

FUNGSIONAL METAGENOMIK: STRATEGI EFEKTIF DALAM EKSPLORASI GEN TARGET GLIKOSIDA HIDROLASE

Maris Kurniawati^{1*}, Amak Yunus²

^{1,2} Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas PGRI Kanjuruhan Malang

Email: maris@unikama.ac.id^{1*}, amakyunus@unikama.ac.id²

*) Corresponding Author

Abstrak

Strategi metagenomik memberikan keuntungan dapat mengeksplorasi langsung genom-genom yang belum terjelajahi, terutama dari mikroorganisme yang tidak dapat dibudidayakan atau dikultur dalam kondisi tertentu. Penemuan gen-gen yang berisi klon-klon glikosida hidrolase yang sama sekali tidak identik dengan yang ditemukan pada database publik, telah berhasil dilakukan melalui pendekatan metagenomik. Analisis data terhadap hasil temuan-temuan klon-klon pada pustaka metagenomik yang dihasilkan menunjukkan klon yang diperoleh sebagai rangkaian asam nukleat fungsional baru yang berbeda dari database yang sudah ada.

Kata Kunci: Fungsional metagenomik, eksplorasi gen target, glikosida hidrolase



This is an open access article under the [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

PENDAHULUAN

Enzim hidrolase adalah enzim yang mengkatalis hidrolisis ikatan-ikatan ester, eter, peptida, glikosil, anhidrida asam, C-C, C-halida, atau P-N. Kelompok utama enzim hidrolase dibagi dalam sub kelompok enzim esterase, glikosidase, peptidase, fosfatase, tiolase, fosfolipase, amidase, deaminase dan ribonuklease (Indah, 2004). Sub kelompok enzim glikosidase atau glikosida hidrolase yang lain seperti enzim selulase, hemiselulase dan lignase. Enzim glikosida hidrolase banyak dimanfaatkan untuk kepentingan bioteknologi dan proses industri seperti memproses biomassa menjadi bioenergi, industri pakan ternak, industri pulp dan kertas dan industri detergen serta pemanfaatan di bidang kesehatan sebagai anti-biofilm *Candida* pada kondisi kandidiasis (Kurniawati *et al.*, 2019).

Begitu banyak manfaat dari glikosida hidrolase sehingga dipandang sangat penting untuk dilakukan suatu upaya *screening* atau penapisan terutama sisi genetik enzim glikosida hidrolase. Penapisan kumpulan gen atau pustaka gen dapat ditempuh melalui teknik pustaka metagenomik. Teknik metagenomik terbagi dalam dua pendekatan, yaitu *functional-based* dan *sequence-based* (Schmeisser *et al.*, 2007). Pendekatan *functional-based* menganalisis pustaka metagenomik (*metagenomic library*) berdasarkan fungsi genom dari suatu organisme dengan tujuan mencari gen baru penghasil enzim tanpa mengetahui jenis organismenya terlebih dahulu. Pendekatan *sequence-based* menganalisis metagenomik berdasarkan urutan basanya yang digunakan untuk melihat keanekaragaman spesies dan kekerabatan bakteri (Yun & Ryu, 2005).

Strategi metagenomik telah digunakan untuk mengeksplorasi gen novel dari berbagai lingkungan dan ekosistem (Kanokratana *et al.*, 2015). Sekuensing gen dan genom yang bersumber dari mikroba hasil kultur menggunakan media di laboratorium, hanya berpeluang mendapatkan 0,1% dari keseluruhan komunitas mikroorganisme lingkungan. Berbeda dengan metagenomik, yang merupakan studi tentang semua materi genetik yang bersumber langsung dari sampel lingkungan tanpa perlu ditumbuhkan terlebih dahulu. Metagenomik berbasis fungsional memiliki tambahan keuntungan, yaitu tidak memerlukan informasi tentang sekuens gen yang telah ada sebelumnya (Mirete *et al.*, 2016). Selain itu, metagenomik berbasis fungsional merupakan metode yang efektif, karena penemuan gen didasarkan pada ekspresi gen tersebut dengan aktivitas nyata (Escuder-Rodríguez *et al.*, 2018).

METODE PENELITIAN

1. Metode Penelitian

Jenis penelitian dalam penelitian ini adalah penelitian survei yang bersifat deskriptif yaitu analisis hasil publikasi penelitian ilmiah yang terpublikasi pada jurnal internasional tentang penelitian fungsional metagenomik yang berhasil menemukan gen novel glikosida hidrolase.

2. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah jurnal ilmiah berskala internasional yang diterbitkan pada jurnal internasional bereputasi pada rentang tahun 15 tahun terakhir (2005-2020). Sampel yang diambil adalah hasil publikasi penelitian ilmiah yang terpublikasi pada jurnal internasional tentang penelitian fungsional metagenomik yang berhasil menemukan gen novel glikosida hidrolase. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik purposive sampling, sampel yang diambil harus memenuhi kriteria sebagai berikut: (1) artikel menggunakan metode penelitian eksperimen; (2) artikel berasal dari jurnal internasional yang bereputasi; (3) artikel merupakan penelitian kuantitatif; (4) artikel diterbitkan 15 tahun terakhir yaitu tahun 2005-2022.

3. Tahap Penelitian

Teknik pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi dengan bantuan alat pengumpulan data berupa blangko isian. Prosedur dalam penelitian ini disesuaikan dengan langkah-langkah melakukan meta-analisis yang disarankan oleh David B. Wilson dan George A. Kelley, yaitu: 1) Menetapkan masalah atau topik yang hendak diteliti; 2) Menentukan periode hasil-hasil penelitian yang dijadikan sumber data; 3) Mencari laporan penelitian yang berkaitan dengan masalah atau topik yang hendak diteliti; 4) Membaca judul dan abstrak laporan penelitian untuk melihat kesesuaian isinya dengan masalah yang akan diteliti; 5) Memfokuskan penelitian pada masalah, metodologi penelitian seperti jenis penelitian, tempat dan waktu penelitian, metode, populasi, sampel, teknik penarikan sampel, teknik analisis data, dan hasil; 6) Mengkategorikan masing-masing penelitian; 7) Membandingkan hasil semua penelitian sesuai dengan kategorinya; 8) Menganalisis kesimpulan yang ditemukan dengan mengkaji hasil-hasil penelitian itu dengan mengkaji metode dan analisis data dalam setiap penelitian sehingga dapat diketahui keunggulan dan kelemahan penelitian yang dilakukan sebelumnya; 9) Menarik kesimpulan penelitian meta-analisis atas dasar langkah ketujuh dan kedelapan di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelusuran pustaka jurnal internasional dari database ScienceDirect menggunakan kata kunci metagenomic dan glycoside hydrolase dengan rentang waktu dari 2005 hingga 2022 diperoleh sebanyak 478 judul research articles. Penelusuran selanjutnya lebih dikhususkan pada hasil penelitian tentang functional metagenomic yang mengeksplorasi gen fungsional glikosida hidrolase sehingga diperoleh 86 judul jurnal hasil penelitian. Judul-judul penelitian dan abstrak dari hasil penelitian selanjutnya dipilih dan ditinjau kesesuaiannya dengan topik penelitian tentang efektivitas strategi metagenomik dalam eksplorasi gen-gen target terutama glikosida hidrolase. Analisis pada penelitian ini selanjutnya lebih difokuskan pada kajian tentang enzim glikosida hidrolase, klasifikasi glikosida hidrolase, dan efektivitas strategi fungsional metagenomik dalam mengeksplorasi gen target glikosida hidrolase.

1. Enzim Glikosida Hidrolase

Lignoselulosa tersusun atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Diantara ketiganya, selulosa merupakan molekul organik paling melimpah dibandingkan yang lain (Ueda *et al.*, 2013). Selulosa merupakan senyawa polisakarida yang tersusun atas satuan β -D-glukopyranosa yang tergabung melalui ikatan 1,4-glikosidik. Selulosa merupakan komponen utama pada dinding sel tanaman (Sakamoto & Toyohara, 2009). Antara selulosa dan lignin dihubungkan oleh hemiselulosa. Komponen terbesar pada hemiselulosa adalah xylan. Perbedaan selulosa dan hemiselulosa adalah selulosa lebih

mudah larut pada asam dan sukar larut pada alkali, tetapi hemiselulosa lebih mudah larut pada alkali dan sukar larut pada asam.

Selulosa dapat terdegradasi oleh golongan enzim selulase. Ada tiga tipe enzim selulase fungsional yang dapat menghidrolisis selulosa menjadi gula. Pertama, 1,4- β -glukan selobiohidrolase (exo-glukanase; EC 3.2.1.91) yang mendegradasi unit selobiosa pada ujung polimer selulosa. Kedua, endo-1,4- β -glukanase (endo-glukanase; EC 3.2.1.4) secara acak mendegradasi bagian dalam dari ikatan 1,4- β -glikosidik menjadi selo-oligosakarida dengan berbagai ukuran panjang. Ketiga, 1,4- β -glukosidase (EC 3.2.1.21) memotong selo-oligosakarida menjadi glukosa melalui suatu proses sakarifikasi (Chu *et al.*, 2011; Ueda *et al.*, 2013).

Selulase diklasifikasikan menjadi 14 *glycoside hydrolase family* (GHF) antara lain GHF 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 dan 74. Ada lima famili yang dilaporkan ada pada hewan yaitu GHF5, GHF6, GHF9, GHF10 dan GHF45. GHF9 yang paling banyak ditemukan tersebar dengan berbagai tipe selulase hewan (Sakamoto *et al.*, 2009).

Laminarinase atau β -1,3-glukanase merupakan golongan enzim digestif hemiselulase yang menunjukkan aktifitas tinggi dalam menghidrolisis ikatan β -1,3-glikosidik pada β -1,3-glukan seperti laminarin. β -1,3-glukanase termasuk golongan GHF16 ditemukan pada jaringan pencernaan decapoda yaitu Gecarcoidea natalis dan Cherax destructor. Enzim ini mampu mendegradasi selulosa dan hemiselulosa (Linton *et al.*, 2015).

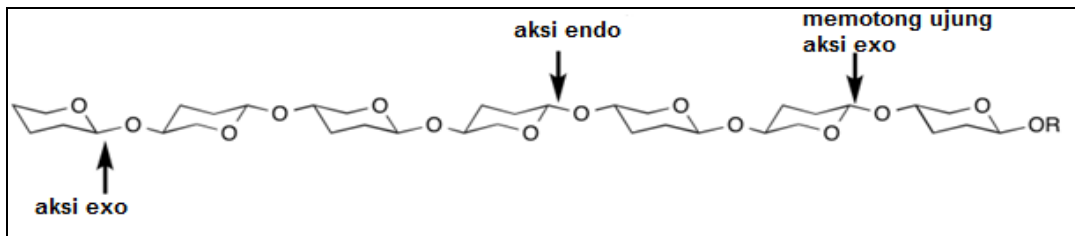
2. Klasifikasi Glikosida Hidrolase

Glikosida hidrolase merupakan kelompok enzim yang dihasilkan oleh hampir seluruh organisme hidup (Naumoff, 2011). Domain katalitik glikosida hidrolase hingga saat ini dikelompokkan dalam 156 famili berbasis sekuen asam amino dalam klasifikasi internasional *Carbohydrate-Active Enzyme* (CAZy). Jenis klasifikasi glikosida hidrolase didasarkan pada: 1. **Reaksi Endo/exo**; 2. **Enzyme Commission (EC) number**; 3. **Klasifikasi mekanistik**; dan 4. **Klasifikasi berbasis sekuen**.

Nomenklatur atau sistem tata nama enzim secara konvensional menurut *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) didasarkan pada spesifisitas substrat dan mekanisme molekulernya. Tata nama dengan klasifikasi IUBMB tidak menggambarkan struktur dan fitur mekanis enzim (Wyk *et al.*, 2017). Glikosida hidrolase (EC 3.2.1.-3.2.3) merupakan kelompok enzim yang menghidrolisis ikatan glikosida antara dua atau lebih karbohidrat atau antara karbohidrat dengan non karbohidrat (Henrissat *et al.*, 1995). Lebih spesifik glikosida hidrolase (GH) diberikan nomor klasifikasi enzim EC 3.2.1.x yang didefinisikan sebagai kelompok enzim yang mampu menghidrolisis ikatan glikosidik pada senyawa O- dan S-glikosil (Naumoff, 2011). Digit terakhir pada sistem tata nama IUBMB tergantung pada struktur substrat dan produk reaksi katalitiknya. Walau demikian, sistem tata nama ini masih digunakan hingga saat ini (Wyk *et al.*, 2017).

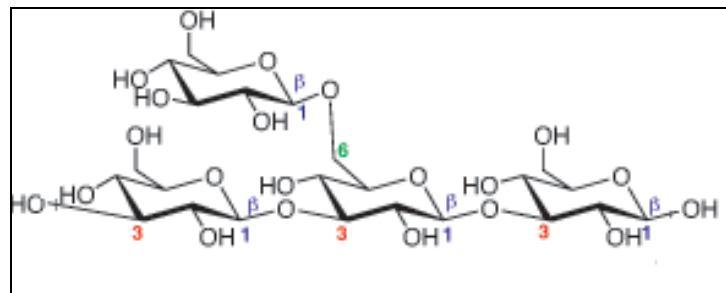
Klasifikasi glikosida hidrolase dalam suatu famili yang didasarkan pada kemiripan sekuen asam amino telah diusulkan beberapa tahun yang lalu (Henrissat *et al.*, 1995). Ada keterkaitan antara sekuen asam amino dan kemiripan folding dalam suatu sistem tata nama. Klasifikasi ini dikembangkan dalam sistem database yang disebut *Carbohydrate Active Enzyme* (CAZy) (Cantarel *et al.*, 2009). Klasifikasi GH dengan sistem CAZy dapat dilakukan dalam beberapa cara yang berbeda, tergantung pada stereokimia ikatan yang dapat diputuskan dan stereokimia produk (Wyk *et al.*, 2017). Database CAZy mengklasifikasikan GH dalam famili-famili berdasarkan kemiripan sekuen asam amino dan residu katalitik sebagai *conserved features* pada sebagian besar famili GH (Vuong and Wilson, 2010; Abot *et al.*, 2016). Salah satu golongan glikosida hidrolase adalah β -glukanase.

β -glukanase dibedakan berdasarkan aksinya (tipe glukanase endo- atau exo-) dan jenis substrat yang dihidrolisis. Glukanase exo- mengkatalis hidrolisis rantai β -glukan memutuskan residu glukosa dari ujung nonreduksi dan melepaskan glukosa sebagai produk hidrolisis. Glukanase endo- memutuskan ikatan β pada bagian yang acak sepanjang rantai polisakarida, melepaskan oligosakarida yang lebih pendek (Peng *et al.*, 2011).



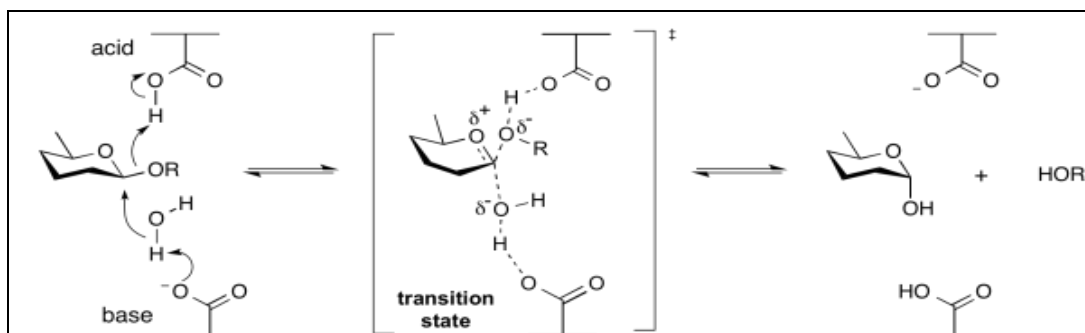
Gambar 1. Aktivitas exo- dan endo- glikosida hidrolase terhadap substrat

β -glukan ditemukan tersebar luas di alam, dengan 1,4- β -glukan selulosa yang paling melimpah. β -glukan ditemukan pada tanaman, mikroorganisme, dan invertebrata. Polimer β -glukan tersusun atas glukosa yang tergabung dalam konfigurasi β pada ikatan glikosidik. Beberapa β -glukan seperti curdlan dan paramylon (1,3- β -glukan) dan pustulan (1,6- β -glukan) mempunyai struktur yang relatif sederhana yang terdiri atas satu tipe ikatan dalam rantai tidak bercabang. Sedangkan barley- β -glukan (1,3-1,4- β -glukan) dan laminarin (1,3-1,6- β -glukan) mempunyai struktur yang lebih kompleks dengan tipe keragaman ikatan linear dan bercabang (Martin *et al.*, 2007).

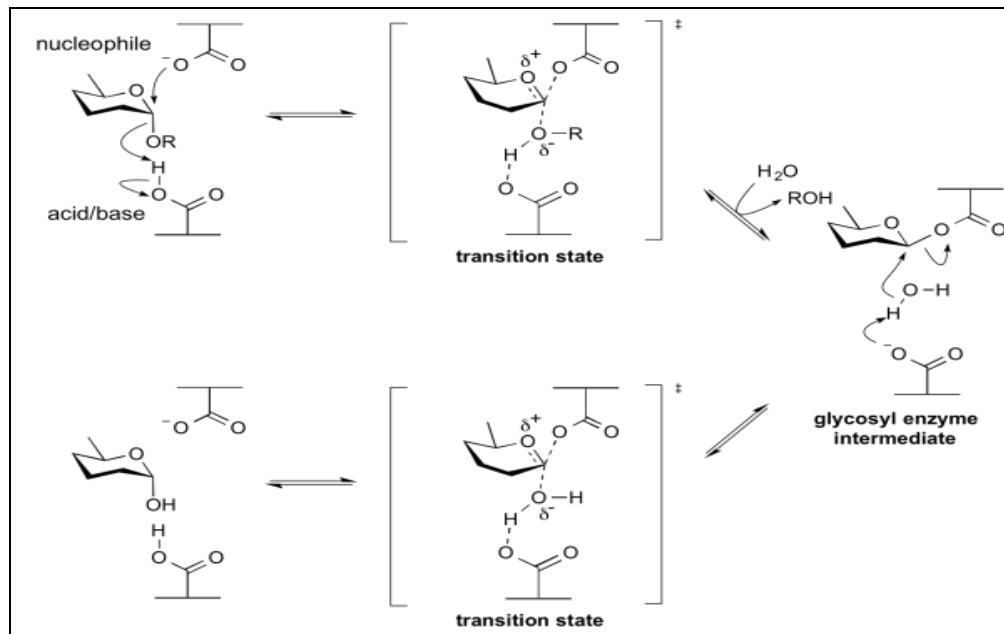


Gambar 2. Struktur rantai utama 1,3- β -glukan dan rantai cabang 1,6- β -glukan

Glikosida hidrolase digolongkan berdasarkan dua mekanisme reaksi retensi dan inversi, berdasarkan perubahan konfigurasi oksigen anomerik selama reaksi. Suatu tipe glikosidase inversi memerlukan sebuah residu katalitik asam dan residu katalitik basa, sedangkan tipe retensi memerlukan sebuah residu asam/basa dan sebuah nukleofil (Vuong & Wilson, 2010). Reaksi inversi biasanya terjadi dengan bantuan general asam dan general basa dari dua rantai samping asam amino (biasanya glutamat atau aspartat) yang jarak keduanya 9-10 Å. Reaksi retensi terjadi dengan bantuan asam/basa dan nukleofil yang diberikan oleh rantai samping asam amino (glutamat atau aspartat) yang letaknya terpisah 5-6 Å (Naumoff, 2011).



Gambar 3. Mekanisme reaksi inversi



Gambar 4. Mekanisme reaksi retensi

3. Eksplorasi Gen Glikosida Hidrolase Menggunakan Pendekatan Pustaka Metagenomik cDNA

Metagenomik merupakan suatu metode yang bertujuan untuk mengumpulkan dan mengkarakterisasi bahan genetik secara langsung dari lingkungan atau habitatnya (Yoon *et al.*, 2013). Pendekatan metagenomik menggabungkan beberapa bidang ilmu, seperti genetika, mikrobiologi, dan bioinformatika (Handelsman, 2007). Pendekatan metagenomik secara umum terdiri atas empat tahap, yaitu (1) konstruksi pustaka metagenomik (pengumpulan gen-gen dari mikroba), (2) penapisan atau *screening* pustaka metagenomik (penyeleksian gen-gen penyandi enzim-enzim tertentu), (3) analisis urutan gen (analisis urutan asam aminonya), dan (4) ekspresi gen.

Penapisan pustaka metagenomik bertujuan untuk menyeleksi gen-gen yang menyandi suatu enzim. Ada dua pendekatan yang bisa dilakukan pada proses penapisan pustaka metagenomik, yaitu: (1) dengan mendeteksi produk enzim yang dihasilkan, dan (2) dengan mendeteksi enzim melalui hibridisasi *in situ*. Penapisan produk enzim, dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain: (1) melalui uji degradasi substrat (*substrate degradation-based assay*), (2) melalui uji berdasarkan pendaran warna (*chromogenic and fluorogenic assay*), dan (3) melalui uji imunologi menggunakan metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) kompetitif. Jika enzim tidak dapat diekspresikan, maka penapisan pustaka metagenomik dapat dilakukan dengan pendekatan hibridisasi *in-situ* (Uria *et al.*, 2005).

Berdasarkan tujuan yang diinginkan dari pendekatan metagenomik, terdapat dua metode analisa yang dilakukan, yaitu *function-based* dan *sequence-based*. Analisa *function-based* dilakukan dengan cara mengkonstruksi klon DNA genomik dan selanjutnya dilakukan penapisan dari klon DNA genomik berdasarkan ekspresi fenotif yang diinginkan. Klon DNA genomik dilakukan pengujian untuk melihat ada dan tidak adanya aktivitas enzim tertentu. Keunggulan dari analisa *function-based* adalah mendapatkan keseluruhan gen fungsional yang mengkode dan mengekspresikan suatu fungsi yang diharapkan (Yun dan Ryu, 2005).

Analisa metagenomik *sequence-based* merupakan metode untuk melihat kekerabatan mikroorganisme dengan bantuan bioinformatika. Klon DNA metagenomik dilihat urutan basanya dan kemudian disusun menjadi pohon filogeni. Metode analisa tersebut melibatkan penggunaan PCR dan primer-primer spesifik untuk mengisolasi dan memperbanyak suatu daerah target pada DNA genomik.

Hasil dari PCR selanjutnya digunakan untuk konstruksi pustaka genomik (Uria dkk., 2005). penelitian-penelitian yang telah berhasil menemukan gen novel menggunakan strategi metagenomik (Tabel 1).

Tabel 1. Beberapa hasil penelitian dengan strategi metagenomik (dilengkapi dari data Kurniawati *et al.*, 2018)

No	Sampel/sumber metagenom	Estimasi jumlah pustaka	Gen target	Referensi
1.	Metagenom tanah	1,700 klon plasmid	1 gen endoglukanase	(Voget <i>et al.</i> , 2006)
2.	Tanah hutan, kotoran gajah, rumen sapi, dan metagenom pohon yang membusuk	1 – 4 . 10 ⁴ phages	5 gen β -1,4-glukanase dan 2 gen β -glukosidase	(Wang <i>et al.</i> , 2009)
3.	Metagenom kompos hijau sampah daun	225 Mbp, 800 gen	Glikosida Hidrolase (GH5 and GH9)	(Allgaier <i>et al.</i> , 2010)
4.	Metagenom usus <i>Globitermes sulphureus</i>		1 gen β -1,4-endoglukosidase	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
5.	Metagenom koloni mikroba intestinal mamalia	10 ⁶ titers	β -1,3-1,4-glukanase	(Yoon <i>et al.</i> , 2013)
6.	Metagenom mikroba tanah dan cairan rumen	29,006 fosmid klon	4 genes exocelluloses	(Ko <i>et al.</i> , 2013)
7.	Metagenom rumen sapi	20,160 klon	β -glukosidase	(Li <i>et al.</i> , 2014)
8.	Metagenom tanah	24,000 klon plasmid	1 gen endoglukanase	(Xiang <i>et al.</i> , 2014)
9.	Metagenom ampas tebu	120,000 klon fosmid	1 gen endoglukanase dan 1 gen endoxylanase	(Kanokratana <i>et al.</i> , 2015)
10.	Metagenom rumen sapi		1 gen selulase dan 1 gen xylanase	(Kang <i>et al.</i> , 2015)
11.	Metagenom tanah	7,500 klon fosmid	1 gen β -1,4-endoglukosidase	(Pandey <i>et al.</i> , 2016)
12.	Metagenom rumen sapi	38.400 klon fosmid	1 gen selulase	(Li <i>et al.</i> 2016)

Keberhasilan konstruksi pustaka ekspresi metagenomik seperti data pada Tabel 1 di atas didukung oleh efisiensi setiap tahapan pada proses konstruksi pustaka metagenomik, antara lain pemilihan dan penggunaan vektor yang dapat menerima gen insert dengan ukuran besar, proses fraksinasi yang mampu mengeliminasi fragmen cDNA berukuran kecil, dan proses optimasi ligasi yang sangat berpengaruh terhadap tingginya titer hasil konstruksi pustaka ekspresi metagenomik. Data yang tersaji pada Tabel 1 di atas menunjukkan bahwa strategi metagenomik begitu efektif dalam mengeksplorasi gen-gen target termasuk gen-gen baru yang termasuk dalam klasifikasi gen penyandi glikosida hidrolase.

SIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan yang diperoleh bahwa data-data hasil penelitian eksplorasi gen dari berbagai sumber genom menggunakan strategi metagenomik menunjukkan keberhasilan hingga menghasilkan ribuan klon dalam pustaka metagenomik. Hasil penelusuran data pustaka metagenomik yang berhasil terangkum menjadi bukti efektivitas strategi metagenomik dalam menemukan gen target glikosida hidrolase dan peluang penemuan gen target yang lain.

Saran bagi penelitian selanjutnya adalah lebih mengeksplorasi tentang faktor-faktor yang menentukan dan berpengaruh bagi keberhasilan strategi metagenomik, tidak hanya untuk gen glikosida hidrolase melainkan untuk gen-gen target yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Abot, A., Arnal, G., Auer, L., Lazuka, A., Labourdette, D., Lamrre, S., Trouilh, L., Laville, E., Lombard, V., Potocki-Veronese, G., Henrissat, B., O'Donohue, M., Hernandez-Raquet, G., Dumon, C., & Leberre, V.A. 2016. CAZyChip: Dynamic Assessment of Exploration of Glycoside Hydrolases in Microbial Ecosystems. *BMC Genomics*. 17: 1-12.
- Allgaier, M., Reddy, A., Park, J.I., Ivanova, N., D'haeseleer, P., Lowry, S., Sapra, R., Hazen, T.C., Sommons, B.A., VanderGheynst, J.S., & Hugenholtz, P. 2010. Targeted Discovery of Glicoside Hydrolases from a Switchgrass-Adapted Compost Community. *PloS ONE*. 5 (1): e8812.
- Chu, C.Y., Tseng, C.W., Yueh, P.Y., Duan, C.H., & Liu, J.R.. 2011. Molecular Cloning and Characterization of a β -Glucanase from *Piromyces rhizinflatus*. *Journal of Bioscience & Bioengineering*. 111(5): 541-546.
- Escuder-Rodríguez, J.J., Decastro, M.E., Becerra, M., Rodríguez-Belmonte, E., & Gonzalez-Siso, M.I. 2018. Advances of Functional Metagenomics in Harnessing Thermozyms. *Metagenomics*. Chapter 15.
- Handelsman, J. 2007. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology Molecular Biology*. 68(4): 669-685.
- Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.P., & Davies, G. 1995. Conserved Catalytic Machinery and The Prediction of a Common Fold for Several Families of Glycosyl Hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 7090-7094.
- Indah, M. 2004. Enzim. *Digitized by USU digital library*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- Kurniawati M, Purkan, Sumarsih S, Baktir A. Metagenomic DNA Library: Exploration of Novel Genes Encoding Glycoside Hydrolases. *Int J Eng Technol*. 2018;7(4.7):472.
- Kurniawati M, Halimah N, Hudha M N, Sudiyono S, Purkan P, Sumarsih S and Baktir A 2019 Construction and Screening Beta-Glucanase Activity of Metagenomic cDNA Expression Library of Digestive Gland of *Achatina fulica* *International Journal of Pharmaceutical Research* 11(1) 67-73
- Kang, Y.M., Kim, M.K., An, J.M., Haque, M.A., & Cho, K.M. 2015. Metagenomics of Un-Culturable Bacteria in Cow Rumen: Construction of *cel9E-xyn10A* Fusion Gene by Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 113: 29-38.
- Kanokratana, P., Eurwilaichitr, L., Pootanakit, K., & Champreda, V., 2015. Identification of Glycosyl Hydrolases from a Metagenomic Library of Microflora in Sugarcane Bagasse Collection Site and Their Cooperative Action on Cellulose Degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119 (4): 384-391.
- Ko, K.C., Han, Y., Cheong, D.E., Choi, J.H., & Song, J.J. 2013. Strategy for Screening Metagenomic Resources for Exocellulase Activity Using A Robotic, High-Throughput Screening System. *Journal of Microbiological Methods*. 94: 311-316.
- Li, Y., Liu, N., Yang, H., Zhao, F., Yu, Y., Tian, Y., & Lu, X. 2014. Cloning and characterization of a new β -Glucosidase from a metagenomic library of Rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. *BMC Biotechnology*. 14(85): 1-9.
- Li, B.F., Zhu, Y.X., Gu, Z.B., Chen, Y, Leng, J., Guo, X., Feng, L., Li, Q., Xi, D.M., Mao, H.M., & Yang, S.L. 2016. Screening and Characterization of a Novel Ruminant Cellulase Gene (Umccl-1) from a Metagenomic Library of Gayal (*Bos frontalis*). *Journal of Integrative Agriculture*. 15(4): 855-861.
- Linton, S.M., Cameron, M.S., Gray, M.C., Donald, J.A., Saborowski, R., Bergen, M.V, Tamm, J.M., & Allardyce. 2015. A Glycosyl Hydrolase Family 16 Gene is Responsible for the Endogenous Production of β -1,3-Glucanases within Decapod Crustaceans. *Gene*. 569: 203-217.
- Martin, K., McDougall, B.M., McIlroy, S., Jayus, Chen, J. & Seviour, R.J. 2007. Biochemistry and Molecular Biology of exocellular Fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-Glucanases. *FEMS Microbiological Reviews*. 31: 168-192.
- Mirete, S., Morgante, V., & Pastor, J.E.G. 2016. Functional metagenomics of extreme environments. *Current Opinion Biotechnology*. 38: 143-149.

- Naumoff, D.G. 2011. Hierarchical Classification of Glycoside Hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*. 76: 764-780.
- Pandey, S., Gulati, S., Goyal, E., Singh, S., Kumar, K., & Nain, L. 2016. Construction and Screening of Metagenomic Library Derived from Soil for β -1,4-Endoglucanase Gene. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 5: 186-192.
- Peng, Y., Liu, G.L., Yu, X.J., Wang, X.H, Jing, L., & Chi, Z.M. 2011. Cloning of Exo- β -1,3-glucanase Gene from a Marine Yeast *Williopsis saturnus* and Its Overexpression in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology*. 13: 193-204.
- Sakamoto, K., & Toyohara, H. 2009. Molecular Cloning of Glycoside Hydrolase Family 45 Cellulase Genes from Brackish Water Clam *Corbicula japonica*. *Comparative Biochemistry & Physiology*. Part B. 152: 390-396.
- Schmeisser, C., Steele, H., & Streit, W.R. 2007. Metagenomics with non-culturable microbes. *Application Microbiology & Biotechnology*. 75: 955-962.
- Ueda, M., A., Ito, A., Nakazawa, M., Miyatake, K., Sakaguchi, M., & Inouye, K. 2014. Cloning and Expression of The Cold-Adapted endo-1,4- β -Glucanase gene from *Eisenia fetida*. *Carbohydrate Polymers*. 101: 511-516.
- Uria, A.R., Fawzya, Y.N., & Chasanah, E. 2005. Eksplorasi Enzim Mikroba dari Lingkungan Laut Melalui Pendekatan Metagenomika. *WPPI*. 11(7): 17-24.
- Voget, S., Steele, H.L., & Streit, W.R. 2006. Characterization of a Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase. *Journal of Biotechnology*, 126: 26-36.
- Vuong, T.V. & Wilson, D.B. 2010. Glycoside Hydrolases: Catalytic Base/Nucleophile Diversity. *Biotechnology and Bioengineering*. 107: 195-205.
- Wang, F., Li, F., Chen, G., & Liu, W. 2009. Isolation and Characterization of Novel Cellulase genes from Uncultured Microorganisms in Different Environmental Niches. *Microbiological Research*. 164: 650-657.
- Wang, Q., Qian, C., Zhang, X.Z., Liu, N., Yan, X., & Zhou, Z. 2012. Characterization of a Novel Thermostable β -Glucosidase from a Metagenomic Library of Termite Gut. *Enzyme and Microbial Technology*. 51: 319-324.
- Wyk, N.V., Drancourt, M., Henrissat, B. & Kremer L. 2017. Current Perspectives on The Families of Glycoside Hydrolases of *Mycobacterium tuberculosis*: Their Importance and Prospects for Assigning Function to Unknowns. *Glycobiology*. 27: 112-122.
- Xiang, L., Li, A., Tian, C., Zhou, Y., Zhang, G., and Ma, Y., *Identification and characterization of a new acid-stable endoglucanase from a metagenomic library*. *Protein Expr. Purif.*, vol. 102, pp. 20–26, 2014.
- Yoon, M.Y., Lee, K.M., Yoon, Y., & Go, J. 2013. Functional Screening of a Metagenomic Library Reveals Operons Responsible for Enhanced Intestinal Colonization by Gut Commensal Microbes. *Applied & Environmental Microbiology*. 79(12): 3829-3838.
- Yun, J. & Ryu, S. 2005. Screening for novel enzymes from metagenome & SIGEX. as a way to improve it. *Microbial Cell Factories*. 4(8): 1-5.