



Protein Engineering: Perannya dalam Bioindustri dan Prospeknya di Indonesia

(The Role of Protein Engineering in Bioindustry and Its Prospect in Indonesia)

Dr. Arief Budi Witarto*

*Department of Biotechnology,
Tokyo University of Agriculture and Technology
and*

*Working Group on Life Sciences,
Institute for Science and Technology Studies (ISTECS) chapter Japan*

Abstract

Proteins have many interesting characteristics such as high catalytic activity, significant substrate specificity, etc, which attract their use in industry. However, in such applications, proteins should work not in their natural conditions, which in turn promote the engineering of proteins. Protein is the final product of genetic code, thus the advancement of DNA manipulation techniques has contributed much to the exploding research on protein engineering in the 80's. Assisted by protein 3D structure and computational analysis, significant progress in the "rational" engineering of protein to improve their stability, substrate specificity, even novel protein design has been achieved. Engineering with "irrational" approach, such as random mutation, when combined with proper selection method would give straightforward results. State of the art in protein engineering is discussed and to illustrate the path for commercialization, complete protein engineering of glucose dehydrogenase for diabetes diagnosis device, is presented. Finally, the prospect of protein engineering in Indonesia is discussed.

1. Protein dalam alam

Protein adalah molekul penyusun tubuh kita yang terbesar setelah air. Hal ini mengindikasikan pentingnya protein dalam menopang seluruh proses kehidupan dalam tubuh. Dalam kenyataannya, memang kode genetik yang tersimpan dalam rantai DNA digunakan untuk membuat protein, kapan, dimana dan seberapa banyak. Protein berfungsi sebagai penyimpan dan pengantar seperti hemoglobin yang memberikan warna merah pada sel darah merah kita, bertugas mengikat oksigen dan membawanya ke bagian tubuh yang memerlukan. Selain itu juga menjadi penyusun tubuh, "dari ujung rambut sampai ujung kaki", misalnya keratin di rambut yang banyak mengandung asam amino Cysteine sehingga menyebabkan bau yang khas bila rambut terbakar karena banyaknya kandungan atom sulfur di dalamnya, sampai kepada protein-protein penyusun otot kita seperti actin, myosin, titin, dsb. Kita dapat membaca teks ini juga antara lain berkat protein yang bernama rhodopsin, yaitu protein di dalam sel retina mata kita yang merubah photon cahaya menjadi sinyal kimia untuk diteruskan ke otak. Masih banyak lagi fungsi protein seperti hormon, antibodi dalam sistem kekebalan tubuh, dll.

Di antaranya, yang paling menonjol adalah enzim, yaitu protein yang berfungsi sebagai katalis dalam tubuh. Berkat enzim, kita dapat hidup dalam kondisi yang "normal" yaitu suhu tubuh rata-rata 37C dan tekanan udara 1 atmosfer (atm). Proses pembuatan amonia dari gas Nitrogen dan Hidrogen yang ditemukan oleh penerima hadiah Nobel Kimia 1918, Fritz Haber dari Jerman, bekerja pada suhu 700C dan tekanan 300 atm, namun berkat enzim Nitrogenase, mikroba yang hidup di akar tumbuhan kacang-kacangan dapat melakukannya pada kondisi "normal", sehingga menyuburkan tanah. Secara umum, enzim memiliki kelebihan terhadap katalisator non-biologis pada kecepatan reaksi serta spesifikasi terhadap substrat yang tinggi. Rekor tertinggi yang dipublikasikan saat ini dipegang oleh enzim Orotidine 5'-phosphate (OMP) decarboxylase yang dapat mempercepat reaksi sampai 10^{17} kali dari reaksi non-enzimatik dengan *half-time* 78 juta tahun, sementara enzim lainnya rata-rata dibawah 10^{14} kali (1).

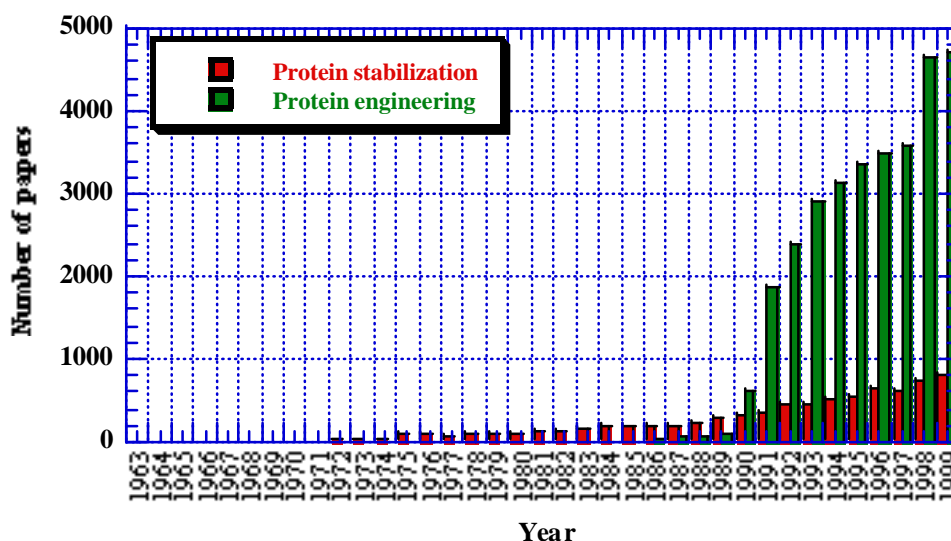
* Current address: Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST). On-leave from Puslitbang Bioteknologi-LIPI, Cibinong.

2. Lahirnya Protein Engineering

Sifat-sifat unggul di atas telah mendorong aplikasi protein dalam berbagai sektor seperti industri, kedokteran, lingkungan, dsb. Namun ada beberapa kendala yang menghadang antara lain kuantitas protein yang tersedia secara alamiah, sangat rendah serta karakter yang dimiliki protein hanya bertahan dalam kondisi "normal". Tantangan inilah yang mendorong upaya merekayasa protein (selanjutnya disebut PE, dari kependekan *Protein Engineering*) untuk "meningkatkan" sifatnya sesuai dengan kebutuhan.

Pada tahun 1973, Herbert Boyer dari University of California di San Fransisco dan Stanley Cohen dari Stanford University berhasil mengembangkan teknologi DNA rekombinan yang menandai revolusi bioteknologi. Dengan teknik ini, protein yang diinginkan dapat diproduksi dalam kuantitas besar. Insulin untuk penderita diabetes adalah protein pertama yang secara komersial diproduksi dengan teknik ini oleh Genentech, Inc. Lima tahun kemudian, 1978, Michael Smith, dari University of British Columbia-Canada, berhasil mengembangkan teknik *site-directed mutagenesis* (SDM) yang memungkinkan perubahan asam amino penyusun suatu protein pada posisi yang diinginkan. Atas jasanya itu, Smith menerima hadiah Nobel Kimia bersama penemu polymerase chain reaction (PCR), teknologi memperbanyak satu segmen rantai DNA, Karry B. Mullis dari Cetus Corp. tahun 1993. Mulai saat itulah, PE sebagai istilah lahir, dicetuskan pertama kali oleh Kevin M. Ulmer dari Genex Corp. (2).

Dari gambar 1 dapat dilihat bahwa mulai tahun itu, jumlah paper mengenai PE melonjak pesat. Namun bukan berarti sebelumnya, belum ada upaya untuk merekayasa protein. Paper mengenai stabilisasi protein yang merupakan salah satu tema utama PE, telah ada sebelumnya (Gambar 1). Namun dengan belum ditemukannya teknik SDM, rekayasa yang dilakukan lebih merupakan modifikasi asam amino reaktif seperti Cysteine, Lysine, dsb secara kimiawi, daripada perubahan/mutasi. Lebih lanjut, menurut pengakuan Professor Taiji Imoto dari Kyushu University yang merupakan salah satu Editor jurnal *Protein Engineering*, modifikasi satu asam amino secara selektif saja bisa memakan waktu berbulan-bulan.

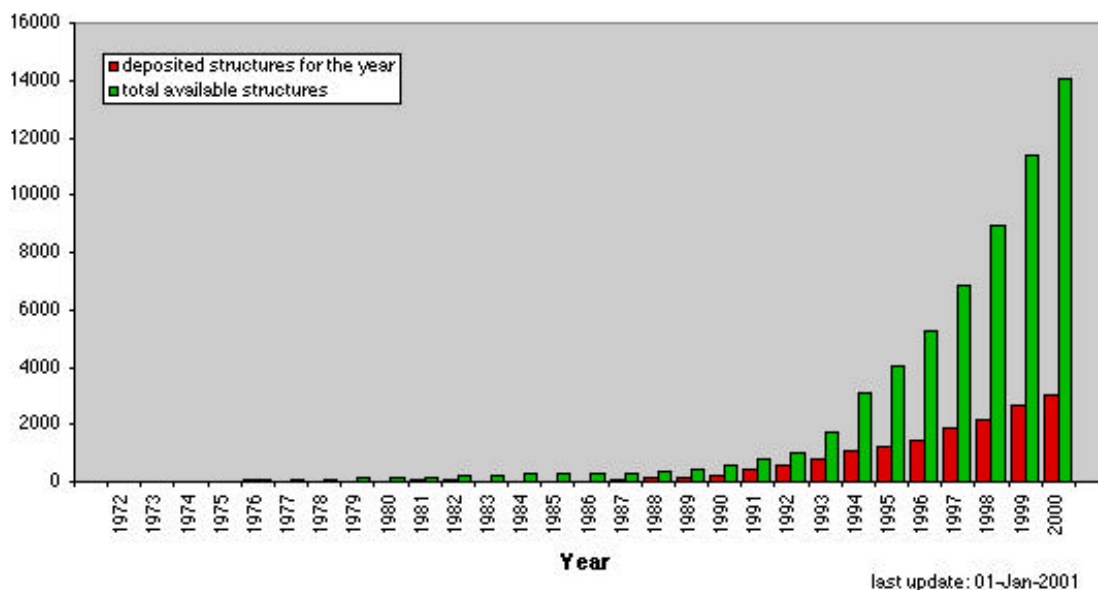


Gambar 1. Pertumbuhan jumlah penelitian PE

Data diambil dari PubMed *search* menggunakan masing-masing kata kunci dalam klasifikasi "all fields".

Satu lagi teknologi penting untuk PE adalah *X-ray crystallography* untuk menentukan struktur atom tiga dimensi (3D) protein dari kristal protein. Max Perutz dan John Kendrew dari Medical Research Council (MRC), Inggris adalah orang pertama yang berhasil mengembangkan teknik ini pada tahun 1958 dan berkat jasanya itu menerima hadiah Nobel Kimia tahun 1962, bersamaan dengan penemu struktur DNA, James Watson, Francis Crick dan Maurice Wilkins untuk hadiah Nobel Kedokteran. Akan tetapi, seperti disebutkan di atas, karena kuantitas protein pada lazimnya sangat rendah, ditambah dengan teknologi yang belum modern, pada tahun 1971 ketika Protein Data Bank (PDB) sebagai pusat pengumpulan/repositori data koordinat struktur 3D protein dibentuk, hanya ada data tujuh protein saja. Lebih dari 10 tahun kemudian, ketika PE digagas pun, tak lebih dari puluhan data yang tersedia (Gambar 2). Dengan mengetahui, struktur detail sebuah protein, memilih asam amino mana yang akan dirubah, akan

lebih mudah direncanakan untuk mendapatkan efek perubahan tertentu pada protein tersebut. Sehingga seperti dapat dilihat dari Gambar 1 dan 2, pertumbuhan riset PE berjalan hampir bersamaan dengan banyaknya struktur protein yang ada.



Gambar 2. Pertumbuhan jumlah struktur data yang disimpan di PDB

Data diambil dari homepage PDB di <http://www.rcsb.org/pdb>.

Jepang bisa dibilang adalah negara pertama yang memberikan perhatian penuh pada PE yaitu dengan dibentuknya Protein Engineering Research Institute (PERI) di Osaka pada tahun 1986. PERI merupakan konsorsium perusahaan-perusahaan swasta yang berhubungan dengan bioteknologi di Jepang dengan Pemerintah Jepang, dalam hal ini Ministry of International Trade and Industry (MITI). Beberapa tahun kemudian, pusat-pusat PE didirikan pula di Amerika (Center for Advanced Research in Biotechnology/CARB, Rockville) dan Eropa, seperti Cambridge Center for Protein Engineering di Inggris, Center for Applied Protein Engineering/CAPE di Jerman, Danish Protein Engineering Research Center di Denmark, dsb. Kesamaan utama dari lembaga-lembaga ini adalah adanya bidang-bidang yang merupakan dasar PE seperti bidang produksi protein, bidang desain protein, bidang analisa struktur dan bidang database struktur. Dalam perkembangannya, tahun 1991, dibentuklah International Network of Protein Engineering Center (INPEC) oleh antara lain lembaga-lembaga di atas, dan pada tahun 1995, nama "protein" dalam PERI dirubah menjadi "biomolecular" sehingga kependekannya menjadi BERI, walau secara organisasi tidak banyak berubah.

3. Peningkatan sifat protein dengan PE

"Peningkatan" di sini bukan berarti bahwa sifat/karakter protein itu tidak baik. Justru sifat-sifat itu sudah sangat tepat untuk kondisi alamiah (*native*) protein yang bersangkutan. Akan tetapi dalam aplikasi protein itu, tidak jarang memerlukan kondisi yang sangat berbeda sehingga beberapa karakter protein perlu ditingkatkan (baca: disesuaikan).

Dari sekian banyak sifat protein, mungkin yang paling mendapat perhatian dalam PE adalah stabilitas, khususnya stabilitas terhadap suhu. Ini disebabkan karena sejak proses produksi, penyimpanan (*storage*), sampai kepada penggunaan, semuanya dipengaruhi oleh *heat*/panas. Telah dipahami secara umum bahwa struktur protein mempengaruhi fungsinya, sehingga struktur itu sering disebut dengan istilah konformasi/*conformation*. *Hydrophobic interaction*, interaksi antara *side chain* asam amino *hydrophobic*; *electrostatic interaction/salt-bridge/ion pair*, interaksi antara asam amino yang memiliki *charge* seperti Lysine/Arginine/Aspartic acid/Glutamic acid serta *amino/carboxyl group* dari *peptide bond* 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

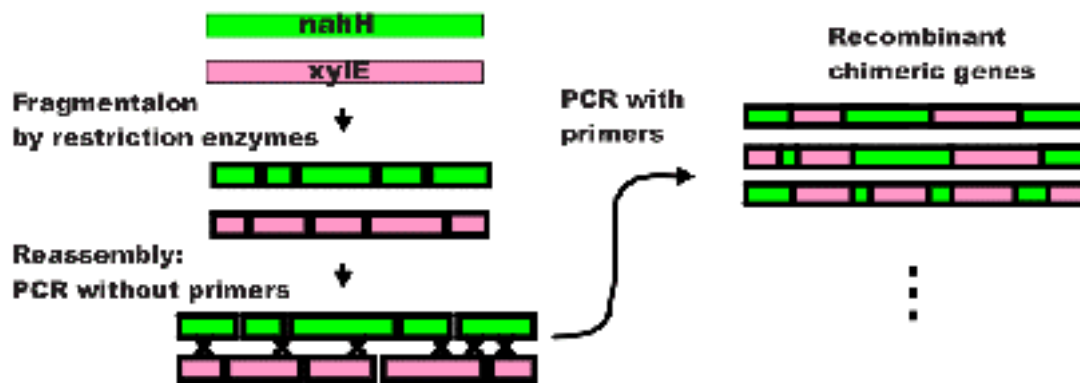
stabilitas protein bersangkutan. Contoh keberhasilan yang spektakuler akhir-akhir ini misalnya, keberhasilan grup dari Eropa (University of Groningen di Belanda dan European Molecular Biology Laboratory/EMBL di Jerman yang masing-masing terkenal dengan *X-ray crystallography* dan analisa komputernya) melakukan PE terhadap Thermolysin-like Protease dari *Bacillus stearothermophilus* (4). Hasil mutasi menunjukkan bahwa mutan enzim memiliki stabilitas lebih dari 340 kali, dimana *half-life* pada suhu 100 °C mencapai hampir 3 jam, sementara enzim *native* kurang dari 1/2 menit. Lebih jauh, enzim mutan menunjukkan aktivitas yang sama tingginya pada suhu tinggi dan 37 °C. Contoh lainnya adalah keberhasilan grup dari Caltech, Amerika yang melakukan PE terhadap protein Gβ1 domain dari *Streptococcus* sp. Protein mutan memiliki T_m lebih dari 100 °C sementara protein *native* hanya 83 °C. Kenaikan stabilitas secara termodinamik menunjukkan angka 5,3 kcal/mol pada suhu 50 °C. Salah satu kunci 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*, penulis telah berhasil menaikkan stabilitas protein tersebut hanya dengan mutasi tunggal untuk meningkatkan *hydrophobic interaction* antara dua terminal polipeptida (6). Studi secara sistematis terhadap protein dengan struktur serupa, menunjukkan bahwa strategi ini dapat diterapkan secara umum (7). Hal ini sesuai dengan kenyataan bahwa protein dengan struktur serupa cenderung memiliki *folding pathway* yang sama pula.

"Peringkat kedua" perubahan sifat yang paling banyak mendapat perhatian PE adalah spesifikasi substrat protein. Hubungan protein dengan substratnya sering digambarkan dengan kunci (substrat) dan lubang kunci (protein), dimana hanya kunci yang pas benar saja dengan lubang kunci itu yang dapat membukanya. Memang dalam kenyataan, tak jarang enzim bisa membedakan substrat sampai kepada perbedaan isomer molekul. Namun tidak sedikit pula enzim yang bersifat agak longgar terhadap spesifikasi substrat ini. Karena substrat berikatan dengan protein pada *active site*-nya, mutasi dilakukan pada asam amino yang berada pada posisi tersebut. Contoh menarik PE terhadap spesifikasi substrat ini misalnya perubahan spesifikasi Thrombin kepada protein C dari Fibrinogen, hanya dengan mutasi satu asam amino (8). Dengan demikian, hasil penelitian dari perusahaan biotek, Gilead Sciences di California ini, dapat merubah Thrombin menjadi kandidat obat *anticoagulant*. Contoh yang menarik lainnya adalah keberhasilan grup dari Perancis merubah reaksi yang dikatalis oleh enzim Cyclophilin dari isomerisasi menjadi endopeptidase (9). Selain itu, PE telah digunakan untuk merubah berbagai sifat protein seperti aktivitas (10), pH (11) dan lain-lain.

4. *Random mutation* dalam PE

Seperti diutarakan di atas, telah banyak hasil yang dicapai oleh PE dengan pendekatan yang rasional berbekal pengetahuan detail terhadap struktur 3D protein. Christian B. Anfinsen lebih dari 40 tahun yang lalu telah memprediksikan bahwa "kode" struktur protein tersimpan dalam sekuen asam aminonya, yang atas jasanya itu mendapat hadiah Nobel Kimia tahun 1972. Namun sampai sekarang kita belum mengetahui secara persis bagaimana proses terbentuknya struktur protein (secara khusus, istilahnya disebut *folding problem*) dimana hal ini terus menjadi tantangan studi dengan simulasi komputer sampai misalnya IBM tak segan mengembangkan proyek bernama Blue Gene dengan dana 100 juta USD khusus untuk memecahkan masalah ini (12). Keterbatasan pengetahuan kita terhadap hubungan struktur-fungsi protein menyebabkan tak selalu usaha PE berakhir sesuai dengan hasil yang diharapkan. Kadang satu strategi cocok untuk protein tertentu, namun tidak untuk protein lainnya. Hal ini melatarbelakangi lahirnya pendekatan "baru" dalam PE yaitu *random mutation*. Ada dua metoda utama dalam teknik ini yaitu DNA *shuffling* dan *error-prone PCR*.

DNA *shuffling* pertama dikembangkan oleh Willem P.C. Stemmer dari Affymax Research Institute di California pada tahun 1994 (13). Dalam metoda ini, (minimal) dua gen berbeda suatu protein dipotong secara *random* dengan nuclease kemudian dirangkaikan sambil diperbanyak menggunakan PCR (Gambar 3). Dalam proses perangkaian tadi, secara *random* DNA polymerase akan menggabungkan fragmen DNA yang ada sehingga terjadi proses mutasi pada gen secara keseluruhan. Menggunakan metode ini beberapa protein telah berhasil dimutasi secara efisien untuk memiliki sifat yang diharapkan (14,15). Dari pengalaman penulis, proses perangkaian fragmen DNA melalui PCR tadi tampaknya memerlukan *know-how* yang sulit didapat hanya dari yang tertulis di *paper* saja. Sehingga penggunaan metode ini oleh grup peneliti lain, relatif jarang.



Gambar 3. Gambar skema contoh proses dalam DNA shuffling

Metode kedua yang menggunakan fenomena kesalahan pembacaan DNA dalam proses amplifikasi PCR (*error-prone* PCR) lebih mudah dipraktikkan dan akhir-akhir ini mendapat perhatian besar atas keberhasilan yang menonjol dari grup Caltech yang dipimpin oleh seorang Professor wanita, Frances H. Arnold. Fenomena *error-prone* PCR sudah dikenal sejak tahun 1985 dan pada tahun 1989, protokol standarnya telah dikembangkan (16). Pada prinsipnya, dengan menggantikan Mg^{2+} dengan Mn^{2+} serta meninggikan konsentrasi dATP dibanding dNTP yang lain, akan menghasilkan produk PCR dengan frekuensi kesalahan yang jauh lebih besar. Kunci keberhasilan PE dengan metoda ini adalah pada tahapan *screening* produk gen tersebut. Menemukan kondisi *screening* yang efektif, misalnya *screening* yang dapat dilakukan secara *in-vivo* di atas plate, sangat berpengaruh dalam efisiensi PE ini. Grup Arnold telah berhasil mengembangkan protein dengan berbagai karakter yang unik menggunakan metoda ini (17 dan referensi yang ada di dalamnya). Kombinasi dari DNA *shuffling* dan *error-prone* PCR juga telah dicoba untuk mendapatkan tingkat mutasi yang lebih tinggi (18). Teknik mutasi secara random yang diikuti dengan *screening* dan dilakukan berulang kali ini, mirip proses evolusi dimana suatu sifat yang paling sesuai dengan lingkungan (adaptasi) bakal bertahan, sehingga teknik ini sering pula disebut *directed evolution*.

Aplikasi komputer dalam biologi, yang dikenal dengan bidang bioinformatika, akan semakin penting (19). Desain protein sampai ukuran 100-an asam amino mulai dapat dilakukan menggunakan bantuan komputer (20). Namun masih banyak kendala, seperti struktur yang kurang stabil dan sebagainya, apalagi untuk protein berukuran lebih besar. Kombinasi dengan *random mutation* telah berhasil menghasilkan protein baru dengan fungsi tertentu (21).

5. PE Glucose dehydrogenase sebagai contoh komersialisasi protein

Tidak sedikit, PE dilakukan terhadap satu sifat protein seperti stabilitas, aktivitas, spesifikasi substrat dan sebagainya. Di lapangan, komersialisasi sebuah produk protein memerlukan tahapan yang kompleks dimana PE secara "komplit" terhadap berbagai karakter protein, diperlukan. Untuk memberikan gambaran, berikut ini diuraikan PE enzim glucose dehydrogenase untuk digunakan sebagai komponen dalam sensor glukosa.

Biosensor menggunakan komponen biologis seperti protein (prosentase terbesar), sel sampai kepada jaringan/organ. Biosensor kebanyakan digunakan untuk keperluan diagnostik kondisi pasien dan pasar dunia biosensor (lebih dari 500 juta USD) yang utama (lebih dari 90 %), dipegang oleh biosensor glukosa untuk mengukur kadar gula penderita diabetes. Enzim yang digunakan untuk sensor glukosa saat ini adalah glucose oxidase (GOD) dari *mold* seperti *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. dan lain-lain. Berkat perkembangan sirkuit elektronik, kimia bahan, dan lain-lain dari biosensor yang bersifat multidisipliner tersebut, sensor glukosa dapat dibeli dengan harga terjangkau dan mudah pakai (22). Akan tetapi komponen pengenalnya, enzim GOD sama sekali tidak mengalami perbaikan sejak pertama kali digunakan 40 tahun yang lalu. Enzim GOD tetap dipergunakan antara lain karena mudah didapatkan serta stabil. Tetapi kelemahan utamanya, dalam reaksinya mengoksidasi glukosa, bergantung pada konsentrasi oksigen dalam sampel di mana kadarnya tentu sangat bervariasi. Saat ini, hal itu ditanggulangi dengan menggunakan mediator (lazimnya, ferricyan ion). Untuk itulah, diperlukan satu enzim baru yang tidak bergantung pada kadar oksigen.

Pilihan jatuh pada enzim glucose dehydrogenase (GDH) yang tidak hanya *independent* terhadap kadar oksigen, juga memiliki aktivitas yang tinggi. Ada dua jenis GDH, yaitu tipe *membrane-bound* (m-GDH, kadang disebut pula GDH-A) yang ditemukan pada banyak *Gram-negative bacteria* seperti *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* dan sebagainya, serta tipe *soluble* (s-GDH, kadang disebut pula GDH-B) yang hanya ditemukan pada *A. calcoaceticus*. Tidak seperti GOD, kedua GDH hanya diproduksi oleh bakteri yang bersangkutan dalam jumlah kecil. Untuk itu, diperlukan pengembangan sistem produksi massal yang efisien serta *low-cost*. Menggunakan beberapa *host-bacteria*, produksi massal GDH telah berhasil dicapai (23, 24 m-GDH, 25 s-GDH). PE terhadap GDH dilakukan pula untuk meningkatkan karakter stabilitas (26, 27, 28 m-GDH, 29 s-GDH), spesifikasi substratnya (28 m-GDH, 30 s-GDH) dan *range* konsentrasi glukosa yang dapat diukur (31, 32 m-GDH). Selain itu, juga diadakan analisa stabilitas GDH dalam penyimpanan (33 m-GDH). Barulah, GDH ini dapat dimanfaatkan secara komersial untuk sensor glukosa (22).

6. Prospek PE di Indonesia

Indonesia, sebagaimana diketahui, memiliki kekayaan biodiversitas dan sumber daya alam yang melimpah. Selain itu, dengan populasi yang besar, pasar industri bioteknologi di Indonesia sangat potensial. Bioteknologi sudah cukup lama dikembangkan di Indonesia, namun sebagai sebuah industri belum mendapatkan porsi perhatian yang memadai, walau sebenarnya beberapa sektor industri yang ada, punya peluang yang menjanjikan (34). *Extremophiles*, adalah mikroba yang hidup dalam lingkungan ekstrem seperti panas yang tinggi, lingkungan bersifat alkali dan sebagainya. Dari mikroba seperti ini, banyak didapatkan protein yang bermanfaat untuk keperluan industri (35). Untuk itu tidak segan-segan, peneliti Eropa/Amerika maupun Jepang menjelajah negara-negara yang kaya biodiversitas, termasuk Indonesia (36). Lingkungan seperti itu sangat banyak berada di Indonesia baik di daratan bahkan di lautan. Untuk itu, Indonesia perlu melengkapi diri dengan koleksi mikroba yang lengkap dan terjaga dengan baik serta *accessible* untuk seluruh peneliti.

Apabila dana menjadi salah satu kendala dalam pengembangan PE secara khusus maupun bioteknologi secara umum di Indonesia, perlu siasat untuk menggunakan instrumen maupun teknologi alternatif. Penulis telah menggunakan program untuk protein modeling dalam LINUX (37) dan membandingkannya dengan program komersial serupa (38). Penulis juga telah berhasil mendapatkan *expression vector* untuk produksi massal rekombinan protein yang memerlukan *inducer*, IPTG yang lebih sedikit (25). Selain itu, perlu komunikasi yang intens antara peneliti bioteknologi Indonesia untuk tukar-menukar informasi maupun menjalin hubungan non-formal yang penting untuk kolaborasi mendatang. Hal ini antara lain telah coba diwadahi dengan media mailing list biotek@egroups.com yang terbuka untuk praktisi maupun peminat bioteknologi. Dengan demikian, penulis beranggapan Indonesia memiliki prospek yang cukup bagus untuk pengembangan PE bagi industri, bila hal-hal di atas diperhatikan.

Catatan: Penelitian dalam tulisan ini dilakukan Protein Chemistry Laboratory (Professor Koji Sode), Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan. Sebagian dari isi tulisan ini telah dipresentasikan dalam Seminar terbuka Hokuriku Science Forum (HSF) di Fukui University, 17 Desember 2000 (<http://www.jaist.ac.jp/~witarto/HSF>).

Referensi

1. Radzicka, A. and Wolfenden, R. 1995. A Proficient Enzyme. *Science* **267**:90-93.
2. Ulmer, K.M. 1983. Protein Engineering. *Science* **219**: 666-671.
3. Bott, R. and Boelens R. 1999. The role of high-resolution structural studies in the development of commercial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 391-397.
4. Van den Burg, B. *et al.* 1998. Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **95**: 2056-2060.
5. Malakauskas, S. and Mayo, S.L. 1998. Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nature Structure Biology* **5**: 470-475.
6. Witarto, A.B. and Sode, K. (in press). Increasing the hydrophobic interaction between terminals W-motifs enhances the stability of *Salmonella typhimurium* sialidase: A general strategy for the stabilization of beta-propeller fold.
7. Witarto, A.B. 2000. Study on the conformational stability of β -propeller proteins. PhD thesis Tokyo University of Agriculture and Technology.
8. Gibbs, C.S. *et al.* 1995. Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering. *Nature* **378**: 413-416.
9. Quemeneur, E. *et al.* 1998. Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature* **391**: 301-303.
10. Zhou, H.X., Wong, K.Y. and Vijayakumar, M. 1997. Design of fast enzymes by optimizing interaction potential in active site. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* **94**: 12372-12377.
11. Gulich, S. *et al.* 2000. Stability towards alkaline conditions can be engineered into a protein ligand. *Journal of Biotechnology* **80**: 169-178.
12. <http://www.research.ibm.com/bluegene/>
13. Stemmer, W.P.C. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
14. Cramer, A. *et al.* 1996. Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling. *Nature Biotechnology* **14**: 315-319.
15. Christians, F.C. *et al.* 1999. Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling. *Nature Biotechnology* **17**: 259-264.
16. Leung, D.W., Chen, E. and Goeddel, D.V. 1989. A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**: 11-15.
17. Arnold F.H. 1998. Design by Directed Evolution. *Accounts of Chemical Research* **31**: 125-131.
18. Ostermeier, M., Shim, J.H. and Benkovic, S.J. 1999. A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nature Biotechnology* **17**: 1205-1209.
19. Witarto, A.B. 2001. Aplikasi komputasi dalam biologi. Paper dipersiapkan untuk Seminar IECI-Japan, The University of Tokyo.
20. Dahiyat, B.I. and Mayo, S.L. 1997. *De novo* design protein design: Fully automated sequence selection. *Science* **278**: 82-87.
21. Altamirano, M.M. *et al.* 2000. Directed evolution of new catalytic activity using the $\alpha\beta$ -barrel scaffold. *Nature* **403**: 617-622.
22. Witarto, A.B. 2000. From bench to business: The story of glucose sensor. Proc.Temu Ilmiah PPI-Jepang ke-9, pp.5-8.
23. Sode, K. *et al.* 1994. Over expression of PQQ glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* under holo enzyme forming condition. *Biotechnology Letters* **16**: 1265-1268.
24. Sode, K. *et al.* 1996. Increased production of recombinant pyrroloquinoline quinone (PQQ) glucose dehydrogenase by metabolically engineered *Escherichia coli* strain capable of PQQ biosynthesis. *Journal of Biotechnology* **49**: 239-243.
25. Kojima, K., Witarto, A.B. and Sode, K. 2000. The production of soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by *Klebsiella pneumoniae*, the alternative host of PQQ enzymes. *Biotechnology Letters* **22**: 1343-1347.
26. Sode, K. *et al.* 1995. Thermostable PQQ glucose dehydrogenase. *FEBS Letters* **364**: 325-327.
27. Witarto, A.B. Ohtera, T. and Sode, K. 1999. Site-directed mutagenesis study on the thermal stability of a chimeric PQQ glucose dehydrogenase and its structural interpretation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **77-79**: 159-168.
28. Yoshida, H., Kojima, K., Witarto, A.B. and Sode, K. 1999. Engineering a chimeric pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase: improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity. *Protein Engineering* **12**: 63-70.
29. Sode, K. *et al.* 2000. Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by single amino acid replacement. *Enzyme and Microbial Technology* **26**: 491-496.
30. Igarashi, S. *et al.* 2000. Construction and characterization of mutant water-soluble PQQ glucose dehydrogenases with altered Km values - site-directed mutagenesis studies on the putative active site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **264**: 820-824.
31. Sode, K. and Kojima, K. 1997. Improved substrate specificity and dynamic range for glucose measurement of *Escherichia coli* PQQ glucose dehydrogenase by site directed mutagenesis. *Biotechnology Letters* **19**: 1073-1077.
32. Yamazaki, T., Kojima, K. and Sode, K. 2000. Extended-range glucose sensor employing engineered glucose dehydrogenases. *Analytical Chemistry* **72**: 4689-4693.
33. Sode, K. and Yasutake, N. 1997. Preparation of lyophilized pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase using trehalose as an additive. *Biotechnology Techniques* **11**: 577-580.
34. Witarto, A.B. 2001. Current state of Indonesia Bioindustry and its prospect in global market era. Paper prepared for IASA Symposium on Agri-Bioche, The University of Tokyo.
35. Hough, D.W. and Danson, M.J. 1999. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**: 39-46.
36. Pengakuan beberapa peneliti dalam International Congress on Extremophiles. 18-22 January 1998, The Pacific Yokohama Conference Center, Japan.
37. Witarto, A.B. 1997. Protein Engineering of PQQ Reayasa protein enzim PQQ glucose dehydrogenase untuk komponen biosensor glukosa. *Inovasi* **7**: 20-28.
38. Witarto, A.B. *et al.* 1999. Secondary structure study of pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics* **2**: 209-213.