

BIOTEKNOLOGI

**LAPORAN HASIL
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA
(HIBAH PASCA)**

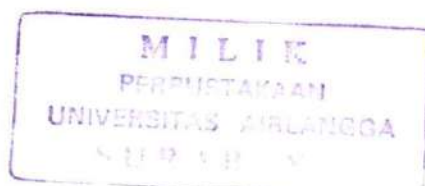


**PENINGKATAN AKTIVITAS ENZIM HEMISELULASE DENGAN
REKAYASA PROTEIN UNTUK PENGOLAHAN BIOMASSA BERBASIS
LIGNOSELULOSA**

**Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
Prof. Dr. Eddy Bagus W., M.S., Sp.MK.
A.A. Istri Ratnadewi
Ratna Melinda
M. Fanani**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian kepada Masyarakat Mono
Tahun, dan Pengabdian kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga
Tahun Anggaran 2012 Nomor : 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2012**



HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa
2. Ketua Peneliti :
- a. Nama lengkap : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Msi
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 19630615 198701 2001
 - d. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 - e. Jabatan Struktural : Direktur Pendidikan
 - f. Bidang Keahlian : Biokimia
 - g. Fakultas/Jurusan/ Puslit : Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

3. Tim Peneliti

NO.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Edy Bagus W., MS., Sp.MK.	Mikrobiologi	Fak. Kedokteran/ Mikrobiologi	Universitas Airlangga
2.	Dr. Zeily Nurachman	Biokimia	Fak. MIPA/ Kimia	Institut Teknologi Bandung
3.	Moch. Fanani	Biokimia	Mahasiswa S2, Kimia, Fak. Sains dan Teknologi	Universitas Airlangga
4.	Ratna Melinda	Bioteknologi	Mahasiswa S2, Kimia, Fak. Sains dan Teknologi	Universitas Airlangga
5.	A. A. Istri Ratnadewi	Biokimia	Mahasiswa S3, Kimia, Fak. Sains dan Teknologi	Universitas Jember
6.	Lanny Hartanti	Bio-Farmasi	Mahasiswa S3, Kimia, Fak. Sains dan Teknologi	Universitas Katholik Widya Mandala

4. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
- b. Biaya yang diusulkan : Rp. 180.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2012 : Rp. 60.000.000,-

Surabaya, 30 Oktober 2012

Ketua Peneliti,

Mengetahui
Dekan Fak. Sains dan teknologi

Prof. Dr. Win Darmanto, MS
NIP. 196106161987011001

Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSi
NIP. 19620615 198701 2001

Mengetahui.

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., Msi
NIP. 195908051987011001



RINGKASAN

Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa melalui pendanaan Hibah Tim Pascasarjana direncanakan berlangsung selama 3 tahun. Penelitian tahun kedua telah meluluskan 2 mahasiswa jenjang Magister dan melibatkan 2 mahasiswa jenjang Doktor. Selain itu telah pula menghasilkan 3 artikel untuk publikasi internasional (submit) dan 1 naskah diseminarkan dalam seminar internasional (prosiding). Hasil penelitian tahun kedua menunjukkan bahwa (1). rekayasa protein melalui *site directed mutagenesis* terhadap enzim β -D-xilosidase telah menghasilkan enzim varian yang mampu mengekspresikan enzim tersebut dan telah pula berhasil dikristalkan, (2). rekayasa protein melalui *direct evolution* terhadap enzim α -L-arabinofuranosidase telah dianalisis secara biokimia dan in-silico , dan salah satu diantaranya menunjukkan karakterisasi pH dan suhu lebih tinggi dibandingkan wild type nya, (3). Peluang aplikasi enzim arabinofuranosidase untuk terapi tuberculosis karena mampu menghidrolisis dinding sel berbasis arabinosa, dan (4). Gen putative exo-xilanase dalam pTP510 telah berhasil diisolasi dan disisipkan dalam pET-30b dan menunjukkan enzim xilosidase kedua. Hasil penelitian pada tahun kedua tersebut akan dilanjutkan pada tahun ketiga ini dengan menggabungkan dua gen unik xilosidase dalam sistem ekspresi serta kelanjutan analisis kinetika reaksi hemiselulase variant.

ABSTRACT

SUBSTRATE SPECIFICITY OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE GH51 FROM *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 TOWARD *Mycobacteria* CELL WALL

(hasil tesis S2 atas nama M. Fanani)

The purpose of this research is to investigate the substrate stereospecificity of α -L-arabinofuranosidase GH51 *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 (AbfA) toward *Mycobacteria* cell wall. In general, there are 3 stages in this research are (1) the production of AbfA recombinant from *E. coli* BL21(DE3)/pET-abfA, (2) specific activity assay of AbfA recombinant, (3) substrate stereospecificity analysis of AbfA in silico. In laboratory methods, AbfA has hydrolase activity toward D-arabinofuranoside (H37Rv and BFCC). However its activity toward L-arabinofuranoside (arabinogalactan, pectin, oat spelt xylan and arabinan) higher than its hydrolase activity toward D-arabinofuranoside (H37Rv and BFCC). On silico analysis, hydrolase activity AbfA toward D-arabinofuranoside may occur due to fingerprint interactions between the ligand and catalytic residue Glu294. Based on in silico analysis, the catalytic mechanism of AbfA toward D-arabinofuranoside was suggested following model catalytic mechanism of α -L-arabinofuranosidase GH51 toward L-arabinofuranoside substrate. Effect of steric hindrance by Trp99 and Trp298 at the sub-site -1 rationalize the substrate specificity toward D-arabinofuranoside lower than L-arabinofuranoside. This thesis research was the first reported that AbfA has catalytic activity toward D-Arabinofuranoside derived from *Mycobacteria* cell wall.

Key words : α -L-arabinofuranosidase GH51, substrate stereospecificity, fingerprint interaction, steric hydrance.

ABSTRACT

Characterization of α -L-arabinofuranosidase (AbfA) Variant Biochemical Properties and In Silico Study on The Effect of Mutation to Its Structure

(hasil tesis atas nama Ratna Melinda)

Geobacillus thermoleovorans IT-08 α -L-arabinofuranosidase (AbfA) is an enzyme with optimum activity around neutral pH (6-8). Its variant (variant A9) exhibit an increased activity at pH 9. In this study, a nucleotide alignment to the wildtype (DQ387046.1) was done to determine the modification in *abfa* variant A9 gene. The enzyme expressed in *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5abf were characterized for its biochemical properties. Protein tertiary structure model which built by aligning the sequence to *Geobacillus stearothermophilus* T-6 α -L-arabinofuranosidase protein crystal structure (PDB accession number: 1PZ3), was subjected to determine the structure alteration. The relation between change in biochemical property and structure alteration was also investigated. Substitution at three bases in *abfa* variant A9 gene (A137G; T615A; A853G) resulted in amino acids replacement (Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu). Expression of *abfa* variant gene was detected using SDS PAGE, shown a 61 KDa band corresponds to AbfA variant A9. The partially purified enzyme displayed optimum activity at pH 7 and 70°C. AbfA variant A9 was stable for

24 hours at pH 6-9 (in 4°C) and lost almost 70% of its activity on 16 hours incubation at 70°C. Superimpose of Abfa variant with the wildtype tertiary structure model shown RMSD value 0.05%. In silico analysis of non covalent interaction revealed that non covalent interactions within the protein were reduced due to amino acid replacement. Substitution of Arg46 to Gln46 ($\Delta\Delta G$: +0.22) decrease 3 Van der Waals interaction, Asp205Glu substitution ($\Delta\Delta G$: +2.32) resulted in decrease of 3 Hydrogen bonds and 1 Van der Waals bond and generation of 1 electrostatic interaction, substitution of Lys285 by Glu ($\Delta\Delta G$: -0.09) decreased 1 Van der Waals interaction but reduced the repulsive effect arises from positive side chains around residue 285. The decrease in AbfA variant thermostability was related to the reduction of some non covalent interactions especially Hydrogen bonds and Van der Waals interaction, because of changes in structure.

Keywords: α -L-arabinofuranosidase (AbfA), mutation, biochemical properties
protein tertiary structure model, non covalent interaction

CAPAIAN INDIKATOR KINERJA

No.	Indikator Kinerja	Tahun I	Tahun II	Tahun III	Capaian Tahun II 2012
1.	Jumlah mahasiswa jenjang magister	2	2	2	2
2.	Jumlah mahasiswa jenjang Doktor	2	-	-	2
3.	Jumlah publikasi internasional (submitted)	1	2	2	3 (submitted)
4.	Jumlah mahasiswa magister yang lulus tepat waktu	2	2	2	2
5.	Jumlah mahasiswa Doktor yang lulus tepat waktu	-	2	-	Akan ujian kelayakan

LUARAN HASIL PENELITIAN

1. Tesis 2 mahasiswa Program Magister Kimia yang telah lulus
2. Tiga naskah artikel publikasi internasional dari tesis mahasiswa program magister kimia dan disertasi dua mahasiswa S3 yang telah dinyatakan *submitted*
3. Dua orang mahasiswa Program Doktor MIPA (Jurusan Kimia, minat Biokimia) akan mengikuti ujian kelayakan
4. Jejaring kerjasama dengan Perguruan Tinggi Luar Negeri yang telah dijalin sebelumnya tetap dilanjutkan untuk pengiriman mahasiswa S2 dan S3 mengikuti program sandwich, yaitu University of Groningen, Belanda; Mie University dan Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
ABSTRAK	iii
CAPAIAN INDIKATOR KINERJA	iv
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I	5
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB IV. METODE PENELITIAN	10
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	12
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	32
BAB VII. RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA	33
A. Tujuan Khusus	
B. Metode	
C. Jadwal kerja	
BAB VIII. Draf Artikel Ilmiah atau Artikel yang sudah terbit	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN:	
A. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	38

BAB I PENDAHULUAN



1.1. Latar belakang

Sektor pertanian merupakan penyumbang kedua terjadinya pemanasan global di bumi ini. Kalimat tersebut tentunya menimbulkan tanda tanya besar bagi kita semua, mengingat aktivitas pertanian tidak akan pernah berhenti selama di bumi ini masih ada kehidupan. Pertanian adalah sumber utama bagi kelangsungan hidup manusia. Oleh karena itu, hasil pengolahan pertanian yang berupa hasil panen dan limbah hasil pengolahan pertanian sebaiknya dikelola dengan baik dan maksimal bagi kelestarian alam. Dua penyumbang utama penyebab pemanasan global asal pertanian adalah penggunaan lahan, pembakaran biomassa (10%), dan hasil samping/limbah pertanian (12,5%). Selanjutnya langkah-langkah apa yang perlu dilakukan oleh masyarakat untuk mengurangi efek pemanasan global akibat aktivitas pertanian tersebut?

Limbah pertanian yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri kimia, bio-energi dan prebiotik adalah limbah pertanian kaya akan kandungan selulosa, dan hemiselulosa. Kandungan polisakarida yang cukup tinggi pada limbah pertanian tersebut dapat didegradasi secara kimia maupun enzimatik menjadi gula sederhana, selanjutnya digunakan sebagai bahan baku pembuatan bio-etanol. Sedangkan produk hidrolisis dalam bentuk oligosakarida sangat bermanfaat sebagai bahan prebiotik. Degradasi secara kimia dapat menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan, oleh karena itu degradasi enzimatik yang lebih spesifik dan ramah lingkungan sangat diperlukan dalam proses degradasi limbah pertanian tersebut. Teknologi seperti ini dikenal dengan nama *White Biotechnology*, yaitu menggunakan enzim sebagai biokatalis dalam proses industri.

Salah satu kelompok enzim yang dapat mendegradasi limbah pertanian tersebut adalah kelompok enzim hemiselulase, diantaranya adalah kelompok enzim xilanase. Berbagai limbah pertanian, seperti ampas tebu, tongkol jagung, limbah padat pengolahan kelapa sawit, dedak padi dan gandum mengandung hemiselulosa yang kaya akan kandungan xilan. Hemiselulosa merupakan suatu heteropolimer yang mengandung monosakarida pentosa (xilosa, arabinosa), heksosa (glukosa, galaktosa, manosa) dan juga gula asam (asam glukuronat) (Saha, 2003). Degradasi hemiselulosa kaya xilan secara enzimatik akan menghasilkan monosakarida dan oligosakarida

yang selanjutnya dapat dimanfaatkan pada proses pembuatan alkohol maupun industri kimia lain, seperti pembuatan xilitol, 2,3-butanadiol. Penggunaan enzim xilanolitik termofilik hasil rekombinasi galur lokal yang telah berhasil dilakukan oleh peneliti pengusul (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2000 – 2009) akan sangat bermanfaat dalam degradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa, seperti limbah padat kelapa sawit, ampas tebu, ampas pengolahan bio-diesel biji jarak, limbah tongkol jagung menjadi gula sederhana. Keberadaan limbah-limbah pertanian tersebut di atas sangatlah berlimpah di Indonesia yang merupakan negara agraris, berbasis pada pertanian.

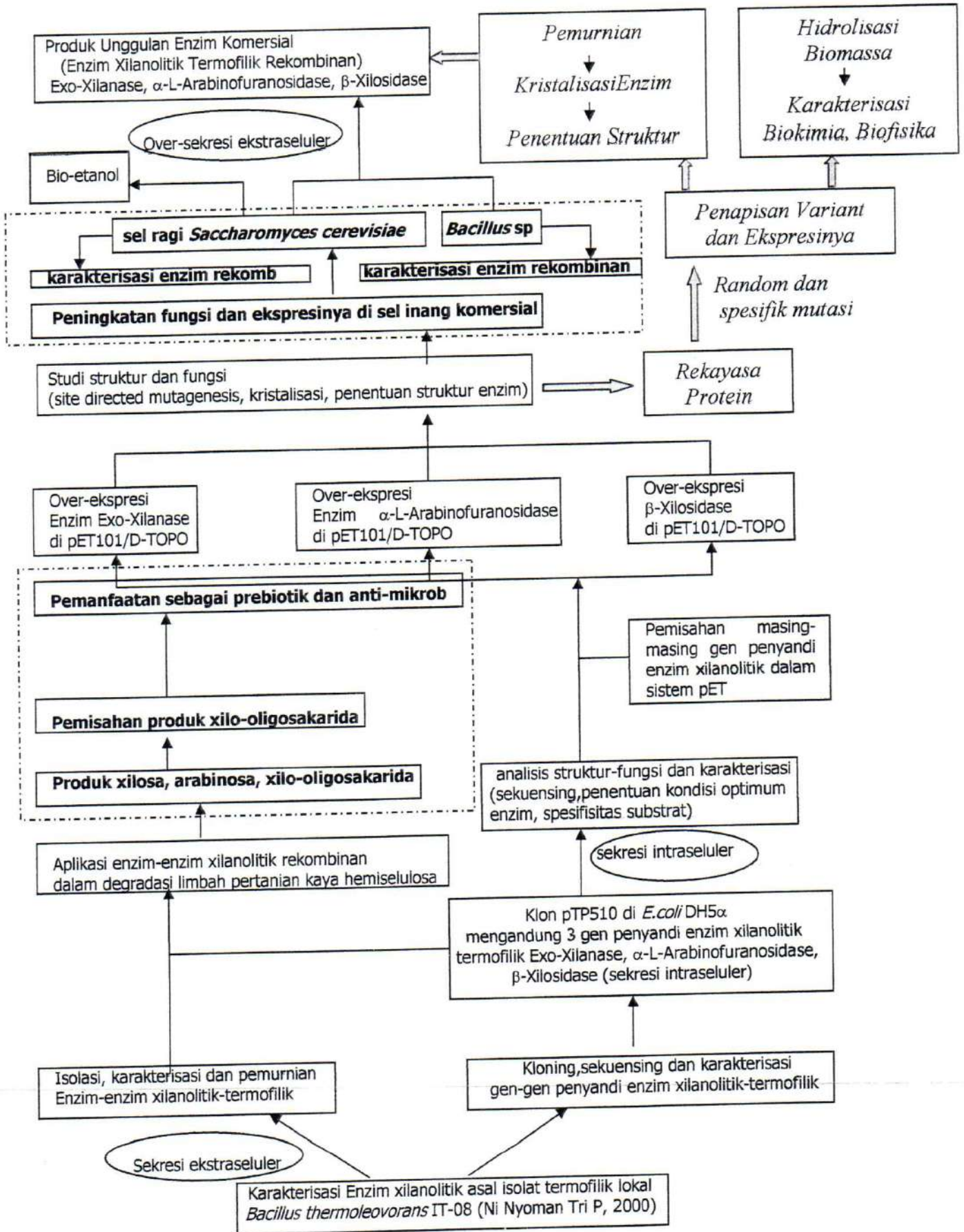
Hidrolisis total hemiselulosa xilan membutuhkan beberapa enzim yang berbeda, yaitu endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC.3.2.1.8) menghidrolisis struktur dasar xilan secara acak menjadi xilooligosakarida; 1,4- β -D-xilosidase (1,4- β -D-xylanxylohydrolase, EC.3.2.1.37) memutus xilooligosakarida menjadi xilosa. Gugus samping yang menyusun xilan akan dibebaskan oleh α -L-arabinofuranosidase, α -D-glukuronidase, galaktosidase dan asetil xilan esterase menjadi arabinosa, glukuronat, galaktosa dan asetat (Subramanian *et al.*, 2002).

Enzim xilanolitik dapat digunakan untuk beberapa keperluan, diantaranya adalah untuk (1) proses pemutihan industri pulp dan kertas, (2) meningkatkan mutu pakan ternak, (3) pengolahan bahan makanan, (4) meningkatkan kemampuan dalam degradasi material tumbuhan, khususnya limbah pertanian, (5) produksi alkohol, xilitol serta (6) meningkatkan proses ekstraksi minyak tumbuhan. Keberadaan limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan akan sangat bermanfaat sebagai bahan baku industri kimia bila didegradasi secara enzimatik menjadi oligosakarida maupun monosakarida.

Penelitian Penelitian yang telah dilakukan dan dikembangkan oleh Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim selama 8 tahun terakhir telah berhasil mengisolasi, mengkarakterisasi enzim-enzim xilanolitik termofilik dari isolat lokal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan *Bacillus subtilis* PC-01 serta telah pula berhasil mengklon gen-gen penyandi enzim xilanolitik termofilik tersebut ke dalam *Escherichia coli*. Kemampuan enzim-enzim xilanolitik rekombinan tersebut dalam mendegradasi limbah pertanian kaya hemiselulosa xilan telah pula dilakukan. Hasil menunjukkan tingginya produk xilo-oligosakarida selain dihasilkan pula monosakarida xilosa dan arabinosa. Hasil penelitian Hibah Pasca (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2007-2008) telah berhasil mensekresikan enzim xilanolitik rekombinan tersebut ke dalam sel

inang komersial *Bacillus megaterium* dan *Saccharomyces cerevisiae*. Selain itu, uji aktivitasnya sebagai anti-bakteri juga telah pula menunjukkan adanya sinergi fungsi anti-bakteri dan prebiotik akan sangat bermanfaat dalam pengembangan industri pangan. Penelitian Hibah Pascasarjana tersebut telah pula meluluskan 2 orang Doktor dan 3 orang Magister. Aplikasi produk enzim hemiselulase tunggal maupun konsorsium telah pula dikembangkan dan saat ini dalam proses perolehan patent dengan merk *Excelzyme*. Untuk lebih meningkatkan aktivitas dan daya saing komersial di masa yang akan datang, maka pada penelitian ini akan dilakukan pendekatan proteomik untuk meningkatkan aktivitas hemiselulase yang telah berhasil dikembangkan dalam produk *Excelzyme*. Rekayasa protein dalam sistem proteomik tersebut terdiri dari *site directed mutagenesis*, *gene shuffling*, analisis SEM terhadap kerja enzim terhadap substrat limbah pertanian terpilih serta over-ekspressinya. Peningkatan produksi enzim-enzim rekombinan secara mandiri tersebut diharapkan akan mampu meningkatkan ekonomi bangsa. Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa melalui pendanaan Hibah Tim Pascasarjana direncanakan berlangsung selama 4 tahun. Penelitian tahun pertama telah meluluskan 2 mahasiswa jenjang Magister dan melibatkan 2 mahasiswa jenjang Doktor. Selain itu telah pula menghasilkan 1 publikasi internasional (accepted). Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan bahwa (1). rekayasa protein melalui *site directed mutagenesis* terhadap enzim β -D-xilosidase telah menghasilkan 4 enzim varian, (2). rekayasa protein melalui *direct evolution* terhadap enzim α -L-arabinofuranosidase telah menghasilkan beberapa varian, dan salah satu diantaranya menunjukkan karakterisasi pH dan suhu lebih tinggi dibandingkan wild type nya, (3). kerusakan substrat limbah pertanian oleh enzim xilanolitik telah berhasil dianalisis dengan *Scanning Electron Microscope*, dan (4). Gen *exo-xilanase* dalam pTP510 telah berhasil diisolasi dan disisipkan dalam pET-30b. Hasil penelitian pada tahun pertama tersebut akan dilanjutkan pada tahun kedua ini.

Roadmap penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 1. Tahapan penelitian yang akan dilakukan dalam usulan penelitian Hibah Pasca ini ditunjukkan pada *huruf miring dalam kotak*.



Gambar 1. State of the art bidang penelitian [Hibah Pasca 2007-2008 (: : :)]

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE 2 (2012)

2.1. Tujuan Penelitian

- a. Meningkatkan fungsi enzim hemiselulase melalui *site directed mutagenesis* dan *directed evolution*
- b. Mengkarakterisasi enzim variant untuk efisiensi hidrolisis limbah pertanian kaya akan hemiselulosa
- c. Menentukan struktur protein melalui *protein modeling*
- d. Menganalisis produk hidrolisis enzim dan *scanning electron microscope*

2.2. Manfaat Penelitian Tahun ke 2

- a. Meningkatkan nilai ekonomis limbah pertanian sebagai sumber energi yang kaya akan polisakarida
- b. Pengembangan bioproduk secara mandiri dari isolat lokal
- c. Meningkatkan wawasan keilmuan bagi mahasiswa pascasarjana dalam penguasaan rekayasa protein

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

Pemurnian dan pencirian enzim xilanolitik-termofilik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 telah berhasil dilakukan (Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2002). Isolat *Bacillus thermoleovorans* diisolasi dari Sumber Air Panas Gunung Pancar, Bogor oleh Tan, I (1999). Selain itu, gen penyandi enzim xilanolitik telah pula berhasil diklonkan ke dalam plasmid pBluescript KS-II(+) di *Escherichia coli* DH5 α dan dinamakan pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2003). Peta restriksi pTP510 terlihat pada Gambar 2. Turunan pTP510 telah pula berhasil dikembangkan dalam vektor ekspresi pET101/D-TOPO dan dinamakan *pET-exoxyl*, *pEt-abfa* dan *pET-xyl* (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2007-2009). Keunggulan kedua enzim tersebut adalah secara sinergis mampu menghasilkan produk utama xilosa, arabinosa dan xilo-oligosakarida. Hasil ini sangat menguntungkan bila diaplikasikan secara industri. Hasil degradasi berbagai substrat xilan komersial oleh enzim xilanolitik rekombinan di pTP510 tertera pada Tabel 1.

Table 1. Produk hidrolisis berbagai xilan komersial oleh enzim xilanolitik di pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim, 2006)

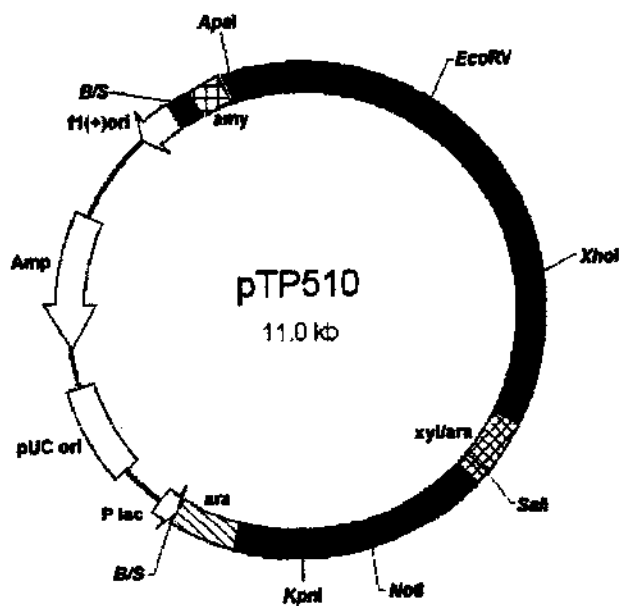
No.	Substrat	Xylose (%)	Arabinose (%)	Xylo-oligosaccharides (%)
1.	Oat spelt xylan	21.73	26.67	-
2.	Birchwood	20.60	22.26	18.60
3.	Wheat arabinoxylan	17.62	19.95	42.46
4.	Ryeflour arabinoxylan	8.89	13.02	10.05
5.	Arabinan (sugar beet)	13.55	15.10	13.99

Hasil pada Tabel 1 menunjukkan bahwa produk tertinggi xilo-oligosakarida dihasilkan oleh degradasi substrat *wheat arabinoxylan*. Selanjutnya dalam penelitian lanjutan ini akan diisolasi xilo-oligosakarida dari substrat *wheat arabinoxylan*.

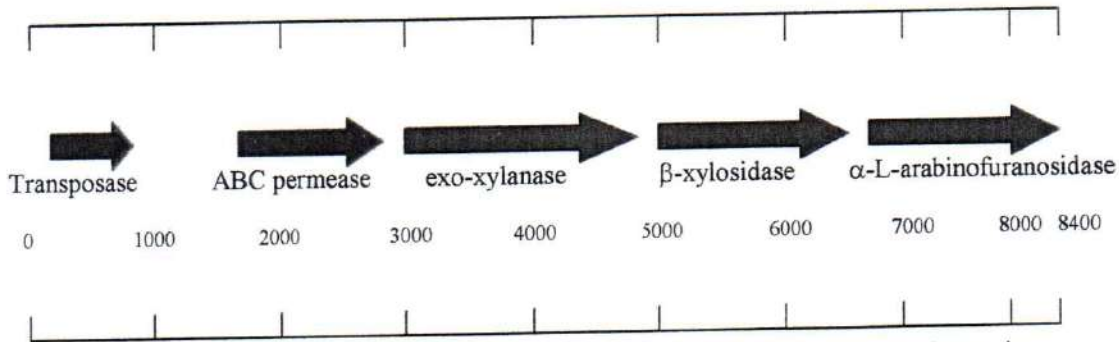
Mekanisme sinergis kedua enzim dalam menghidrolisis *oat spelt xylan* diawali oleh pemutusan rantai cabang arabinosil oleh enzim α -L-arabinofuranosidase, kemudian diikuti dengan pelepasan unit xilosa oleh aktivitas ekso dari enzim β -xilosidase (Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2003). Hasil sekuensing sebagian dari

pTP510 ujung 3' menunjukkan gen penyandi α -L-arabinofuranosidase mempunyai kesamaan yang tinggi dengan gen *abfa* dari *Geobacillus stearothermophilus* T6 famili GH51. Sedangkan hasil sekuensing sebagian gen penyandi xilosidase (*xyl*) dan/atau β -xilosidase/ α -L-arabinofuranosidase (*xyl/abfa*) mempunyai kesamaan hanya 25-34% dengan famili GH43 dari gen *xyl/abfa* *Oceanobacillus theynsis* HTE831 dan gen *xyl* dari *Bacillus halodurans*. Enzim β -xilosidase (Xyl) dan α -L-arabinofuranosidase (Abfa) yang diisolasi dari isolat *B. thermoleovorans* maupun *E.coli* DH5 α rekombinan menunjukkan kesamaan sifat, yaitu (1) secara sinergis mampu menghidrolisis *oat spelt xylan* menghasilkan produk utama xilosa, (2) bekerja pada suhu optimum 70°C, dan (3) memiliki stabilitas pH pada kisaran 5-8. Perbedaan hanya terjadi pada pH optimumnya. Selain itu aktivitas kedua enzim rekombinan menunjukkan peningkatan aktivitas dibanding enzim aslinya.

Analisis struktur gen penyandi enzim xilanolitik yang terinsersi dalam pTP510 dilakukan pada tahun 2005 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih) dan hasil menunjukkan bahwa selain gen penyandi β -xilosidase (*xyl*) dan α -L-arabinofuranosidase (*abfa*) juga ditemukan adanya gen penyandi *exo-xylanase* (*exo-xyl*). Peta posisi masing-masing gen dalam pTP510 terlihat pada Gambar 3. Diduga dua dari gen penyandi xilanolitik, yaitu *xyl* dan *exo-xyl* merupakan novel enzim yang menarik untuk dieksplorasi lebih mendalam. Selain itu, ditemukan pula terinsersinya 2 gen penyandi transposase dan ABC permease dalam pTP510. Kedua gen tersebut diduga berperan dalam proses transport monosakarida dalam transport membran.



Gambar 2. Peta restriksi pTP510 (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2003)



Gambar 3. Diagram gen penyandi enzim xilanolitik yang terinsersi dalam pTP510 (■→) (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2005)

Ketiga gen penyandi enzim xilanolitik termofilik telah terdaftar di GenBank dengan perolehan 3 Accession Number (Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan tim, 2006), yaitu DQ345777 untuk gen penyandi xilosidase, DQ387046 untuk gen penyandi α -L-arabinofuranosidase, dan DQ387047 untuk gen penyandi exo-xylanase. Informasi ketiga gen tersebut dapat diakses secara internasional oleh seluruh peneliti dunia melalui website NCBI atau DDBJ. Hasil penelusuran pada data GenBank menunjukkan bahwa belum ada data mengenai klon penyandi enzim xilanolitik yang dieksplorasi dari isolat *Bacillus thermoleovorans* IT-08 yang telah dihasilkan oleh tim peneliti pengusul. (Ni Nyoman Tri Puspaningsih, 2000 – 2005).

Beberapa penelitian mengenai enzim-enzim pendegradasi xilan khususnya dari *Bacillus sp.* telah pula dilaporkan. Diantaranya adalah β -xylanase dan β -xylosidase dari *Bacillus stearothermophilus*. Kedua gen penyandi enzim tersebut telah pula berhasil diklonkan (Nanmori et al. 1990 dan 1994), kelompok β -xylanase termofilik asal *Bacillus thermoleovorans* K-3d (Sunna, et al., 1997) hanya mengkarakterisasi enzim ekstrak kasar, β -xylanase asal *Bacillus sp.* Thermoalkalifilik strain TAR-1 (Takahashi, et al., 2000).

Gen penyandi enzim xilanolitik telah dilaporkan merupakan suatu kelompok gen. Beberapa diantaranya adalah kelompok gen (gen klaster) penyandi enzim β -xilanase; β -xilosisidase serta α -L-arabinofuranosidase dari *Clostridium stercorarium* (Schwarz et al. 1990) dan *Bacteroides ovatus* (Whitehead dan Hespell. 1990), β -xilosisidase dan xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* 21 (Baba et al. 1994), β -xilosisidase dan α -L-arabinofuranosidase dari *Trichoderma reesei* (Clark et al. 1996). Ukuran kelompok gen penyandi enzim xilanolitik tersebut bervariasi, misalnya kelompok gen penyandi xilosidase dan arabinofuranosidase dari *Bacteroides ovatus* yang berukuran 3,8 kb

(Whitehead dan Hespell. 1990) dan kelompok gen penyandi xilosidase dan xilanase dari *Bacillus stearothermophilus* 21 yang berukuran 4,2 kb (Kulkarni et al. 1999). Pemanfaatan produk hidrolisis hemiselulosa kaya xilan yaitu xilo-oligosakarida sebagai prebiotik dan anti-mikrob telah dikembangkan oleh Christakopoulos P. (2002) dan Dominique *et al* (2003).

BAB IV METODE PENELITIAN

A. PROSES PENELITIAN

1. Analisis Biokimiawi Enzim Arabinouranosidase variant (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2)

- a. Pemurnian Enzim arabinofuranosidase variant hasil *direct evolution* dilakukan menggunakan affinitas kromatografi dengan perangkat kolom Ni-NTA . Hasil pemurnian dianalisis dengan SDS-PAGE, uji aktivitas menggunakan substrat spesifik turunan p-nitrophenol.
- b. Karakterisasi struktur dan fungsi enzim variant

Klon positif yang telah dikarakterisasi strukturnya dengan sekuensing, selanjutnya diuji ekspresinya dengan menentukan aktivitas enzim variant yang dihasilkan menggunakan substrat spesifik p-nitrofenil- α -L-arabinosida dan p-nitrofenil- β -D-xylopiranoside. Enzim dan substrat diinkubasi selama 30menit pada suhu 70°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 405 nm.

2. Pemodelan dan analisis stereospesifik enzim arabinofuranosidase (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2)

Pemodelan dan analisis stereospesifik enzim arabinofuranosidase dalam fungsinya menghidrolisis ikatan L- dan D- dari substrat turunan arabinosa dilakukan melalui sitem docking in-silico dan pengujian aktivitas arabinofuranosidase secara laboratorium basah.

3. Kristalisasi dan Analisis Xilosidase Varian (penelitian lanjutan oleh 1 mahasiswa S3)

Xilosidase Varian yang telah diperoleh pada tahun pertama akan dilakukan kristalisasi untuk menganalisis struktur varian (mutan) terutama yang menunjukkan aktivitas xilosidase tertinggi. Kristalisasi dilakukan dengan metode hanging drop menggunakan larutan standar kristalisasi.

4. Analisis Kinetika enzim xilosidase novel dalam sistem pTP510 (penelitian lanjutan oleh 1 mahasiswa S3)

Hasil tahun pertama yang menemukan bahwa ekso-xilanase merupakan xilosidase novel, maka analisis varian pada residu katalitik akan dikuatkan melalui analisis kinetika enzim xilosidase novel tersebut.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisis Biokimiawi Enzim Arabinouranosidase variant (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2 atas nama Ratna Melinda)

Hasil Penelitian tahap 1 ini telah menghasilkan tesis dan mahasiswa atas nama atna Melinda sudah dinyatakan lulus Magister. Ringkasan hasil penelitiannya sebagai berikut.

Enzim golongan glikosida hidrolase dapat menghidrolisis ikatan glikosidik antara dua atau lebih karbohidrat atau antara molekul karbohidrat dengan bukan karbohidrat sehingga memiliki aplikasi dalam berbagai bidang seperti industri, lingkungan dan kesehatan (Numan dan Bhosle, 2006). *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 memiliki 3 gen pengkode enzim glikosida hidrolase yaitu gen *exo-xyl*, *β-xyl* dan *abfa*. Gen *abfa* menghasilkan enzim α-Larabinofuranosidase (AbfA) dengan aktivitas optimum pada pH 7 dan suhu 60°C (Puspaningsih, 2004). AbfA varian A9 yang diekspresikan gen *abfa* varian A9 hasil PCR-*Errorprone* menunjukkan aktivitas tinggi di pH 9 (Yamani, 2011). Belum dilaporkan mengenai perubahan nukleotida pada gen *abfa* varian A9. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan perubahan nukleotida gen *abfa* varian A9, sifat biokimia AbfA varian A9 yang disintesis dan model struktur proteinnya sekaligus mengidentifikasi keterkaitan perubahan sifat biokimia yang terjadi dengan perubahan pada model struktur AbfA varian A9.

Urutan nukleotida *abfa* varian A9 diujarkan dengan urutan nukleotida *abfa* tipe alami (kode akses GenBank DQ387046.1) untuk menentukan perubahan yang terjadi. AbfA varian A9 diekspresikan dalam sel inang *E. coli* BL21(DE3) dan ekspresi yang terjadi dideteksi menggunakan SDS PAGE. Ekstrak kasar AbfA varian A9 dimurnikan secara parsial dengan pemanasan selama 1 jam pada 70°C. Fraksi hasil pemurnian digunakan untuk karakterisasi sifat biokimia meliputi suhu dan pH optimum serta termostabilitas dan stabilitas pH. Pemodelan struktur AbfA varian A9 dilakukan menggunakan program Swiss Model dengan struktur Kristal AbfA dari *Geobacillus stearothermophilus* T6 (kode akses PDB: 1PZ3) sebagai *template*. Adanya perubahan pada struktur diidentifikasi dengan penjajaran struktur tersier (*superimpose*) menggunakan program SuperPose. Interaksi non kovalen pada protein yang meliputi interaksi hidrofobik, interaksi Van der Waals, ikatan Hidrogen dan interaksi elektrostatik ditentukan dengan menggunakan program Chimera 1.6.2.

Perubahan nilai ΔG akibat mutasi diprediksikan dengan menggunakan program PoPMuSiC.

Penjajaran urutan nukleotida gen *abfa* varian A9 dengan tipe alami (DQ387046.1) menunjukkan adanya tiga mutasi titik yaitu A137G, A853G dan T615A. Translasi *in silico* gen tersebut menunjukkan adanya perubahan asam amino yang ditranslasikan yaitu Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu. Ekspresi gen *abfa* varian A9 tampak pada profil SDS PAGE dengan massa molekul relatif (Mr) sebesar 61 kDa. Pemurnian parsial AbfA varian intraseluler menunjukkan peningkatan kemurnian sebesar 17,60 kali. AbfA varian memiliki suhu optimum 70°C dan pH optimum 7, stabil direntang pH 6-9 pada 4°C selama 24 jam. Inkubasi Abfa varian pada 70°C selama 16 jam mengakibatkan penurunan aktivitas sebesar hampir 70%. *Superimpose* model struktur AbfA tipe alami dan varian menunjukkan nilai RMSD sebesar 0,05. Berdasarkan hasil tersebut, disimpulkan bahwa perubahan asam amino yang terjadi akibat mutasi gen *abfa* menyebabkan perubahan struktur yang kemudian juga mempengaruhi interaksi non kovalen pada protein. Pada asam amino ke 46, terjadi pengurangan 3 interaksi Van der Waals yang mengarahkan pada destabilisasi, sesuai dengan prediksi $\Delta\Delta G$ yang bernilai +0,22 (destabilisasi). Pada asam amino urutan 205, terjadi pengurangan 3 ikatan Hidrogen dan 1 interaksi Van der Waals. Akan tetapi, perubahan asam amino menyebabkan munculnya interaksi elektrostatik antara rantai samping Glu 205 dan His 146. Interaksi elektrostatik yang muncul tidak dapat mengimbangi ikatan Hidrogen yang berkurang sehingga perubahan asam amino pada posisi ini menyebabkan destabilisasi. Prediksi nilai $\Delta\Delta G$ pada posisi ini menunjukkan nilai +2,32 (destabilisasi). Glu285 membentuk interaksi Van der Waals yang lebih sedikit daripada Lys285 namun perubahan asam amino menjadi bermuatan negative menyebabkan berkurangnya gaya tolak yang terjadi akibat keseragaman muatan positif di sekitar residu 285 sehingga dapat mengimbangi destabilisasi yang terjadi akibat pengurangan sebuah interaksi Van der Waals. Nilai $\Delta\Delta G$ perubahan asam amino posisi 285 adalah -0,09. Substitusi asam amino pada posisi ini mengarahkan pada stabilisasi namun pengaruh stabilisasinya kecil. Karakterisasi sifat biokimia menunjukkan penurunan termostabilitas AbfA varian (Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu) jika dibandingkan dengan AbfA tipe alami.

Berkurangnya termostabilitas AbfA varian terkait dengan berkurangnya interaksi non kovalen yang terjadi khususnya ikatan Hidrogen dan interaksi Van der Waals. Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan agar pada penelitian selanjutnya,

dilakukan pemurnian diikuti dengan pengukuran kinetika dan spesifisitas substrat AbfA varian, kristalisasi untuk mendapatkan struktur protein AbfA serta penentuan interaksi non kovalen yang terjadi secara kuantitatif

2. Pemodelan dan analisis stereospesifik enzim arabinofuranosidase (dilakukan oleh 1 mahasiswa S2 atas nama M. Fanani)

Hasil Penelitian tahap 2 ini telah menghasilkan tesis dan mahasiswa atas nama M. Fanani sudah dinyatakan lulus Magister. Ringkasan hasil penelitiannya sebagai berikut.

Tuberkulosis (TB) merupakan masalah kesehatan masyarakat dunia. Berdasarkan data organisasi WHO terdapat korban meninggal dunia sebanyak 1,2-1,5 juta jiwa pada tahun 2011 dan Indonesia termasuk kedalamnya. Permasalahan TB semakin serius ketika ditemukannya kasus resistensi obat anti-TB lapis pertama, sehingga obat lapis pertama sudah tidak efektif dan diperlukan pengembangan obat dengan mekanisme baru. Enzim pendegradasi dinding sel merupakan salah satu alternatif yang menjanjikan sebagai kandidat anti-TB karena dapat bersinergis dengan antimikroba. Salah satu unit penyusun dinding sel *Mycobacteria* yaitu unit D-arabinofuranosil (Araf). Sampai saat ini, α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) dilaporkan memiliki aktivitas hidrolase pada substrat dengan unit L-arabinofuranosil, tetapi belum pernah diketahui tentang kemampuan α -L-arabinofuranosidase menghidrolisis substrat dengan unit D-arabinofuranosil. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui stereospesifitas substrat α -L-arabinofuranosidase GH51 dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 terhadap dinding sel *Mycobacteria*. Penelitian ini secara umum terbagi menjadi 3 tahap yaitu (1) produksi AbfA rekombinan dari *E. coli* BL21 (DE3)/pET-abfA, (2) uji aktivitas spesifik AbfA rekombinan, (3) analisis stereospesifitas AbfA secara *in silico*.

Produksi AbfA dilakukan dengan menumbuhkan *E. coli* BL21 (DE3)/pET-abfA kedalam media Luria-Bertani ampisilin diinkubasi pada temperatur 37°C selama 18 jam tanpa induksi IPTG. AbfA dapat diproduksi oleh *E. coli* BL21 (DE3)/pET-abfA meskipun tanpa ditambahkan IPTG karena efek glukosa. Efek glukosa dapat terjadi karena glukosa tidak tersedia didalam media produksi, sehingga sel menggunakan sumber energi alternatif lainnya yang menyebabkan cAMP didalam sel dapat

dihasilkan. Ketika cAMP dihasilkan maka dapat terbentuk kompleks cAMP/CAP yang mampu mengikat pada hulu daerah promotor. Pengikatan cAMP/CAP pada hulu promotor mengakibatkan stimulasi secara langsung proses transkripsi oleh RNA polymerase sehingga proses perpanjangan untai RNA dapat berlangsung. Ekstrak AbfA diperoleh melalui proses lisis sel menggunakan ultrasonikator karena pada plasmid tidak terdapat elemen untuk sekresi protein yaitu signal peptida. Pemanasan AbfA pada temperatur 70⁰C selama 1 jam dapat meningkatkan faktor kemurnian sebesar 3.68 kali dan peningkatan aktivitas spesifik mencapai 253.36 % dibandingkan tanpa pemanasan. Faktor kurnian dan aktivitas spesifik dapat ditingkatkan melalui pemanasan karena AbfA bersifat termostabil sedangkan protein pengotor yang dihasilkan oleh sel inang bersifat termolabil, sehingga dengan pemanasan protein pengotor dapat terdenaturasi dan dapat dipisahkan melalui sentrifugasi.

Stereospesifitas AbfA pada dinding sel *Mycobacteria* ditentukan berdasarkan pada aktivitas spesifik AbfA. Substrat polisakarida yang mengandung unit L-arabinofuranosa dapat diperoleh secara komersial, tetapi substrat dengan stereokimia D-arabinofuranosa tidak tersedia secara komersial sehingga dilakukan isolasi substrat dari dinding sel *Mycobacteria*. Berdasarkan hasil analisis HPLC, substrat hasil isolasi dari dinding sel 2 isolat *Mycobacteria* yaitu *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (H37Rv) dan *Mycobacterium sp.* BFCC (BFCC) dapat digunakan sebagai substrat untuk penentuan stereospesifitas AbfA. Hasil uji aktivitas spesifik dan analisis produk hidrolisis menunjukkan bahwa AbfA memiliki aktivitas hidrolase pada kedua substrat dengan stereokimia unit arabinofuranosa yang berbeda yaitu L-arabinofuranosida (arabinogalaktan, arabinan, *oat spelt xylan* dan pektin) dan D-arabinofuranosida (H37Rv dan BFCC). AbfA memiliki aktivitas spesifik tertinggi pada substrat arabinogalaktan yaitu 10,375 U/mg dan terendah pada kedua substrat D-arabinofuranosida masing-masing 2.404 U/mg (BFCC) dan 2.332 U/mg (H37Rv).

Stereospesifitas AbfA secara *in silico* dianalisis menggunakan metode bioinformatika dan *docking* molekular. Analisis bioinformatika dilakukan untuk identifikasi residu asam amino lestari dari α -L-arabinofuranosidase GH51. Berdasarkan hasil *multiple-alignment* 49 urutan asam amino α -L-arabinofuranosidase GH51 diketahui bahwa residu asam amino yang lestari yaitu Glu29, Gly38, Arg69, Pro71, Gly72, Gly73, Trp81, Gly86, Arg91, Trp99, Gly108, Arg156, Gly160, Gly173, Asn174, Glu175, His244, Tyr246, Glu294 dan Ala350 (AbfA). Seperti yang diharapkan, residu katalitik juga termasuk kedalam residu lestari dari GH51 yaitu

Glu175 dan Glu294. Hasil identifikasi residu lestarsi digunakan sebagai referensi untuk menentukan residu lestarsi yang membentuk interaksi sidik jari dengan ligan. Berdasarkan hasil analisis interaksi sidik jari menggunakan LigPlot pada struktur 1QW9, 1QW8, 2C8N, 2C7F dan 2VRQ diketahui bahwa terdapat 2 macam interaksi yang lestarsi yaitu ikatan hidrogen (Glu29, Asn74, Tyr246, Glu294) dan interaksi hidrofobik (Gly73, Trp99, Trp298). Interaksi AbfA dengan substrat dianalisis menggunakan metode *docking* molekular. Validasi *docking* dilakukan menggunakan metode *re-docking* dan *cross docking* bertujuan untuk mendapatkan hasil *docking* yang dapat dipercaya. *Grid-docking* yang tervalidasi digunakan untuk tes *docking* ligan L-arabinofuranosida dan D-arabinofuranosida pada tiga struktur yaitu 1QW9, 2C8N dan AbfA E175A. Hasil tes *docking* menunjukkan bahwa terdapat interaksi sidik jari yang terbentuk antara ligan dengan protein yaitu ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Ikatan hidrogen lestarsi yang terbentuk oleh residu katalitik Glu294 mengarahkan bahwa AbfA memiliki aktivitas hidrolase pada kedua substrat. Akan tetapi terdapat perbedaan pada residu asam amino yang menstabilkan gugus arabinofuranosil pada sub-site -1. Pembentukan ikatan hidrogen lestarsi Glu294 mensarankan bahwa mekanisme katalitik pada substrat D-arabinofuranosida sama dengan mekanisme katalitik α -L-arabinofuranosidase GH51 pada substrat L-arabinofuranosida yaitu mekanisme retaining pergantian ganda 2 tahap. Interaksi hidrofobik lestarsi Trp99 dan Trp298 diduga sebagai residu yang bertanggung jawab pada spesifitas gugus arabinofuranosil pada sub-site -1. Kemampuan aktivitas hidrolase AbfA pada substrat D-arabinofuranosida lebih kecil dibandingkan dengan substrat L-arabinofuranosida dijelaskan melalui mekanisme kemampuan bifungsional AbfA pada substrat D-xilopiranosida. Terdapat efek halangan ruang antara residu Trp dengan C-6 pada gugus xilopiranosil yang menyebabkan pengikatan substrat tidak menguntungkan pada sub-site -1, tetapi masih memungkinkan terjadi aktivitas hidrolase meskipun spesifitasnya lebih rendah. Pada substrat D-arabinofuranosida juga terdapat efek halangan ruang yang tidak menguntungkan dalam pengikatan gugus D-arabinofuranosil pada sub-site -1. Mengingat pendekatan ini dilakukan secara *in silico*, maka masih perlu dilakukan uji pembuktian secara laboratorium tentang peran dan fungsi residu Trp99 dan Trp298 pada stereospesifitas substrat melalui side-directed mutagenesis dan protein kristalografi.

Kesimpulan dalam penelitian ini yaitu (1) stereospesifitas substrat α -L-arabinofuranosidase GH51 dari *G. thermoleovorans* IT-08 pada dinding sel

Mycobacteria (H37Rv dan BFCC) secara laboratorium lebih rendah dibandingkan dengan L-Araf (Arabinogalaktan, pektin, oat spelt xylan dan arabinan), (2) stereospesifitas substrat α -L-arabinofuranosidase GH51 dari *G. thermoleovorans* IT-08 terhadap D-Araf secara in silico lebih rendah dibandingkan dengan L-Araf yang disebabkan adanya efek halangan ruang oleh residu Trp99 dan Trp9298. Mekanisme katalitik AbfA pada substrat D-Araf diusulkan mengikuti model mekanisme katalitik AbfA pada substrat L-Araf yaitu melalui mekanisme retaining pergantian ganda 2 tahap.

3. Kristalisasi dan Analisis Xilosidase Varian (penelitian lanjutan oleh 1 mahasiswa S3 atas nama Lanny Hartanti)

Desain DNA Primer

Untuk melakukan mutasi *xyl*, didesain beberapa sekuens primer mutagenik. DNA primer tersebut didesain berdasarkan sekuens DNA penyandi Xyl (GenBank dengan *Accession number* ABC75004). Desain DNA primer dilakukan dengan menggunakan program CloneManager (Scientific & Educational Software, 2000). Tabel 4.1 menunjukkan sekuens primer-primer mutagenik yang digunakan untuk melakukan mutasi terarah (*site-directed mutagenesis*).

Tabel 4.1 Sekuens Primer Mutagenik

Mutasi	Kode ^{*)}	Panjang (pb)	Sekuens Primer ^{**)}	T _m (°C)	GC (%)
D121E	D121E-F	17	5' -GGAGGCATTGAGCCATC-3'	59,6	58,8
	D121E-R	17	5' -GATGGCTCAATGCCTCC-3'	59,6	58,8
D121N	D121N-F	19	5' -GATGGGGAGGCATTAAATCC-3'	60,2	52,6
	D121N-R	19	5' -GGATTAATGCCTCCCCATC-3'	60,2	52,6
D121T	D121T-F	19	5' -GGAGGCATTACTCCATCAC-3'	60,2	52,6
	D121T-R	19	5' -GTGATGGAGTAATGCCTCC-3'	60,2	52,6
D121V	D121V-F	19	5' -GGAGGCATTGTTCCATCAC-3'	60,2	52,6
	D121V-R	19	5' -GTGATGGAACAATGCCTCC-3'	60,2	52,6
D121L	D121L-F	19	5' -GGAGGCATTCTTCCATCAC-3'	60,2	52,6
	D121L-R	19	5' -GTGATGGAAGAATGCCTCC-3'	60,2	52,6

*) Kode dengan akhiran F adalah primer *forward*, sedang kode dengan akhiran R adalah primer *reverse*

**) Posisi mutasi ditunjukkan oleh residu nukleotida yang tercetak tebal dan dengan garis bawah.

Mutasi Terarah

Gen penyandi β -xilosidase rekombinan dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 (pET-*xyl*) diisolasi dari dari *E. coli* TOP10 menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) sesuai dengan protokolnya. Mutasi terarah terhadap pET-*xyl* dilakukan dengan teknik PCR menggunakan DNA primer yang telah didesain, dengan komposisi reaksi PCR seperti pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Komposisi Reaksi PCR Sampel

Larutan	Volume
10x Buffer reaksi	2,0 μ l
Plasmid pET- <i>xyl</i>	1,0 μ l
Primer <i>forward</i>	0,8 μ l
Primer <i>reverse</i>	0,8 μ l
dNTP mix 10 mM	0,4 μ l
MgSO ₄ 50 mM	0,8 μ l
ddH ₂ O	14,0 μ l
<i>Tag-Hifi</i> DNA polymerase	0,2 μ l
Total volume reaksi	20,0 μ l

Reaksi PCR dilakukan pada kondisi seperti pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Kondisi Reaksi PCR

Tahap	Siklus	Suhu (°C)	Selama
Pre denaturasi	1	95	2 menit
Denaturasi	25	95	30 detik
<i>Anneal</i>		51 – 61*)	50 detik
<i>Extension</i>		72	3 menit
Post elongasi	1	72	5 menit

*) variasi suhu untuk tiap percobaan mutasi tergantung T_m dari masing-masing primer.

Produk amplifikasi PCR kemudian didigesti dengan enzim restriksi *DpnI* untuk menguraikan plasmid *template* (pET-*xyl*), sehingga hanya tersisa plasmid hasil amplifikasi PCR. Percobaan digesti dilakukan pada suhu 37°C selama 1 jam. Komposisi percobaan restriksi dengan enzim *DpnI* dijelaskan pada Tabel 4.4 berikut.

Tabel 4.4 Komposisi Reaksi Restriksi Produk PCR dengan Enzim *DpnI*

Larutan	Volume
Produk PCR	15,0 μ l
Enzim <i>DpnI</i> (10 U/ml)	1,0 μ l
10x Buffer Tango	1,8 μ l
Total volume reaksi	17,8 μ l

Transformasi hasil digesti produk PCR ke *E. coli* TOP10

DNA plasmid produk mutasi terarah yang telah didigesti dengan enzim *DpnI*, ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* TOP10. Sel kompeten *E. coli* TOP10 dicairkan pada penangas es. Sebanyak 3,0 μ l DNA plasmid produk mutasi terarah ditambahkan ke dalam 50 μ l sel kompeten. Campuran diinkubasi pada penangas es selama 30 menit dan selanjutnya dipindahkan ke penangas air suhu 42°C selama 30 detik. Setelah itu segera dipindahkan kembali pada penangas es selama 2 – 10 menit, kemudian ditambahkan 250,0 μ l media LB segar. Tabung eppendorf disegel dengan parafilm dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, dengan pengocokan 150 rpm selama 1 jam. Selanjutnya sebanyak 100-200 μ l kultur disebar pada media agar LB yang mengandung 100 μ g/ml ampicillin, dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C.

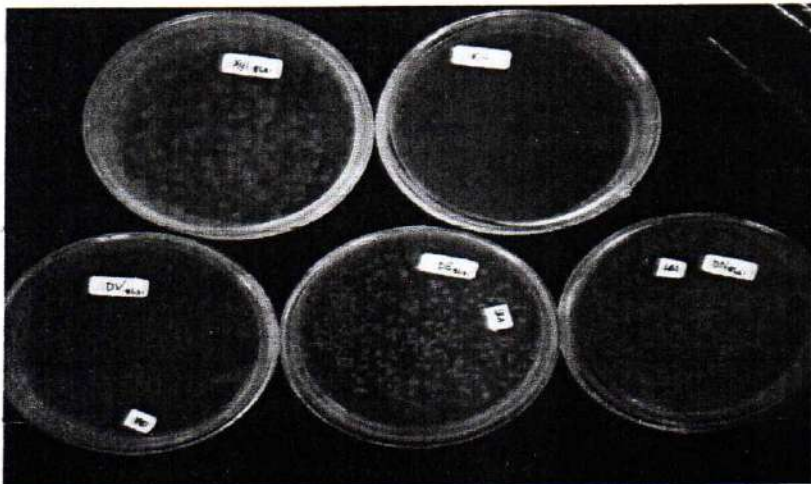
Isolasi DNA Plasmid, Sekuensing dan Analisis Hasil Sekuensing DNA plasmid Varian-varian Xyl

Percobaan mutasi terarah dan transformasi hanya berhasil untuk empat varian, yaitu varian D121V, D121T, D121E, dan D121N, sedangkan varian D121L tidak berhasil diperoleh. Terhadap keempat varian *E. coli* yang diperoleh dilakukan produksi dan isolasi DNA plasmidnya, untuk selanjutnya disekuensing untuk menentukan keberhasilan proses mutasi terarah. Analisis hasil sekuensing terhadap keempat DNA plasmid varian Xyl menunjukkan bahwa mutasi asam aspartat pada residu nomor 121 (D121) menjadi valin (D121V), threonin (D121T), asam glutamat (D121E), dan asparagin (D121N) berhasil. Analisis didasarkan pada hasil *alignment* sekuens awal dengan sekuens hasil mutasi terarah (Lampiran), menggunakan program *Clone Manager*.

Hasil sekuensing DNA plasmid varian D121E, D121T, D121V, dan D121N memberikan persentasi kesesuaian terhadap sekuens DNA plasmid varian awal berturut-turut sebesar 96%, 77%, 99%, dan 89%. Dengan demikian, belum dapat dipastikan bahwa mutasi hanya terjadi pada residu asam amino posisi nomor 121, karena hasil sekuensing tidak utuh, masih ada *gap* / residu asam amino di daerah tengah yang tidak mampu terbaca oleh mesin sekuensing. Jika mutasi hanya terjadi pada satu residu asam amino saja, yaitu pada residu nomor 121, maka persentase kesesuaian sekuens hasil mutasi dan sekuens awal diharapkan sebesar 99,93% (kesesuaian 1535 basa terhadap 1536 basa sekuens β -xylosidase).

Transformasi Varian Xyl pada *E. coli* BL21 (DE3 star)

Semua plasmid mutan (4 varian, D121E, D121N, D121V, D121T) dan plasmid pET-xyl (sebagai kontrol positif) diisolasi dari mutan-mutan *E. coli* TOP10 menggunakan QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) sesuai dengan protokolnya. Plasmid-plasmid mutan tersebut masing-masing ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* BL21 (DE3 star), dengan prosedur yang sama seperti transformasi ke *E. coli* TOP 10. Hasil transformasi ditunjukkan oleh gambar 4.1.



Gambar 4.1 Transformasi varian xyl pada *E. coli* BL21 (DE3 Star)

Eksresi Varian Xyl pada *E. coli* BL21 (DE3 star)

Semua varian Xyl kemudian diekspresikan dari setiap transforman *E. coli* BL21 (DE3 star). Pre-kultur bakteri-bakteri transforman tersebut ditumbuhkan semalam di dalam medium LB yang mengandung ampisillin (100 μ g/mL) pada suhu

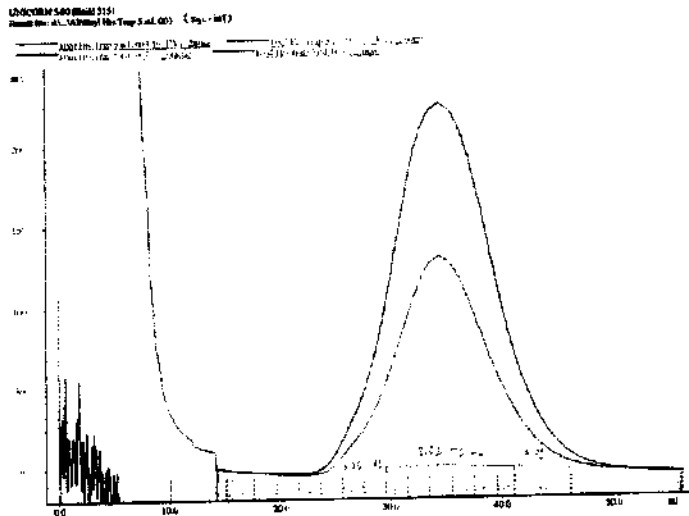
310 K. Pre-kultur tersebut kemudian digunakan untuk inokulasi pada medium LB baru yang juga mengandung ampicillin (100 μ g/mL) dengan konsentrasi inokulum 1%. Untuk menginduksi terekspresinya gen β -xylosidase yang disisipkan pada daerah lac operon, maka setelah 2,5 – 3 jam inkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan aerasi 150 – 200 rpm, ke dalam medium ditambahkan 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside). Setelah inkubasi pada kondisi yang sama selama 3 jam, sel bakteri dipanen.

Pemurnian Xyl dan Varian-varianannya

Enzim β -xylosidase (Xyl) merupakan enzim yang menghidrolisis oligonukleotida menjadi xilosa, dan termasuk enzim intraseluler. Oleh karenanya untuk mengisolasi dan memurnikan Xyl diawali dengan tahapan lisis sel. Sebagai buffer lisis digunakan buffer dengan komposisi 50 mM buffer fosfat, 250 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5 mM β -merkaptoetanol, pH 8,0. Pellet sel diresuspensikan ke dalam buffer A (dengan perbandingan 1 gram : 4 mL) yang telah ditambah dengan satu tablet cocktail inhibitor protease dan DNase I. Lisis dilakukan secara mekanik dengan metode French Press pada tekanan 550-900 MPa, tiga – empat kali. Produk lisis selanjutnya disentrifus pada kecepatan 35.000 g suhu 277 K selama 20 menit untuk memisahkan debris sel. Supernatan yang mengandung xyl dipanaskan pada *water-bath* suhu 50°C selama 30 menit. Xyl yang bersifat termofilik (suhu optimum 50°C) tetap stabil pada suhu tersebut sehingga bisa dipisahkan dari beberapa protein yang tidak stabil atau terdenaturasi pada suhu ini.

Hasil pemanasan selanjutnya disentrifus pada kecepatan 35.000 g suhu 277 K selama 20 menit untuk memisahkan protein-protein pengotor yang terdenaturasi dan terendapkan pada suhu 50°C. Supernatan yang mengandung Xyl dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi afinitas menggunakan kolom agarose Ni-NTA, tipe HisTrap 5 mL dari GE Healthcare. Pemurnian dengan metode kromatografi dilakukan dengan menggunakan alat FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), merk ÄKTA Explorer dari Amersham Biosciences. Prinsip pemurnian berdasarkan perbedaan afinitas protein terhadap Ni^{2+} yang terikat pada matriks agarosa, yang disebabkan perbedaan jumlah residu histidin yang dikandungnya. Dua residu histidin yang masing-masing memiliki struktur cincin imidazole dapat membentuk kompleks dengan ion Ni^{2+} . Xyl dan keempat variannya merupakan hasil rekayasa genetika, memiliki 6 residu histidin yang berturutan pada ujung C terminalnya, sehingga memiliki afinitas yang tinggi terhadap ion Ni^{2+} dan karenanya dapat dipisahkan dari protein-protein lain yang afinitasnya terhadap Ni^{2+} lebih rendah.

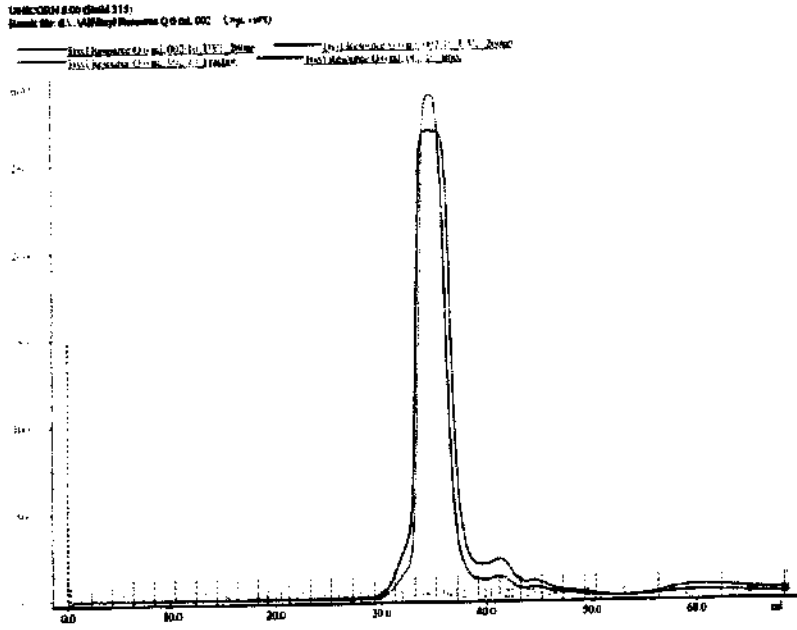
Hasil pemurnian terhadap kelima varian Xyl menunjukkan profil kromatogram yang serupa (Gambar 4.2), di mana Xyl terelusi pada fraksi 12 – 18, yaitu larutan pengelusi yang mengandung \pm 75 – 112.5 mM imidazole. Perbedaan utama dari proses pemurnian kelima varian Xyl tersebut adalah pada jumlah protein yang diperoleh dari jumlah sel *E.coli* yang sama, atau dengan kata lain perbedaan pada tingkat ekspresinya. Varian Xyl *native* memiliki tingkat ekspresi yang tinggi, demikian pula dengan varian D121E dan D121T. Namun varian D121V dan D121N memiliki tingkat ekspresi yang jauh lebih rendah dibandingkan ketiga varian Xyl lainnya



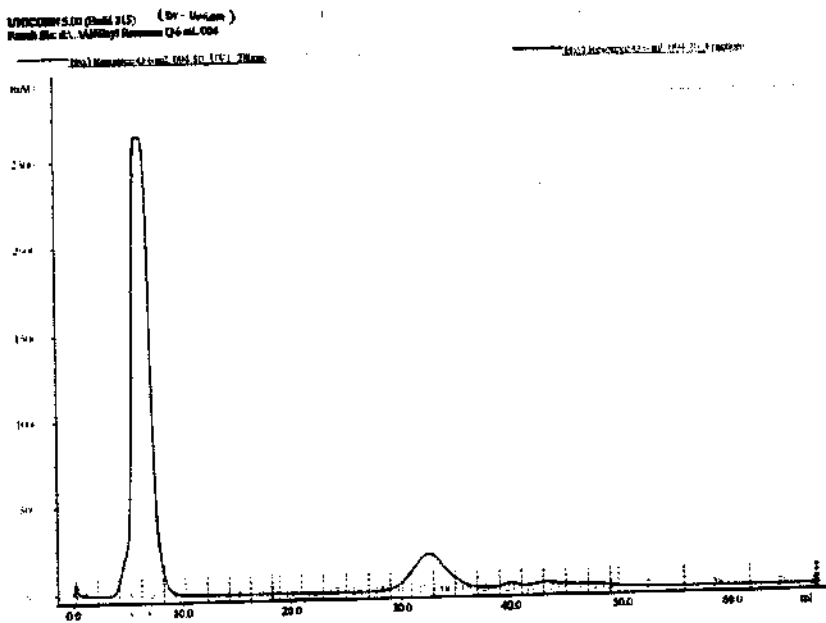
Gambar 4.2 Kromatogram varian xyl hasil pemurnian menggunakan kolom agarosa Ni-NTA (HisTrap 5 mL, GE Healthcare)

Fraksi Xyl dari kolom HisTrap kemudian dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi penukar anion, yaitu dengan menggunakan kolom Resource Q 6 mL (GE Healthcare), dalam sistem FPLC, merk ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences). Xyl dan keempat variannya memiliki pI teoritis 5,86 atau 5,94 (berdasarkan hasil analisis menggunakan ProtParam Tool dari website ExPASy). Hal ini menunjukkan bahwa Xyl dan variannya memiliki jumlah residu asam amino bermuatan negatif lebih banyak daripada residu asam amino bermuatan positif, sehingga muatan totalnya adalah negatif dan dapat dimurnikan dengan resin penukar anion. Sebelum dimasukkan pada kolom, fraksi Xyl diencerkan 10x terlebih dahulu dengan larutan buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,0, sehingga konsentrasi NaCl dalam fraksi menjadi 25 mM. Setelah dimasukkan ke dalam kolom, fraksi Xyl yang terikat dielusi dengan larutan NaCl 0 – 0,5 M dalam Tris-HCl 25 mM pH 8,0.

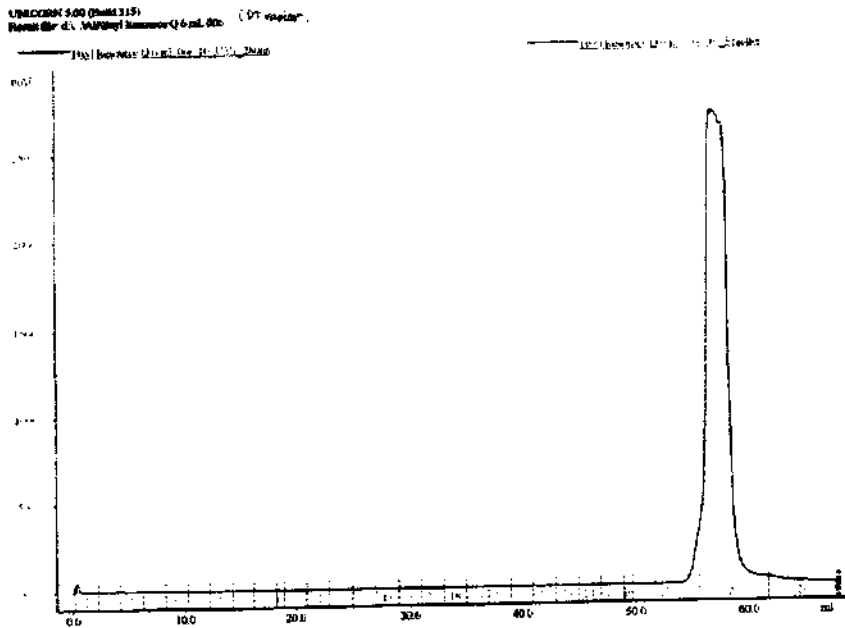
Hasil pemurnian menunjukkan profil kromatogram yang serupa untuk Xyl *native* dan varian D121E (Gambar 4.3), di mana Xyl terelusi pada fraksi 18 – 19, dengan larutan yang mengandung \pm 200 mM NaCl. Varian D121V dan D121N terelusi pada fraksi 3 – 4, pada konsentrasi \pm 25 mM NaCl (Gambar 4.4), sedangkan varian D121T terelusi pada fraksi 28, yaitu dengan larutan yang mengandung \pm 500 mM NaCl (Gambar 4.5). Varian D121E memiliki profil kromatogram yang serupa dengan native-nya karena kekuatan ioniknya hampir sama (sama-sama memiliki gugus karboksil). Varian D121V dan D121N terikat secara lemah pada resin penukar kation, karena residu valin tidak bermuatan sedangkan asparagin cenderung bermuatan positif (-NH₂). Threonin yang memiliki gugus hidroksil ternyata terikat lebih kuat pada resin penukar anion dibandingkan gugus aspartat (pada Xyl *native*).



Gambar 4.3 Profil kromatogram xyl (*native type*) dan varian D121E hasil pemurnian menggunakan kolom penukar anion (Resource Q 6 mL, GE Healthcare)



Gambar 4.4 Profil kromatogram varian D121V dan D121N hasil pemurnian menggunakan kolom penukar anion (Resource Q 6 mL, GE Healthcare)

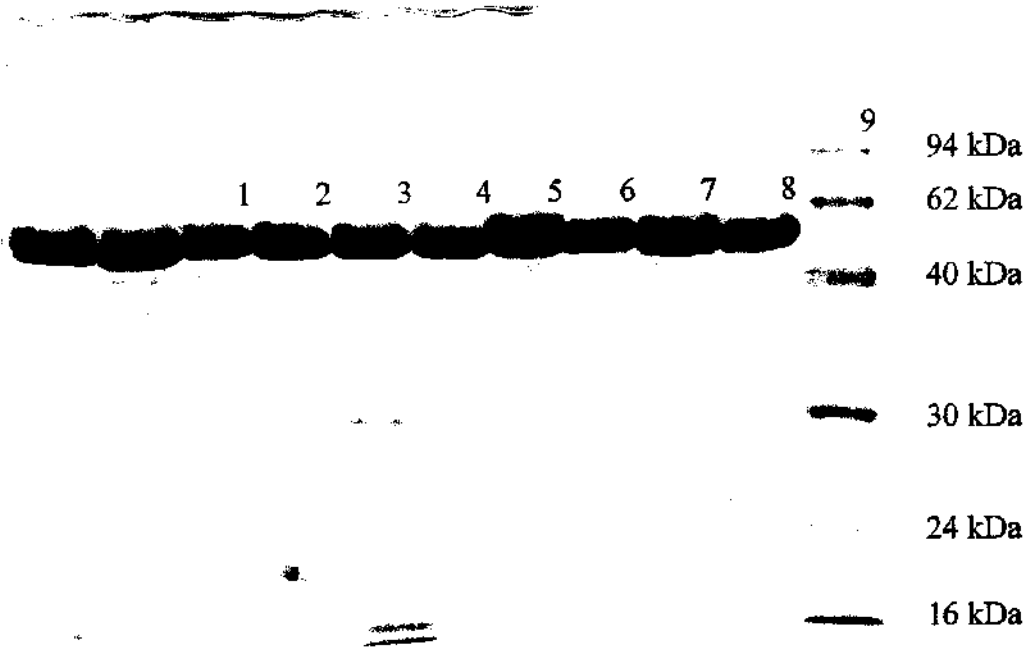


Gambar 4.5 Kromatogram varian D121T hasil pemurnian menggunakan kolom penukar anion (Resource Q 6 mL, GE Healthcare)

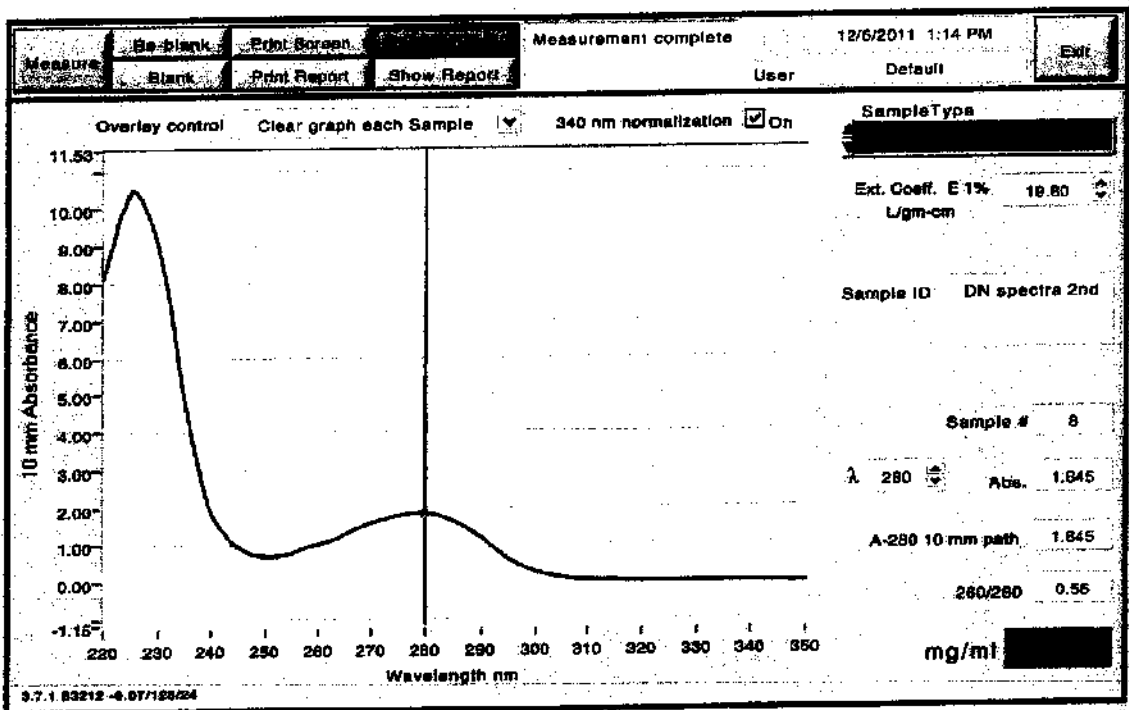
Masing-masing fraksi Xyl hasil pemurnian selanjutnya diganti larutan buffernya dan dipisahkan dengan tabung Amicon millipore 50 K. Masing-masing larutan enzim disimpan dalam buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,0 yang mengandung 100 mM NaCl, dalam beberapa alikuot dan disimpan pada suhu -20°C .

Penentuan Derajat Kemurnian Xyl dan Varian-variannya

Masing-masing batch larutan Xyl dan keempat variannya ditentukan kemurniannya berdasarkan analisis elektroforesis SDS-PAGE. Berdasarkan hasil elektroforesis yang ditunjukkan oleh Gambar 4.6, baik Xyl maupun keempat variannya menunjukkan kemurnian yang cukup tinggi, kurang lebih 95%. Protein dengan tingkat kemurnian minimal 95% dapat digunakan untuk penentuan strukturnya, misalnya dengan teknik kristalisasi dan difraksi sinar X. Namun demikian, untuk varian D121N masih tampak adanya beberapa pita yang cukup tebal dengan berat molekul < 50 kDa (kolom 3 Gambar 4.6), sehingga disimpulkan bahwa tingkat kemurnian varian D121N masih $< 95\%$. Hal ini diperkuat dengan pengukuran tingkat kemurnian protein secara spektrofotometri, berdasarkan perbandingan A_{260}/A_{280} dengan spektrofotometer NanoDrop. Gambar 4.7 menunjukkan spektra varian D121N yang diperoleh, di mana nilai A_{260}/A_{280} varian ini adalah 0,56. Dibandingkan dengan nilai A_{260}/A_{280} keempat varian Xyl yang lain, yang berkisar antara 0,52 – 0,53, maka tingkat kemurnian varian D121N lebih rendah.



Gambar 4.6 Elektrofogram Xyl dan keempat variannya.
 Keterangan: (1) Xyl batch 1; (2) D121T; (3) D121N, (4) D121V;
 (5) D121E batch 1; (6) D121E batch 2; (7) Xyl batch 2; (8) Xyl batch 3



Gambar 4.7 Spektrum hasil pengukuran spektrofotometri UV larutan protein varian D121N dengan menggunakan spektrofotometer Nano Drop.

Penentuan Konsentrasi Protein

Konsentrasi masing-masing larutan enzim murni Xyl dan keempat variannya ditentukan secara spektrofotometri, pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Absorbansi masing-masing larutan dibaca pada panjang gelombang maksimumnya, yaitu 280 nm. Dengan menggunakan nilai koefisien absorpsi molar masing-masing varian Xyl hasil perhitungan teoritis, maka konsentrasi masing-masing larutan enzim murni yang diperoleh dapat ditentukan. Tabel 4.5 berikut menyajikan data absorbansi pengukuran serta hasil perhitungan konsentrasi protein Xyl dan variannya.

Tabel 4.5 Data Absorbansi dan Hasil Perhitungan Konsentrasi Protein Xyl dan Keempat Variannya secara Spektrofotometri UV

Varian	$A_{280\text{ nm}}$	$A_{280\text{ nm}}$	A_{260}/A_{280}	Konsentrasi (mg/mL)
Xyl	1,721	0,113	0,066	13,34
D121V	1,690	0,126	0,075	13,72
D121T	1,770	0,120	0,068	13,48
D121N	1,739	0,140	0,081	14,41
D121E	1,858	0,115	0,062	18,21

Hasil pengukuran tingkat kemurnian masing-masing larutan enzim sesuai dengan hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer Nano Drop, yaitu tingkat kemurnian varian D121N paling kecil didasarkan pada nilai perbandingan A_{260}/A_{280} yang paling besar.

Pengujian Aktivitas Xyl dan Variannya

Pengujian aktivitas Xyl didasarkan pada reaksi enzimatisnya terhadap substrat spesifik para-nitrofenol xilopiranosida (PNPX), yang akan menghasilkan xilosa dan para-nitrofenol yang menyerap radiasi UV pada panjang gelombang maksimum 400 nm. Pada pengujian aktivitas untuk mempelajari pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas Xyl dan keempat variannya, digunakan metode penghentian reaksi, yaitu dengan menambahkan larutan natrium karbonat pada akhir reaksi, sehingga panjang gelombang maksimum para-nitrofenol bergeser menjadi 405 nm. Karena perbedaan panjang gelombang maksimum hasil reaksi dengan penambahan natrium karbonat tidak jauh berbeda dengan panjang gelombang maksimum hasil reaksi tanpa penambahan natrium karbonat, maka pada pengujian aktivitas baik menggunakan metode penghentian reaksi (pada penentuan pH dan suhu optimum) serta metode kinetika (pada penentuan parameter kinetika enzim) keduanya diamati pada panjang gelombang maksimum 400 nm.

Secara umum pengujian aktivitas dilakukan dengan menambahkan 50 μL enzim ke dalam 450 μL larutan substrat dalam buffer pH 6 atau pH tertentu (variasi pH) yang telah diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 40°C atau suhu tertentu (variasi suhu), kemudian diinkubasi dalam penangas air suhu yang sama selama 30 menit. Pada akhir periode inkubasi, ke dalam campuran ditambahkan 50 μL larutan natrium karbonat 0,4 M, dikocok homogen, disentrifus dan diambil supernatannya jika larutan keruh, kemudian diamati absorbansi campuran pada panjang gelombang maksimum. Sebagai blanko digunakan air atau larutan buffer pH yang sama dengan yang

digunakan untuk mempersiapkan larutan substrat. Sebagai kontrol dilakukan pengujian dengan komposisi campuran yang sama, namun larutan enzim digantikan dengan air. Masing-masing pengujian dilakukan dengan replikasi minimal tiga kali.

7:47:57 PM

Biochrom Ltd

Title Standard curve of PNP in MUB
 Operator
 Filename PNP in MUB + NaCarb (2)- [16-11-11
 19-05]
 Date 11/16/2011
 Time 7:05:32 PM
 Comments 400 uL PNP in MUB pH 6.0 + 100 uL
 NaCarb

Standards

Conc. (m.mol/l)	Mean	Abs
0.0000	-0.008	-0.008
0.0063	0.090	0.090
0.0125	0.171	0.171
0.0250	0.345	0.345
0.0500	0.690	0.690
0.1000	1.407	1.407
0.2000	2.542	2.542

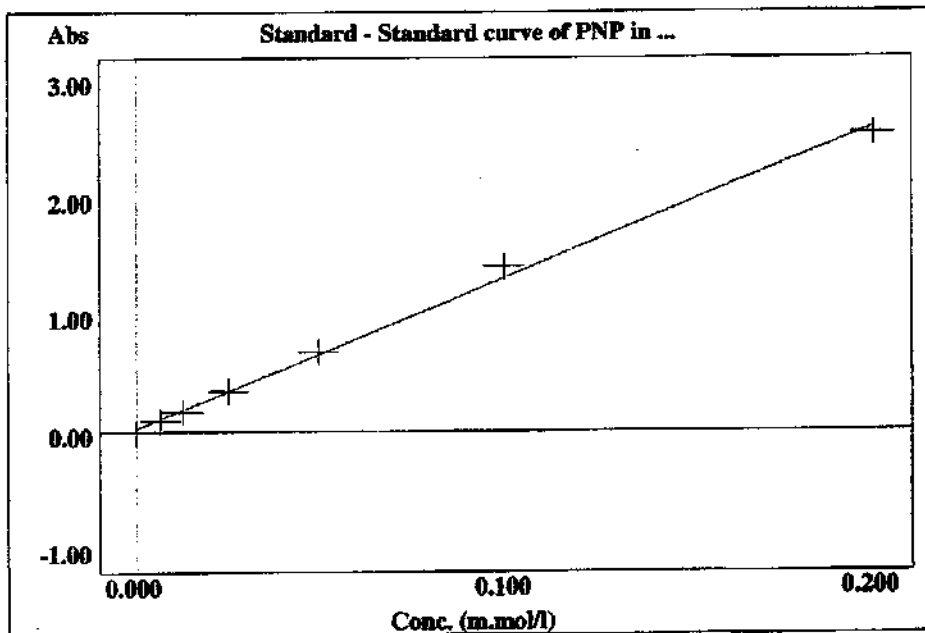
Wavelength 400.0
 Temperature Off

Standard slope method Linear Regression
 Force zero Off
 Curve extrapolation Off

Mode Standard Curve
 Standard Replicates 1
 Units m.mol/l

Slope 12.844
 Intercept 0.026
 Line quality 99.9%

Sample Replicates 1



Gambar 4.8 Grafik hubungan antara konsentrasi para-nitrofenol dan absorbansinya pada panjang gelombang 400 nm

Aktivitas xilosidase dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{aktivitas xilosidase} = \frac{(C - C_k) \times FP \times 1000 \times 1000 / 50 \times 550 / 1000000}{\text{Waktu inkubasi}} \text{ U/mL}$$

dengan ketentuan sebagai berikut:

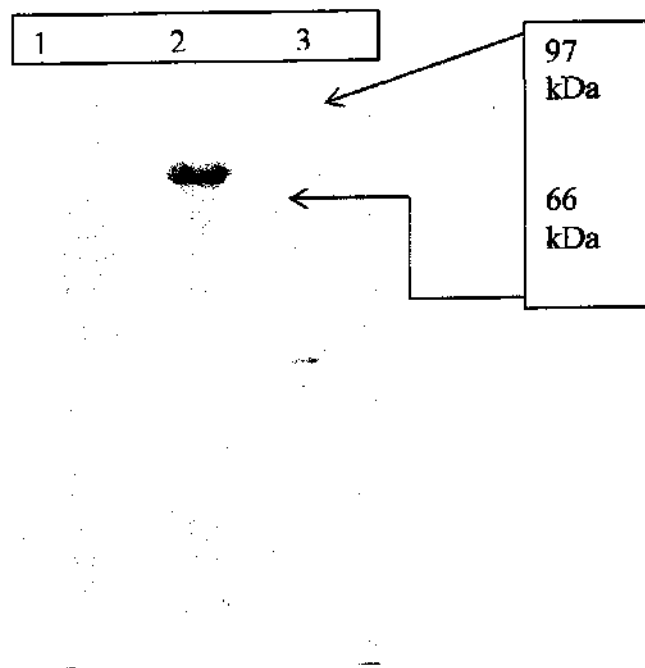
- C = konsentrasi sampel hasil konversi absorbansi sampel melalui persamaan regresi hubungan konsentrasi para-nitrofenol dan absorbansi
- C_k = konsentrasi kontrol (nilai rata-rata)
- Volume enzim = 50 µl
- Satuan aktivitas = µmol. (ml enzim)⁻¹. menit⁻¹

Persamaan regresi diperoleh dengan mengukur absorbansi 450 μ L larutan para-nitrofenol berbagai konsentrasi dalam buffer pH 6 yang ditambahkan dengan 50 μ L larutan natrium karbonat 0,4 M. Hasil yang diperoleh ditunjukkan pada gambar 4.8.

4. Analisis Kinetika enzim xilosidase novel dalam sistem pTP510 (penelitian lanjutan oleh 1 mahasiswa S3 atas nama A.A. Istri Ratnadewi)

Ekspresi protein eksoxilanase putative (xilositase novel)

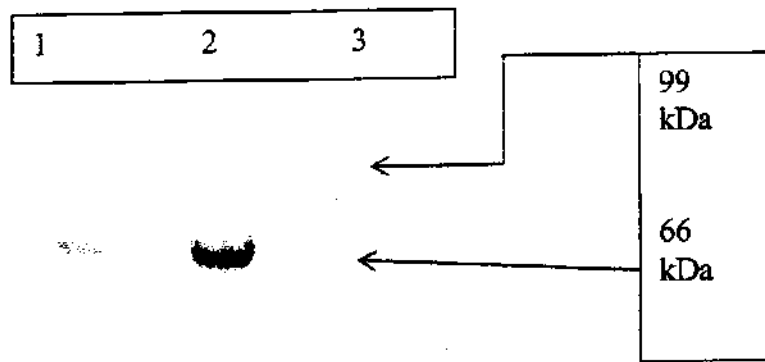
Ekspresi protein eksoxilanase dilakukan pada sel inang E.coli BL21. E.coli BL21 yang mengandung rekombinan pET-ekso, dikultivasi dalam media LB-kanamisin (50 mg/mL) selama 16-18 jam pada kecepatan 150 rpm 37 $^{\circ}$ C. Produksi protein dilakukan pada 250 mL LB kanamisin ketika mencapai OD₆₀₀ absorbansi sebesar 0.6-0.8 ditambahkan IPTG sebagai induser. Sel dipanen dan pelet sel dilisis dengan menggunakan sonikasi. Protein intraselular eksoxilanase berhasil diproduksi ditunjukkan pada gambar 2. Protein eksoxilanase overekspresi pada ukuran berkisar antara 66 kDa – 97 kDa, sebagai pembanding protein dari E.coli yang hanya membawa plasmid pET30a saja



Gambar 1. Protein pET30 tanpa insert ekso (1); Protein pET30-ekso (2) dan Marker Protein

Purifikasi protein eksoxilanase rekombinan

Tahapan purifikasi dilakukan dengan kolom His-Trap. Histidin pada protein eksoxilanase rekombinan akan terikat pada resin Ni-NTA dan terelusi menggunakan buffer elusi yang mengandung imidazol. Elusi dilakukan secara gradien imidazol mulai dari 30 mM, 60 mM, 100mM, 300mM dan 500mM. Protein eksoxilanase terelusi optimum pada gradien 100 mM imidazol. Pada hasil SDS-PAGE, menunjukkan satu pita, pada ukuran target yang sesuai berkisar 66- 99 kDa, seperti yang ditunjukkan pada gambar 2



Gambar 2. Protein murni eksoxilanase (1), Crude ekstrak protein eksoxilanase (2) dan Marker Protein (3)

Aktifitas eksoxilanase rekombinan pada berbagai substrat

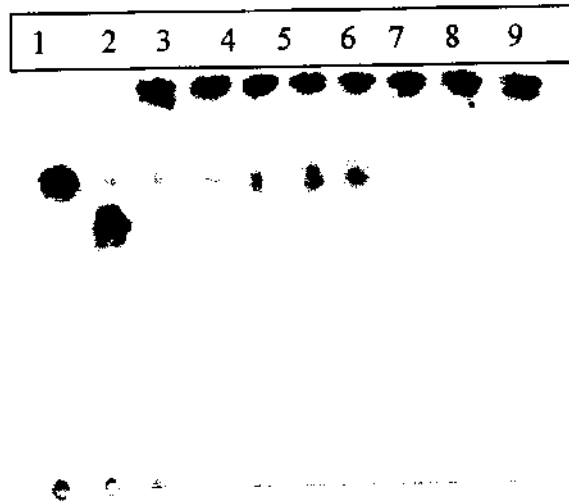
Untuk menguji aktifitas eksoxilanase rekombinan pada berbagai substrat, seperti pada tabel 1 data aktifitas eksoxilanase pada berbagai substrat.

No	Substrat	Aktifitas (Unit/mL)
1	pNPP	173069.9272
2	Oat Spelt Xilan	0.049178
3	Birchwood	0.009279
4	Arabinan (sugar beet)	-
5	Rye Arabinonylan	-
6	Xiloglucan	-
7	1-Kestose	-

Aktifitas tertinggi pada substat pNPX, eksoxilanase menunjukkan kemampuan dapat menghidrolisis substrat pNPX dengan melepaskan xilosa. Pada substar alami Oat spelt xilan dan birchwood mnunjukkan aktifitas yang sangat kecil.

Produk Hidrolisis

Produk hidrolisis dari eksoxilanase ditunjukkan oleh hasil TLC pada substrat pNPX



Gambar 3 Xilosa (1), Xilobiosa (2) , Produk Hidrolisis eksoxilanase pada substrat pNPX pada variasi waktu 10-50 menit (1-7), Kontrol pNPX tanpa enzim (8) dan kontrol enzim in active dengan substart pNPX (9-10)

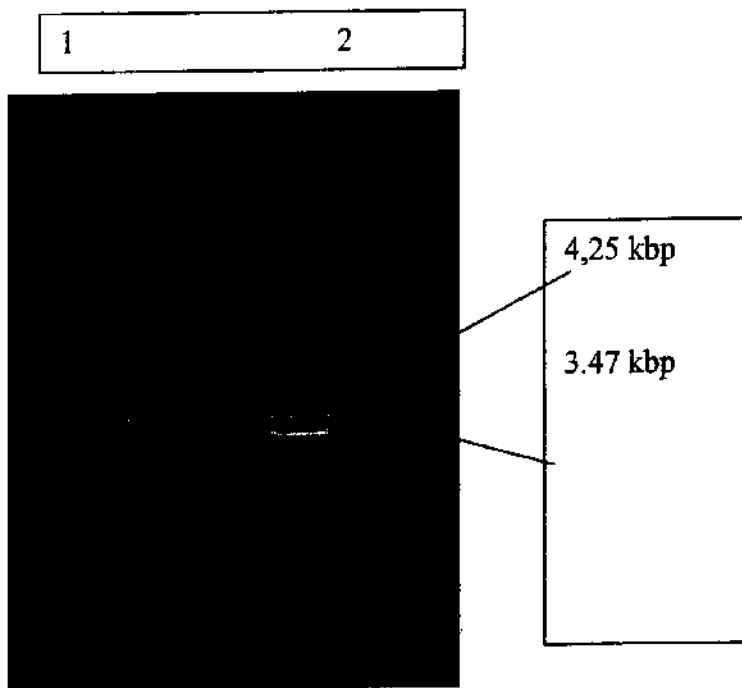
Pada gambar 3 menunjukkan produk hidrolisis eksoxilanase dengan substart pNPX adalah xilosa sebagai kontrol adalah enzim eksoxilanase *in-active* (enzim yang dipanaskan 100 °C selama 2 menit)

Hidrolisis dengan menggunakan substrat pNPX2 enzim eksoxilanase tidak menghasilkan produk hidrolisis. Ini dapat disebabkan oleh aktifitas eksoxilanase yang sangat kecil dan eksoxilanase putative yang diduga bersifat ekso oleh Gen Bank yang dinamakan exoxylanase putative ternyata dari hasil hidrolisis menunjukkan jenis enzim Xilosidase ini diperkuat dengan hasil hidrolisis menghasilkan hanya menghasilkan xilosa saja.

Mutan eksoxilanase

Mutan eksoxilanase dirancang dengan memutasi secara *site directed mutation* dengan mengganti residu katalitik Asp.287, Asp412 dan Glu 476 dengan glisin. Mutasi ini untuk membuktikan eksoxilanase putative asal *Geobacillus thermoleovorans* termasuk kelompok GH43. Mutasi menggunakan bervariasi primer seperti ditunjukkan tabel 2

No	Sequencing primer	Sequencing direction
1	F (ekso/xyn43)	5' GCG AGC TCA TGA CTT TAC AGA CGA ATA 3'
2	R (ekso/xyn43)	5' CGC TCG AGT TAA GTC AAA ATG ACA TCC 3'
3	F mutan asp1- g1y	5' ATC GAG CCG GTC CGT GTAT 3'
4	R mutan asp1- g1y	5' ATA CAC GGA CCG GCT CGA T 3'
5	F mutan asp2- g1y	5' GCA GGG AAG ACT AIA TCT TTG GGT ATG ACT GS'
6	R mutan asp2- g1y	5' CAG TCA TAC CCA AAG ATA TAG TCT TOC CTG C 3'
7	F mutan glu-gly	5' AGT TGG AGG ACC TTT CG 3'
8	R mutan glu-gly	5' CGA AAG GTC CTC CAA CT 3'



Gambar 4. DNA Mutan Mix rekombinan eksoxilanase putative direstriksi BglII (± 4000 bp dan ± 3000 bp) (1), Marker DNA (2)

Tabel 3. Data aktifitas mutan eksoxilanase

No	Sampel	Aktifitas (U/ml)	Konsentrasi protein (mg)	Aktifitas spesifik (U/mg/ml)
1	Crude ekstrak mutan rekombinan eksoxilanase	12743.34895	933874.074	0.000040566
2	Mutan rekombinan eksoxilanase	-7842.060894	849888.8889	-0.00922716

Data aktifitas menunjukkan mutasi pada residu katalitik menyebabkan aktifitas enzim eksoxilanase tidak mempunyai aktifitas, Ini dapat disimpulkan bahwa eksoxilanase putative terbukti termasuk kelompok GH43 dengan residu katalitik pada asp287, asp412 dan glu476 ketika di ganti glisin tidak mempunyai aktifitas.

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

- a. Gen *abfa* varian A9 menunjukkan perubahan tiga nukleotida yaitu A137G, A853G dan T615A. Perubahan nukleotida yang terjadi menyebabkan substitusi asam amino Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu di tingkat proteinnya.
- b. AbfA varian (Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu) memiliki suhu optimum 70°C dan pH optimum 7. AbfA varian stabil di rentang pH 6 hingga 9 pada 4°C selama 24 jam dan kehilangan hampir 70% aktivitasnya pada inkubasi selama 16 jam di 70°C. Model struktur AbfA varian menunjukkan adanya perbedaan RMSD sebesar 0,05
- c. AbfA varian mengalami penurunan termostabilitas dibanding tipe alami akibat adanya perubahan interaksi non kovalen pada struktur protein.
- d. Stereospesifitas substrat α -L-arabinofuranosidase GH51 dari *G. thermoleovorans* IT-08 pada dinding sel *Mycobacteria* (H37Rv dan BFCC) secara laboratorium lebih rendah dibandingkan dengan L-Araf (Arabinogalaktan, pektin, *oat spelt xylan* dan arabinan).
- e. Stereospesifitas substrat α -L-arabinofuranosidase GH51 dari *G. thermoleovorans* IT-08 terhadap D-Araf secara *in silico* lebih rendah dibandingkan dengan L-Araf yang disebabkan adanya efek halangan ruang oleh residu Trp99 dan Tr9298. Mekanisme katalitik AbfA pada substrat D-Araf diusulkan mengikuti model mekanisme katalitik AbfA pada substrat L-Araf yaitu melalui mekanisme retaining pergantian ganda 2 tahap.

6.2. Saran

- a. Pemurnian AbfA varian (Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu) hingga mendapatkan protein murninya. AbfA varian yang telah murni dapat digunakan untuk pengukuran kinetika enzim untuk mengetahui perubahan nilai K_m dan K_{cat} akibat mutasi serta spesifisitas substratnya.
- b. Perlu dilakukan sub-kloning terhadap dua xilosidase dalam sistem ekspresi

BAB VII
RENCANA/ PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA
(TAHUN KETIGA)

A. Tujuan Khusus

1. Sub-kloning gen penyandi xilosidase-a dan xilosidase-b dalam sistem ekspresi
2. Menganalisis produk hidrolisis enzim xilosidase-a dan xilosidase-b
3. Megidentifikasi spesifisitas kedua enzim xilosidase terhadap substrat alam dan sintetis

B. Metode

1. Sub-kloning dan ekspresi gen penyandi enzim xilosidase-a dan xilosidase-b (dilakukan oleh 2 mahasiswa S2)

- a. Gen penyandi enzim xilosidase-a dan xilosidase-b hasil penelitian tahun pertama dan kedua akan digabungkan dalam vektor ekspresi yang sama yaitu pET dan diekspresikan di *E.coli*
- b. Karakterisasi xilosidase kompleks rekombinan

Klon positif yang telah dikarakterisasi strukturnya dengan sekuensing, selanjutnya diuji ekspresinya dengan menentukan aktivitas enzim variant yang dihasilkan menggunakan substrat alam dan substrat spesifik p-nitrofenil- α -L-arabinosida dan p-nitrofenil- β -D-xylopiranoside. Enzim dan substrat diinkubasi selama 30menit pada suhu 70°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 405 nm.

2. Analisis Kinetika hemiselulase variant (Lanjutan disertasi mahasiswa S3)

Hemiselulase Varian yang telah diperoleh pada tahun kedua akan dilakukan uji kinetika reaksi enzim variant nya

3. Jadwal Kerja

No.	Kegiatan	Jadwal		
		Tahun I	Tahun II	Tahun III
1.	Rekayasa Protein melalui <i>site directed mutagenesis</i> dan <i>gene shuffling</i> terhadap Xylosidase dan Arabinofuranosidase Rekombinan (<i>pET-xyI</i> dan <i>pET-abfa</i>)			
2.	Analisis SEM aktivitas enzim hemiselulase terhadap limbah pertanian			
3.	Pemurnian Enzim Variant			
4.	Karakterisasi Struktur dan Fungsi Xylosidase dan Arabinofuranosidase Variant			
5.	Kajian Biokimia Enzim Variant			
6.	Kajian Biofisika enzim Variant			

BAB VIII.
DRAF ARTIKEL ILMIAH YANG TELAH DITERIMA

ANALISIS BIOINFORMATIKA MOTIF RESIDU LESTARI DOMAIN (β/α)₈-BARREL GH51 α -L-ARABINOFURANOSIDASE YANG BERPERAN PADA SPESIFITAS SUBSTRAT MELALUI INTERAKSI SIDIK JARI GUGUS ARABINOFURANOSIL

Much Zaenal Fanani^{1), 2)}, One Asmarani²⁾, Hery Suwito³⁾, Ni Nyoman Tri Puspaningsih^{2), 3)}

¹⁾Mahasiswa: Departemen Kimia; Fakultas Sains dan Teknologi; Universitas Airlangga

²⁾Peneliti; KS Proteomik; Lembaga Penyakit Tropis; Universitas Airlangga

³⁾Staf Pengajar: Departemen Kimia; Fakultas Sains dan Teknologi; Universitas Airlangga

Email: fanani.mz@itd.unair.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motif residu lestari pada domain (β/α)₈-barrel GH51 α -L-arabinofuranosidase yang berperan pada spesifitas substrat melalui interaksi sidik jari gugus arabinofuranosil secara bioinformatik dan docking molekular. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya motif residu asam amino lestari pada domain (β/α)₈-barrel yaitu E29, R69, P71, G72, G73, W99, G173, N174, E175, H244, E294, A350 (urutan asam amino mengacu pada urutan asam amino Abfa). Pada domain (β/α)₈-barrel terdapat motif residu asam amino lestari yang yaitu GNE dan R-X-P-G-G dengan substitusi X menjadi W/Y/F. Melalui analisis struktur dan docking molekular diketahui bahwa residu asam amino lestari pada domain (β/α)₈-barrel yang berperan pada spesifitas substrat melalui interaksi sidik jari gugus arabinofuranosil yaitu Glu29 (CO'-O3B, CO''-O3B), Asn174 (NH'-O2B) dan Glu294 (CO'-O2B).

Kata kunci : GH51 α -L-arabinofuranosidase , motif residu lestari, interaksi sidik jari

PENDAHULUAN

L-arabinosa merupakan salah satu unit monomer yang terdistribusi secara luas sebagai penyusun dinding sel tanaman yaitu sebagai rantai samping pada arabinogalaktan dan tulang punggung pada arabinan. Degradasi total dinding sel tanaman secara enzimatik memerlukan peran penting enzim pemutus rantai samping unit arabinofuran yaitu α -L-arabinofuranosidase (EC 3. 2. 1. 55). α -L-Arabinofuranosidase merupakan enzim ekso yang mampu memotong ikatan pada ujung non-pereduksi α -L-1,2; 1,3 dan 1,5-arabinofuranosidik (Saha, 2000). Berdasarkan homologi urutan asam amino penyusunnya, maka α -L-arabinofuranosidase dapat digolongkan pada sistem CAZY (*Carbohydrate Acting Enzyme*) menjadi 5 famili glikosida hidrolase (GH) yaitu GH3,

GH43, GH51, GH54 dan GH63 (Henrissat and Davies, 1997).

Puspaningsih (2004) telah berhasil mengklon dan menentukan gen penyandi α -L-Arabinofuranosidase (Abfa) dari isolat *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. Berdasarkan urutan asam amino penyusunnya, maka Abfa termasuk kedalam famili GH51. Abfa dilaporkan memiliki aktivitas katalitik terhadap berbagai macam substrat misalnya substrat alam (*oat-spelt xylan, birchwood, wheat, rye, arabinan*) dan substrat sintetik (4-nitrophenil arabinofuran). Spesifitas substrat Abfa dapat ditingkatkan melalui rekayasa protein, tetapi informasi tentang residu asam amino yang berperan dalam menentukan spesifitas substrat belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini telah dilakukan analisis motif

residu asam amino lestari dari GH51 α -L-arabinofuranosidase yang berperan pada spesifitas substrat melalui interaksi sidikjari secara bioinformatik dan docking molekular.

BAHAN DAN METODE

Analisis urutan asam amino

Analisis urutan asam amino penyusun GH51 α -L-Arabinofuranosidase dari berbagai mikroorganisme yang telah dikarakterisasi didatabase Cazy (www.cazy.org/) diperoleh dari *National Center Biotechnology Information* (NCBI) (Catarel *et al.*, 2009). Kemudian dilakukan penjajaran urutan asam amino yang telah diperoleh menggunakan ClustalX2 Multiway Blossum64 dan visualisasi motif menggunakan WebLogo (weblogo.berkeley.edu/logo.cgi) (Larkin *et al.*, 2007; Crooks *et al.*, 2004).

Analisis struktur

Analisis struktur protein GH51 α -L-Arabinofuranosidase yang telah terdeposit di Protein Data Bank (PDB) diperoleh melalui informasi database Cazy dan model struktur Abfa yang didepositkan pada Protein Modeling Database (PMDB) dengan kode PM0078180 (mi.casput.it/PMDB/main.php). Preparasi dan visualisasi struktur protein dilakukan menggunakan program PyMol 1.3 dan Discovery Studio Visualizer 2.5.

Docking molekular

Preparasi ligan dan makromolekul menggunakan Autodock Tools (Morris *et al.*, 2009). Docking dilakukan menggunakan program AutoDock4 dan dianalisis menggunakan program PyMol 1.3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motif residu asam amino lestari pada domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel GH51 α -L-arabinofuranosidase

Database urutan asam amino protein terdapat pada Swissprot, tetapi tidak semua asam amino yang disubmit telah dikonfirmasi sehingga untuk mendapatkan urutan asam

amino GH51 α -L-Arabinofuranosidase diambil kode akses urutan-urutan yang telah dikarakterisasi pada database Cazy dan dilakukan proses pengambilan urutan asam amino di NCBI. Dari hasil pengumpulan urutan asam amino dari berbagai mikroorganisme, diperoleh 50 urutan asam amino GH51 α -L-Arabinofuranosidase yang terdiri dari 13 urutan asam amino berasal dari Eukariot, 37 berasal dari prokariot dan 4 yang tidak terklasifikasi.

Urutan asam amino yang telah didapatkan digunakan sebagai data penjajaran multi untuk mendapatkan output yang akan digunakan dalam analisis selanjutnya. Analisis motif urutan asam amino dilakukan menggunakan program berbasis online yang membuat logo residu asam amino berdasarkan probabilitas dari hasil penjajaran.



Gambar 1. Motif urutan asam amino lestari GH51 Abfa.

Hasil penjajaran 50 data urutan asam amino dari berbagai mikroorganisme didapatkan daerah lestari GH51 Abfa yaitu E29, R69, P71, G72, G73, W99, G173, N174, E175, H244, E294, A350 (urutan asam amino mengacu pada urutan asam amino Abfa). Asam amino yang berperan sebagai residu katalitik pada mekanisme retaining GH51 α -L-Arabinofuranosidase menunjukkan daerah lestari/terkonservasi pada 50 urutan asam amino yaitu glutamat sebagai acid/basa dan nukleofil. Hasil ini menunjukkan bahwa residu asam amino yang lestari mempunyai peran penting pada fungsi GH51 α -L-

Arabinofuranosidase yaitu Glu175 dan Glu294. Selain residu katalitik yang lestari, terdapat motif urutan asam amino lestari yang belum pernah dilaporkan sebelumnya yaitu R-X-PGG dan G-N-E (Gambar 1.). Motif R-X-P-G-G berada secara berurutan jika pada urutan asam amino Abfa masing-masing 69 sampai dari 73 dengan substitusi X nomor 70 menjadi W/Y/F. Selain itu, motif GNE secara berurutan pada urutan asam amino Abfa masing-masing residu nomor 173 sampai dari 175. Motif GNE dapat diduga berhubungan dengan aktivitas katalitik yang diperankan oleh residu Glu175 sehingga motif GNE tetap lestari.

Interaksi sidik jari gugus L-arabinofuranosil

Struktur 3D GH51 α -L-Arabinofuranosidase yang telah ditentukan secara eksperimental dan dideposit pada PDB terdapat 6 struktur utama yang berasal dari berbagai mikroorganisme (Tabel. 1). Struktur yang diperoleh dari PDB menunjukkan bahwa GH51 α -L-Arabinofuranosidase memiliki 2 domain yaitu $(\beta/\alpha)_8$ -barrel sebagai domain katalitik dan β -propeller diduga sebagai domain pengikatan karbohidrat (Gambar 2A). Abfa memiliki kesamaan urutan asam amino dengan 6 struktur yang telah diketahui, dengan persen homologi tertinggi 96% terhadap 1PZ3 dan persen homologi terendah 30% terhadap 2VRK.

Tabel. 1 Struktur Protein GH51 α -L-Arabinofuranosidase di PDB.

Kode PDB	Sumber Mikroorganisme
3S2C	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1
3UG3, 3UG4, 3UG5	<i>Thermotoga maritima</i>
2Y2W	<i>Bifidobacterium logum</i>
1PZ3, 1PZ2,	<i>Geobacillus</i>
1QW8, 1QW9	<i>stearothermophilus</i> T-6
2VRK, 2VRQ	<i>Thermobacillus xylanilyticus</i>
2C8N, 2C7f	<i>Clostridium thermocellus</i>

Posisi residu katalitik pada domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel ditunjukkan pada Gambar 2B. Posisi residu katalitik Glu175 dan Glu294 menunjukkan berada pada celah sempit dipermukaan struktur barrel. Dari hasil analisis superpose menunjukkan bahwa residu katalitik Glu175 dan Glu294 merupakan residu lestari yang dikonfirmasi dari hasil analisis struktur, dimana posisi residu katalitik tersebut tetap berada pada posisi yang sama dari ke 6 struktur kristal dan model, tetapi berbeda dalam urutan masing-masing asam aminonya.

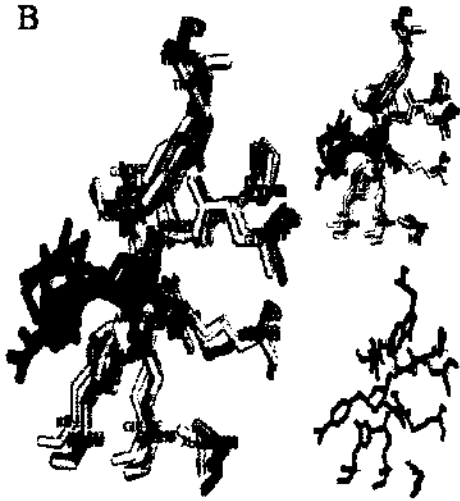


Gambar 2. (A) Struktur 3D GH51 α -L-Arabinofuranosidase bentuk publikasi, domain β -propeller ditunjukkan oleh warna kuning yang diduga sebagai domain pengikatan karbohidrat dan domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel ditunjukkan oleh warna biru sebagai domain katalitik, (B) Superimpose struktur 3D GH51 α -L-Arabinofuranosidase, residu katalitik ditunjukkan oleh merah dan biru.

A



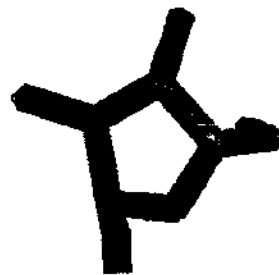
B



Gambar 3. (A) Superimpose struktur 3D dari struktur kristal dengan kode 1PZ3, 2Y2W, 3S2C, 3UG3, warna biru menunjukkan residu lestari pada domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. (B) Superimpose struktur 3D kompleks Substrat-Enzim mutan dari struktur kristal dengan kode 2VRQ (abu-abu), 2C8N (kuning), 2C7F (merah muda), 1QW9 (biru muda), 1QW8 (hijau), mutan E175A Abfa (biru tua).

Selain residu katalitik, hasil penjajaran urutan asam amino dari 50 urutan asam amino, dikonfirmasi bahwa residu lestari tersebut menunjukkan posisi lestari pada struktur domain $(\beta/\alpha)_8$ -barrel. Posisi residu lestari yang diperoleh sebelumnya ditampilkan distribusinya pada domain

$(\beta/\alpha)_8$ -barrel yang ditunjukkan oleh Gambar 3A. Residu lestari tersebut berada pada celah sempit seperti pada posisi residu katalitik dimana terjadinya proses reaksi enzimatik terjadi. Hasil analisis superpose antara kompleks enzim-substrat dari berbagai macam kristal ditampilkan dalam Gambar 3B. Hasil analisis interaksi sidik jari dari 5 struktur kristal kompleks berbagai susbtat arabinofuranosil dengan enzim GH51 menunjukkan adanya interaksi sidik jari, dimana gugus arabinofuranosil yang masuk kedalam celah sempit/sisi aktif berada pada posisi yang serupa.



Gambar 4. Gugus arabinofuranosil, atom oksigen (O) ditunjukkan oleh warna merah, atom karbon (C) ditunjukkan oleh warna hijau.

Analisis interaksi sidik jari gugus arabinofuranosil hasil docking susbtat pNP-A menggunakan struktur mutan E175A Abfa menunjukkan pola interaksi yang mirip dengan struktur referensi 1QW9 (Gambar 3B.). Dari hasil analisis interaksi ligan-makromolekul, didapatkan residu asam amino lestari yang membentuk interaksi sidik jari dengan gugus arabinofuranosil adalah E29, N174 dan E294 (urutan asam amino mengacu pada urutan asam amino Abfa). Interaksi sidik jari gugus arabinofuranosil (Gambar 4.) yaitu Glu29 terbentuk melalui interaksi CO'-O3B dan CO"-O3B, Asn174 terbentuk melalui interaksi NH'-O3B dan Glu294 terbentuk melalui CO'-O3B. Dari 5 struktur yang

diperoleh dari PDB (1QW9, 1QW8, 2VRQ, 2C8N dan 2C7F) dan E175A menunjukkan interaksi sidik jari dengan gugus arabinofuranosil, tetapi ada perbedaan pada panjang interaksi. Interaksi sidik jari menunjukkan perbedaan pada panjang interaksi kisaran 2.6 - 3.4 Å dari hasil analisis struktur kristal dan docking (Data tidak ditampilkan).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa motif residu lestari pada domain (β/α)₈-barrel GH51 α -L-arabinofuranosidase yang berperan pada spesifitas substrat melalui interaksi sidik jari gugus arabinofuranosil adalah Glu29, Asn174 dan Glu294. Dalam penelitian ini diketahui adanya motif residu lestari RXPGG dan GNE pada domain (β/α)₈-barrel yang belum pernah dilaporkan sebelumnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Indonesia Toray Science Foundation research grant dan Hibah Penelitian Pascasarjana-DIKTI untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. 2009. **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Res* 37:D233-238.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J, M., Brenner, S, E. 2004. **WebLogo: A sequence logo generator.** *Genome Research* 14:1188-1190.
- Henrissat, B., Davies, G, J. 1997. **Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases.** *Current Opinion in Structural Biology* 7:637-644.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Morris, G, M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M, F., Belew, R, K., Goodsell, D, S., Olson, A, J. 2009. **Autodock 4 and AutodockTools4: Automated docking with selective receptor flexible.** *J Comput Chem* 30(16): 2785-2791.
- Puspaningsih, N, N, T. 2004. **Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08.** Desertasi, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Saha BC, 2000. **α -L-arabinofuranosidase: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology.** *Biotechnol Advn* 18:403-423.

DAFTAR PUSTAKA

- Beg QKM, Kapoor L, Mahajan G, Hoondal S. 2001. Microbial xylanase and their industrial application : a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56: 326-338.
- Biswas S dan Vashishtha N. 2003. Xylitol : Technology & Business Opportunities. Internet.
- Clark EM, Tenkanen M, Nakni-Setana T and Pentika M. 1996. Cloning of gene encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 3840-3846.
- Christakopoulos, P *et al.* 2002. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endo-xylanases, *International Journal of Biological Macromolecules*, 31 : 171-175
- Dominique H *et al.* 2003, Xylo-oligosaccharides : Properties and Production Technologies, *Electronic Journal Environmen. Agric. Food. Chem.*, ISSN : 1579-4377.
- Gupta N, Reddy SV, Maiti S, Ghosh A. 2000. Cloning, Expression and sequence Analysis of The Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endo-1,4- β -xylanase from Alkalophilic, Mesophilic *Bacillus sp.* Strain NG-27, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2631-2635.
- Hilge M, Gloor S, Winterhalter K, Zimmermann W, Piontek K. 1996. Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of Two β -Mannanase Isoform from *Thermotomonospora fusca* KW3, *Acta. Cryst.* D52:1224-1225.
- Horikoshi K. 1999. Alkaliphilic : Some Applications of their Products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 735-750
- Kulkarni NA, Shendye, dan Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS. Microbiol. Rev.*, 23: 411-456.
- Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A and Kawamura Y. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain, *J. of Bact.*, 172: 6669-6672.
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2002. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Xilanolitik dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08, Penelitian S3-IPB Bogor dan *JSPS-Short-course Program*, Juli-Oktober, Osaka Prefecture University, Jepang
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih. 2003. Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E. coli* DH5 α , Penelitian S3-IPB, Bogor dan *JSPS-Short Course Program*, September-November, Mie University, Jepang.
- Ni Nyoman Tri Puspaningsih dkk. 2005. Kloning, Over-ekspresi Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di sistem pET101/D-TOPO, KNAW Mobility Program, The Netherlands

Ni Nyoman Tri Puspaningsih dkk, 2005 dan 2006. Degradasi Limbah Kelapa Sawit dengan Enzim Xilanolitik Rekombinan, Penelitian RUT XII (berakhir 2006), Menristek, Jakarta

Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 279-291.

Schwarz HW, Adelsberger H, Jauris S, Herte C, Funk B, Staudenbauer LW.1990.Xylan Degradation by The Thermophilic *Clostridium stercorarium* : Cloning and Expression of Xylanase, β -D-xylosidase, and α -L-arabinofuranosidase Genes in *Escherichia coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 170 : 368-374

Shallom D, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y.2002. Detailed Kinetic Analysis and Identification of the Nucleophile in α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T6, a Family 51 Glycoside Hydrolase, *J.Biol.Chem.*, 277: 436667-43673.

SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Peningkatan Aktivitas Enzim Hemiselulase dengan Rekayasa Protein untuk Pengolahan Biomassa Berbasis Lignoselulosa melalui pendanaan Hibah Tim Pascasarjana direncanakan berlangsung selama 3 tahun. Penelitian tahun kedua telah meluluskan 2 mahasiswa jenjang Magister dan melibatkan 2 mahasiswa jenjang Doktor. Selain itu telah pula menghasilkan 3 artikel untuk publikasi internasional (submit) dan 1 naskah diseminarkan dalam seminar internasional (prosiding). Hasil penelitian tahun kedua menunjukkan bahwa (1). rekayasa protein melalui *site directed mutagenesis* terhadap enzim β -D-xilosidase telah menghasilkan enzim varian yang mampu mengekspresikan enzim tersebut dan telah pula berhasil dikristalkan, (2). rekayasa protein melalui *direct evolution* terhadap enzim α -L-arabinofuranosidase telah dianalisis secara biokimia dan in-silico , dan salah satu diantaranya menunjukkan karakterisasi pH dan suhu lebih tinggi dibandingkan wild type nya, (3). Peluang aplikasi enzim arabinofuranosidase untuk terapi tubercolosis karena mampu menghidrolisis dinding sel berbasis arabinosa, dan (4). Gen putative exo-xilanase dalam pTP510 telah berhasil diisolasi dan disisipkan dalam pET-30b dan menunjukkan enzim xilosidase kedua. Hasil penelitian pada tahun kedua tersebut akan dilanjutkan pada tahun ketiga ini dengan tujuan khusus dan tahapan penelitian sebagai berikut.

A. Tujuan Khusus

1. Sub-kloning gen penyandi xilosidase-a dan xilosidase-b dalam sistem ekspresi
2. Menganalisis produk hidrolisis enzim xilosidase-a dan xilosidase-b
3. Mengidentifikasi spesifisitas kedua enzim xilosidase terhadap substrat alam dan sintesis

B. Metode

1. Sub-kloning dan ekspresi gen penyandi enzim xilosidase-a dan xilosidase-b (dilakukan oleh 2 mahasiswa S2)

a. Gen penyandi enzim xilosidase-a dan xilosidase-b hasil penelitian tahun pertama dan kedua akan digabungkan dalam vektor ekspresi yang sama yaitu pET dan diekspresikan di *E. coli*

b. Karakterisasi xilosidase kompleks rekombinan

Klon positif yang telah dikarakterisasi strukturnya dengan sekuensing, selanjutnya diuji ekspresinya dengan menentukan aktivitas enzim variant yang dihasilkan menggunakan substrat alam dan substrat spesifik p-nitrofenil- α -L-arabinosida dan p-nitrofenil- β -D-xylopiranoside. Enzim dan substrat diinkubasi selama 30menit pada suhu 70°C dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 405 nm.

2. Analisis Kinetika hemiselulase variant (Lanjutan disertasi mahasiswa S3)

Hemiselulase Varian yang telah diperoleh pada tahun kedua akan dilakukan uji kinetika reaksi enzim variant nya

3. Jadwal Kerja

No.	Kegiatan	Jadwal		
		Tahun I	Tahun II	Tahun III
1.	Rekayasa Protein melalui <i>site directed mutagenesis</i> dan <i>gene shuffling</i> terhadap Xylosidase dan Arabinofuranosidase Rekombinan (<i>pET-xyl</i> dan <i>pET-abfa</i>)			
2.	Analisis SEM aktivitas enzim hemiselulase terhadap limbah pertanian			
3.	Pemurnian Enzim Variant			
4.	Karakterisasi Struktur dan Fungsi Xylosidase dan Arabinofuranosidase Variant			
5.	Kajian Biokimia Enzim Variant			
6.	Kajian Biofisika enzim Variant			

LAMPIRAN

Dari: Graciela Munoz <edbiotec@ucv.cl>
Kepada: ratna.me189@yahoo.com
Dikirim: Selasa, 6 November 2012 16:11
Judul: [ejbiotechnology] Submission Acknowledgement

Dear Dr Ratna Meiinda,

Thank you for submitting the manuscript, "CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE (AbfA) VARIANT (Q46R; D205E; K285E) BIOCHEMICAL PROPERTIES AND IN SILICO STUDY ON THE EFFECT OF MUTATION TO ITS STRUCTURE"
to Electronic Journal of Biotechnology.

The paper will be revised by our Local Editorial Board before it is submitted to peer review.

With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress by logging into the journal web site:

Manuscript URL:

<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/author/submission/1230>

Username: ratna

If you have any questions, please contact us.

Sincerely,

Graciela Munoz
Electronic Journal of Biotechnology

Electronic Journal of Biotechnology
<http://www.ejbiotechnology.info>

CHARACTERIZATION OF α -L-ARABINOFURANOSIDASE (AbfA) VARIANT (Q46R; D205E; K285E) BIOCHEMICAL PROPERTIES AND IN SILICO STUDY ON THE EFFECT OF MUTATION TO ITS STRUCTURE

Ratna Melinda¹⁾, Purkan¹⁾, Handoko Darmokoesoemo¹⁾, Ni Nyoman Tri Puspaningsih^{1,2)}

¹⁾Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia

²⁾Laboratory of Proteomic, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, Surabaya 60115, Indonesia

*Corresponding author: nyomantri@yahoo.com

Financial support: This work was supported by a research grant of *Hibah Pasca* 2012, The Ministry of Education, Republic of Indonesia.

Keywords: *Biochemical properties, α -L-arabinofuranosidase (AbfA), in silico, non covalent interaction*

Abstract

This study aimed to determine the biochemical properties of the AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) also the correlation between change in biochemical properties and its tertiary structure modification. The enzyme expressed in *E. coli* BL21 (DE3)/pBM5abf were partially purified by heat treatment for 1 hour at 70°C. The partially purified enzyme was characterized for its biochemical properties. Protein tertiary structure model which was built by homology modeling method using *Geobacillus stearothermophilus* T-6 α -L-arabinofuranosidase crystal structure (PDB: 1PZ3) as template, was subjected for in silico study. Partial purification showed an increase of purity by 17.60 fold. The partially purified enzyme showed optimum activity towards p-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNPA) at pH 7 and 70°C. AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) was stable for 24 hours at pH 6-9 (at 4°C) and lost almost 70% of its activity on 16 hours incubation at 70°C. Compared to its wildtype, AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) showed decrease on thermostability. Superimpose of AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) to its wildtype showed RMSD 0.05. In silico analysis of AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) protein model revealed that the decrease on thermostability was related to the reduction of some non covalent interactions especially Hydrogen bonds and Van der Waals interaction, due to modification in AbfA variant (Q46R; D205E; K205E) structure.

Introduction

Alpha-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) are the enzymes catalyze the hydrolysis of terminal non reducing α -L-1,2-, α -L-1,3- L-arabinofuranosidic bonds in hemicelluloses such as arabinoxylan, L-arabinan and other L-arabinose-containing polysaccharides. The α -L-arabinofuranosidase acts synergistically with other hemicellulases and pectic enzymes for complete degradation of hemicelluloses and pectin (DeVries et al. 2000). Its synergistic action with other lignocelluloses degrading enzymes are promising tool in agro-industrial processes including improvement of animal feedstock quality, production of bioethanol from lignocelluloses material, production of important medicinal compounds and pulp treatment (Numan and Bhosle, 2006). Since pulping and bleaching are both performed at high temperature, the application in paper industry needs a thermophilic hemicellulases preferably those active above pH 7 (Vieille and Zeikus, 2001).

A xylanolytic gene cluster from a thermophilic bacterium *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 that had been isolated from Gunung Pancar hot spring (Bogor, West Java, Indonesia) was successfully cloned into plasmid pTP510 in *Escherichia coli* DH5 α . This gene cluster encodes exo-xylanase (geneBank accession number DQ387047), β -xylosidase (DQ345777) and α -L-arabinofuranosidase (DQ387046) (Puspaningsih, 2004). In order to increase the activity of AbfA on basic condition, *abfA* gene had subjected to direct evolution using PCR-errorprone method, followed by cloning to M5 plasmid (excretory expression system) and transformation to *E. coli* BL21(DE3). Screening of the extracellular AbfA, had showed some variants with increasing activity on pH 9, one of which is variant A9 (Yamani, 2011). Nucleotide sequencing and alignment of *abfA* variant A9 to its wildtype (DQ 387046.1) showed three point mutations:

Nucleotide sequencing and alignment of *abfA* variant A9 to its wildtype (DQ 387046.1) showed three point mutations: A137G, A853G and T615A. In silico translation of the gene showed three amino acids substitution: Gln46Arg; Asp205Glu; Lys285Glu.

Amino acid substitution might affect the fold or function of the protein by disrupting the interacting forces within the protein as well as between protein and its environment. Studies on the effects of mutations have mostly been performed experimentally e.g. biochemical characterization of the mutations, which able to provides some insight into how the mutation affects activity; however, without structural information it is rare that the exact mechanism responsible for a change in activity can be characterized. Due to difficulties in experimental determination of protein structure, a bioinformatics approach is very useful in predicting the protein structure (Berrondo, 2010). An understanding of correlation between mutation and protein function and stability is important for designing, engineering or developing a new enzyme (Tokuriki et al. 2007). This study aims to determine the biochemical properties of the AbfA variant (Q46R; D205E; K285E) as well as identify the correlation between biochemical property changes and modification on its tertiary structure, using protein tertiary structure model.

Experiment

Microorganism and media culture. *E. coli* BL21(DE3)/pBM5abf variant (A137G, A853G and T615A) was grown in sterile Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100 µg/ml Ampicillin, 2.5 mM IPTG and 10 mM Glycine. Sterile LB medium and Glycine were prepared by autoclaving the medium for 15 min at 121°C while the sterile IPTG was prepared by filtering the IPTG solution using 0.22 µm filter.

Production of AbfA variant. The cultures were grown in LB medium containing 100 µg/ml Ampicillin and incubated under shaking condition (150 rpm) at 37°C until the OD₆₀₀ measured by spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu) was 0.5. When the OD has reached 0.5, sterile IPTG was added to the culture until final concentration 2.5 mM. The incubation continued under shaking condition (150 rpm) at 30°C up to 24h. At the 4th hour, sterile Glycine was added until final concentration 10 mM. Culture were taken after 24 h incubation and centrifuged (3500rpm) for 10 min. The cell pellet obtained was then resuspended in phosphate buffer (pH 7). After that cell suspension was lysed by ultrasonicator (Soniprep 150 Sanyo) and centrifuged (12000rpm) for 10 min to produce crude enzymes.

Partial purification. The crude enzyme was partially purified by heat treatment at 70°C in an hour. The denatured protein was separated with the undenatured one by centrifugation at 4°C (12000rpm, 15 min). The partially purified enzyme was used for the biochemical properties characterization including determination of optimum pH and temperature as well as pH stability and thermostability.

Enzyme activity assay. Enzyme activity was measured by incubating 20 µL enzyme with 180 µL pNPA 1mM in phosphate buffer pH 7, at 70°C for 30 minutes. After 30 minutes incubation, 200 µL Na₂CO₃ 0.5 M was added, followed by 600 µL aquadest. The absorbance was measured at 405 nm using spectrophotometer. One unit of enzyme activity was defined as µmol p-nitrophenol liberated by 1 mL of enzyme per minute at incubation condition.

SDS PAGE. SDS PAGE (Mini Protean II BioRad) was done according to the method described by Sambrook and Russell (Sambrook and Russel, 2001). The separating gel concentration was 10% and the stacking gel concentration was 5%. Low weight molecular marker (Amersham) was used as a molecular weight marker.

Determination of optimum temperature

The optimum temperature of enzyme was determined by measuring the enzyme activity towards pNPA diluted in phosphate buffer pH 7 at various temperatures (50-90°C).

Determination of optimum pH

The optimum temperature of enzyme was determined by measuring the enzyme activity at various pH (6-10). Incubation of enzyme and substrate were held at 70°C. The buffers used were: phosphate citrate buffer (pH 6), phosphate buffer (pH 7-8), Glycine-NaOH buffer (pH 9-10).

Determination of temperature stability. Thermostability was assessed by incubating the enzyme at 70°C up to 24 hours. The activity of enzyme measured at 0, 5th, 9th, 16th and 24th hour using same procedure as described in enzyme activity assay at optimum and pH temperature. Residual activity at x hour is the comparison between activity at x hour and activity at 0h.

Determination of pH stability. pH stability was assessed by diluting the enzyme at various pH and same concentration for each pH then stored at 4°C for 24 h. On 0h and 24 h, the enzyme activity was measured at its optimum pH and temperature. Residual activity at 24 h is the comparison between activity at 24 h and activity at 0h.

Protein tertiary structure modeling. Protein tertiary structure was modeled using homology modeling method by Swiss Model [9] using α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 as template (Schwede et al. 2003).

Determination of RMSD changes. The RMSD changes was determined using SuperPose (Maiti et al. 2004)

Determination of non covalent interaction and Solvent Accessibility Surface. Solvent Accessibility Surface and non covalent interactions including Hydrogen bonds, Van der Waals Interaction were determined using Chimera 1.6.7. Electrostatic interaction were determined by measuring the distance between charged atom using Chimera 1.6.7 (Pettersen et al. 2004)

Determination of $\Delta\Delta G$. The changes in ΔG upon mutation ($\Delta\Delta G$) was determined using PoP MuSiC-2.0 (Dehouck et al. 2009)

Result and Discussion

Expression of intracellular AbfA variant (Q46R; D205E; K285E) was detected by using SDS PAGE. A 61 kDa band was shown, corresponded to intracellular AbfA variant (Figure 1). The molecular weight of AbfA produced by *G. thermoleovorans* IT-08 is 58 kDa but since *abfA* variant gene was on M5 plasmid system (excretory expression system) (Jones et al. 2012), the intracellular protein synthesized would still have the signal peptide, gave an addition to the molecular weight (Bailey et al. 1989; Westley and Weber, 1982). The band showed at polyacrylamide gel was in agreement with the protein molecular weight estimated by using ProtParam (Gasteiger et al. 2005) which is 61 kDa.

Partial purification by heat treatment at 70°C was based on thermophilic property of AbfA (Puspaningsih, 2004). The heat treatment would denature most mesophilic proteins produced by *E. coli* but not the thermophilic AbfA protein, resulted in increase of purity by 18.84 fold (Table 1).

Table 1. Purification table

Sample	[pNP] ($\mu\text{g/mL}$)	[protein] ($\mu\text{g/mL}$)	Activity (U/mL)	Volume (mL)	Total activity	Specific activity (U/mL.mg)	Yield	Purification fold
Crude	0.154	32968.42	0.36868	5	1.8434	0.011183	100%	1
Partially purified	0.110	1336.67	0.263031	3.5	0.92060	0.1967812	50%	17.60

AbfA variant displayed an optimum activity at pH 7 (Figure 1) and 70°C (Figure 2). AbfA variant showed no differences in optimum temperature with extracellular AbfA synthesized by *E. coli* BL21(DE3)/pBM5abf. The optimum pH of AbfA variant was relatively same as the extracellular AbfA synthesized by *E. coli* BL21(DE3)/pBM5abf, which is between the range of neutral to slightly basic (pH 7-8) (Yamani, 2011).

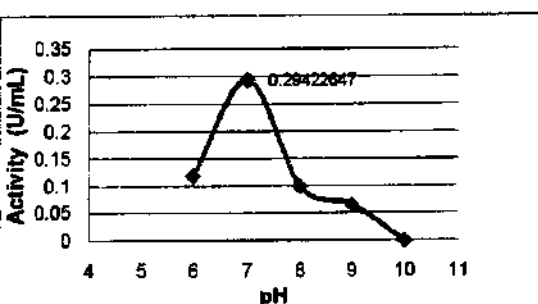


Figure 1. The activity of AbfA variant on various pH

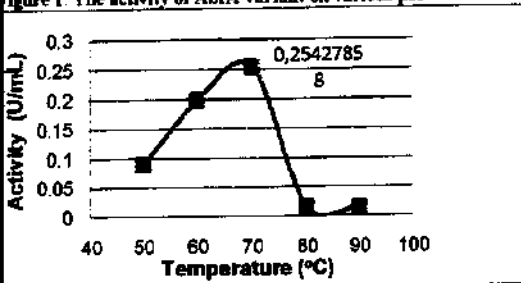


Figure 2. The activity of AbfA variant on various incubation temperature.

Mutation on *abfa* gene did not affect the optimum condition for catalysis since the substituted amino acid weren't located at or around the active site (Lu et al. 2002; Nielsen et al. 2001; Tynan-Connolly and Nielsen, 2007). Residues involved in catalysis are Glu29, Arg69, Asn74, Asn174, Glu175, His244, Tyr246, Glu294 and Gln351 (Hovel et al. 2003)

AbfA variant lost 25% of its activity at 70°C after 9 h and retained only 34% of its activity over 16 h. Meanwhile, AbfA wildtype still showed 95% activity after 9 h and retained 73% of its activity over 16 h (Figure 3). The pH stability assessment showed that both AbfA variant and wildtype maintained more than 86% of activity on incubation at pH 6-9 over 24 h thus assumed as stable at pH 6-9 (Figure 4).

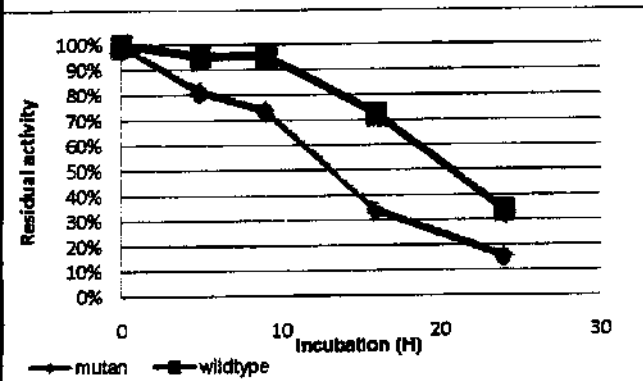


Figure 3. Effect of pH 6-9 on the stability of AbfA wildtype and variant

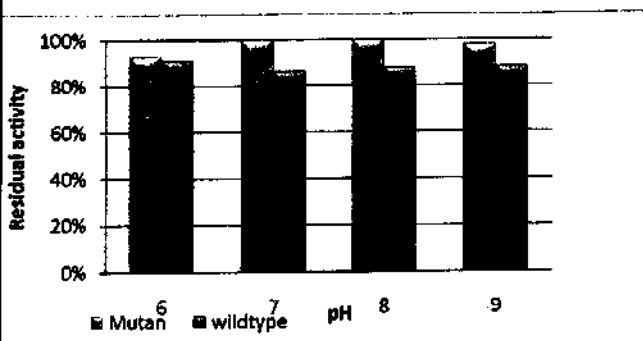


Figure 4. Effect of temperature at 70°C on the stability of AbfA wildtype (■) and variant (♦)

AbfA from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 was found to be 96% identical to α -L-arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6 thus it was used as template for construction of homology model of AbfA variant and wildtype. Superimpose of AbfA variant to its wildtype showed total RMSD 0.05 (Figure 5). The amino acids replacement due to gene mutation resulted in several changes in Hydrogen bonds, Van der Waals interaction and electrostatic interaction, as summarized on Table 2. Solvent accessibility area of AbfA variant and wildtype were 9000.7 and 19011.8, respectively. Solvent accessible surface area is one of the parameters characterizing the compactness of protein (Bogatyeva and Ivankov, 2008; Lesk and Chotia, 1979). The hypothesis in protein flexibility stated that rigidity is a prerequisite for high protein thermostability, supported by some studies conclude that hyperthermophilic proteins are more rigid enzymes (Vieille and Zeikus, 2001). Increase in solvent accessible surface area of AbfA mutant showed a less compact protein structure, affecting the thermostability of AbfA variant.



Figure 5. Superimpose of AbfA wildtype (brown) and variant (blue). Substituted amino acids were shown inside red circle

Table 2. Summary of intermolecular Hydrogen bonds, Van der Waals interaction and electrostatic interaction formed by residue 46, 205 and 285.

Interaction	Residue number:					
	Gln46	Arg46	Asp205	Glu205	Gln285	Glu285
Hydrogen bond	1	1	5	2	0	0
Van der Waals interaction	24	21	33	32	2	1
Electrostatic interaction	0	0	0	1	0	1 (weak)

Substitutions of Gln46Arg is not affecting the polarity but the charge (Whitford, 2005), gave a chance to the residue to make an electrostatic interaction. However, the amino acid changes did not make any change in electrostatic interaction because the three negatively charged residues around Arg46 (Asp48, Asp55, Glu58) were at 6.5-11Å in distance to Arg46 while the maximum distance for salt bridge formation is 4Å (Kumar and Nussinov, 2002; Karshikoff and Melesarov, 2008). The only Hydrogen bond formed, was between atoms at protein backbone so it wasn't affected by the mutation (Figure 6).

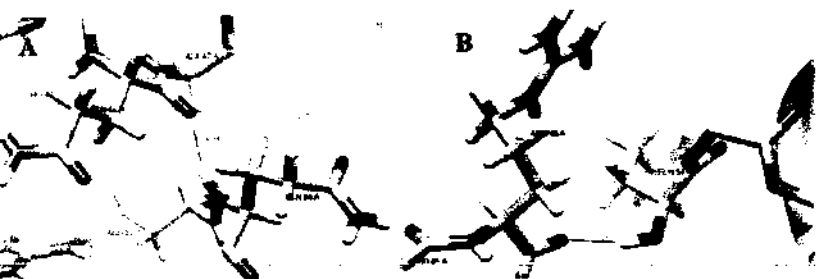


Figure 6. Hydrogen bond (blue line) formed by residue 46 (A: before mutation; B: after mutation)

The only change at this position was reduction of 3 Van der Waals interactions (Figure 7). Prediction of mutant stability using $\Delta\Delta G$ showed the $\Delta\Delta G$ was +0.22. It means that mutation in this position directing to destabilization, most probably caused by reduction of Van der Waals interaction.



Figure 7. Van der Waals interaction (green line) on residue 46 (A: before mutation; B: after mutation)

Theoretically, the Asp205Glu substitution might not have a huge effect since those two has similar side chain, differ only by a methylene group (Whitford, 2005). However, the in silico study showed reduction of 3 hydrogen bonds (Figure 8) and 1 Van der Waals interaction (picture not showed), also addition of 1 electrostatic interaction (His146-Glu205 O), compensating the attractive force formed by electrostatic interaction. Replacement at this position showed a destabilization with $\Delta\Delta G$ +2.32. The destabilization was mainly because of the reduction of 3 Hydrogen bonds.

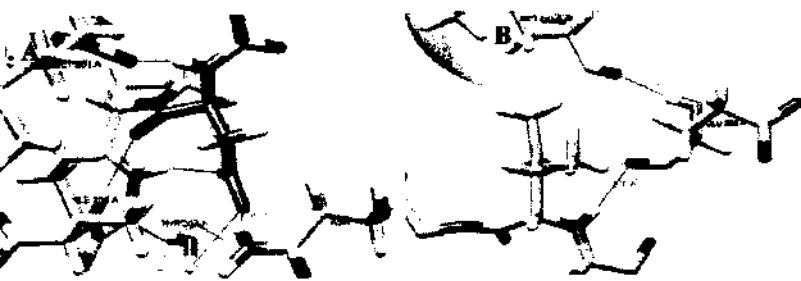


Figure 8. Hydrogen bonds (blue line) formed by Asp205 (A) and Glu205 (B)



Figure 9. Salt bridge between Glu205 OE2 and His146 ND1 (3.66Å)

Lys285Glu changes caused a side chain charge inversion, from positively to negatively charged (Betts and Russell, 2003). The replacement at this position actually was more favorable since most charged amino acids around position 285 are positively charged: Lys279, Lys281, Lys282, Arg283 and Lys286. The charge inversion reduced the repulsive force arose from same charges around residue 285. Although amino acid at this position was charged, they were not involved in any salt bridge because of spatial hindrance. The closest negative amino acid to Lys285 was Asp276, whose charged atom was 12.3-13.5 Å to Nz Lys285 while the closest positive amino acid to Glu285 was Lys279, whose Nz was 4.6 Å to Glu285 OE1. It was assumed that Glu285 OE1 create a weak electrostatic interaction with Lys279 Nz because the charged atom distance was longer than salt bridge's maximum distance. The other change following

replacement at this position was reduction of 1 Van der Waals interaction. This residue (before or after mutation) did not form any Hydrogen bond. The facing-out side chain packing cause the atoms of residue 285 were at unfavourable distance to form interaction (Figure 10). Despite Glu285 formed less Van der Waals interaction than Lys285 did, but the weak electrostatic interaction formed and the charge inversion were able to compensate the destabilization caused by reduction of a Van der Waals interactions. The $\Delta\Delta G$ value of amino acid substitution on residue 285 was -0.09.

Qualitatively, there were reduction in non covalent interaction due to amino acid replacement, causing $\Delta H_{\text{folding}}$ of AbfA variant smaller than its wildtype. The maximum approximate bond energy for Hydrogen bond, Van der Waals interaction and electrostatic interaction are 10, 5, 20 kJ/mol, respectively (Whitford, 2005). Reduction of 3 hydrogen bonds and 5 Van der Waals interaction also formation of 2 electrostatic interaction prior to amino acids substitution would reduce 15 kJ/mol in bond energy. According to the equation $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ [23], a small ΔH (less heat released) causing a small ΔG value. The $\Delta G_{\text{folding}}$ depict amount of energy released to convert unfolding to folding state. Hence, the smaller $\Delta H_{\text{folding}}$ value, the smaller $\Delta G_{\text{folding}}$. Small value of $\Delta G_{\text{folding}}$ means unfolding is easier to occur. The smaller $\Delta H_{\text{folding}}$ of AbfA variant cause AbfA variant was more susceptible to unfolding than AbfA wildtype when treated with same heating treatment or in other words, cause AbfA variant has less thermostability than AbfA wildtype.

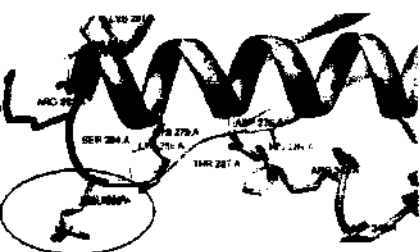


Figure 10. Side chain packing of residue 285 (before mutation: orange; after mutation: blue colored)

Conclusion

The partially purified AbfA variant (Q46R, D205E, K285E) displayed optimum activity at pH 7 and 70°C, was stable for 24 hours at pH 6-9 (at 4°C) and lost almost 70% of its activity on 16 hours incubation at 70°C. The decrease in thermostability was prior to reduction in non covalent interaction driven by changes in structure.

References

- BAILEY, C.; GERBER, L.; HOWARD, A.; and UDENFRIEND, S. (1989). Processing at the carboxyl terminus of nascent placental alkaline phosphatase in a cell free system: Evidence for specific cleavage of a signal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol 86 pp 22-26
- BETTS, M. and RUSSELL, R. (2003). *Bioinformatics for Geneticists: Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*. John Wiley & Sons, Ltd. ISBNs: 0-470-84393-4 (HB); 0-470-84394-2 (PB)
- BERRONDO, M. (2010). *Predicting The Structure and Function of Protein Mutants*. Dissertation: John Hopkins University
- BOGATYREVA, N. and IVANKOV, D. (2008). The Relationship between the Solvent-Accessible Surface Area of a Protein and the Number of Native Contacts in Its Structure. *Molecular Biology*, 2008, Vol. 42, No. 6, pp. 932-938
- DEHOUCQ, Y.; GROSFILS, A.; FOLCH, B.; GILLIS, D.; BOGAERTS, PH.; and ROOMAN, M. (2009). Prediction of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC 2.0. *Bioinformatics* 25:2537-2543
- DE VRIES, R.; KESTER, H.; POULSEN, C.; BENEN, J.; VISSER, J. (2000). Synergy between accessory enzymes from *Aspergillus* in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 327, 2000 p.401-410.

GASTEJGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCHA, A.; WALKER, J.M. (ed.) (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press p.571-607

HOVEL, K.; SHALLOM, D.; NIEFIND, K.; BELAKHOV, V.; SHOHAM, G.; BAASOV, T.; SHOHAM, Y.; SCHOMBURG, D. (2003). Crystal Structure and Snapshots Along The Reaction Pathway of A Family 51 α -L-arabinofuranosidase, *EMBO J* 22:4922-4932

TONET, M.A.; MAHADI, N.M.; MURAD, A.M.A.; RABU, A.; BAKAR, F.D.A.; RAHIM, R.A.; LOW, K.O.; and ALLIAS, R.M.D. (2012). Optimization of a Heterologous Signal Peptide by Site-Directed Mutagenesis for Improved Secretion of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2012; 22:48-58

KARSHIKOFF, A. and JELESAROV, I. (2008). Salt bridges and conformational flexibility: Effect on protein stability. *Biotechnol & biotechnol* EQ22/2008/1

KUMAR, S. and NUSSINOV, R. (2002) Close Range Electrostatic Interactions in Proteins. *Chem BioChem* 3(7):604-617

LIU, Y.; ZEN, K.; MUTUKRISHNAN, S.; KRAMER, K. (2002). Site-directed mutagenesis and functional analysis of active site acidic amino acid residues D142, D144 and E146 in *Manduca sexta* (tobacco hornworm) chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2002) 1369-1382

LESK, A. and CHOTIA, C. (1979). Solvent Accessibility, Protein Surfaces and Protein Folding. *Biophysical Society* 006-3495/80/10/035/13

MAITL, R.; GARY, H.; VAN DOMSELAAR, G.; ZHANG, H.; and WISHART, D. (2004). SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.* July 1; 32

NIELSEN, J.; BORCHERT, T.; VRIEND, G. (2001). The determinants of α -amylase pH-activity profile. *Protein Engineering* vol.14 no.7 pp.505-512.

NUMAN, M.T. and BHOSLE, N.B. (2006). α -L-arabinofuranosidase: the potential applications in biotechnology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 247-260

PETTERSEN, E.; GODDARD, T.; HUANG, C.; COUCH, G.; GREENBLATT, D.; MENG, E.C.; and FERRIN, T. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* Oct 25(13):1605-12.

PUSPANINGSIH, N.N.T. (2004). Pencerian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08. *Dissertation: Institut Pertanian Bogor*

SAMBROOK, J. and RUSSEL, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Edition, Cold Spring Harbor, ISBN 0879695773

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. (2003). Swiss Model: An automated protein homology modeling server. *Nucleic acid research*, Vol 31 no 13. Pp 3381-3385

YOKURIKI, N.; STRICHER, F.; SCHYMKOWITZ, J.; SERRANO, L.; TAWFIK, D. (2007). The Stability Effects of protein Mutations Appear to Be Universally Distributed. *J Mol Biol* (2007) 369, 1318-1332

RYNAN-CONNOLLY, B. and NIELSEN, J. (2007). Redesigning protein pKa values. *Protein Sci* 2007 16(2): 239-249

WIELLE, C. and ZEIKUS, G. (2001) Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:1-43 p.8, 33.

WESTLEY, B. and WEBER, R. (1982). Divergence of the two albumins of *X.laevis*: Evidence for the glycosylation of the major 74K albumin. *Differentiation* 1982; 22(3) :227-30

WHITFORD, D. (2005). *Proteins Structure and Functions*. John Wiley and Sons, Ltd. ISBN 0-471-49893-9 HB

YAMANI, L.N. (2011). Konstruksi Sekresi Ekstraseluler dan Peningkatan pH Optimum α -L-arabinofuranosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08. *Master Thesis*: Airlangga University

EES Registration

Thursday, November 1, 2012 1:20 AM

From:

"Journal of Biotechnology" <jbiotech@cebitec.uni-bielefeld.de>

Add sender to Contacts

To:

nyomantri@yahoo.com

Dear Prof. Ni Nyoman T Puspaningsih,

You have received this message because you have registered, or have been registered by an Editor, for the Elsevier Editorial System - the online submission and peer review tracking system for Journal of Biotechnology.

Here is your username and confidential password, which you will need to access the Elsevier Editorial System at <http://ees.elsevier.com/jbiotec/>.

Your username is: nyomantri

Your password is: puspanings565

Please save this information in a safe place.

Once you login, you may change your password and other personal information by selecting the "Change details" option on the menu bar at the top of the page.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Biotechnology

BIOTECHNOLOGY

>> Important security enhancements! [Read more...](#)

Username: lanny_hart

[Print paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change detail](#) Role:

nsions for Author Lanny Hartanti, M.Sc.

nt link allows you to fix or alter your submission. Please use Edit Submission to make changes to the meta-data and to remove and upload new files that n
ission' link removes your submission from the system. Please use this ONLY if you would like to permanently remove this submission from the system.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

Date Submission Began	Status Date
Oct. 30, 2012	Oct. 30, 2012

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Customize and

1 **Engineering of β -D-xylosidase of *Geobacillus thermoleovorans* IT-08**
2 **to more alkaline pH optimum**

3
4 Lanny Hartanti^{a,1)}, Ali Rohman^{a)}, Ami Suwandi^{b)}, Bauke W. Dijkstra^{c)}, Zeily Nurahman^{d)}, Ni
5 Nyoman Tri Puspaningsih^{a),*}

6
7 ^{a)}Jurusan Kimia, Fakultas Saintek, Universitas Airlangga, Kampus C Mulyorejo, Surabaya
8 60115, Indonesia

9 ^{b)}Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya 60265 Indonesia

0 ^{c)}Protein Crystallography Group, University of Groningen, Netherland

1 ^{d)}Kelompok Keahlian Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut
2 Teknologi Bandung, Bandung Indonesia

3 * Corresponding author

4 E-mail address of the corresponding author: nyomantri@yahoo.com

5 Tel. +62 8113452009 Fax: +62 5981841

6
7 **Abstract**

8 β -D-xylosidases are hemicellulases that catalyzes the release of xylose units from
9 short xylooligosaccharides and its activity is the rate limiting step in xylan hydrolysis. One
0 major application of these enzymes is as an eco-friendly biobleaching agent in the pulp and
1 paper industry with thermo-alkaliphilic xylosidases as the preferred enzymes. Hence, the
2 search of new thermo-alkaliphilic or re-engineering enzymatic pH-activity profiles is of
3 importance for industrial application. The thermophilic bacterium, *Geobacillus*
4 *thermoleovorans* IT-08, produces a meso-thermophilic β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37), which
5 has a unique primary structure compared to other xylosidases with only 32-35% of similarity
6 index. Here, we describe the role of Asp121 as the pKa modulator of this enzyme in
7 modulating the pH-activity profile. Mutation of this residue into Glu121 and Thr121 slightly
8 shifted the optimum pH into acidic condition. On the contrary, mutation of Asp121 into
9 Val121 and Asn121 showed significant shifts in its pH-activity profile, with 3 units increase
0 in its optimum pH. Further, mutant D121N also showed a significant increase in its optimum
1 temperature, i.e. 20°C higher compared to that of the wild-type. This study thus illustrated the
2 importance of pKa modulator in shifting the pH-activity and temperature-activity profile of
3 the enzyme. Changing Asp/Asn residue in enzyme, especially when the residue is located

1)Present address: Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya 60265 Indonesia

near the catalytic site, is thus also a useful strategy in altering the enzyme adaptation in high pH and temperature environment.

Keywords: β -D-xylosidase, *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, pH optimum, temperature optimum, site-directed mutagenesis, pK_a modulator

1. Introduction

Xylan is the major hemicellulosic polysaccharide in the plant cell wall and the second most abundant renewable polysaccharide in nature (Coughlan & Hazlewood, 1993). As a potentially renewable energy resource that could be converted to biofuel, xylan hydrolysis has gained growing interest. This polymer is a heterogenous polysaccharide composed of a β -1,4-linked xylopyranosyl backbone substituted with different side chains such as arabinofuranose, methylglucuronic acid, and acetate. Owing to its complex structure, complete degradation of xylan requires the concerted action of several hemicellulolytic enzymes. The main enzymes involved in xylan backbone hydrolysis are endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8), which hydrolyze the xylan backbone into β -D-xylopyranosyl oligosaccharides, and β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37), which cleave the resulting xylo-oligomers to free xylose (Bravman et al., 2003).

One of the major current applications of xylanases is in the pulp and paper industry, since hydrolysis of xylan by these enzymes facilitates the release of lignin from paper pulp and reduces the amount of hazardous chlorine as the bleaching agents, and also results in a better pulp brightness (Viikari et al., 1994; Beg et al., 2001). Most industrial pulping is done at high temperature (55-70°C) and under alkaline conditions, hence requiring xylanases to be operationally stable under such conditions (Sarethy et al., 2011; Collins et al., 2005; Mamo et al., 2009). Alkaliphilic xylanases would also be required for detergent applications where high pHs are typically used (Kumar et al., 2004). Considering the nature of industrial applications, generating xylanases that are more active and tolerant in alkaline conditions would help to reduce the associated costs.

Various pretreatments are often applied to lignocellulosic biomass prior to enzymatic hydrolysis to fractionate, solubilize, hydrolyze and separate cellulose, hemicellulose and lignin components. The treatment strategies often produce inhibitors for fermentative microorganisms or solubilize hemicelluloses and degrade it to a mixture of xylo-oligosaccharides that need to be further hydrolyzed in order to be used by microorganisms for

production of fuel ethanol and chemicals. β -D-xylosidase in this respect is very helpful to hydrolyze the xylo-oligosaccharides to simple sugars (Saha, 2003).

β -D-xylosidase activity is rate limiting in xylan hydrolysis, and thus addition of pure β -D-xylosidase to commercial hemicellulolytic enzyme mixture are usually applied to boost xylan hydrolysis (Sørensen et al., 2003). The extent of xylan hydrolysis increased from 18% to 48% when *Neurospora crassa* β -xylanase supplemented with *N. crassa* β -xylosidase (Han & Chen, 2010). Other industrial applications of microbial β -D-xylosidases involve baking industry, animal feeding, and D-xylose production for xylitol manufacturing, deinking of recycled paper, and hydrolysis of lignocellulosic biomass in biofuel fermentations to produce ethanol and butanol (Jordan & Wagschal, 2010).

The β -D-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 belongs to the glycoside hydrolase family 43 and is optimally active at 55°C when assayed at pH 6.0 (Rohman et al., 2007). The β -D-xylosidase gene (*xyl*; GenBank accession No. [DQ345777](#)) has been successfully subcloned into the pET101/D-TOPO expression vector (Puspaningsih, unpublished work). Compared to several other members of the GH43 β -D-xylosidase family listed in PDB that have similarity around 52-67% in their primary sequences (Rohman et al., 2007), the primary sequence of Xyl is more divergent, with an identity of 33.5% to the nearest structurally characterized homologue, i.e. the β -1,4-xylosidase from *Bacillus halodurans* C-125 (PDB code 1YRZ; A.A. Fedorov, E.V. Fedorov & S.C. Almo, unpublished). Thus, we consider it of interest to explore the structure-functional properties of this enzyme. Herein, we describe the engineering of Xyl to replace the residue that was identified as potentially influencing the pH-activity profile of the enzyme based on structural modeling and inspection of a model of the active site, with the aim of increasing its pH optimum.

2. Materials and methods

2.1. Strains, growth conditions and reagents

Escherichia coli TOP10 was used for all plasmid constructions while *E. coli* BL21 (DE3) was used for all protein expressions. Conditions for over-production and purification of all enzymes in this study were as outlined previously (Rohman et al., 2007). Growth media were purchased from Becton, Dickinson and Company (France), and unless otherwise stated all other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland).

2.2. Selecting residues for site-directed mutagenesis

A model of the structure of β -D-xylosidase from *Geobacillus thermoleovorance* IT-08 (Xyl) was generated using on-line program SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>, Arnold et al., 2006) based on the coordinates of 1YRZ chain B. This model was used to identify residues that were potentially in a position to interact with the catalytic residues and that might be reasonably expected to regulate the protonation or deprotonation of catalytic residues. The evaluation of the model was done by Swiss-PDB viewer/DeepView program (Guex & Peitsch, 1997). Asp121 was identified as the closest residue next to the two catalytic residues. This residue was therefore chosen as a target for mutation, replaced with Asn, Glu, Val and Thr. Models of the mutant enzymes were generated using the program Swiss-PDB Viewer.

2.3. Evaluation of mutant enzymes models

Models of mutant enzymes were evaluated its physical and chemical characteristics (theoretical pI, instability index, aliphatic index, molecular weight, total of negative and positive residues) by *online* program ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Model structure of mutants built were minimized its energy using GROMOS 96 implementation of Swiss-PdbViewer before further analysis.

2.4. Mutant Construction

Isolation of recombinant β -D-xylosidase plasmid was performed using the QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Site directed mutagenesis was performed using the separated reagents of PCR. The DNA polymerase used was a Platinum[®] *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen), while primers were from 1stBase (Singapore). Primers were designed with program CloneManager (Scientific & Educational Software, 2000), based on β -D-xylosidase DNA sequence from GenBank (GenPept **ABC75004**). The primers used are listed in Table S1 of The Supplementary data. The PCR step amplification was done for 25 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 50 s at 51°C-61°C (according to the T_m of each primers used, Table S1), and 3 min extension at 72°C. A final extension was carried out for 5 min at 72°C. The PCR was carried out using a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Mount Holy, NJ, USA). After polymerase chain reaction, the product was subjected to DpnI (Fermentas) digestion to remove template DNA and then transformed into *E.coli* TOP10. The mutations were

confirmed by nucleotide sequencing analysis. The verified plasmids further were isolated and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for expression trials.

2.5. Protein overexpression

A pre-culture of *E. coli* BL21 carrying plasmids was grown overnight in LB medium containing ampicillin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 310 K and used for 1% inoculation of 6 l fresh LB medium containing $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin. Expression of Xyl was induced with 1 mM of isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) at an OD_{600} of 0.7-0.8. The cells were harvested after an additional 3 h of growth.

2.6. Purification of protein

All proteins were purified using heat treatment, affinity and anion exchange chromatography, according to the method described by Rohman et al. (2007). HisTrap™ HP (GE Healthcare) and Resource™ Q anion-exchange column (GE Healthcare) in ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences) system were used consecutively in chromatography steps. The purified Xyl solution was concentrated to 14 mg ml^{-1} in a Microsep 10K Omega concentrator (Pall Corporation) and stored at 253 K. The purity of the protein was checked on SDS-PAGE (12% (w/v) gel) stained with Coomassie Blue. Protein concentration was determined following the Bradford protein assay (Bradford, 1976) with bovine serum albumin as a standard.

2.7. Activity assays

Activity assays of purified enzymes were performed using 2.0 M *p*NP- β -D-xylopyranoside (*p*NP-X, Sigma Chemical) as substrate at 40°C. The assays solution containing 450 μL substrate in modified universal buffer (Turner, 2010) with pH ranges 2.0 – 10.0 and 50 μL enzyme, which were pre-incubated each at 40°C for 10 minutes prior to assays. After 30 minutes of incubation at 40°C, 50 μL of sodium carbonate 0.4 M was added to the mixture. The absorbance of liberated *p*NP was measured at 400 nm. Each assay was performed at least twice.

3. Results and discussion

3.1. Selection of residues for replacement

Since the structure of Xyl has not been deposited at protein database, we used a model structure of it to facilitate the analysis of which residues would be suitable candidate for replacement. The three-dimensional model of Xyl consisting of 508 amino acids was constructed using SWISS-MODEL based on automated mode of modeling. The program automatically searches the similar homologous structures from the Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) as a modeling template. The best template found from template identification process was a 2.00 Å resolution crystal structure of xylan beta-1,4-xylosidase from *Bacillus halodurans* C-125 with PDB entry 1YRZ chain B. The sequence identity between 1YRZ and Xyl (GenPept [ABC75004.1](#)) was only 33.52%. Though it has low homology, the three-dimensional model of Xyl from modeling has a good reliability estimation (QMEAN4 score 0.563, QMEAN Z-score -3.239, Benkert et al., 2011).

Xyl belongs to the GH43 family consisting of two domains: an N terminal five-bladed β -propeller catalytic domain, and a β -sandwich domain (Brüx et al., 2006). The hydrolyzing of substrate is based on inversion of the anomeric configuration *via* a single nucleophilic displacement (Rohman et al., 2007). The catalytic mechanism involves three catalytic residues: Glu177 as general acid, Asp14 as general base and Asp121 that modulates the pK_a of the general acid and keeps it in the correct orientation relative to the substrate (Brüx et al., 2006). Analysis of the three-dimensional of Xyl with Swiss-PDB Viewer revealed that there are several residues interacting with the catalytic residues. Those residues are Ala193 that forms 2 hydrogen bonds with Glu177, Ala178 that forms one hydrogen bond with Asp121, and Ser29 that form one hydrogen bond with Asp14 (Fig. 1).

[insert Fig. 1 here]

Though there is none of hydrogen bond formed between Glu177 and Asp121, the smallest distance between them (2.62 Å) is the closest compare to the distance of Glu177 and other residues. This explains the important role of Asp121 in donating proton to Glu177, so that Glu177 is kept protonated in pH 6.0 (the optimum pH of Xyl) and consequently allowed Glu177 to function as an acid for the catalytic reaction. Changing this residue will change the acidity or pK_a around the catalytic residue, and thus will change the pH profile of the enzyme.

The importance of pK_a modulator residue in inverting GH43 β -xylosidase had been well explained by Brüx et al. (2006). Besides modulating the pK_a of catalytic residues, Asp128 as the third catalytic residue in XynB3 (β -xylosidase from *G. stearothermophilus*), guide the general acid into the correct orientation toward the substrate. This residue also plays an important role in substrate binding *via* the 2-O of the glycon, as the most important

interaction for transition state stabilization of the substrate. The importance of this residue was also proven by mutation into glycine (D128G) that yielded a less active than the general acid mutant E187G. Considering all the important roles of pKa modulator residue in inverting GH43 β -xylosidase and the fact that the sequence identity of Xyl and XynB3 was only 31.84%, we found it was challenging to study the role of Asp121 in Xyl as a pK_a modulator. Instead of mutation into glycine that had been done in XynB3, we mutated this residue into Asn, Thr, Glu and Val, in order to study the effect of the mutation towards the pH-activity profile.

3.2. β -D-xylosidase expression and purification

Successful expression and purification of β -D-xylosidase was confirmed by SDS-gel analysis to the cell-lysate and eluate from the column for the purification of his-tagged protein. Xyl and all mutants were expressed in *E. coli* BL21 successfully. We found that Xyl, D121E and D121T were expressed in higher quantities than D121V and D121N. Similar results of expression level in *Bacillus circulans* xylanase (BCX) and its mutants were reported by Yang et al. (2008). Two mutants, i.e. Q167M and R73V, were expressed in lower quantities compared to BCX and K175Q mutant. Interestingly, the lower expressed mutants showed a pronounced shift in the pH-activity profiles, while the K175Q mutant showed a similar pH-activity profile from that of BCX. Thus, we expected that two mutants of Xyl, i.e. D121V and D121V, would also show significant changes in their pH-activity profiles compared to that of the wild-type.

3.3. pH-activity profile of β -D-xylosidase

The pH-activity profile of the mutants D121V, D121E, D121T, and D121N, were determined and compared with that of the wild-type (Fig. 2). All mutants showed a different pH-activity profile to that of the wild-type. Two mutants among them, i.e. D121V and D121N, showed the pronounced shift of their pH-activity profile into alkaline pH range. They showed optimum activities at pH 9.0; shifted 3 units from that of the wild-type. But unfortunately, their activities were much lower compared to that of the wild-type (about 5% and 3% respectively for D121V and D121N). These results fitted to our prediction concerning the role of Asp121 as pKa modulator in β -xylosidase. Though the importance of this residue had been confirmed (Brux et al., 2006), the modulating effect in shifting the pH-activity profile had not been explored yet.

Asparagine is a polar-non-charged amino acid, having amide group which is derived from carboxyl group in the side chains of aspartate. DeepView analysis of the mutant model predicted that the change of hydroxyl group into amine group will introduce a new hydrogen bond from $\text{HN}^{\delta 2}$ of Asn121 to $\text{O}^{\epsilon 1}$ of Glu177. The length of hydrogen bond formed is 1.53 Å. The overall distances between Glu177 and Asn121 are smaller compared to the distance between Glu177 and Asp121 in the wild-type. Though the interaction between these two residues is closer, but since the electronegativity of N is smaller than O, the capability of $\text{N}^{\delta 2}$ of Asn121 in donating its proton to $\text{O}^{\epsilon 1}$ of Glu177 is also smaller. Consequently, to be able to function as an acid in the catalytic reaction, Glu177 needs proton donation from the environment, in other words the pH optimum of the enzyme will be shifted to a more alkaline range.

[insert Fig. 2 here]

Mutation of Asp121 into Val121 also shifted the optimum pH of Xyl into a more alkaline range. As a non-polar amino acid, valine contains no oxygen or other electronegative atom and has a high hydrophobicity degree. This make the protonation of Glu177 by valine is not possible. Moreover since valine only has a short side chain, thus the distance between Val121 and Glu177 was bigger compared to that of Asp121 and Glu177. Consequently valine was unable to protonate $\text{O}^{\epsilon 1}$ of Glu177 and hence shifted the pH optimum of Xyl into a more alkaline range. Glutamate, on the other hand, is a negative-polar charged amino acid. Compared to aspartate, glutamate has one more carbon in its side chain that made the overall distance to Glu177 closer than the wild-type. Thus, protonation of Glu177 was easier in D121E and hence shifted the optimum pH of Xyl into a more acid range. The activity of D121E was much lower than that of the wild-type. We assume that this was caused by the free torsion of glutamate. The $\text{O}^{\delta 2}$ of aspartate in the wild-type was held by hydrogen bond with N of Ala178 and hence provided the exact orientation required for it to protonate Glu177. The lost of this hydrogen bond interaction in D121E resulting in the significant loss of its activity.

The pH-activity profile of all mutants showed different profiles to that of the wild-type (Fig. 2). Instead of bell-shape profile as found in the wild-type, the pH-activity profile of mutants showed a dual bell-shape with one shape is smaller than the other, except the one that was found in D121T mutant. D121T showed a similar activity in two pH conditions, i.e pH 5 and 9. As a polar-non charged-amino acid, threonine has a hydroxyl group that was held

by hydrogen bond with the amine group of Ala178, keeping it at a fixed position during the reaction. Thr121 was positioned around 3 – 5 Å from the catalytic acid, Glu177, a distance that enabled it to modulate the pK_a of Glu177, keeping it protonated and allowing it to function as an acid for the reaction. Activity at pH 9 was presumably caused by the decreased distance of the two residues, and hence protonation of the general acid catalyst was much lower compared to that of the wild-type. In the other hand, activity at pH 5 was presumably contributed from the fixed position of hydroxyl group of Thr121, at a distance where water molecule could be activated to protonate the general acid through the reaction. However, further investigation would be necessary to fully confirm these mechanisms, especially further structural studies on complex protein substrate crystal structure.

Overall, our results confirmed several other findings concerning the mechanism of acidic or alkaline pH catalytic adaptation. Study of acidophilic xylanase family 11 revealed the role of charged amino acid residues on the adaptation process. The carboxyl group near the glutamate catalytic residue is able to decrease or increase the pK_a value of the catalytic residue, in which the effect depends on the electrostatic bridges formed between the interacting residues (Collins et al., 2005). In our case, this phenomenon was found in D121E mutant that showed a pK_a decreasing effect. In acidophilic xylanase of *A. kawachii*, mutation of aspartate that is hydrogen bonded to general acid/base catalytic residue into asparagine changed the activity of xylanase to a more alkaline condition, i.e. from pH 2 into pH 5 (Collins et al., 2005). Our mutant, D121N, also showed a 3 units optimum pH shift to alkaline condition. Other random mutagenesis experiment on xylanase from *Neocallimastix patriciarum* showed that increasing of negative charge and hydrophobicity could increase the optimum pH of enzyme (Collins et al., 2005). Study of alkaline active xylanase of *Bacillus halodurans* S7 also underlined the role of charged residues in alkaline adaptation. Alkaline active xylanase have highly acidic surfaces and fewer solvent exposed alkali labile residues (Mamo et al., 2009). Study of low pH optimum mechanism in *A. niger* xylanase I also revealed that Asp37 residue influences critically the pH dependence of xylanase activity. This residue is substituted for asparagine in all xylanases with a high pH optimum (Krengel and Dijkstra, 1996). Contrary to that, mutation of Asp121 to Glu121 that supposed to increase the acidic surfaces of catalytic site was unable to change Xyl into an alkaline active enzyme. In the other hand, we found that mutation of aspartate into valine could increase the hydrophobicity around catalytic residues, and hence increased the optimum pH of Xyl.

[insert Fig. 3 here]

3.4. Temperature-activity profile of β -D-xylosidase

Since Asp121 is considered as one of the three catalytic residues in β -D-xylosidase, the dramatic reduced activity caused by mutation of this residue is reasonable. But the interesting thing is that besides pH-activity profile shift, mutation of Asp121 could also shift the temperature-activity profile. D121V had activity of about 9% compared to the wild-type, and its temperature optimum shifted ten degrees centigrade lower than that of the wild-type. D121T had about 5% of wild-type activity and optimum temperature 20 degrees centigrade lower than the wild-type. Mutant D121E showed the lowest activity, only 3.5% compared to that of the wild-type, and its temperature optimum moved to lower degrees. However, its temperature-activity profile was almost flat in the temperature range between 40°C and 60°C. D121N, on the other hand, had a temperature-activity profile which moved to a higher degree, i.e. 80°C with activity about 19% of the wild-type. Thus the mutant D121N showed the pronounced effect on the temperature-activity profile. Several factors had been reported to contribute in protein stability at high temperature, such as increasing of hydrophobic or ionic interaction, increasing of proline content, reduction of the amount of thermolabile amino acid such as Cys or Asn, or increasing of disulfide bridges in cytoplasmic proteins (Littlechild et al., 2007). Here we report that mutation of Asp into Asn in Xyl could increase the optimum temperature of the enzyme. Though Asn is considered as the most thermolabile amino acid, but if the mutation was located in the catalytic site or at important residue in the catalysis process, the thermostability of the enzyme could be increased. Changing Asp into Asn seemed to increase the hydrophobic interaction in the surface area of binding and catalytic site, and thus increased the thermal stability of protein.

4. Conclusion

The pK_a modulator is a conserved and crucial amino acid residue in all β -xylosidase family GH43. Though changing this residue reduced the activity dramatically, but certain mutation was proved to be a useful tool to engineer more alkaline and thermostable β -xylosidase. Mutation of Asp121 into Val121 and Asn121 of β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 were able to shift the optimum pH into a more alkaline pH range. Moreover, mutant Asp121/Asn121 also showed an increased in its optimum temperature. Our results revealed the importance of asparagines residue located at the catalytic site of β -xylosidase family GH4 in its alkaline adaptation and thermal stability.

Acknowledgements

This research was supported financially by Directorate General of Higher Education (DGHE) Indonesia.

References

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T., 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22,195-201.
- Beg, Q.K.M., Kapoor, L., Mahajan, G., Hoondal, S., 2001. Microbial Xylanase from the Newly Isolated *Bacillus sp.* Strain BP-23. *Can. J. Microbiol.* 39, 1162-1166.
- Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T., 2011. Towards the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 27(3), 343-350.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Bravman, T., Zolotnisky, G., Belakhov V., Shoham, G., Henrissat, B., Baasov, T., Shoham, Y., 2003. Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus*. *Biochem.* 42, 10528-36.
- Brüx, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y., Schomburg, D., 2006. The Structure of an Inverting GH43 β -Xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* with its Substrate Reveals the Role of the Three Catalytic Residues. *J. Mol. Biol.* 359, 97-109.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.
- Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P., 1993. β -1,4-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17, 259-289.
- Guex, N., Peitsch, M. C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 2714-2723.
- Han, Y., Chen, H., 2010. A β -xylosidase from cell wall of maize: Purification, properties and its use in hydrolysis of plant cell wall. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 63, 135-140.

- Jordan, D.B., Wagschal, K., 2010. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(6), 1647-1658.
- Krengel, U., Dijkstra, B.W., 1996. Three-dimensional structure of endo-1,4- β -xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. *J. Mol. Biol.* 263, 70-78.
- Kumar, B.K., Balakrishnan, H., Rele, M.V., 2004. Compatibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31(2), 83-87.
- Littlechild, J.A., Guy, J., Connelly, S., Mallett, L., Waddell, S., Rye, C.A., Line, K., Isupov, M., 2007. Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* 35(6), 1558-1563.
- Mamo, G., Thunnissen, M., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B., 2009. An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie* 91:1187-1196.
- Rohman, A., van Oosterwijk, N., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W., Puspaningsih, N.N.T., 2007. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, *Acta Crys.* F63, 932-935.
- Saha, B.C., 2003. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. *Biores. Technol.* 90, 33-38.
- Sarethy, I.P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S.K., Gupta, V., Gupta, S., 2011, Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 769-790.
- Sørensen, H.R., Meyer, A.S., Pedersen, S., 2003. Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan: Synergy between α -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- β -xylanases, and β -xylosidase activities. *Biotechnol Bioeng.* 81(6), 726-31.
- Turner, B.L., 2010. Variation in pH optima of hydrolytic enzyme activities in tropical rain forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(19), 6485-6493.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 335-350.
- Yang, J.H., Park, J.Y., Kim, S.H., Yoo, Y.J., 2008. Shifting pH optimum of *Bacillus circulans* xylanase based on molecular modeling. *J. Biotechnol.* 133, 294-300.

Legends to figures

Supplementary Data

Tables

Table S1. Sequence of Mutagenic Primers

Mutation	Code ^{*)}	Length (bp)	Primer sequences ^{**)}	T _m (°C)	GC (%)
D121E	D121E-F	17	5'-GGAGGCATTG <u>G</u> CCATC-3'	59.6	58.8
	D121E-R	17	5'-GATGG <u>C</u> TCAATGCCTCC-3'	59.6	58.8
D121N	D121N-F	19	5'-GATGGGGAGGCATT <u>A</u> ATCC-3'	60.2	52.6
	D121N-R	19	5'-GGAT <u>T</u> AATGCCTCCCCATC-3'	60.2	52.6
D121T	D121T-F	19	5'-GGAGGCATT <u>A</u> CTCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121T-R	19	5'-GTGATGG <u>A</u> GTAATGCCTCC-3'	60.2	52.6
D121V	D121V-F	19	5'-GGAGGCATTG <u>T</u> TCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121V-R	19	5'-GTGATGG <u>A</u> CAATGCCTCC-3'	60.2	52.6
D121L	D121L-F	19	5'-GGAGGCATT <u>C</u> TTCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121L-R	19	5'-GTGATGG <u>A</u> GAATGCCTCC-3'	60.2	52.6

^{*)} F code is forward primer, R code is reverse primer

^{**)} The mutational positions are shown as bold and underlined nucleotide residues.

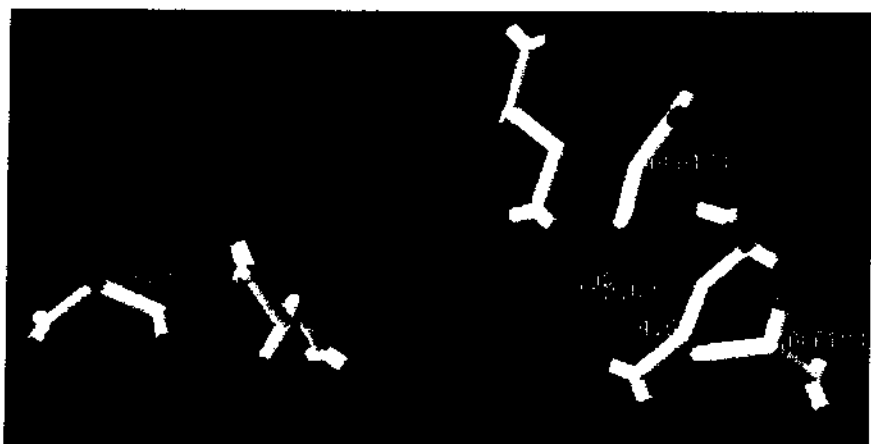


Fig. 1. The representation of catalytic residues in Xyl (red label) and its neighbours (grey label). The green dotted line represents hydrogen bond between adjacent residues. The yellow numbers show the length of hydrogen bond, in Ångstrom.

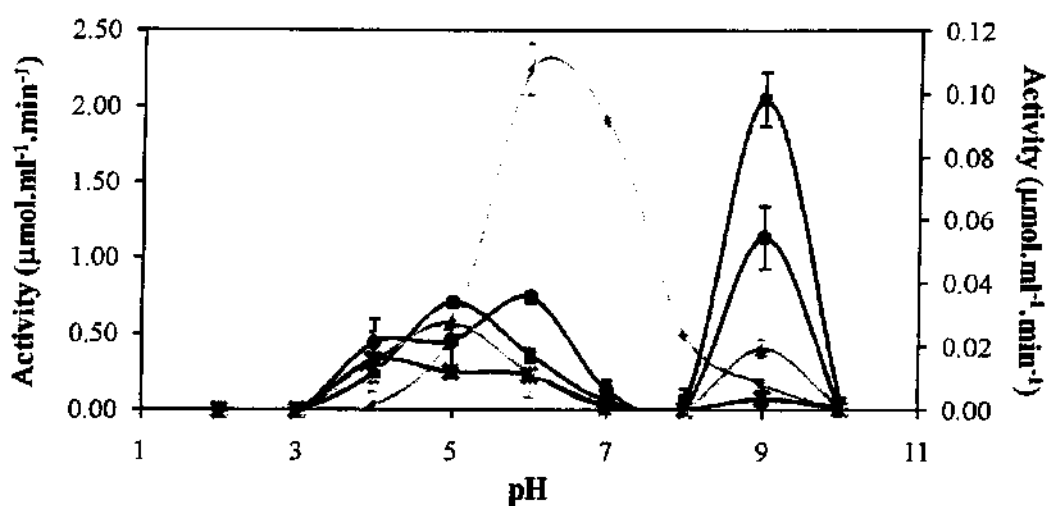


Fig. 2. The pH-activity profiles of Xyl and its mutants (◆) Xyl; (■) D121V; (●) D121N; (▲) D121T; (*) D121E. Activity assays were conducted using 2.0 M *p*NP- β -D-xylopyranoside (*p*NP-X) as substrate at 40°C and 30 minutes of incubation. Each data point was assayed at least twice. Xylosidase activity was defined as the amount of *para*-nitrophenol liberated per minutes per mL enzyme at certain pH and temperature.

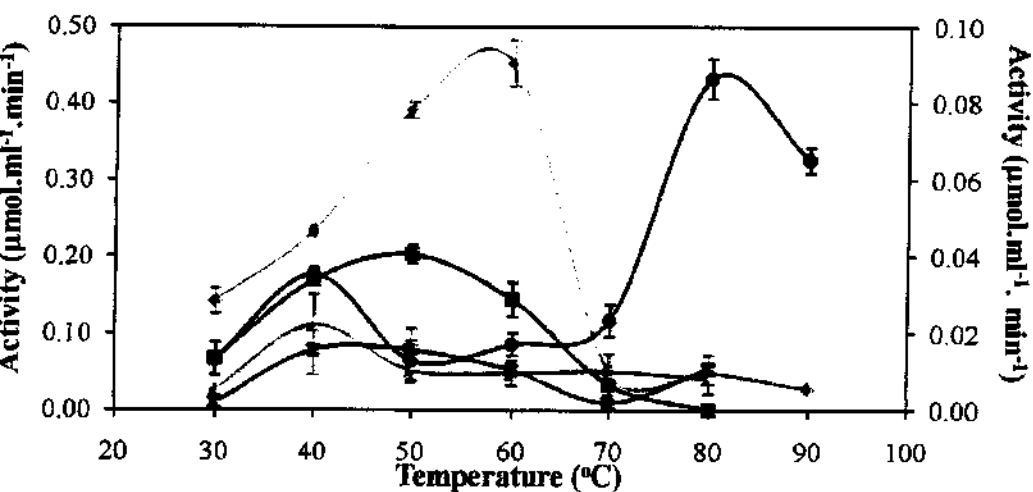


Fig. 3. Temperature-activity profiles for Xyl and the mutants (◆) Xyl; (■) D121V; (●) D121N; (▲)D121T; (✱) D121E. Activity assays were conducted using 2.0 M *p*NP-β-D-xylopyranoside (*p*NP-X) as substrate at 40°C and 30 minutes of incubation, at pH 5.0 for D121V, D121T and D121E, while assays for Xyl and D121N were conducted at pH 6.0. Each data point was assayed at least twice. Xylosidase activity was defined as the amount of *para*-nitrophenol liberated per

Supplementary Data

Table S1. Sequence of Mutagenic Primers

Mutation	Code ^{*)}	Length (bp)	Primer sequences ^{**)}	T _m (°C)	GC (%)
D121E	D121E-F	17	5'-GGAGGCATTGAG <u>G</u> CCATC-3'	59.6	58.8
	D121E-R	17	5'-GATGG <u>C</u> TCAATGCCTCC-3'	59.6	58.8
D121N	D121N-F	19	5'-GATGGGGAGGCATT <u>A</u> ATCC-3'	60.2	52.6
	D121N-R	19	5'-GGATT <u>A</u> AATGCCTCCCCATC-3'	60.2	52.6
D121T	D121T-F	19	5'-GGAGGCATT <u>A</u> CTCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121T-R	19	5'-GTGATGGAG <u>T</u> AATGCCTCC-3'	60.2	52.6
D121V	D121V-F	19	5'-GGAGGCATTG <u>T</u> TCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121V-R	19	5'-GTGATGGAA <u>A</u> CAATGCCTCC-3'	60.2	52.6
D121L	D121L-F	19	5'-GGAGGCATT <u>C</u> TTCCATCAC-3'	60.2	52.6
	D121L-R	19	5'-GTGATGGAA <u>A</u> GAATGCCTCC-3'	60.2	52.6

^{*)} F code is forward primer, R code is reverse primer

^{**)} The mutational positions are shown as bold and underlined nucleotide residues.