

Teknik Produksi Amilase Skala Pilot dari Isolat Rekombinan Pembawa Gen Amilase

Nur Richana, Ahmad Thontowi, dan Pia Lestina

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji produksi enzim dari isolat bakteri rekombinan pembawa gen α -amilase. Diperoleh 2 isolat rekombinan dari isolat MII-10 yang bersifat mesofil. Mengikuti model Monod, maka laju pertumbuhan spesifik dari isolat rekombinan sangat turun, rendemen biomasa maupun rendemen produk berdasarkan protein terlarutnya meningkat pada isolat rekombinan, yaitu isolat TMII-10-1 dan TMII-10-2 masing-masing adalah $Y_{x/s} = 0,32$ dan $0,23$ g/g dan $Y_{p/s} = 0,35$ dan $0,23$ g/g. Namun demikian, tidak meningkatkan produksi amilasanya.

Kata kunci: α -amilase, isolat rekombinan, TMII-10-1, TMII-10-2

ABSTRACT

The purpose of this research was study of amylase production of recombinant isolates that including α -amylase genes. The results indicated were mesophilic two recombinant colonies. According Monod model, specific growth velocity of the recombinants isolates was very decreasing, the biomass rendement either product rendement based on the dissolved protein was increasing of recombinant isolates $Y_{x/s} = 0.32$ and 0.23 g/g and $Y_{p/s} = 0.35$ and 0.23 g/g of TMII-10-1 and TMII-10-2 isolates are respectively. Even though that not increasing the amylase production.

Key words: Amylase, production, recombinant

PENDAHULUAN

Peranan enzim sebagai biokatalisator dalam berbagai bidang industri semakin penting. Saat ini, enzim yang diproduksi secara komersial banyak digunakan dalam bidang industri, analisis, dan kedokteran. Berkembangnya berbagai teknologi proses pada industri biologi yang menggunakan enzim akan memerlukan berbagai jenis enzim dengan spesifikasi masing-masing.

Potensi penggunaan enzim amilase sangat besar, namun masih terdapat kendala, yaitu enzim tersebut masih harus diimpor dengan harga relatif mahal. Untuk memproduksi sendiri juga masih menghadapi beberapa kendala, antara lain tidak tersedianya strain mikroba unggul penghasil enzim amilase dan kurangnya pengetahuan tentang teknologi produksi enzim. Usaha untuk meningkatkan produksi enzim dari mikroorganisme telah dilakukan, baik dengan manipulasi lingkungan maupun sifat mikroba tersebut. Pemanfaatan bahan mutagen seperti sinar ultra violet, sinar gamma, dan N-methyl-N-nitrosoguanidin (NTG) untuk mengubah sifat mikroorganisme telah banyak

dilakukan. Teknik kloning gen juga telah berkembang dan banyak dimanfaatkan untuk memperoleh mikroba unggul penghasil enzim.

Teknik rekayasa genetika telah terbukti dapat digunakan untuk melipatgandakan produktivitas enzim sampai dengan 100-200 kali lipat (Ganter *et al.*, 1988). Mikroba yang sudah umum digunakan untuk menghasilkan enzim adalah bakteri dan kapang, terutama *Bacillus* dan *Aspergillus*. Kedua mikroba dari genus tersebut mensekresikan enzim dalam jumlah relatif besar (Aunstrup *et al.*, 1979).

Kimura dan Chiba (1983) telah melakukan penelitian α -amilase yang diproduksi oleh *Bacillus subtilis* dengan substrat pati ubi jalar dan barley. Sedangkan Ratankhanokchai *et al.* (1992) mencoba *Chloroflexus aurantiacus* untuk memproduksi amilase yang dapat menghidrolisis pati menjadi maltotetraosa dan malto-triosa.

Berdasarkan pertimbangan bahwa pustaka genom gen α -amilase telah diperoleh, maka untuk meningkatkan ekspresi gen α -amilase dilakukan seleksi positif koloni pembawa gen α -amilase dan pembentukan sistem *over expression*. Bakteri rekombinan pembawa gen α -amilase tersebut selanjutnya digunakan dalam produksi α -amilase, sehingga produksi dan aktivitas enzimnya menjadi tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji produksi enzim dari isolat bakteri rekombinan pembawa gen α -amilase.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Enzimatik Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Isolat yang digunakan untuk produksi amilase, yaitu isolat MII-10 (sebagai kontrol), TMII-10-1 dan TMII-10-2.

Produksi amilase dari isolat bakteri hasil rekayasa genetika pada bioreaktor dengan volume kerja 10 l dilakukan pada kondisi proses, yaitu pH 6,0, suhu 30°C, dengan komposisi substrat pati. Pengambilan contoh dilakukan setiap 2 jam sampai jam ke-24, selanjutnya dilakukan setiap 4 jam sampai dengan jam ke-48. Parameter yang dianalisis meliputi pertumbuhan mikroba berdasarkan analisis kerapatan optis (OD), kandungan protein terlarut, aktivitas enzim, bobot sel kering, dan kadar pati sisa.

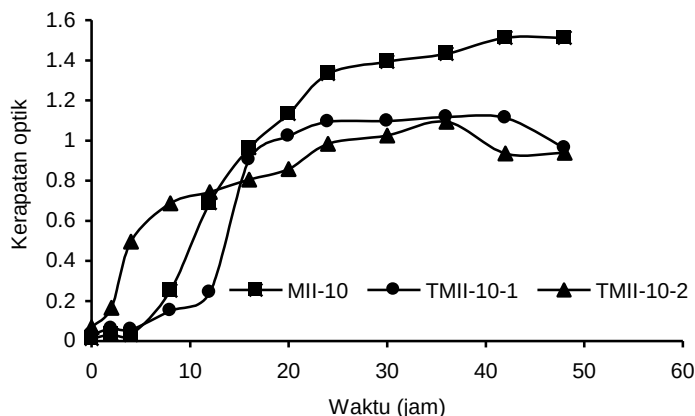
Perhitungan parameter kinetika fermentasi dilakukan menurut metode Monod (1949). Parameter kinetika yang dihitung dalam kajian ini ialah laju pertumbuhan spesifik, rendemen biomasa yang didasarkan pada substrat yang dikonsumsi = Y_x/s , rendemen produk yang didasarkan pada substrat yang dikonsumsi = Y_p/s , dan rendemen produk yang didasarkan pada rendemen biomasa = Y_p/x .

HASIL DAN PEMBAHASAN

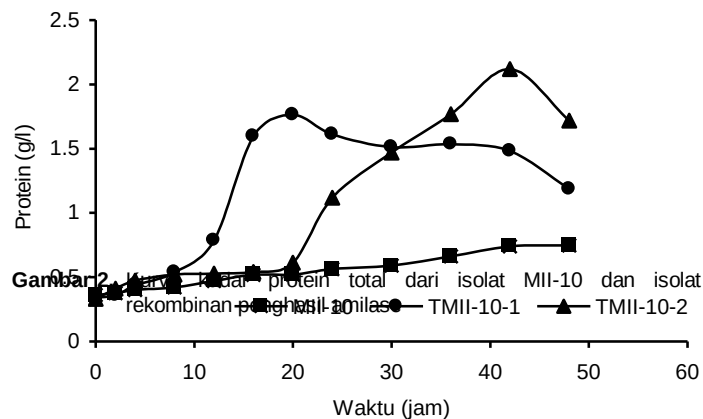
Produksi amilase dilakukan dalam bioreaktor dengan volume kerja 2 l. Kajian produksi ini dilakukan dengan pH 6,0, suhu 30°C, agitasi 200 rpm, dan aerasi 1,5 l/menit. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan amilase ditinjau dari pertumbuhan mikrobanya dan pembentukan produk oleh mikroba tersebut. Pertumbuhan dicirikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk menggandakan massa atau jumlah sel. Metode penentuan jumlah sel sangat sulit sehingga pada umumnya pertumbuhan sel dinyatakan melalui massa sel atau kerapatan optiknya. Hasil pengukuran biomasa berdasarkan pengamatan terhadap kerapatan optik disajikan pada Gambar 1.

Kurva kerapatan optik menunjukkan fase adaptasi untuk isolat bakteri unggul MII-10 berlangsung sampai jam ke-4. Fase tersebut digunakan sel untuk melakukan pembelahan dan pemeliharaan, sel mempersiapkan diri melakukan metabolisme pada fase berikutnya. Fase eksponensial berlangsung dari jam ke-4 sampai jam ke-20, setelah jam ke-20 terjadi deselerasi pertumbuhan sel menuju fase stasioner. Jam akhir terlihat masih menunjukkan kekeruhan yang meningkat. Perubahan kekeruhan yang terjadi seiring dengan waktu tidaklah besar. Pertumbuhan sel MII-10 secara cepat mencapai fase eksponensial (logaritmik). Hal ini ditunjukkan dengan pendeknya fase lag (penyesuaian), antara jam ke-4 dan ke-8 telah mencapai fase eksponensial (Gambar 2).

Hasil pengamatan untuk isolat bakteri rekombinan TMII-10-1 ternyata mempunyai fase adaptasi yang sama dengan isolat TMII-10, sedangkan untuk isolat TMII-10-2 fase adaptasi sangat singkat (tidak sampai 2 jam). Fase stasioner dari ketiga isolat ternyata isolat TMII-10 jauh lebih tinggi



Gambar 1. Pola pertumbuhan isolat MII-10 dan isolat rekombinan penghasil amilase



Gambar 2. Kurva kadar protein total dari isolat MII-10 dan isolat rekombinan penghasil amilase

dibandingkan dengan kedua isolat rekombinan. Kerapatan optik maksimum untuk MII-10, TMII-10-1, dan TMII-10-2 berturut-turut adalah 1,513; 1,117; dan 1,094. Hasil ini didukung dengan perhitungan laju pertumbuhan untuk ketiga isolat tersebut, yaitu MII-10, TMII-10-1, dan TMII-2 berturut-turut adalah 0,165; 0,126; dan 0,07 jam⁻¹.

Hasil ini belum seperti yang diharapkan, seharusnya transformasi dengan *Escheria coli* diharapkan pertumbuhan mikroba jauh lebih cepat, biomasa naik sehingga diharapkan produksi akan meningkat.

Protein

Kurva kadar protein total cenderung meningkat selama kultivasi. Namun untuk isolat MII-10 peningkatan protein terlarut tidak terlalu tinggi, sedangkan untuk isolat rekombinan terjadi kenaikan yang dramatis. Hal ini menunjukkan bahwa selama kultivasi terbentuk enzim yang sangat tinggi. Kemampuan mikroba untuk membentuk enzim sangat tinggi. Namun demikian, perlu ditinjau aktivitas enzim amilasena tinggi atau tidak.

Aktivitas enzim

Aktivitas enzim untuk ketiga isolat mempunyai pola yang hampir sama. Aktivitas enzim meningkat pada saat memasuki fase eksponensial. Enzim diproduksi dalam jumlah yang besar pada fase ini. Fenomena ini memperlihatkan bahwa amilase merupakan produk metabolit primer yang berasosiasi dengan pertumbuhan karena produk digunakan untuk kelangsungan hidup sel dalam mendegradasi pati sebagai substrat.

Aktivitas enzim maksimum dari isolat MII-10 dan TMII-10-2 dicapai pada jam ke-20, yaitu 539,52 dan 558,91 U/ml. Sedangkan untuk isolat TMII-10-1 aktivitas maksimum 603,69 dicapai pada jam ke-24. Hasil ini sesuai dengan penelitian Stredansky *et al.* (1993) bahwa aktivitas tertinggi α -amilase dari *B. licheniformis* dicapai pada jam ke-26 (kultivasi sistem fed batch dengan kontrol sistem batch), setelah jam ke-26 terdeteksi adanya protease sehingga aktivitas tidak hanya stasioner tetapi menurun dengan tajam. Penurunan aktivitas enzim terjadi karena gugus amino dari enzim akan dikonsumsi oleh protease yang terbentuk.

Berdasarkan hasil pengamatan aktivitas enzim isolat rekombinan tersebut belum berhasil baik. Hasil penelitian yang diharapkan dapat memperoleh isolat yang mampu memproduksi enzim berlipat ganda dibanding isolat aslinya. Namun dari penelitian ini aktivitas enzim yang dihasilkan hampir sama.

Kinetika Kultivasi

Beberapa parameter kinetika reaksi yang diperoleh dari proses kultivasi menggunakan bioreaktor disajikan pada Tabel 1, 2, 3, dan 4.

Parameter laju pertumbuhan spesifik yang digunakan untuk mengevaluasi pertumbuhan bakteri, nilai tertinggi dicapai oleh isolat MII-10 yaitu 0,165. Hal ini menunjukkan laju pertumbuhan isolat MII-10 paling cepat dibandingkan dengan kedua isolat rekombinan. Laju pertumbuhan tidak selalu berasosiasi dengan rendemen biomasa. Rendemen biomasa tertinggi adalah isolat TMII-10-1, yaitu 0,32 yang nilai laju pertumbuhan spesifiknya

Tabel 1. Data perhitungan nilai rendemen untuk isolat MII-10

Produk		Substrat	Biomasa	P-Po		S-So	X-Xo
A	B			A	B		
0,360	0,061	8,77	0,220	0,000	0,000	0,000	0,000
0,375	0,218	7,62	0,280	0,015	0,157	1,150	0,060
0,402	0,322	7,22	0,370	0,042	0,261	1,550	0,150
0,422	0,673	7,003	0,490	0,062	0,612	1,767	0,270
0,470	0,840	6,737	0,520	0,110	0,779	2,033	0,300
0,517	0,860	6,237	0,910	0,157	0,799	2,533	0,690
0,520	1,037	5,303	1,150	0,160	0,976	3,467	0,930
0,563	0,757	4,570	1,290	0,203	0,696	4,200	1,070
0,591	0,656	3,820	1,380	0,231	0,595	4,950	1,160
0,662	0,449	3,303	1,470	0,302	0,388	5,467	1,250

Hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan protein sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,055 X - 0,02$ ($r = 0,97$), maka $Y_p/s = 0,055$; hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,103X + 0,214$, maka $Y_p/s = 0,103$; hubungan X-Xo dengan S-So, yaitu melalui persamaan garis regresi $Y = 0,268 X - 0,139$, sehingga diperoleh $Y_x/s = 0,268$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan protein sebagai produk melalui persamaan $Y = 0,199X - 0,0004$, sehingga diperoleh $Y_p/x = 0,199$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk melalui persamaan $Y = 0,344 X + 0,324$, sehingga diperoleh $Y_p/x = 0,344$

0,126 (Tabel 5).

Menurut Wang *et al.* (1979), hubungan kinetika pertumbuhan dan pembentukan produk bergantung pada peranan produk dalam metabolisme sel. Rendemen produk berdasarkan perhitungan protein sebagai produk tertinggi dicapai oleh isolat TMII-10-1 (0,35 g/g), dan terendah adalah MII-10 (0,055 g/g). Hal ini menunjukkan bahwa transformasi gen yang dilakukan dapat meningkatkan produk protein yang tinggi. Namun berdasarkan aktivitas spesifik enzim ternyata isolat TMII-10-1 sangat rendah (0,078 g/g), yang berarti protein yang dihasilkan hanya sedikit yang mempunyai aktivitas amilase. Dengan kata lain enzim bukan amilase lebih banyak terbentuk. Sedangkan untuk isolat TMII-10-2 ternyata rendemen produk berdasarkan protein maupun aktivitas protein cukup tinggi. Demikian pula rendemen produk oleh biomasa juga tertinggi, yaitu 0,433, yang berarti kemampuan bakteri tersebut menghasilkan amilase lebih tinggi.

Tabel 2. Data perhitungan nilai rendemen (Yp/s, Yx/s, dan Yp/x) untuk isolat TMII-10-1

Produk		Substrat	Biomasa	P-Po		S-So	X-Xo
A	B			A	B		
0,341	0,065	9,02	0,22	0,000	0,000	0,000	0,000
0,359	0,087	8,77	0,32	0,018	0,022	0,25	0,100
0,437	0,136	7,62	0,58	0,096	0,071	1,40	0,360
0,537	0,137	7,22	0,62	0,100	0,072	1,80	0,400
0,784	0,175	7,003	1,152	0,196	0,110	1,99	0,932
1,596	0,239	6,74	1,157	1,255	0,174	2,28	0,937
1,762	0,255	6,24	1,256	1,421	0,189	2,78	1,036
1,612	0,374	5,31	1,262	1,271	0,309	3,72	1,042
1,512	0,368	4,57	1,259	1,171	0,303	4,45	1,039

Hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan protein sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,055 X - 0,02$ ($r = 0,97$), maka $Yp/s = 0,055$; hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,103X + 0,214$, maka $Yp/s = 0,103$; hubungan X-Xo dengan S-So, yaitu melalui persamaan garis regresi $Y = 0,268 X - 0,139$, sehingga diperoleh $Yx/s = 0,268$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan protein sebagai produk melalui persamaan $Y = 0,199X - 0,0004$, sehingga diperoleh $Yp/x = 0,199$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk melalui persamaan $Y = 0,344 X + 0,324$, sehingga diperoleh $Yp/x = 0,344$

Tabel 3. Data perhitungan nilai rendemen (Yp/s, Yx/s, dan Yp/x) untuk isolat TMII-10-2

Produk		Substrat	Biomasa	P-Po		S-So	X-Xo
A	B			A	B		
0,331	0,069	8,87	0,340	0,000	0,000	0,000	0,000
0,412	0,125	8,26	0,530	0,081	0,056	0,61	0,195
0,474	0,161	7,79	0,680	0,143	0,091	1,08	0,340
0,521	0,258	7,03	0,743	0,190	0,188	1,84	0,403
0,528	0,748	6,89	0,817	0,197	0,678	1,98	0,477
0,540	0,886	6,13	0,856	0,209	0,816	2,74	0,516
0,612	0,913	5,87	0,982	0,281	0,843	3,00	0,642
1,118	0,476	5,25	1,303	0,787	0,407	3,62	0,963
1,468	0,310	4,87	1,321	1,137	0,240	4,00	0,981

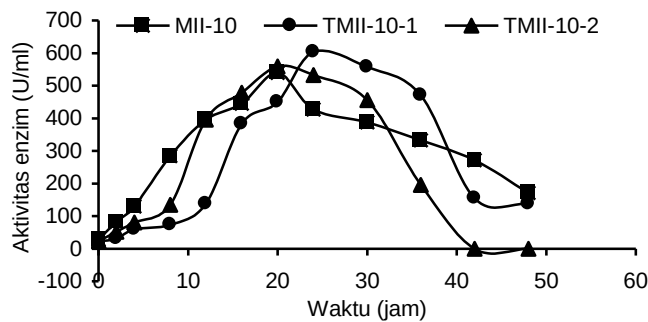
Hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan protein sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,23 X - 0,14$ ($r = 0,84$), maka $Yp/s = 0,23$; hubungan P-Po dengan S-So berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk, yaitu melalui persamaan regresi $Y = 0,138X + 0,078$, maka $Yp/s = 0,138$; hubungan X-Xo dengan S-So, yaitu melalui persamaan garis regresi $Y = 0,23 X + 0,014$, sehingga diperoleh $Yx/s = 0,23$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan protein sebagai produk melalui persamaan $Y = 1,04 X - 0,184$, sehingga diperoleh $Yp/x = 1,04$; hubungan P-Po dengan X-Xo berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk melalui persamaan $Y = 0,432 X - 0,152$, sehingga diperoleh $Yp/x = 0,432$

Berdasarkan uraian tersebut maka isolat TMII-10-2 sudah sedikit lebih tinggi kemampuannya menghasilkan amilase, namun belum seperti yang diharapkan. Di samping itu, dilihat dari aktivitas enzimnya (Gambar 3.) maka waktu fermentasi sangat cepat setelah jam ke-32 sehingga aktivitas enzim sudah tidak ada. Maksimum pembentukan produk enzim pada jam ke-20,

Tabel 4. Parameter kinetika kultivasi isolat MII-10 dan isolat rekombinan peng-hasil α -amilase

Parameter kinetika	MII-10	TMII-10-1	TMII-10-2
Laju pertumbuhan (μ) (jam^{-1})	0,165	0,126	0,07
Rendemen produk (Y_p/s) (g/g) ^a	0,055	0,35	0,23
Rendemen produk (Y_p/s) (g/g) ^b	0,103	0,078	0,138
Rendemen biomasa (Y_x/s) (g/g)	0,268	0,32	0,23
Rendemen produk oleh biomasa (Y_p/x) (g/g) ^a	0,199	1,25	1,04
Rendemen produk oleh biomasa (Y_p/x) (g/g) ^b	0,344	0,231	0,433

^a = perhitungan berdasarkan protein sebagai produk, ^b = perhitungan berdasarkan aktivitas spesifik sebagai produk



Gambar 3. Kurva aktivitas amilase dari isolat MII-10 dan isolat rekombinan TMII-10-1 dan TMII-10-2

kemudian akan secara cepat menu-run. Diduga setelah jam ke-20 mikroba membentuk produk lain sehingga meng-hambat aktivitas amilase.

KESIMPULAN

Mengikuti model Monod nilai laju pertumbuhan spesifik tertinggi adalah isolat MII-10 ($0,165 \text{ jam}^{-1}$). Transformasi gen yang dilakukan, untuk kedua isolat rekombinan justru menurunkan laju pertumbuhan ($0,126$ dan $0,07 \text{ jam}^{-1}$), Rendemen biomasa maupun rendemen produk berdasarkan protein terlarut me-ningkat pada isolat rekombinan, yaitu isolat TMII-10-1 dan TMII-10-2 masing-masing adalah $Y_x/s = 0,32$ dan $0,23 \text{ g/g}$ dan $Y_p/s = 0,35$ dan $0,23 \text{ g/g}$. Namun demikian, tidak meningkatkan produksi amilasena.

DAFTAR PUSTAKA

- Aunstrup, K. 1979.** Production, isolation and economic of extracellular enzymes. *In* Wingard *et al.* (Eds.). Applied Biochemistry and Bioengineering Enzyme Technology. Academic Press, New York.
- Ganter, C., A. Bock, P. Buckel, and R. Mattes. 1988.** Production of thermostable recombinant α -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* 8:301-310.
- Kimura, A. and S. Chiba. 1983.** Quantitative study of anomeric forms of maltose produced by α and β -amylases. *J. Agric. Biol. Chem.* 47(8):1747-1753.
- Monod, J. 1944.** The growth of bacterial cultures. *Ann. Rev. Microbiol.* 3:371-374.
- Ratankhanokchai, K., J. Kaneko, Y. Kamio, and K. Izaki. 1992.** Purification and properties of maltotetraose and maltotriose-producing amylase from *Chloroflexus auranticus*. *APPL. Environ. Microbiol.* 58:2490-2494.
- Stredansky, M., R. Svore, E. Sturdik, and K. Decrove. 1993.** Repeated batch α -amylase production in aqueous two phase system with *Bacillus* strain. *J. Biotechnol.* 27:181-190.
- Wang, D.I.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunhill, A.E. Humphrey, and M.D. Lilly. 1977.** Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Sons, New York.