

**Kloning, Ekspresi dan Karakterisasi  $\alpha$ -Galaktosidase Famili 4 Glikosida Hidrolase  
dari *Bacillus halodurans***

Andian Ari Anggraeni<sup>1</sup>, Makiko Sakka<sup>2</sup>, Tetsuya Kimura<sup>2</sup>, Motomitsu Kitaoka<sup>3</sup>,  
dan Kazuo Sakka<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Universitas Negeri Yogyakarta, <sup>2</sup>Mie University Japan , <sup>3</sup>National Food Research  
Institute Japan )

Kontak Penulis Koresponden

Andian Ari Anggraeni

Fakultas Teknik Universitas Negeri Yogyakarta

Karangmalang Yogyakarta 55281

Telp. (0274)565583

aa\_anggraeni@yahoo.com

Mikrobiologi dan Keamanan Pangan

## ABSTRAK

Gen  $\alpha$ -galaktosidase *mel4A* dari *Bacillus halodurans* diklon dan diekspresi pada *Escherichia coli*. Protein rekombinan kemudian dipurifikasi dan dikarakterisasi. Gen *mel4A* terdiri dari 1305 nukleotida yang merupakan kode dari protein dengan 434 asam amino. Protein diprediksi memiliki berat molekul sebesar 49761 Da. Berdasar pada struktur primer yang berasal dari sekuen nukleotida gen, Mel4A digolongkan dalam famili 4 glycoside hydrolase. Ekspresi pada suhu 37°C menghasilkan protein yang berada pada fase inclusion body. Untuk mengurangi level ekspresi protein, suhu pada saat proses induksi diturunkan menjadi 20°C sehingga protein akan diproduksi pada fase supernatan.  $\alpha$ -Galaktosidase Mel4A dipurifikasi sampai mencapai keadaan homogen dengan teknik purifikasi satu langkah menggunakan His-binding metal affinity chromatography. *B. halodurans* Mel4A mempunyai karakter yang unik karena aktivitas enzim ini tergantung pada  $\text{NAD}^+$  dan  $\text{Mn}^{2+}$ . Selain itu, aktivitas Mel4A juga memerlukan keadaan reduksi yang dapat dicapai dengan penambahan dithiothreitol (DTT). Aktivitas optimum dicapai pada suhu 37°C dan pH 7.4. Enzim ini dapat menghidrolisa *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranosida (*p*NP-Gal), melibiosa, rafinosa, dan stakiosa, tetapi tidak dapat menghidrolisa guar gum. Oleh karena itu enzim ini lebih memilih substrat yang berupa sakarida berukuran kecil daripada galaktomannan yang berderajat polimerisasi tinggi. Western immunoblot pada protein intraselular dan ekstraselular *B. halodurans* menunjukkan bahwa rafinosa menginduksi ekspresi Mel4A pada intraselular *B. halodurans*. Walaupun bakteri ini dapat menggunakan guar gum sebagai sumber karbon dalam mediana, tetapi analisa western blot menunjukkan bahwa produksi Mel4A tidak diinduksi oleh guar gum.

## Pendahuluan

$\alpha$ -Galaktosidase ( $\alpha$ -D-galactoside galactohydrolase; melibiase; EC 3.2.1.22) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,6-galaktosidik dari terminal non-pereduksi pada oligosakarida, liposakarida dan/atau polisakarida yang mengandung galaktosa.  $\alpha$ -Galaktosidase terdapat pada bakteri, fungi, yeast, tumbuhan, hewan dan manusia. Beberapa enzim ini telah dipurifikasi dan dikarakterisasi.

Berdasar pada homologi sekuen asam amino,  $\alpha$ -galaktosidase dikelompokkan dalam famili 4, 27, 36 dan 57 glikosida hidrolase (1). Sebagian besar  $\alpha$ -galaktosidase eukariot menunjukkan homologi sekuen asam amino yang cukup signifikan dan dikelompokkan dalam famili 27. Sampai saat ini, beberapa  $\alpha$ -galaktosidase yang berasal dari bakteri telah dikarakterisasi dan dikelompokkan dalam famili 4, 36 dan 57.

Galaktosa adalah senyawa yang terdapat pada oligosakarida seperti melibiosa, rafinosa, stakiosa dan verbaskosa, dan polisakarida seperti guar gum. Melibiosa, rafinosa, stakiosa dan verbaskosa juga terdapat pada jamur, kacang-kacangan dan sayuran. Sistem pencernaan manusia dan hewan memamah-biak kekurangan  $\alpha$ -galaktosidase. Oleh karena itu, senyawa yang mengandung  $\alpha$ -1,6-galaktosida tidak dapat dicerna di dalam usus. Senyawa ini kemudian terdekomposisi oleh bakteri di dalam usus sehingga terbentuk gas CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> yang mengakibatkan perut menjadi kembung. Untuk menghindari hal ini, sebelum makan disarankan untuk menggunakan suplemen yang mengandung  $\alpha$ -galaktosidase yang berasal dari mikroba.  $\alpha$ -Galaktosidase juga digunakan pada pembuatan susu kedelai untuk mengurangi kandungan oligosakarida yang tidak dapat dicerna oleh tubuh manusia. Pada industri gula,  $\alpha$ -galaktosidase digunakan untuk meningkatkan produksi sukrosa dengan cara mengurangi rafinosa, yang akan mencegah kristalisasi normal pada gula.

*Bacillus halodurans* C-125 diisolasi pada tahun 1977 dan diketahui sebagai penghasil  $\beta$ -galaktosidase dan xilanase. *B. halodurans* adalah bakteri haloalkalifilik yang dapat tumbuh pada kisaran pH 6,8 – 10,8. *B. halodurans* dan *B. subtilis* adalah strain yang paling banyak dikarakterisasi baik dari sisi fisiologi, biokimia, maupun genetika. Bakteri ini menghasilkan enzim-enzim yang penting bagi dunia industri, seperti protease, pektinase, amilase, dan xilanase. Enzim yang dihasilkan oleh *B. halodurans* memiliki suhu optimal yang tinggi (50-70° C) dan pH optimal pada kisaran pH alkali (2).

Sekuen gen *B. halodurans* telah diketahui (3). Berdasar sekuennya, terdapat tiga buah gen  $\alpha$ -galaktosidase pada *B. halodurans*; BH2228 yang merupakan famili 4 glikosida hidrolase, BH1870 dari famili 27 dan BH2223 dari famili 36 (1).

## **Bahan dan Metode**

**Bahan kimia.** Melibiosa dan rafinosa diperoleh dari Nacalai Tesque. *p*NP-galacturonic acid dan *p*NP-glucuronic acid disediakan oleh Dr. Motomitsu Kitaoka (NFRI, Japan). Stakiosa, guar gum, *p*NP-Gal, *p*NP glikosida lainnya, dan bahan kimia lain diperoleh dari Sigma Aldrich. Enzim restriksi dan enzim lain diperoleh dari Takara.

**Strain bakteri, plasmid, media dan kondisi kultivasi.** *Bacillus halodurans* C-125 diperoleh dari Japan Collection of Microorganism (JCM) dan ditumbuhkan secara aerobik dengan media Horikoshi-I pH 10 pada 37° C selama 10 jam. *Escherichia coli* XL1-Blue dan BL21(DE3) digunakan sebagai host kloning dan ekspresi gen. Strain *E. coli* rekombinan ditumbuhkan pada 37° C dengan media Luria-Bertani (LB) yang mengandung ampicillin (75 µg ml<sup>-1</sup>) atau kanamycin (60 µg ml<sup>-1</sup>). Plasmid pT7Blue and pET-28a(+) (Novagen) digunakan untuk TA cloning dan ekspresi gen.

**Pembuatan plasmid rekombinan.** Open reading frame BH2228 (*mel4A*) diamplifikasi dengan PCR menggunakan Taq polymerase master mix (Qiagen). Fragmen DNA produk PCR diligasi pada vektor TA cloning pT7Blue dan ditransformasi ke *E. coli* XL1-Blue. Plasmid kemudian dipurifikasi dan fragmen DNA insert diligasi pada vektor pET-28a(+). Plasmid rekombinan pET28-Mel4A diekspresi pada *E. coli* BL21(DE3).

**Purifikasi protein.** *E. coli* BL21 (DE3) yang mengandung pET28-Mel4A digunakan sebagai sumber enzim rekombinan. Strain rekombinan ditumbuhkan selama 10 jam pada 37° C pada 500 mL media LB yang mengandung 60 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin. IPTG dengan konsentrasi akhir 1 mM ditambahkan ke dalam media dan kultur diinkubasi selama 20 jam pada 20° C. Sel dipisahkan dari media dengan sentrifugasi dan dilarutkan dalam lysis buffer. Sel kemudian dipecah dengan sonikasi dan dinding sel

dipisahkan dengan sentrifugasi. Supernatan digunakan sebagai larutan crude enzyme dan dipurifikasi menggunakan HiTrap Chelating HP (Amersham) column chromatography hingga mencapai homogenitas.

## **Hasil dan Pembahasan**

Gen *mel4A* pada *B. halodurans* menghasilkan  $\alpha$ -galaktosidase. *B. halodurans* Mel4A terdiri dari 434 asam amino dengan perkiraan berat molekul 49761 Da. Berdasar sekuen asam aminonya, Mel4A merupakan glikosida hidrolase famili 4 (GHF4). Karakteristik Mel4A mirip dengan *E. coli* MelA tetapi berbeda dengan  $\alpha$ -galaktosidase eukariot anggota famili 27 maupun  $\alpha$ -galaktosidase bakteri anggota famili 36.

Mel4A kehilangan sebagian besar aktivitasnya pada saat assay dilakukan tanpa  $\text{NAD}^+$ . Aktivitas tertinggi tercapai pada saat enzim diinkubasi dengan  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  dan DTT. Sebagian besar enzim GHF4 membutuhkan  $\text{NAD}^+$  dan  $\text{Mn}^{2+}$  untuk mencapai aktivitas maksimum. Selain  $\text{NAD}^+$  dan  $\text{Mn}^{2+}$ , beberapa enzim GHF4 juga membutuhkan agen pereduksi (DTT atau mercaptoethanol) untuk mencapai aktivitas maksimum (4).

Multiple alignment pada enzim GHF4 menunjukkan adanya beberapa residu glisin pada terminal-N. Thompson *et al* mengusulkan keberadaan  $\text{NAD}^+$  binding protein pada terminal-N protein GHF4 (4).  $\text{NAD}^+$  binding motif juga terdapat pada *B. halodurans* Mel4A. Hasil penelitian ini juga mendukung asumsi bahwa keberadaan  $\text{NAD}^+$  binding motif pada terminal-N berhubungan dengan  $\text{NAD}^+$  binding affinity.

Kondisi optimum Mel4A dicapai pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan pH 7,4. Enzim ini stabil antara pH 7 dan 8 pada  $4^\circ\text{C}$  selama inkubasi 24 jam. Enzim ini juga stabil sampai suhu  $40^\circ\text{C}$  selama inkubasi 10 menit. Inkubasi pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 10 menit

mengakibatkan hilangnya 40% aktivitas enzim, oleh karena itu enzim ini tergolong sebagai enzim yang tidak stabil.

Berdasar spesifitas substrat,  $\alpha$ -galaktosidase dapat diklasifikasi menjadi dua kelompok; yaitu, kelompok enzim yang spesifik pada sakarida kecil seperti *p*NP-Gal, melibiosa, rafinosa dan stakiosa, dan kelompok enzim yang spesifik baik pada polisakarida seperti guar gum maupun oligosakarida. Sebagian besar  $\alpha$ -galaktosidase eukariot spesifik baik terhadap polisakarida seperti galaktomannan maupun oligosakarida, sedang  $\alpha$ -galaktosidase prokariot lebih memilih oligosakarida. Dalam konteks ini, *B. halodurans* Mel4A juga lebih spesifik pada oligosakarida.

Western immunoblot pada protein intraselular dan ekstraselular *B. halodurans* menunjukkan bahwa rafinosa menginduksi ekspresi Mel4A pada intraselular *B. halodurans*. *B. halodurans* yang ditumbuhkan pada media yang mengandung rafinosa menunjukkan protein yang imunoreaktif dengan berat molekul ~51 kDa yang sesuai dengan berat molekul Mel4A. Mel4A membutuhkan pH netral untuk mencapai kondisi hidrolisa optimum. Hal ini juga menunjukkan bahwa Mel4A adalah enzim intraselular pada *B. halodurans*.

*B. halodurans* mampu tumbuh pada media yang mengandung guar gum sebagai sumber karbon, tetapi analisis Western blot menunjukkan bahwa produksi Mel4A tidak dipengaruhi oleh penambahan guar gum pada media.

## **Kesimpulan**

*B. halodurans* Mel4A membutuhkan  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  dan DTT untuk mencapai aktivitas optimum. Enzim ini lebih spesifik pada sakarida kecil daripada polisakarida seperti galaktomannan. *B. halodurans* mampu ditumbuhkan pada media yang

mengandung sumber karbon berupa melibiosa, rafinosa dan guar gum. Rafinosa menginduksi produksi Mel4A intraselular.

### **Pustaka**

1. Henrissat, B. and Coutinho, P. Glycosyl hydrolase families. Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, NRS, Marseille, France, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>
2. Takami, H. and Horikoshi, K. 2000. Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. *Extremophiles* 4:99-108
3. Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiramata, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. and Horikoshi K. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28:4317-4331
4. Thompson, J., Pikis, A., Ruvinov, S.B., Henrissat, B., Yamamoto, H. and Sekiguchi, J. 1998. The gene *glvA* of *Bacillus subtilis* 168 encodes a metal requiring, NAD(H)-dependent 6-phospho- $\alpha$ -glucosidase: assignment to Family 4 of the glycosylhydrolase superfamily. *J. Biol. Chem.* 273:27347-27