



PROSIDING

Seminar Nasional MIPA 2016

Naskah diseminarkan pada 5 November 2016 dan dipublikasikan pada
<http://conf.unnes.ac.id/index.php/mipa/mipa2016/schedConf/presentations>



Simulasi Dinamika Molekul Enzim *Xylanase Aspergillus niger* untuk Meningkatkan Kestabilan Termal

Manogari Sianturi¹ dan Nya Daniaty Malau²

Program Studi Pendidikan Fisika, FKIP, Universitas Kristen Indonesia
email: manog_sianturi@yahoo.com¹, malaunyadaniaty@gmail.com²

Abstrak

Xilanase dapat diaplikasikan dalam industri *pulp* proses pra pemutihan (*pre-bleaching*) *pulp* kimia. Tetapi penggunaan xilanase pada industri *pulp* dan kertas sangat jarang karena adanya beberapa kendala yang dihadapi, salah satunya adalah belum tersedianya xilanase komersial yang sesuai dengan dengan kondisi proses pra pemutihan *pulp* (tahan suhu tinggi). Suhu optimum pada enzim xilanase *Aspergillus niger* hanya berkisar yaitu 45°C, sehingga tidak memungkinkan diaplikasikan pada industri *pulp*. Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan mengamati proses *unfolding*. Variasi suhu yang digunakan adalah 400 K untuk suhu optimum dan 500 K untuk suhu tinggi, masing-masing dilakukan selama 2.5 ns. Parameter yang digunakan untuk mengamati termostabilitas enzim adalah RMSF (*Root-mean-square fluctuation*), Jari-jari Girasi (*radius of gyration*), *solvent accessible surface area* (SASA) dan Ikatan Hidrogen. Nilai RMSF, Rg dan SASA pada suhu optimal terlihat stabil dan tidak mengalami perubahan signifikan, sedangkan pada suhu 500 K nilai RMSF, Jari-jari Girasi dan SASA meningkat secara signifikan. Sedangkan untuk Ikatan Hidrogen berkurang secara signifikan. Peningkatan RMSF, Jari-jari Girasi, SASA dan penurunan Ikatan Hidrogen menunjukkan bahwa telah terjadi proses *unfolding* pada enzim. Sehingga untuk meningkatkan termal enzim Xilanase *Aspergillus niger* maka dilakukan mutasi pada residu yang kurang stabil jika diberikan suhu tinggi. Residu ini dapat dianalisis dari parameter-parameter enzim yang mengalami proses *unfolding* pada suhu 500K.

Abstract

Xylanase can be applied in industrial pulp pre-bleaching process chemical pulp. But the use of xylanase in pulp and paper industry is very rare because there are some obstacles, one of which is the unavailability of commercial xylanase in accordance with the conditions of pre-bleaching process of pulp (high temperature resistant). The optimum temperature of the xylanase enzyme Aspergillus niger only range is 45°C, not permitting applied to the pulp industry. Molecular dynamics simulations performed by observing the unfolding process. Variations in temperature is used to the optimum temperature at 400 K and 500 K for high temperature, each performed for 2.5 ns. The parameters used to observe the enzyme thermostability is RMSF (Root-mean-square Fluctuation), radius of gyration (Rg), solvent accessible surface area (SASA) and Hydrogen Bond. Value RMSF, Rg and SASA at the optimum temperature is stable and there was no significant changes, while at a temperature of 500K value of RMSF, radius of gyration and SASA increased significantly. As for the hydrogen bond is reduced significantly. Increased RMSF, radius of gyration, SASA and decrease Hydrogen Bond show that there has been a process of unfolding the enzyme. So, as to improve the thermal Aspergillus niger xylanase enzyme is carried mutations in residues that are less stable if given the high temperatures. This residue can be analyzed on the parameters of enzymes that undergo unfolding process at a temperature of 500K.

Keywords: *unfolding, thermostability, Xylanase, Molecular dynamic simulation.*

PENDAHULUAN

Dewasa ini industri enzim telah berkembang pesat dan menempati posisi penting dalam bidang industri (Falch, 1991). Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat

mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak toksik (Aunstrup, 1979). Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam bidang industri adalah enzim xilanase (Marisa, 2013).

Xilanase (*1,4-β-D-xilan xilanohidrolase, E.C 3.2.1.8*) merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis xilan. Enzim ini digunakan dalam proses pra pemutihan (*pre-bleaching*) *pulp* kimia (Kirk dan Jeffries, 1996). Dalam proses pemutihan *pulp*, xilanase berfungsi sebagai fasilitator untuk mempermudah proses penghilangan kompleks lignin-karbohidrat (*lignin carbohydrate complex*) yang terbentuk saat proses *pulping* sehingga mudah bereaksi dengan bahan kimia pemutih dan meningkatkan ekstraksi lignin (Beg dkk., 2001). Penggunaan xilanase dapat menurunkan konsumsi senyawa klorin sampai dengan 20-40% dan dapat meningkatkan kualitas kertas yang dihasilkan (Dhillon dkk., 2000b; Beg dkk., 2001). Selain itu, penggunaan enzim dalam proses pemutihan *pulp* biayanya lebih rendah jika dibandingkan dengan proses delignifikasi oksigen, *extended cooking*, dan substitusi ozon, klorin dan hidrogen peroksida yang membutuhkan biaya tinggi. Karakteristik xilanase yang dapat digunakan dalam proses pemutihan tersebut diharapkan tahan suhu tinggi (60 -70°C), tahan pH alkali (Nakamura dkk., 1993), berupa endoxilanase (Viikari dkk., 1994) dan bebas dari aktivitas selulase.

Aplikasi penggunaan xilanase pada industri *pulp* dan kertas sangat jarang karena adanya beberapa kendala yang dihadapi, diantaranya adalah belum tersedianya xilanase komersial yang sesuai dengan dengan kondisi proses pra pemutihan *pulp* (tahan suhu tinggi), proses produksi xilanase saat ini menggunakan xilan murni sebagai inducer sehingga biaya produksi mahal, enzim bersifat eksotik (bukan anorganik), penyimpanan enzim yang terlalu lama tanpa menggunakan metode penyimpanan yang baik dapat menurunkan aktivitas enzim sehingga konsentrasi pemakaian terus meningkat, dan kurangnya transfer teknologi mengenai penggunaan enzim di industri. Karakteristik xilanase komersial yang ada saat ini memiliki suhu optimum kurang dari 50°C (Dhillon dkk., 2000) sehingga kurang sesuai dengan kondisi proses pra-pemutihan *pulp*, sehingga dilakukan berbagai teknik untuk meningkatkan stabilitas termal enzim tersebut. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan termostabilitas suatu enzim adalah dengan teknik rekayasa protein.

Sifat protein yang mendapat perhatian dari sekian banyak sifat protein, dalam teknik rekayasa protein adalah stabilitas, khususnya stabilitas terhadap suhu. Ini disebabkan karena sejak proses produksi, penyimpanan sampai kepada penggunaan, semuanya dipengaruhi oleh panas. Struktur protein (konformasi) akan mempengaruhi fungsinya. Interaksi hidrofobik, jembatan garam dan interaksi antara asam amino yang memiliki muatan seperti lisin, arginin, asam aspartat, asam glutamat serta asam amino dari ikatan peptida adalah beberapa *force* penting yang menjaga struktur protein. Secara umum, menguatkan *force* tersebut, misalnya dengan merubah asam amino *hydrophilic* dalam lingkungan yang *hydrophobic*, akan menaikkan stabilitas protein bersangkutan.

Keberhasilan grup dari Caltech, Amerika merupakan contoh yang melakukan teknik rekayasa terhadap protein Gb1 domain dari *Streptococcus sp.* Protein mutan memiliki suhu optimal lebih dari 100°C sementara protein alami hanya 83°C. Kenaikan stabilitas secara termodinamik menunjukkan angka 5,3 kkal/mol pada suhu 50°C. Keberhasilan yang ditunjukkan oleh contoh di atas adalah kenaikan stabilitas disebabkan oleh kombinasi dari beberapa faktor seperti *hydrophobic interaction*, *fleksibilitas loop structure*, dan sebagainya. Strategi penting dalam meningkatkan stabilitas protein adalah menemukan asam amino/posisi dalam protein yang kiranya berperan besar dalam proses *irreversible denaturation*, dengan menguatkan bagian tersebut tidak jarang mutasi satu asam amino sekalipun akan membawa

perubahan yang dramatis. Menggunakan enzim sialidase dari *Salmonella typhimurium*, telah berhasil menaikkan stabilitas protein tersebut hanya dengan mutasi tunggal untuk meningkatkan *hydrophobic interaction* antara dua terminal polipeptida. Studi secara sistematis terhadap protein dengan struktur serupa, menunjukkan bahwa strategi ini dapat diterapkan secara umum (Witarto, 2010). Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa protein dengan struktur serupa cenderung memiliki *folding pathway* yang sama pula.

Mutasi protein tersebut dapat dilakukan dengan mempelajari struktur protein melalui pendekatan simulasi dinamika molekul (*molecular dynamic simulation*) atau pemodelan komputer (Han dkk., 2009; Santarossa dkk., 2005). Strategi simulasi yang dilakukan untuk mempelajari perubahan struktur protein selama proses denaturasi/ *unfolding* adalah dengan melakukan simulasi pada suhu yang sangat tinggi (Li dan Dagget, 1994; Day dkk., 2002; Becker dkk., 2001; Liu dan wang, 2003; Purmonen dkk., 2007). Penggunaan suhu tinggi menyebabkan simulasi proses perubahan struktur dapat terjadi dengan lebih cepat sehingga penggunaan sumber daya komputasi dapat dikurangi. Analisa hasil simulasi tersebut dapat dimanfaatkan oleh peneliti eksperimen sebagai bahan pertimbangan untuk menentukan residu asam amino yang akan dimutasi pada rekayasa genetik.

Dalam penelitian ini dilakukan analisis kestabilan termal pada struktur xilanase *Aspergillus niger Wild Type* (ANX). Xilanase *Aspergillus niger* berhasil di kristalisasi oleh Kregel dan Dijkstra pertama kali pada tahun 1996 dengan resolusi struktur kristal 2,4 Angstrom. Struktur ANX ini diambil dari protein data bank (PDB) dengan kode 1UKR dengan berat molekul 13,5 - 14 kDa (Beg dkk., 2001), suhu 22°C sedangkan asam amino penyusun adalah 181 asam amino. Alasan menggunakan enzim xilanase dari *Aspergillus niger* adalah karena suhu optimum dari enzim yang dihasilkan masi sangat rendah yaitu 22°C. Sedangkan untuk dapat diaplikasikan pada bidang industri *pre-bleaching pulp* karakteristik xilanase yang digunakan adalah tahan pada suhu tinggi sekitar 60-70°C. Analisa kestabilan termal dari enzim xilanase akan dianalisis menggunakan simulasi dinamika molekuler, dan mengamati parameter kestabilan termal antara lain RMSF (*Root-mean-square fluctuation*), Rg (*radius of gyration*), *solvent accessible surface area* (SASA) dan Ikatan Hidrogen.

METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data eksperimen hasil *X-Ray Diffraction* berupa data koordinat enzim xilanase *Aspergillus niger* (Kregel dan Dijkstra, 1996) yang dapat diunduh di protein data bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (Berman dkk., 2000) dengan kode PDB 1UKR.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini berupa perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras terdiri atas komputer dengan spesifikasi RAM 8 GB, *Quad Core Processor* (Intel CoreI7), *Graphic Card* NVIDIA Ge Force GTS 9400, 16 core GPU dan sistem operasi LINUX Ubuntu versi 14.04. Perangkat lunak yang digunakan untuk proses simulasi adalah NAMD (*Not Just Another Molecular Dynamics Program*) versi 2.9 (Philips dkk., 2005) dan AMBER sedangkan untuk preparasi dan analisa hasil simulasi dilakukan menggunakan program VMD (*Visual Molecular Dynamics Program*) versi 1.9.1 (Humphrey dkk., 1996), perangkat lunak yang digunakan untuk prediksi mutasi sepasang residu menjadi sistein adalah "*Disulfide by DesignTM V 1.2*" (Dombkowski, 2003) untuk pengolahan data digunakan program CatDCD versi 4. VBA Ms. Excel 2010 digunakan untuk *smoothing* grafik, dan Gnuplot versi 2.6 digunakan untuk membuat grafik.

Struktur kristal enzim xilanase *Aspergillus niger* (kode PDB: 1UKR) (Kregel dan Dijkstra, 1996) yang digunakan pada simulasi didapat dari bank data Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>). Penentuan struktur kristal 1UKR dilakukan dengan metode difraksi sinar-X dan memiliki resolusi 2.4 Å. Residu asam amino penyusun Xilanase adalah 181 residu. File PSF (*Protein Structure File*) adalah file berisikan informasi

molekul secara spesifik yang dibutuhkan untuk menerapkan medan gaya tertentu ke dalam sistem molekul. Untuk membuat file ini NAMD menyediakan program *psfgen*.

Untuk lebih menyerupai lingkungan selular, protein dilarutkan dan dimasukkan kedalam air. Protein itu dilarutkan dalam bentuk kotak dengan ukuran $100\text{\AA} \times 100\text{\AA} \times 100\text{\AA}$ yang berisi molekul air. Molekul air yang dipilih sebagai pelarut eksplisit (solvasi) pada sistem simulasi adalah model molekul air TIP3P dengan *metode periodic boundary condition* (PBC) (Jorgenseng dkk., 1983). Sistem ini dinetralkan dengan menambahkan ion (NaCl) pada konsentrasi fisiologis menggunakan VMD *solvate* dan *autoionize plugin*.

Dalam simulasi ini dibutuhkan file parameter medan gaya. Sebuah medan gaya adalah ekspresi matematis dari gaya potensial yang diperoleh dalam sistem. Sebuah file parameter medan gaya CHARMM berisi konstanta numerik yang diperlukan untuk mengevaluasi gaya dan energi, mengingat PSF sebuah file struktur dan atom koordinat. Parameter CHARMM dapat didownload dari website: [http : //www.charmm.org/](http://www.charmm.org/). Untuk menjalankan simulasi dinamika molekuler dibutuhkan *script*. *Script* simulasi adalah program untuk menjalankan simulasi NAMD seperti yang diinginkan. NAMD menjalankan file konfigurasi dengan menggunakan bahasa *scripting* Tcl. Simulasi ini dilakukan dengan empat tahapan menggunakan program NAMD dengan masukan awal file konfigurasi. File ini sebagai pengontrol sistem yang berisi parameter dalam menjalankan simulasi. File topologi yang digunakan adalah *par_all27_prot_na_lipid.inp*. Tahap pertama adalah minimisasi. Minimisasi bertujuan untuk meminimalkan energi pada molekul. Masukan awal adalah file struktur dan file psf hasil dari preparasi molekul. Kedua, pemanasan, masukan awal adalah hasil dari minimisasi. Pada awal simulasi sistem bersuhu 0 K, suhu akhir akan divariasikan menjadi 400 K, 450 K dan 500 K. Ketiga, ekuilibrisasi, suhu sistem dijaga konstan dengan protokol Langevin. Kemudian tahap terakhir adalah *production run*. Pada tahap inilah simulasi dinamika molekul dijalankan. Molekul dibiarkan bebas bergerak dengan cara suhu sistem tidak dikontrol lagi. Tahap ini dilakukan selama 10 ns untuk 400 K, 450 K dan suhu 500 K. Simulasi suhu 300 K juga dilakukan namun hanya selama 1 ns. Hal ini diperlukan untuk validasi data, sehingga dapat dipastikan variasi suhu selanjutnya dapat dilanjutkan.

Keluaran dari tahap akhir simulasi dinamika molekul adalah file *dcd*. File ini divisualisasikan pada program VMD. Data yang diperoleh tersebut menghasilkan grafik yang dibutuhkan untuk analisis kestabilan termal protein. Analisa simulasi dinamika molekul pada enzim Xilanase dilakukan untuk mengetahui fleksibilitas enzim dan perubahan struktur yang terjadi. Parameter-parameter yang dianalisis antara lain adalah RMSF (*Root-mean-square fluctuation*), R_g (*radius of gyration*), *solvent accessible surface area* (SASA), Jembatan Garam dan Ikatan Hidrogen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Root-mean-square fluctuation (RMSF)

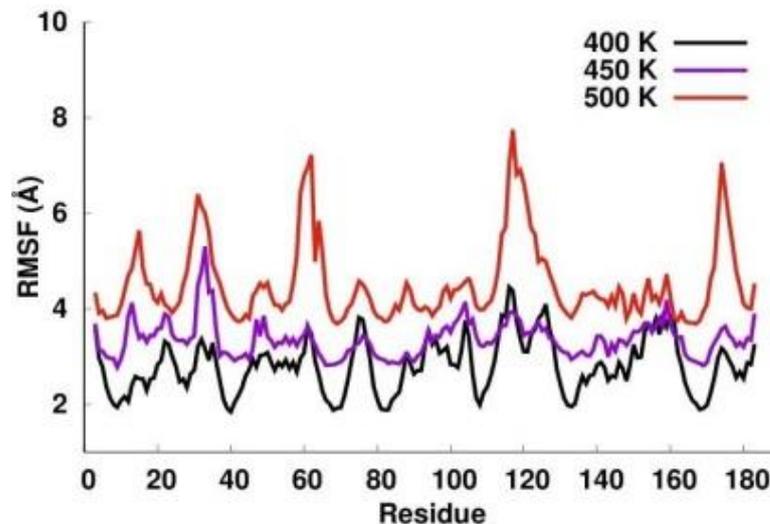
RMSF adalah akar kuadrat rata-rata fluktuasi koordinat atom terhadap struktur referensinya. Analisis ini digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai residu asam amino yang bersifat fleksibel dan yang bersifat kaku selama proses simulasi berlangsung. Analisis pergerakan atom C- α mewakili pergerakan rata-rata dari suatu residu protein selama simulasi.

Ditunjukkan pada gambar 1 beberapa residu yang memiliki nilai RMSF tertinggi pada setiap simulasi. Residu tersebut adalah residu 14, 32, 62, 116 dan 174. Simulasi 500K menghasilkan RMSF yang berbeda dengan yang lainnya. Banyak residu yang tadinya tidak fleksibel menjadi fleksibel. Hal ini dikarenakan terjadinya proses unfolding yang merubah fleksibilitas residu.

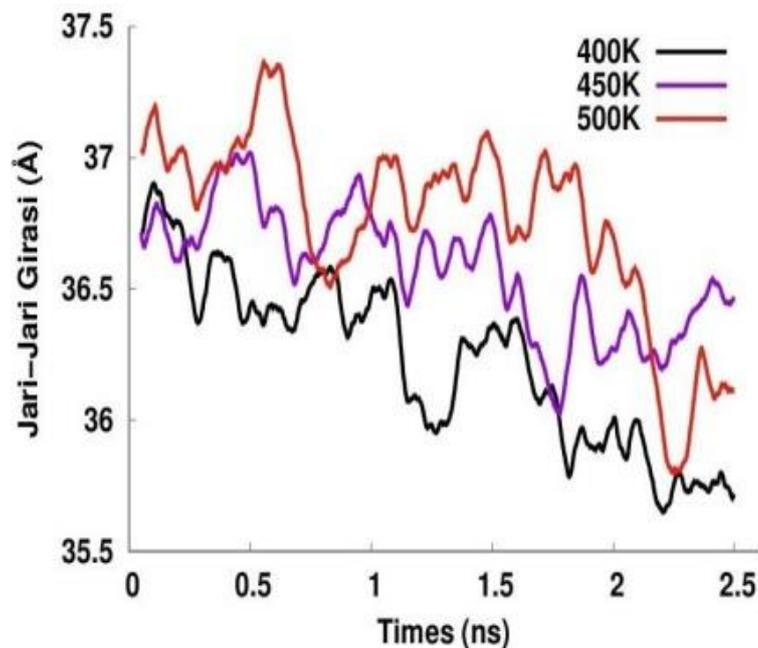
Jari-jari Girasi

Analisis jari-jari girasi (*radius of gyration*, Rg) juga dapat digunakan untuk menggambarkan kekompakan (*compactness*) serta kepadatan/ densitas molekul protein. Nilai jari-jari girasi dihitung menggunakan fungsi posisi atom terhadap pusat massa protein.

Jari-jari girasi enzim selama simulasi temperatur 400K sampai 450K masih berada pada rentang 35 - 36 Å sedangkan pada suhu 500K ternyata jari-jari girasi sudah mencapai 37,5 Å yaitu pada saat 0.5 ns. Terlihat pada Gambar 2, semakin meningkat temperatur maka fluktuatif jari-jari girasi juga akan semakin besar. Fluktuasi dapat diartikan sebagai persen kenaikan jari-jari girasi dari nilai minimal ke nilai maksimal yang ada dalam simulasi.



Gambar 1. Perubahan analisis parameter RMSF pada temperatur 400 K, 450 K dan 500 K masing-masing selama 2,5 ns



Gambar 2. Perubahan analisis parameter Jari-Jari Girasi pada temperatur 400 K, 450 K dan 500 K masing-masing selama 2,5 ns

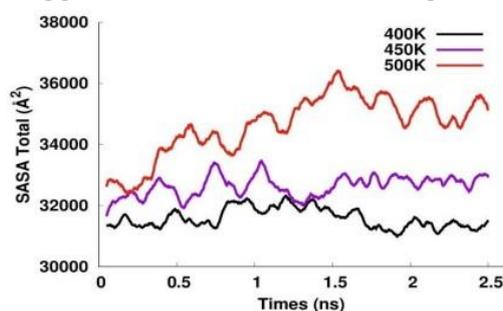
Solvent accessible surface area (SASA)

Solvent accessible surface area (SASA) didefinisikan sebagai luas permukaan biomolekul (protein misalnya) yang dapat di akses oleh pelarut (Lee dan Richards, 1971). Nilai SASA memberikan gambaran terhadap struktur tersier protein. Ketika proses simulasi termal berlangsung, kestabilan struktur tersier protein dan derajat keeksposuran dapat diamati dengan melakukan perhitungan SASA.

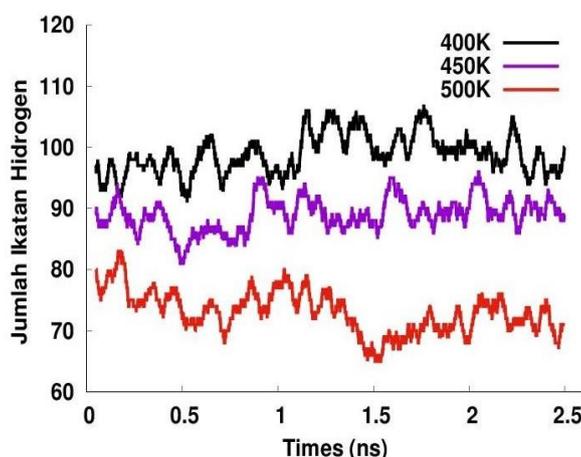
Sasa juga merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kekompakan protein. Grafik yang ditampilkan merupakan data yang sudah diperhalus dengan moving average untuk setiap 50 frame. Semakin meningkatnya suhu maka perlahan-lahan nilai total SASA juga akan semakin meningkat (Gambar 3). Secara rata-rata nilai total SASA enzim yang diperoleh dari masing-masing simulasi berada pada rentang 31000-32000Å². Saat unfolding yaitu pada suhu 500K nilai SASA meningkat drastis ke angka 36000 Å². Hal ini dikarenakan terbukanya gugus hidrophobik protein.

Ikatan Hidrogen

Ikatan hidrogen yang dihitung adalah ikatan hidrogen dimana jarak donor-akseptor proton masih berada di rentang 3.0Å. Pada Gambar 4 menunjukkan ikatan hidrogen antar backbone cenderung konstan selama simulasi. Kenaikan suhu menyebabkan energi sistem bertambah sehingga vibrasi antar ikatan semakin kuat dan akan menyebabkan putusnya ikatan hidrogen yang termasuk ikatan lemah. Backbone adalah rantai utama peptida tanpa memasukkan rantai samping atau residunya. Pada proses unfolding yaitu pada suhu 500K terlihat penurunan jumlah ikatan hidrogen (Gambar 4). Ini dikarenakan jarak beberapa backbone yang menjauh sehingga memutuskan ikatan hidrogen.



Gambar 3. Perubahan analisis parameter SASA pada temperatur 400 K, 450 K dan 500 K masing-masing selama 2,5 ns



Gambar 4. Jumlah ikatan hidrogen antara backbone selama 2,5 ns dengan variasi temperatur 400K, 450K dan 500K

Tabel 1. Peningkatan jumlah ikatan hidrogen selama simulasi dengan variasi temperatur

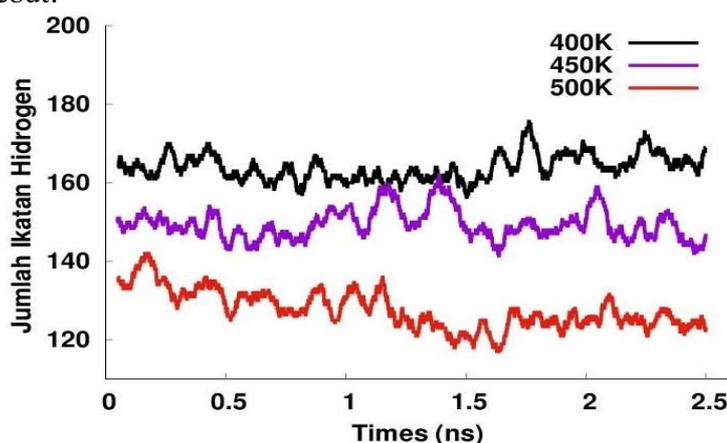
Temperatur	Backbone/backbone	Protein/protein
400K	118	178
450K	92	150
500K	40	96

Pada Gambar 5 ikatan hidrogen antar protein juga menunjukkan pola yang sama dengan Gambar 4 hanya jumlahnya lebih banyak. Hal ini sudah benar karena telah memasukkan ikatan hidrogen antar residu dan ikatan hidrogen residu/backbone. Karena pada proses unfolding yaitu suhu 500K jumlah ikatan hidrogen antar protein tetap (Gambar 5), dapat disimpulkan bahwa terjadi peningkatan jumlah ikatan hidrogen antar residu. Jarak residu terhadap backbone akan tetap walaupun terjadi unfolding, sehingga tidak akan ada perbedaan jumlah ikatan hidrogen residu/backbone saat unfolding.

Untuk peningkatan nilai ikatan hidrogen dapat dilihat lebih jelas pada tabel 1. Terlihat bahwa semakin tinggi suhu maka ikatan hidrogen semakin berkurang. Protein menjadi rusak akibat naiknya temperatur sehingga banyak ikatan hidrogen yang putus dan terurai.

SIMPULAN

Simulasi dinamika molekul yang dilakukan pada enzim Xilanase *Aspergillus niger* dengan variasi temperatur 400K, 450K dan 500K selama 2.5 ns menunjukkan bahwa pada suhu 500K, semua parameter yang dianalisis yakni RMSF, Jari-Jari Girasi, SASA dan Ikatan hidrogen menunjukkan bahwa enzim tersebut pada suhu 500K telah mengalami unfolding/ perusakan enzim. Nilai RMSF menunjukkan bahwa pemberian suhu yang tinggi menyebabkan residu menjadi lebih fleksibel karena nilai RMSF nya meningkat. Nilai Jari-jari Girasi dan SASA meningkat signifikan pada suhu 500K, ini berarti enzim yang awalnya folded/ terlipat menjadi terurai, sehingga Jari-jari meningkat dan luas area yang terkena air (SASA) juga meningkat secara signifikan dan Ikatan hidrogen menurun secara drastis. Sehingga, jika ingin melakukan mutasi untuk meningkatkan stabilitas enzim Xilanase *Aspergillus niger*, maka diharapkan mengganti residu yang kurang stabil menjadi lebih stabil dari keempat analisa tersebut.



Gambar 5. Jumlah ikatan hidrogen antara protein selama 2,5 ns dengan variasi temperatur 400K, 450K dan 500K

DAFTAR PUSTAKA

- Aunstrup, K.O., Andressen, Falch, and Nielsen. (1979). *Production of Microbial Enzymes. Microbial Technology*. Vol. 1. Academic Press Inc. New York
- Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal. (2001). *Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 326-338
- Becker, O.M., A.D. Mackerell, Jr. B. Roux, and M. Watanabe. (2001). *Computational Biochemistry and Biophysics*. Marcel Dekker. New York.
- Buchner, J. and T. Kiefhaber. (2005). *Protein folding handbook*. Part I. Weinheim. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA
- Collins, T., C. Gerday, and G. Feller. (2005). *Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiol. Rev.* 29:3-23.
- Das, R., and M. Gerstein. (2000). *The stability of thermophilic protein : a study based on comprehensive genome comparison. Funct. Integr. Genom.* 1(1):76-88
- Dhillon, A., J. K. Gupta, and S. Khanna. (2000a). *Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from Bacillus circulans AB 16. Process Biochemistry.* 35:849- 856
- Emond, S., I. Danré, K. Jaziri, G. Potocki-Véronèse, P. Mondon, and K. Bouayadi. (2008). *Combinatorial engineering to enhance thermostability of amylosucrase. Protein Sci.* 17(6):967-976
- Han, Z., S. Han, S. Zheng, and Y. Lin. (2009). *Enhancing thermostability of a Rhizomucor mieheili lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 117-126
- Kim, H.S., Q.A.T. Le, and Y.H. Kim. (2010). *Development of thermostable lipase B from Candida antarctica (CalB) through in silico design employing Bfactor and Rosetta Design. Enzyme and Microbial Technology.* 47: 1-5
- Kumar, S., and R. Nussinov. (2001). *How do thermophilic proteins deal with heat? Cell. Mol. Life Sci.* 58 (9): 1216-1233
- Liu, H. and W. Wang. (2003). *Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from Aspergillus awamori based on molecular dynamics simulations. Protein Engineering.* 16: 19-25
- Marisa A. Lima. (2013). *Aspergillus niger β -Glucosidase Has a Cellulase-like Tadpole Molecular Shape. The Journal of Biological Chemistry.* 288 : 32991-33005
- Ponder, J.W. and D.A. Case. (2003). *Force fields for protein simulations. Advances in protein Chemistry.* 66: 27-85
- Purmonen, M., J. Valjakka, K. Takkinen, T. Laitinen and J. Rouvinen. (2007). *Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 Xylanases. Protein Engineering, Design & Selection,* 20: 551-55
- Roux, B., T. Allen, S. Berneche and W. Im. (2004). *Theoretical and computational models of biological ion channels. Quart. Rev. Biophys.* 37: 15-103
- Santarossa, G., P.G. Lafranconi, C. Alquati, L. DeGioia, L. Alberghina, P. Fantucci, and M. Lotti. 2005. *Mutation in the "lid" region affect chain length specificity and thermostability of a Pseudomonas fragii lipase. FEBS Letters.* 579: 2383-2386.
- Subramanian, S. and P. Prema. (2002). *Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology. Molecular Biology and Application Critical Rev. Biotechnol.* 22 : 33-46.
- Trivedi, S., H.S. Gehlot, and S.R. Rao. (2006). *Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. Genet. Mol. Res.* 5(4) : 816-827.
- Vieille, C. and G.J. Zeikus. (2001). *Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 1-43

- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist, and M. Linko. (1994). *Xylanases in bleaching: from an idea to the industry*. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 335- 350
- Witarto, A.B. (2000). *Study on the conformational stability of b-propeller proteins*. PhD thesis. Tokyo University of Agriculture and Technology
- Zhang, J., K. Zhang and L. Zhou. (2004). *Thermostability of protein studied by molecular dynamics simulation*. *J. Biomo. Struct. Dyn.* 21: 657-662