untuk suatu kondisi reaksi yang diinginkan.

Evolusi laboratorium dipertimbangkan sebagai strategi mutagenesis paling efektif di abad milenium ini. Hal ini karena kemampuannya mengubah performa enzim dalam waktu yang relatif singkat tanpa memerlukan dukungan informasi mengenai struktur dan hubungan struktur-fungsi enzim. Ada dua metode yang relatif sederhana dalam evolusi laboratorium, yaitu *error-prone PCR* dan *DNA shuffling*. Dengan menggunakan *error-prone PCR* khususnya, suatu molekul enzim dapat dimanipulasi pada tingkat gen untuk 'melahirkan' turunan unggul. Dengan *DNA shuffling*, dua atau lebih enzim homolog dengan keunggulan yang berbeda dapat 'dikawinsilangkan' untuk melahirkan suatu turunan mutan yang mewarisi semua sifat unggul dari induknya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Ariyanti yang telah membaca dan memberi masukan berharga terhadap isi manuskrip ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, F.H. 2001. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature* 409: 253-258.
- Banex, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421.
- Bornscheuer, U.T. and Pohl, M. 2001. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5: 137-143.
- Cottrell, M.T., Moore, J.A. and Kirchman, D.L. 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6): 2553-2557.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(4): 669-685.
- Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G. and Daniel, R. 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3113-3116.
- Karp, G. 2005. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 4<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., NJ. 780 pp.
- Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A. and Daniel, R. 2003. 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.* 69(3): 1408-1416.
- Machielsen R., Uria, A.R., Kengen, S.W. and van der Oost, J. 2006. Heterologous production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to aldo-keto reductase superfamily. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1): 233-238.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey, USA. 991 pp.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 2002. *Microbiology*. 5<sup>th</sup> edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York. 1022 pp.
- Raymond, J.-L. 2001. New high-throughput screening assays for biocatalysis. *Chimia*. 55(12): 1049-1052.
- Riesenfeld, C.S., Schiess, P.D. and Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38: 525-553.
- Rondon, M.R., August, P.R., Betterman, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., Macneil, I.A., Minor, C., Tong, C.L., Gilman, M., Osborne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6): 2541-2547.
- Sambrook, J.E. and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Stemmer, W.P.C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 10747-10751.
- Streit, W.R., Daniel, R. and Jaeger, K.-E. 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 285-290.
- Taguchi, S., Ozaki, A. and Momose, H. 1998. Engineering of a cold-adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 492-495.
- Uria, A.R., Machielsen, R., Dutilh, B.E., Huynen, M.A. and Van der Oost, J. 2006. Alcohol dehydrogenases from marine hyperthermophilic microorganisms and their importance to the pharmaceutical industry. *International Seminar and Workshop on Marine Biodiversity & their Potential for Developing Bio-Pharmaceutical*

Industry in Indonesia, on the 17-18<sup>th</sup> of May 2006 at Jakarta.  
Van der Oost, J. and de Graaff, L. 2002. *Applied Molecular Genetics*. A Teaching Module.

Wageningen University and Research Centre, the Netherlands.  
Wahler, D. and Reymond, J-L. 2001. High-throughput screening for biocatalysts. *Curr. Opin.*

*Biotechnol.* 12:535-544.  
Whitman, W.B., Coleman, D.C. and Wiebes, W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.