

**KONSTRUKSI DAN EKSPRESI
REKOMBINAN TUNGGAL PEPTIDA SURFAKTAN
(SINGLE SUPEL CONSTRUCTION) UNTUK APLIKASI EOR
(Construction and Expression of Single Recombinant
Peptide Surfactant for Eor Application)**

Cut Nanda Sari¹, Usman P¹, Riesa K. W. Rohmat², Leni Herlina¹, Ken Sawitri Suliandari¹, Onie Kristiawan¹,
Dwiyantari², Tati Kristianti², dan Sony Suhandono²

¹Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi "LEMIGAS"
Jl. Ciledug Raya Kav.109, Cipulir, Kebayoran Lama, Jakarta Selatan
Telepon: +62-21-7394422, Fax.: +62-21-7246150

²Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati – Institut Teknologi Bandung

Email: nanda@lemigas.esdm.go.id; sony@sith.itb.ac.id; upasarai@lemigas.esdm.go.id;
herlina@lemigas.esdm.go.id; kenss@lemigas.esdm.go.id; oniek@lemigas.esdm.go.id

Teregistrasi I tanggal 8 Maret 2016; Diterima setelah perbaikan tanggal 1 Agustus 2016;
Disetujui terbit tanggal: 30 Desember 2016.

ABSTRAK

Surfaktan yang digunakan pada aplikasi peningkatan perolehan minyak tahap lanjut pada umumnya merupakan hasil sintesis kimia. Hasil sintesis ini bersifat cepat dan efektif namun secara kuantitas sangat kecil, sehingga bila dibutuhkan dalam jumlah banyak akan membutuhkan banyak biaya untuk memproduksinya. Alternatif lain yang bisa digunakan untuk menghasilkan surfaktan adalah dengan rekayasa genetika melalui produksi rekombinan dalam mikroorganisme seperti bakteri untuk menghasilkan surfaktan berbasis peptida. Teknologi ini relatif murah dan simpel untuk dilakukan yaitu dengan manipulasi ekspresi sel inang agar menghasilkan peptida surfaktan yang dikonstruksi ke dalam vektor ekspresi berbasis bakteri. Pada penelitian ini dilakukan konstruksi peptida surfaktan dengan menggunakan metode overlapped reaksi berantai polimerase untuk menghasilkan surfaktan peptida sebagai peptida tunggal. Hasil analisis SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) menunjukkan konstruksi peptida surfaktan tunggal dapat diekspresikan dengan cara diinduksi IPTG 1 mM dan dilakukan pemecahan sel untuk mendapatkan protein yang diproduksi diperiplasma. Penelitian ini membuktikan bahwa kedua konstruk berhasil diekspresikan dengan menghasilkan peptida pada ukuran yang sesuai.

Kata Kunci: *peptida surfaktan, rekombinan tunggal, metode reaksi berantai polimerase, perolehan minyak tahap lanjut.*

ABSTRACT

Surfactant that is used in enhanced oil recovery applications is generally synthetic chemical result. This synthetic result is quick and effective but very small in quantity, so if the demand in great amount, the more expensive cost needed. The other possible alternative to produce surfactant is by genetic engineering through recombinant production in micro organism such as bacteria to produce peptide based surfactant. This technology is relatively cheap and simple to be implemented, that is by manipulating bacterial based main cell expression. In this research, construction of peptide surfactant using overlapped polymerase chain reaction method to generate surfactant peptide as single peptide. Analysis result of SDS poly acrilamid gel electrophoresis shows that single surfactant peptide construction can be expressed by induction of IPTG 1 mM and also cell cracking to obtain protein which is produced by diperiplasma. This research proves that both two constructions have been successfully expressed by producing peptide in suitable size.

Keywords: *surfactant peptide, single recombinant, PCR method, enhanced oil recovery.*

I. PENDAHULUAN

Perolehan minyak bumi dari sumur produksi masih belum berjalan secara optimal karena metode tradisional masih dilakukan sehingga tidak dapat memenuhi target perolehan minyak mentah yang dibutuhkan (Bachmann et al. 2014). Permasalahan lain dari industri perminyakan adalah pemisahan molekul lain dari minyak mentah. Industri perminyakan sebaiknya memanfaatkan sumur-sumur produksi yang sudah ada maupun yang sudah ditinggalkan (Brown & Vadie, 2000). Perolehan minyak secara primer memerlukan biaya yang mahal dengan hasil hanya sebesar 20% -50% dari OOIP (*original oil in place*) (Sandrea & Sandrea, 2007). Oleh karena itu, diperlukan teknologi perolehan minyak yang lebih baik serta mengurangi biaya produksi.

Salah satu teknologi yang sudah ada saat ini adalah menggunakan surfaktan sebagai pembentuk emulsi antara minyak dan air. Emulsi antara minyak dan air dapat membuat perolehan minyak menjadi lebih mudah dilakukan dan dapat meningkatkan perolehan minyak mentah hingga 30%-200% lebih banyak. Namun, surfaktan yang ada saat ini tidak ramah lingkungan karena sulit didegradasi di alam. Menurut Salter et al. (2011) salah satu contoh dari surfaktan yang tidak ramah lingkungan adalah *Oleyl alcohol* ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{-CH=CH-(CH}_2)_8\text{OH}$) yang diproduksi secara sintetik. Senyawa ini dapat menyebabkan kerusakan pada hidrodinamika perairan terbuka dan mempengaruhi efektivitas pertukaran CO_2 yang merugikan bagi kehidupan laut. Selain itu, *Oleyl alcohol* juga bersifat iritan terhadap manusia terutama pada kulit dan mata. Menghasilkan surfaktan yang lebih ramah lingkungan adalah dengan memproduksi secara alami (biosurfaktan). Produksi biosurfaktan menggunakan mikroba alami biasa disebut dengan teknologi *MEOR*. *MEOR* atau *microbial enhanced oil recovery* adalah teknologi yang menggunakan mikroba dan jalur metabolisme untuk menambah perolehan minyak (Bachmann et al. 2014). Perolehan minyak menggunakan mikroba yang dikembangkan menjadi biosurfaktan telah berkembang dilihat dari banyaknya penelitian yang menghasilkan dan mempelajari tentang biosurfaktan (Desai & Banat, 1997; Van Hamme et al. 2003; Sandrea & Sandrea, 2007; Maneerat, 2005; Dwyer et al. 2014; Pacheco et al. 2010). Namun biosurfaktan yang menggunakan mikroba alami juga memiliki kelemahan yaitu produk sulit distandarisasi kualitasnya. Oleh karena itu perlu dikembangkan

biosurfaktan secara rekombinan agar mutu lebih terjamin.

Biosurfaktan berbasis peptida pada penelitian ini telah dibuat sekuen asam aminonya oleh Lemigas. Sekuen peptida ini kemudian disebut sebagai Supel. Namun produksinya belum dapat dilakukan skala besar dan akan diproduksi secara rekombinan. Penelitian ini bertujuan untuk membuat Supel dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan. Sekuen peptida diterjemahkan kedalam sekuen DNA dengan pertimbangan *codon usage* optimal pada *E. coli*, kemudian DNA tersebut di buat secara sintetik dan di konstruksi ke plasmid pET 32-b + yang kemudian disebut sebagai SSC (*Single Supel Construction*). Peptida akan di produksi oleh sel *E. coli* secara alami dan hasilnya di analisis menggunakan *Poli Akrilamid Gel Electrophoresis* (PAGE).

II. BAHAN DAN METODE

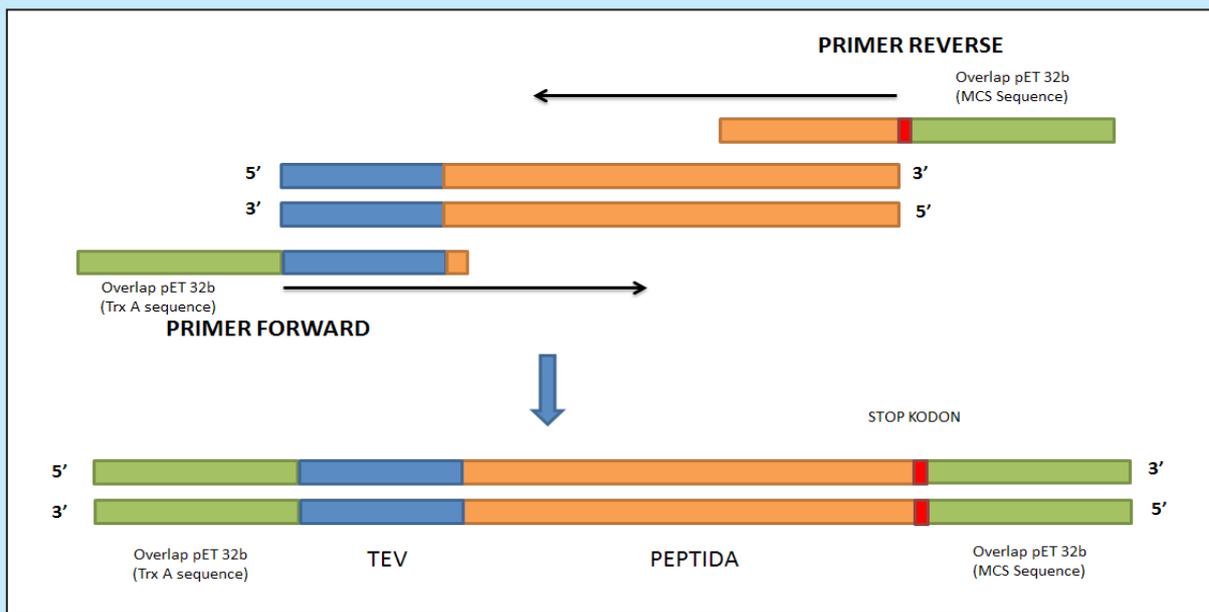
A. Optimasi Codon Usage Supel

Pada penelitian ini akan digunakan sel inang *Escherichia coli strain BL21 (DE3)*, oleh karena itu perlu dilakukan optimasi *codon usage* urutan asam amino peptida surfaktan yang optimum untuk diekspresikan pada sel inang. *Codon Adaptation indeks* (CAI) dengan referensi gen gen yang di ekspresikan tinggi pada *E. coli* (Maloy et al. 1996). Sekuen asam amino *Supel* pada penelitian ini diperoleh dari LEMIGAS, Jakarta. Selanjutnya dengan menggunakan program bioinformatika dilakukan optimasi kodon terhadap urutan asam amino tersebut yang disesuaikan dengan *codon usage* pada bakteri.

Pada penelitian ini dibuat konstruk *Single Supel Construction* (SSC) yang merupakan konstruk pET-32b(+) rekombinan yang membawa satu untai basa *Supel*.

B. Disain Single Supel Construction

1. Metode untuk membuat konstruk SSC adalah metode *overlap PCR*. Pada konstruksi ini tidak digunakan DNA sekuen peptida sintetik, akan tetapi sintesis DNA sekuen peptida dengan menggunakan metode *PCR walking*. Pada primer juga dirancang untuk membawa sekuen untuk penambahan sisi pengenalan TEV protease. Sepasang primer dirancang untuk mempunyai sekuen (30bp) yang saling komplemen di bagian ujung 3'. Pasangan primer spesifik yang digunakan untuk amplifikasi [TEV + nukleotida penyusun surfaktan] adalah: primer TEV-F dan primer TEV-R.



Gambar 1

Desain primer untuk overlap ekstension PCR. Primer forward memiliki panjang total 56 pasang basa terdiri dari 30 pasang basa yang overlap dengan Trx tag dari pet-32b (hijau) dan 26 pasang basa yang overlap dengan urutan TEV dan nukleotida penyusun surfaktan (biru dan orange). Primer reverse memiliki panjang total 51 pasang basa terdiri dari 28 pasang basa yang overlap dengan bagian MCS dari pet-32b (hijau), 3 basa stop kodon (merah), dan 20 pasang basa dengan nukleotida penyusun surfaktan (orange).

2. Profil PCR amplifikasi TEV dan nucleotida pengkode surfaktan diawali dengan pre-denaturasi 95°C selama 3 menit, siklus 1 sebanyak 15 kali (95°C selama 30 detik, 55°C selama 30 menit, 72°C selama 1 menit), siklus 2 sebanyak 10 kali (95°C selama 30 detik, *touchdown* suhu *annealing* 55-50°C selama 30 detik, 72°C selama 1 menit), siklus 3 sebanyak 15 kali (95°C selama 30 detik, 50°C selama 30 menit, 72°C selama 1 menit), elongasi tambahan suhu 72°C selama 7 menit dan 4°C untuk menonaktifkan enzim. Produk PCR selanjutnya menjadi template untuk sepasang primer yang *overlap PCR*. Pada gambar 1. menunjukkan desain PCR konstruksi TEV dan nukleotida. Primer didesain memiliki Tm= 60-65°C pada bagian yang overlap dengan vektor pET-32b. Primer yang overlap dengan vektor pET-32b memiliki panjang antara 25-35 pasang basa. Primer untuk overlap ekstension PCR memiliki panjang 15-20 pasang basa untuk bagian yang overlap dengan templat [TEV + nukleotida surfaktan].
3. Produk PCR selanjutnya direaksikan dengan enzim *DpnI* yang akan mencerna template (vektor pET-32b+) yang masih tersisa ketika proses PCR selesai. Enzim ini akan mendegradasi vektor pET-32b+ *wild type* karena vektor ini secara

endogenous sudah termetilasi. Hasil penambahan enzim *DpnI* ini hanya akan menyisakan produk *overlap PCR* dan otomatis bisa ditransformasikan kedalam sel inang bakteri *Eschericia colli strain BL21 (DE3)*.

4. Konfirmasi sisipan *Supel* dengan PCR (*Polymerase chain reaction*), enzim restriksi dan sekuensing. Plasmid putatif rekombinan diamplifikasi dengan menggunakan sekuen primer Primer *forward TEV-PEP_F* dan Primer *reverse TEV-PEP_R* dengan menggunakan *Green Taq Ready Mix*. Sekuensing dilakukan di Macrogen Inc. Korea dengan dua arah yakni menggunakan primer universal T7 promoter dan T7 terminator. Hasil sekuensing kemudian dianalisis dan di alignment dengan beberapa perangkat lunak seperti Bioedit dan SnapGene™ v.1.1.3.

C. Uji Ekspresi *Single Supel Construction*

Hasil konstruk SSC dengan menggunakan *overlap PCR* kemudian ditransformasikan dan dibuat stok gliserol. Sesudah itu stok gliserol tersebut, *distreak* ke medium LB (Luria Bertani) padat dalam cawan petri lalu dibuat kultur cair. Hasil kultur overnight sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 100 ml medium LB. Kemudian kultur diinkubasi di dalam inkubator 37°C dengan

Tabel 1
Codon usage untuk single peptida supel pada E. coli

Asam Amino	Codon Usage	% kemunculan	Asam Amino	Codon Usage	% kemunculan
M	ATG	100	L	CTG	55
D	GAC	41	E	GAA	70
F	TTC	49	N	AAC	61
S	TCT	19	I	ATC	46
S	TCT	19	L	CTG	55
M	ATG	100	D	GAC	41
A	GCT	19	K	AAA	76
K	AAA	76	A	GCT	19
L	CTG	55	R	CGT	42
C	TGC	57	N	AAC	61
H	CAC	48	S	TCT	19
T	ACC	43	stop	TAA	62

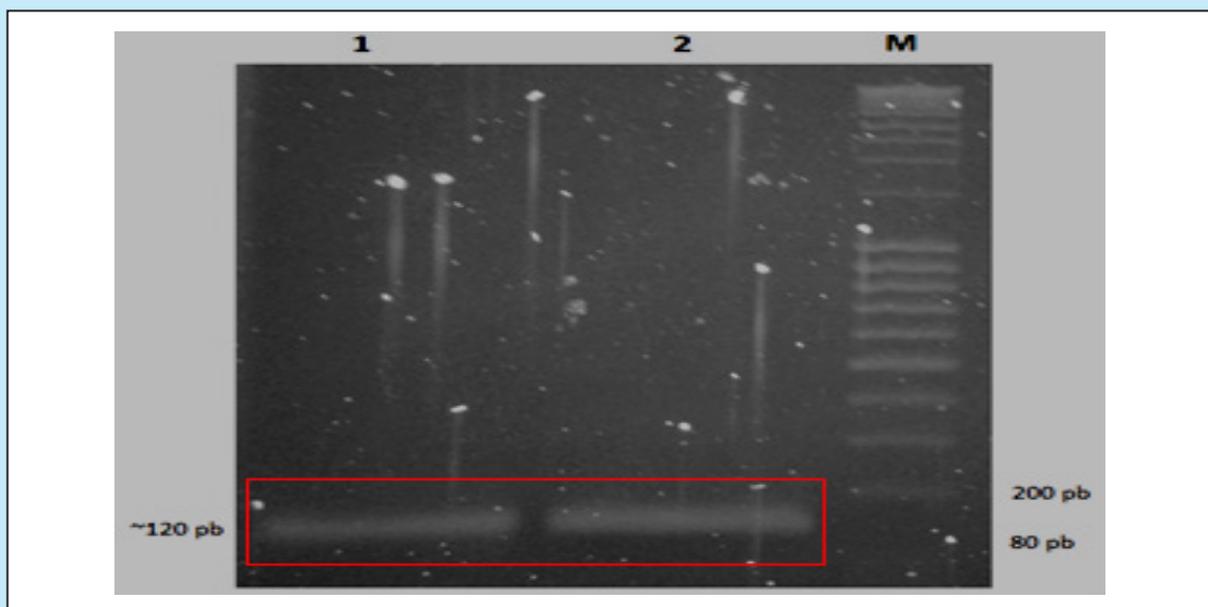
shaker 180 rpm selama 2-4 jam untuk mendapatkan OD₆₀₀ sebesar 0.5-0.7. Setelah OD₆₀₀ mencapai nilai tersebut, 5 ml dari kultur dipisahkan sebagai kultur yang tidak akan diinduksi kemudian 95 ml sisa kultur diinduksi menggunakan IPTG 1 mM (konsentrasi akhir). Kemudian kultur diinkubasi selama 4 jam diukur OD₆₀₀ dengan menggunakan rumus $V \times OD_{600} = 1$ untuk menyamakan jumlah sampel SDS-PAGE. Kultur selanjutnya dipeletkan pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Pelet dipecahkan

dengan menggunakan sonikator. Hasil pemecahan sel selanjutnya diberi buffer lysis dan kemudian dilakukan analisis SDS-PAGE menggunakan gel 15% atau 20% Tris-glisin.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Hasil Optimasi *Codon Usage Supel*

Urutan basa *Supel* hasil optimasi *codon usage* yang digunakan dalam penelitian ini terdapat



Gambar 2
Elektroforegram walking PCR Supel ; 1 & 2 sampel PCR, M. DNA 1 Kb ladder.



Gambar 3
Peta single supel construction.

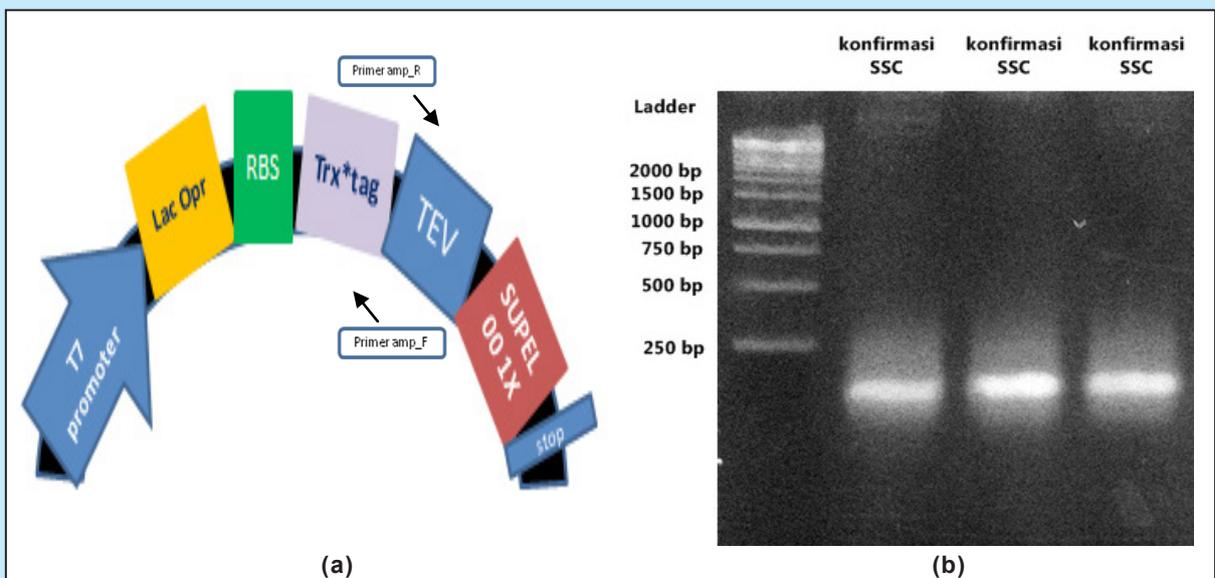
pada tabel 1. Berdasarkan hasil optimasi ini akan digunakan pada desain konstruk.

B. Single Supel Construction

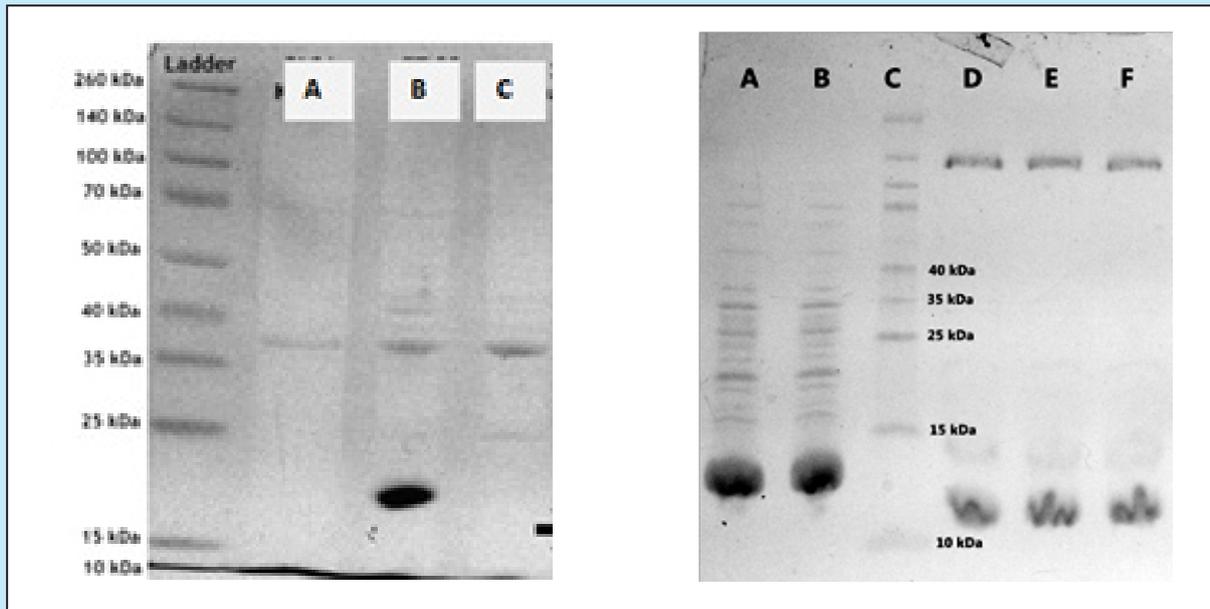
Hasil walking PCR untuk mensintesis sendiri *template* peptida *Supel* menggunakan sepasang primer yang mempunyai 30 basa *overlap*, maka diperoleh hasil PCR yang berukuran sekitar 120bp (Gambar 2). Produk PCR ini selanjutnya menjadi *template* untuk melakukan PCR dengan menggunakan mega primer.

Produk PCR dengan mega primer selanjutnya digunakan untuk overlap PCR dengan menggunakan vektor ekspresi pET32b sebagai *template*-nya. Melalui overlap PCR ini untaian basa TEV + *Supel* + stop kodon akan menyisip diantara sekuen Trx*tag dan His*tag, sehingga hasil konstruksi akan menghasilkan peta konstruk dibawah ini.

Peta di atas menunjukkan bahwa peptida *supel* berada di bawah kendali kuat signal transkripsi dan translasi T7 *bacteriophage*. Ekspresi diinduksi



Gambar 4
a) Sisi penempelan *prime ramp_F* dan *amp_R* pada sekuen; b) elektroferogram hasil konfirmasi keberadaan sekuen TEV dan 1x sekuen peptida *supel*.



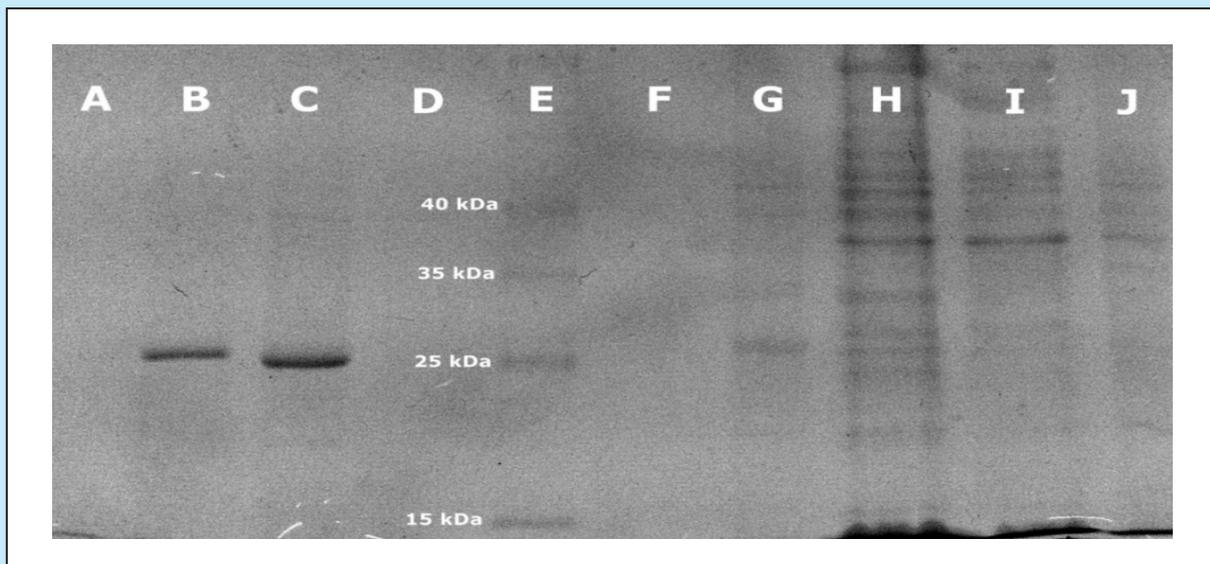
Gambar 5

a) SDS-PAGE sampel pelet A. BL 21 (DE3) kosong, B. pET 32b non rekombinan induksi, C. pET 32b non rekombinan non-induksi; b) A. SSC non induksi, B. SSC non induksi, C. *ladder*, D. SSC induksi (20°C), E. SSC induksi, F. SSC induksi.

oleh ketersediaan T7 RNA polymerase dalam sel inang serta induksi dengan IPTG pada konsentrasi akhir 1 mM (Novagen 2003). Keberadaan sekuen TEV berfungsi untuk melakukan purifikasi protein target. Hasil konfirmasi keberadaan sekuen TEV + *Supel* + stop kodon divalidasi dengan menggunakan metode PCR. Metode primer spesifik digunakan untuk mengamplifikasi sekuen pengkode TEV

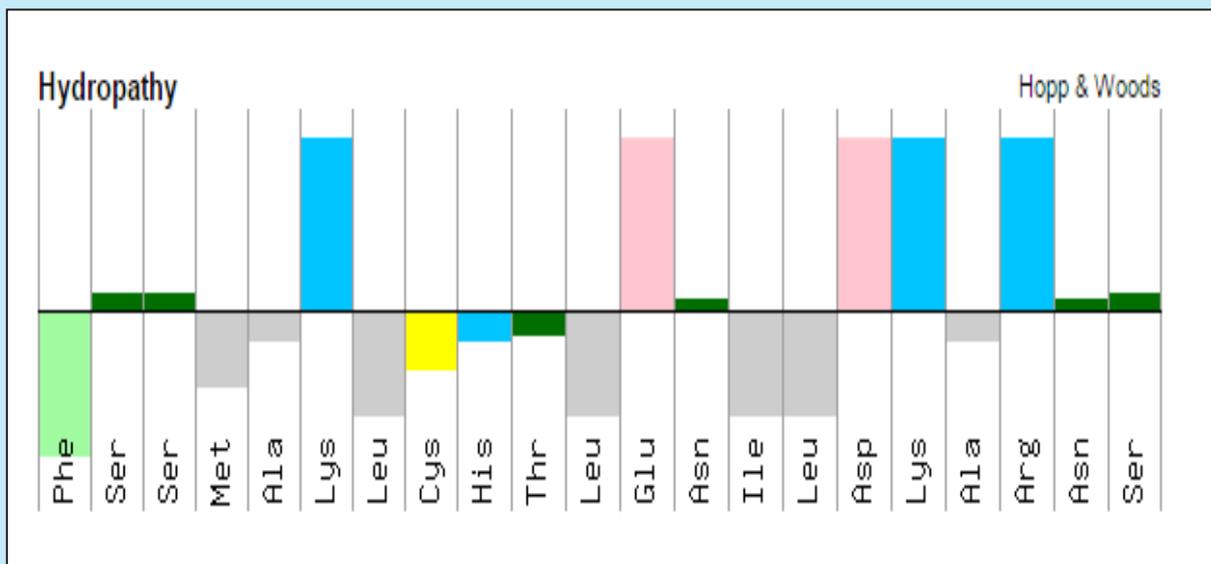
dan SSC yaitu amp_F dan amp_R. Hasil PCR menunjukkan ukuran dibawah pita ladder 250bp. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen pengkode TEV dan SSC berhasil diamplifikasi karena uikuran seharusnya adalah 81 bp (*Gambar 4*).

Gambar 4 menunjukkan keberadaan sekuen TEV dan 1x sekuen peptida *Supel* yang ini



Gambar 6

SDS-PAGE sample supernatan SSC; A. Pemecahan sel BL21 DE3 kosong, B. pET non-induksi, C. pET induksi, D. Supernatant non-induksi, E. *Ladder*, F. Supernatant 1 induksi, G. Supernatant sonikasi1 induksi, H. Supernatant sonikasi 2 induksi, I. Supernatant sonikasi3 induksi.



Gambar 7
Simulasi *hydropathy in silico* dengan menggunakan *innovagen* <http://pepcalc.com/>.

menginformasikan bahwa proses konstruksi sudah berhasil dilakukan.

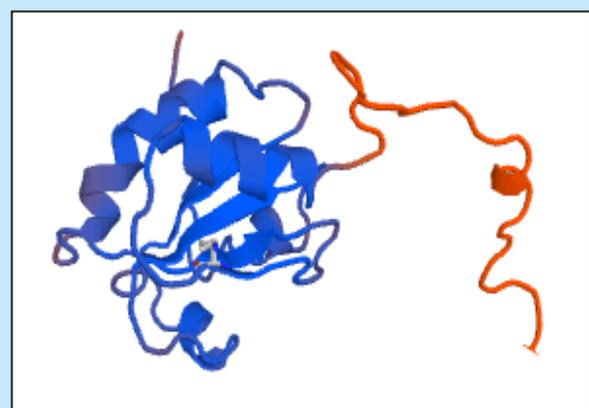
C. Analisis Skspresi Single Peptida *Supel* Rekombinan

Ekspresi dari peptida *Supel*, selanjutnya diuji dengan uji ekspresi dan analisis SDS-PAGE. Analisis SDS-PAGE dengan menggunakan sampel supernatan maupun peletnya, sehingga bisa diperoleh informasi keberadaan protein tersebut pada sel inang, baik di dalam sel, di luar sel atau didalam periplasma. Berikut ini adalah hasil SDS-PAGE sampel pelet.

Gambar 5 menunjukkan bahwa konstruk SSC mengekspresikan protein peptida *Supel* pada ukuran dibawah ladder 15 kDa. Kondisi ini sejalan dengan hasil perhitungan program online perhitungan berat molekul protein TEV + 1x *Supel* + stop kodon yang diperoleh ukuran ~14.9 kilodalton. Protein *Supel* sudah diekspresikan secara benar pada konstruk SSC. Hasil analisis SDS-PAGE dengan sample yang telah mengalami pemecahan sel ditunjukkan pada Gambar 6. Ekspresi protein konstruk SSC juga terdeteksi pada ukuran disekitar 15 kDa yang berasal dari sampel supernatan yang telah disonikasi sebanyak dua dan tiga kali. Hal ini bisa diasumsikan bahwa protein 1x *Supel* diekspresikan berada di dalam sel inang (*intraselular*).

Rangkaian asam amino pada *Supel* ini menyebabkan peptida mempunyai dua kubu rantai samping yang berbeda, yaitu hidrofobik dan hidrofilik. pemodelan dengan menggunakan

software online innovagen (<http://pepcalc.com/>). Sekitar 67% asam amino bersifat hidrofobik dan 33% asam amino bersifat hidrofilik (Gambar 7). Hal ini mengindikasikan bahwa peptida *Supel* dapat berikatan dengan senyawa non polar seperti minyak. Kondisi kedua sifat yang ada pada peptida *Supel* ini menyebabkan peptida *Supel* bersifat amfipatik ketika dalam suatu larutan, yaitu bagian yang hidrofilik berada didalam air sementara bagian yang hidrofobik akan berada dipermukaan. Peptida *Supel* ini dirancang untuk membentuk struktur helix. Struktur helix dirancang agar peptida memiliki sifat surfaktan, terlaut dalam air, serta stabil pada suhu dan salinitas yang tinggi (Dwyer et al. 2014).



Gambar 8
Peptida 1X yang masih berfusi dengan TRX dan TEV. Protein biru menunjukkan thioredoxin sedangkan oranye menunjukkan TEV dan peptida surfaktan.

Peptida surfaktan harus mempunyai sifat-sifat yang mirip dengan surfaktan yang bisa digunakan dalam kristalisasi, yaitu peptida surfaktan harus dirancang untuk mempunyai residu hidrofilik dan 3-6 residu hidrofobik pada bagian ekornya (Yeh, 2005; Kiley, 2005; Matsumoto, 2009). Pada bagian ekor peptida *Supel* juga dirancang untuk mempunyai 3 residu asam amino hidrofobik yaitu arginin (R), lysin (K) dan asparagin (N).

Prediksi struktur protein 1x peptida *Supel* yang berfusi dengan Thioredoxin dan TEV dianalisis secara *in silico* dengan program bioinformatik. Struktur ini menunjukkan bahwa terdapat protein Trx yang membentuk alfa helix dan TEV serta 1x peptida *Supel* membentuk struktur linear (Gambar 8).

Simulasi struktur protein fusi antara Thioredoxin, TEV, dan *single peptide Supel*, menunjukkan bahwa dalam keadaan berfusi, *single peptide Supel* masih membentuk struktur linear sehingga diasumsikan bahwa peptida belum memiliki sifat surfaktan. Oleh karena itu, pemisahan *single peptide Supel* dari thioredoxin dengan menggunakan TEV protease perlu dilakukan sebelum uji karakteristik surfaktan hasil rekombinan dilakukan. Disisi lain jika peptida belum aktif bisa lebih aman bagi sel *E. coli* untuk tumbuh dan berkembang tanpa terganggu senyawa surfaktan di dalam sel.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Telah berhasil dilakukan konstruk sekuen surfaktan *Supel* (SSC) kedalam vektor ekspresi pET-32b dengan menggunakan metode overlap PCR. Melalui analisis SDS-PAGE, konstruk SSC dapat mengekspresikan protein peptida *Supel* pada ukuran di bawah ladder 15 kDa. Hal ini sejalan dengan hasil perhitungan program *online* yang menunjukkan berat molekul protein TEV + 1x *Supel* + stop kodon pada ukuran ~14.9 kilodalton.

KEPUSTAKAAN

- Bachmann, R. T., Johnson, A. C., Edyvean, R. G.**, 2014. *Biotechnology in petroleum industry: an overview*. International Biodeterioration & Biodegradation, 86, 225-237.
- Brown, L. R. & Vadie, A. A.**, 2002. *Slowing production decline and extending the economy life of an oil field: new MEOR technology*. Reservoir evaluation & engineering 5(1): 33-41.
- Desai, J. D., Banat, I. M.**, 1997. *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiol. Mol. Biol. Rev 61(1): 47-64.
- Dwyer, M. D., Brech, M., Yu, L., Middelberg, Anton P. J.**, 2014. *Intensified expression and purification of a recombinant biosurfactant protein*. Chemical engineering science. 105: 12-21.
- Kiley P, Zhao X, Bruce BD, Baldo M, Zhang S**, 2005. *Self-assembling peptida detergents stabilize isolated photosystem I on a dry surface for an extended time*. PLoS Biol 3:1181–1186.
- Maloy, S., Stewart, V., Taylor, R.**, 1996. *Genetic analysis of pathogenic bacteria*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Maneerat, Suppasil**, 2005. *Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources*. Slongklanakar J. Sci. Technol. 27 (3): 675-683.
- Matsumoto K, Koutsopoulos S, Vaughn M, Bruce BD, Zhang S**, 2009. *Designer lipid-like peptida surfactants stabilize functional photosystem I membrane complex in solution*. J Phys Chem 115:75–83.
- Novagen**, 2003. pET System Manual. US: Novagen.
- Pacheco, G. J., Ciapina, Elisa M. P., Gomes, Edelvio de B., Pereira Junior, Nei**, 2010. *Biosurfactant production by Rhodococcus erythropolis and its application to oil removal*. Brazilian Journal of Microbiology 41: 685-693.
- Salter, E., Upstoll-Goddard, R.C., Nihtingale, P. D., Archer, S. D., Blomquist, B., Ho, D. T., Huebert, B. Schlosser, P., Yang, M.**, 2011. *Impact of an artificial release on air-sea gas fluxes during deep ocean gas exchange experiment*. Journal of geophysical research 116: 1-6.
- Sandrea, Ivan & Sandrea, Rafael**, 2007. *Global oil reserves-recovery factors leave bast target for EOR technologies*. Oil and gas journal pp. 1-8
- Van Hamme, Jonathan D., Singh, A., Ward, Owen P.**, 2003. *Recent Advances in Petroleum Microbiology*. Microbiol. Mol. Biol. Rev 67 (4): 503-549.
- Yeh JI, Du S, Tordajada A, Paulo J, Zhang S.**, 2005. *Peptergent: Peptida detergents that improve stability and functionality of a membrane protein glycerol-3-phosphate dehydrogenase*. Biochemistry 44:16912–16919.