EKSPRESI GEN PENYANDI β-XILOSIDASE DALAM SISTEM pHIS1525/ *Bacillus megaterium* MS941

Sri Sumarsih, Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Sofijan Hadi, Ami Soewandi J.S.
Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga Surabaya

ABSTRACT

*The aim of this research was to express the β-xylosidase gene in the pHIS1525/ **Bacillus megaterium** MS941 system. The xyl gene was amplified from pTP510 and cloned into pHIS1525 in **E. coli** DH10β. The recombinant plasmid was transformed into **B. megaterium** MS941 by protoplast transformation. Transformants were selected by growing the recombinant **B. megaterium** MS941 on solid LB medium containing tetracycline (10 μg/ ml). The expression of β-xylosidase was assayed using 0.2% methylumbelliferyl-β-D-xyloside (MUX) and the proteins were analyzed by SDS-PAGE method. The β-xilosidase activity was determined toward p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (pNPX) as a substrate and p-nitrofenol releasing was measured by UV/Vis spectrophotometer at λ = 405 nm. This research showed that recombinant **B. megaterium** MS941 expressed the β-xylosidase gene (xyl) and secreted it into the culture medium. The SDS-PAGE analysis of extracellular protein (culture medium) showed a 60,0 kD protein band. The recombinant **Bacillus megaterium** MS941 expressed and secreted the β-xilosidase into culture medium 5 hours after adding 5% xylose. The β-xylosidase activity was 0.441 unit/ml toward pNPX as a substrate.*

Key words: *β-xylosidase, pHIS1525, **Bacillus megaterium** MS941, protoplast, methylumbelliferyl-β-D-xyloside, p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside*

PENGANTAR

Xilan merupakan komponen utama hemiselulosa dalam dinding sel tanaman, yang memiliki kerangka dasar residu 1,4-D-xilopiranosil yang rantai sampingnya tersubstitusi dengan gugus asetil, 4-O-metil-D-glukuronosil dan α-arabinofuranosil. Degradasi sempurna xilan merupakan proses banyak tahap yang melibatkan aktivitas beberapa enzim hidrolitik yang bekerja secara sinergis, yaitu (1) endo-1,4-β-xilanase, (2) 1,4-β-D-xilosidase, (3) α-L-arabinofuranosidase, α-glukuronidase dan asetil esterase (Yang *et al*., 2006).

Enzim xilanolitik mendapat banyak perhatian dari kalangan peneliti dan industri karena peranannya dalam penyempurnaan biokonversi biomassa lignosellosa menjadi produk-produk yang bermanfaat. Enzim xilanolitik dan juga glikosidase lain, menunjukkan aktivitas glikosintase untuk sintesis oligosakarida, misalnya sintesis 4-metilumbeliferil β-D-1,4-xilooligosida yang merupakan substrat untuk uji β-D-xilanase (Czjzek *et al*., 2005; Eneyskaya *et al*., 2005).

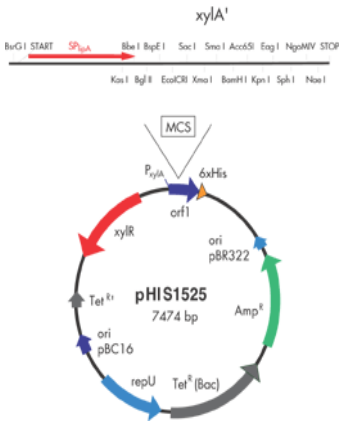
Plasmid pTP510 merupakan plasmid hasil rekombinasi gen penyandi enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dalam plasmid pBluescriptKS+/ sel inang *E. coli* DH5α. Plasmid ini mengekspresikan 3 jenis gen penyandi enzim xilanolitik-termofilik, yaitu gen penyandi ekso-xilanase (*ekso-xyl*), β-xilosidase (*xyl*) dan α-L-arabinofuranosidase (*abfa*) (Puspaningsih *et al*., 2005). Sekuens gen penyandi β-xilosidase dalam pTP510 tersebut telah terdaftar dalam *Gene Bank* dengan nomor akses DQ345777. Sedangkan dalam Genpept, enzim β-xilosidase tercantum dengan nomor akses ABC 75004, yang tersusun atas 511 residu asam amino dengan berat molekul 57.993 Da.

Escherichia coli disebut sebagai "*workhorse*" untuk produksi berbagai protein rekombinan dengan berbagai sistem ekspresi. Namun demikian, *E. coli* tidak dapat memproduksi beberapa protein yang mengandung ikatan disulfida kompleks, atau protein mamalia yang membutuhkan modifikasi postranslasi untuk aktivitasnya. Pada umumnya protein yang diover-ekspresi sering kali diproduksi dalam bentuk *inclusion body*, akibatnya protein yang aktif biologi hanya dapat diambil dengan proses denaturasi dan *refolding* yang rumit dan mahal (Choi dan Lee, 2004; Schallmey *et al*., 2004).

Bakteri Gram positif *Bacillus megaterium* mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan dengan sel inang lain untuk produksi protein rekombinan. Bakteri ini mampu mengekspresikan DNA heterolog. Berbeda dengan *B. subtilis*, *B. megaterium* tidak menghasilkan protease alkalin dan dikenal stabil dalam replikasi dan pemeliharaan plasmid. Pada dinding selnya juga tidak ditemukan adanya endotoksin. Akhir-akhir ini, beberapa sistem ekspresi *B. megaterium* telah dikembangkan untuk produksi protein rekombinan intraseluler dan ekstraseluler. Beberapa vektor

dan galur *B. megaterium* telah dikembangkan untuk produksi beberapa protein rekombinan, misalnya glukosiltransferase (Wang *et al*., 2005), levansucrase (Malten *et al*., 2006; Yang *et al*., 2006), dextransucrase dan penisilin amidase (Yang *et al*., 2006) serta fragmen antibodi scFv (Jordan *et al*., 2007).

Vektor ekspresi pHIS1525 telah dikonstruksi untuk keperluan produksi dan sekresi protein heterolog. Plasmid pHIS1525 merupakan *shuttle vector E. coli/B. megaterium* yang mengandung *signal peptide* yang terdiri atas sekuens penyandi esterase ekstraseluler asal *Bacillus* sehingga memungkinkan untuk sekresi protein target ke dalam medium kultur.



Gambar 1. Peta restriksi pHIS1525

Sistem pHIS1525 ini juga dilengkapi dengan adanya 6× *His-tag* untuk tujuan pemurnian protein satu tahap dan deteksi protein target (MoBitec, 2004; Malten *et al*., 2006).

Pada penelitian ini dipelajari ekspresi gen penyandi β-xilosidase (gen *xyl*) dalam sistem pHIS1525/*B. megaterium* MS941. Pada tahap penelitian sebelumnya telah dilakukan amplifikasi *gen xyl* dari pTP510 dan telah berhasil diklonkan ke dalam plasmid pHIS1525 dengan sel inang *E. coli* DH10β, menghasilkan plasmid rekombinan pHIS1525-*xyl* yang kemudian dinamakan pSMX. Selanjutnya, plasmid rekombinan pSMX ini ditransformasikan ke dalam sel *B. megaterium* MS941 melalui transformasi protoplas, untuk mengetahui ekspresinya di *Bacillus megaterium*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel Penelitian

1. Plasmid rekombinan pTP510 dalam *E. coli* DH5β yang merupakan hasil penelitian sebelumnya (Puspaningsih, 2003) dan disimpan sebagai koleksi di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia FST-Unair, Surabaya.
2. Plasmid pHIS1525/*E. coli* DH10β, sel *Bacillus megaterium* MS941 diperoleh dari Institute of Microbiology, Technical University Braunschweig, Germany.

Cara Kerja

Proses transformasi plasmid rekombinan ke *B. megaterium* MS941 dilakukan dengan prosedur standar transformasi protoplas Puyet *et al*. (1987) yang dimodifikasi (Barg *et al.,* 2005 dan MoBiTec, 2004).

Penyiapan protoplas

Satu koloni tunggal sel *B. megaterium* MS941 diinkubasi dalam medium LB pada 37° C dengan pengocokan 100 rpm semalam. Sebanyak 1 ml prekultur diinokulasikan ke dalam 50 ml medium LB dan diinkubasi pada 37° C dengan pengocokan 250 rpm hingga OD_{578nm}= 0,1. Sel dipisahkan dengan sentrifugasi 5000 rpm, 4° C selama 15 menit dan disuspensikan dengan 5 ml SMMP, ditambahkan 50 µl lisozim dan diinkubasi pada 37° C dengan pengocokan sangat lambat. Terbentuknya protoplas (20–80%) diamati dengan mikroskop. Protoplas dipisahkan dengan sentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan diresuspensikan dengan 5 ml SMMP.

Transformasi DNA rekombinan pSMX ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941

Ke dalam tabung *Falcon* 12 ml yang berisi 0,5–1 µg DNA (dalam SMMP), ditambahkan 500 µl suspensi protoplas dan 1,5 ml PEG-P kemudian diinkubasi selama 2 menit pada suhu 20° C. Ke dalam campuran ditambahkan 5 ml larutan SMMP, kemudian dicampur dengan membolak-balik tabung. Panen sel dilakukan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Sel dilarutkan dalam 500 µl SMMP dan diinkubasi pada 37° C selama 90 menit. Pada saat yang sama disiapkan 2,5 ml *top agar* dan inkubasi dalam penangas air (maksimum 43° C). Kemudian sel dipipet dan dicampur dengan *top agar* dan segera dituang dan disebar di atas medium padat LB (+ Tc 10 µg/ml), selanjutnya diinkubasi pada 37° C semalam. Koloni sel yang tumbuh digoreskan pada medium padat LB (+ Tc 10 µg/ml) yang baru dan diinkubasi pada suhu 37° C semalam dan digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Uji ekspresi gen penyandi β-xilosidase dengan metilumbelliferil-β-D-xilosida (MUX)

Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) ditutup (*overlay*) dengan larutan agar 0,5% dalam bufer fosfat sitrat pH 6,0 yang mengandung MUX 0,2%. Biakan diinkubasi pada suhu 60° C semalam.

Biakan (transforman) yang positif mengekspresikan β-xilosidase akan berpendar jika diletakkan di atas transluminator UV.

Analisis protein dengan SDS-PAGE

Kultur sel *B. megaterium* MS941 rekombinan ditumbuhkan dalam medium LB (+Tc) pada 37° C dengan pengocokan 250 rpm hingga $OD_{578\ nm}$ = 0,3–0,4 dan setelah ditambahkan larutan xilosa 0,5% diinkubasi kembali pada 37° C selama 5 jam. Sampel disentrifugasi 13.000 rpm pada 4° C selama 10 menit dan diperoleh supernatan (protein ekstraseluler). Supernatan dipekatkan dengan pengendapan aseton 70%. Pelet sel disonikasi dua kali pada 20 kHz selama 2 menit sehingga diperoleh protein intraseluler. Selanjutnya, protein yang diperoleh (protein ekstraseluler dan intraseluler) dianalisis dengan SDS-PAGE.

Uji aktivitas enzim β-xilosidase rekombinan

Aktivitas β-xilosidase ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil-β-D-xilopiranosida. Enzim sebanyak 100 μl dicampur dengan 900 μl substrat pNP-β-D-xilopiranosida 1 mM diinkubasi pada suhu 50° C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 ml Na_2CO_3 0,4 M. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah p-nitrofenol yang dilepaskan secara spektrofotometri UV-vis pada λ 405 nm.

HASIL

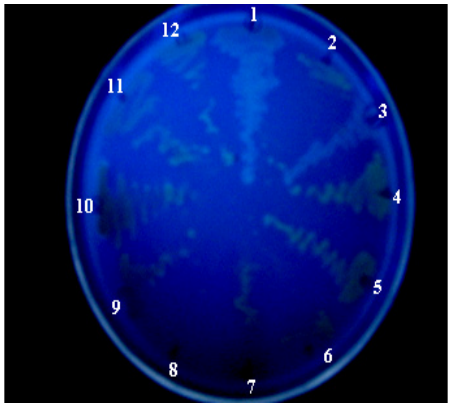
Transformasi DNA plasmid rekombinan ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941

Transformasi plasmid rekombinan pHIS1525-*xyl* (yang selanjutnya disebut pSMX) dilakukan dengan transformasi protoplas. Gambar 2(a) merupakan foto mikroskopis protoplas *B. megaterium* MS941, sedangkan Gambar 2(b) merupakan sel *B. megaterium* MS941 setelah transformasi dan telah mengalami proses regenerasi sehingga dinding sel sudah terbentuk kembali.

Uji ekspresi gen penyandi β-xilosidase oleh B. megaterium MS941 rekombinan

Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) yang ditutup (*overlay*) dengan larutan agar 0,5% yang mengandung MUX 0,2% nampak berpendar ketika dilihat di atas transluminator UV (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan menghasilkan β-xilosidase, yang menghidrolisis substrat MUX menghasilkan senyawa umbelliferol yang berpendar di bawah sinar UV.

Hasil analisis protein ekstraseluler (medium kultur) *B. megaterium* MS941 rekombinan dengan metode SDS-

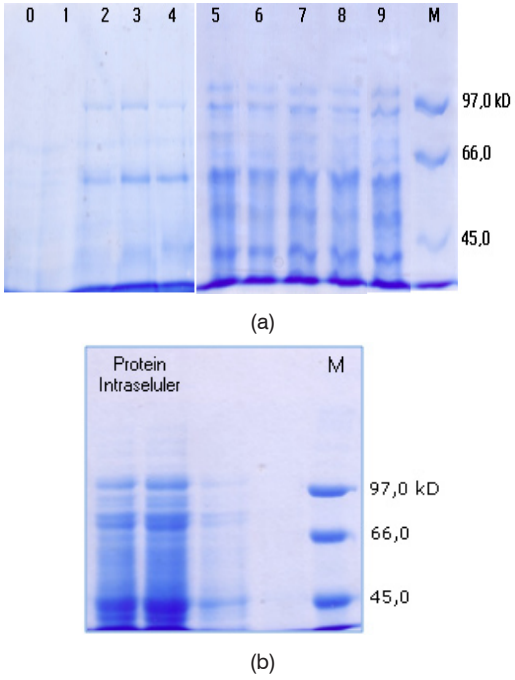


Gambar 3. Foto hasil uji β-xilosidase dengan MUX. Biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan pada media padat LB (+Tc) yang ditutup dengan larutan agar 0,5% yang mengandung MUX 0,2%

(a) (b)

Gambar 2. Foto mikroskopis (a) protoplas *B. megaterium* MS941; (b) sel *B. megaterium* MS941 setelah transformasi (perbesaran 1000×)

PAGE, menunjukkan adanya pita protein dengan ukuran sekitar 60,0 kD, mendekati ukuran β-xilosidase, yaitu 57.993 Dalton (Gambar 4a.). Pita protein ini tidak terlihat pada protein intraseluler (Gambar 4b).



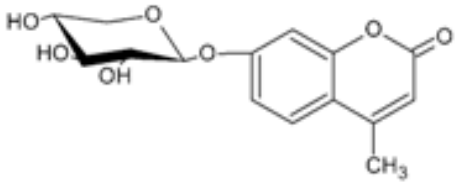
Gambar 4. Hasil analisis SDS-PAGE (a) protein ekstraseluler 5-9 jam setelah penambahan xilosa 0,5% (b) protein intraseluler

Enzim *β*-xilosidase yang dihasilkan dan disekresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil-*β*-D-xilopiranosida (pNPX). Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa *β*-xilosidase yang diekspresikan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan 5 jam setelah penambahan xilosa, mempunyai aktivitas sebesar 0,441 unit/ml.

PEMBAHASAN

Proses transformasi DNA plasmid rekombinan (pSMX) ke dalam protoplas *B. megaterium* MS941 dilakukan di dalam medium yang isotonik dan mengandung polietilen glikol (PEG). Kondisi isotonik untuk menjaga agar sel tidak lisis, sedangkan PEG untuk menginduksi masuknya DNA ke dalam protoplas dan regenerasi dinding sel bakteri.

Metilumbelliferil-*β*-D-xilosida (MUX) merupakan substrat dari enzim *β*-xilosidase yang mempunyai struktur:



Enzim *β*-xilosidase menghidrolisis ikatan glikosidik pada senyawa MUX, melepaskan xilosida dan menghasilkan senyawa umbelliferol yang dapat berfluoresensi di bawah sinar UV. Dari 12 biakan sel *B. megaterium* MS941 rekombinan yang diuji, ada dua biakan (yaitu, biakan nomor 1 dan 3) yang nampak berpendar ketika dilihat di atas transluminator UV (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa biakan nomor 1 dan 3 menghasilkan enzim *β*-xilosidase. Enzim tersebut menghidrolisis ikatan glikosidik pada senyawa metilumbelliferil-*β*-D-xilosida (MUX), yang menghasilkan senyawa umbelliferol yang berpendar di bawah sinar UV. Hal ini membuktikan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan 1 dan 3 mengekspresikan *β*-xilosidase.

Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan mampu mengekspresikan β-xilosidase dan mensekresikannya ke medium kultur. Analisis SDS-PAGE terhadap protein ekstraseluler (medium kultur) pada inkubasi 5–9 jam setelah penambahan xilosa 0,5% menunjukkan adanya pita protein di sekitar 60 kD (Gambar 4a). Sedangkan dalam protein intraseluler tidak nampak adanya pita protein di sekitar 60 kD (Gambar 4b). Hal ini membuktikan bahwa *B. megaterium* MS941 rekombinan mampu mengekspresikan *β*-xilosidase dan mensekresikannya ke medium kultur. Tidak adanya pita protein dengan ukuran sekitar 60,0 kD menunjukkan tidak adanya protein β-xilosidase yang tersimpan di dalam sel.

Enzim *β*-xilosidase yang dihasilkan oleh *B. megaterium* MS941 rekombinan ditentukan aktivitasnya terhadap substrat p-nitrofenil-*β*-D-xilopiranosida (pNPX). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghidrolisis pNP-*β*-D-xilopiranosida menghasilkan 1 µmol p-nitrofenol. Medium kultur *B. megaterium* MS941 rekombinan 5 jam kultivasi setelah penambahan xilosa 0,5% menunjukkan aktivitas *β*-xilosidase sebesar 0,441 unit/ml terhadap substrat p-nitrofenil-*β*-D-xilopiranosida.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa gen penyandi *β*-xilosidase dapat diekspresikan oleh *Bacillus megaterium* MS941 rekombinan sebagai enzim ekstraseluler.

KEPUSTAKAAN

Barg H, Malten M, Jahn M, Jahn D, 2005. Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*, *Microbial Processes and Products*, Edited by: Barredo JL. Totowa, Humana press**,** 18: 205–224.

Choi JH dan Lee SY, 2004. Secretory and extracellular production of recombinant protein using *Escherichia coli*, *Appl. Microbial biotechnol*, 64: 625–635.

Czjzek M, David AB, Bravman T, Shoham G, Henrissat B dan Shoham Y, 2005. Enzyme-substrate complex structures of a GH39 β-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*, *Journal of Molecular Biology*, 353: 838–846.

Eneyskaya, EV, Ivanen, DR, Shabalin KA, Kulminskaya AA, Backinosky LV, Brumer III H dan Noustroev KN, 2005. Chemo-enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl β-(1$\rightarrow$4)-D-xylooligosides: New substrates for β-D-xylanase assays, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3: 146–151.

Jordan E, Hust M, Roth, A, Biedendieck, Schirrmann, Jahn D dan Dubel S, 2007. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell Factories*, 6: 2.

Malten M, Biedendieck R, Gamer M, Drews A, Stammen S, Buchholz K, Dijkhuizen L, dan Jahn D, 2006. A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, export and One-Step Purification of Affinity-Tagged heterologous Levansucrase from Growth Medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1677–1679.

MoBiTec, 2004. *Bacillus megaterium.* Protein Expression System, Product Information and Instruction.

Puspaningsih NNT, 2003. Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E. coli* DH5α, Penelitian S3-IPB, Bogor dan *JSPS-Short Course Program*, September-November, Mie University, Japan.

Puspaningsih NNT, Suwanto A, Suhartono MT, Suminar SA, Kimura T, dan Ohmiya K, 2005. *Cloning of Clustered Gene for Thermostable Xylan-Degrading Enzymes β-xylosidase and α-L-arabinofuranosidase of Bacillus thermoleovorans IT-08,* International Workshop on Biorefinery and Bioenergy, Kyoto 9-10 Februari 2005, Japan.

Schallmey M, Singh A, dan Ward OP, 2004. Development in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1–17.

Wang W, Hollmann R, Furch T, Nimtz M, Malten M, Jahn D, dan Deckwer W, 2005. Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase, *Proteome science*, 3: 4.

Yang Y, Biedendieck R, Wang W, Gamer M, Malten M, Jahn D dan Deckwer, 2006. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*, *Microbial Cell Factories*, 5: 36.

Hollan *et al*., 2007.

Reviewer: **Dr. Abinawanto**