

**PENGARUH KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL SERTA  
SUMBER KARBON SORBITOL DAN MONITOL TERHADAP  
PRODUKSI  $\alpha$ -AMILASE *Saccharomycopsis fibuligera* R64  
DALAM *Pichia pastoris***

<sup>1</sup>Shabarni-Gaffar, <sup>2</sup>Dani Permana, <sup>1</sup>Diana P. Rahmawati, <sup>1</sup>Triana N. Meirina, <sup>1</sup>Abu Bakar M.I. Syihab, <sup>1</sup>Safri Ismayana, <sup>1</sup>Toto Subroto, <sup>1</sup>O. Suprijana, dan <sup>1</sup>Soetijoso Soemitro.

1) Jurusan Kimia FMIPA Universitas Padjadjaran  
2) Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia  
Alamat email: [sabarni.ghafar@unpad.ac.id](mailto:sabarni.ghafar@unpad.ac.id) atau [era2504@yahoo.com](mailto:era2504@yahoo.com)

**ABSTRAK**

*Pichia pastoris* sudah banyak digunakan sebagai inang ekspresi protein heterolog untuk keperluan komersial. Beberapa keunggulan *P. pastoris* sebagai inang ekspresi protein adalah kemampuannya untuk tumbuh hingga mencapai densitas sel yang tinggi dan adanya promotor gen yang dapat diinduksi dengan ketat, yaitu *AOX1* yang mengode alkohol oksidase. Peningkatan produksi protein rekombinan dibawah kontrol promotor *AOX1* dalam sistem ekspresi *P. pastoris* masih menjadi perhatian utama. Optimasi konsentrasi penginduksi metanol dan penambahan sumber karbon yang tidak menghambat produksi protein asing, merupakan salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk meningkatkan level ekspresi protein. Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh konsentrasi penginduksi metanol serta sumber karbon tambahan sorbitol dan manitol terhadap tingkat ekspresi  $\alpha$ -amilase *Saccharomycopsis fibuligera* (Sfamy) rekombinan oleh *P. pastoris* (*Mut*<sup>+</sup>). Kedua jenis sumber karbon ini dikenal sebagai sumber karbon yang non-represif, yaitu dapat meningkatkan pertumbuhan *P. pastoris*, namun tidak menghambat promotor *AOX1* dan ekspresi protein asing.  $\alpha$ -Amilase diekspresikan menggunakan inang *P. pastoris* GS115 (*His*<sup>-</sup>, *Mut*<sup>+</sup>) dengan tambahan sumber karbon sorbitol dan manitol secara terpisah ke medium ekspresi. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi penginduksi metanol optimum untuk produksi Sfamy adalah 0,75%. Penambahan sorbitol dan manitol meningkatkan produksi Sfamy. Konsentrasi sorbitol dan manitol 2% dengan penginduksi metanol 0,75% meningkatkan level sekresi Sfamy rekombinan berturut-turut 2,13-kali dan 1,94-kali dibandingkan tanpa penambahan sumber karbon. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian sumber karbon tambahan dapat meningkatkan sekresi protein rekombinan oleh *P. pastoris* dan sumber karbon tambahan sorbitol lebih efektif digunakan dibanding manitol.

**Kata kunci:**  $\alpha$ -amilase, *Pichia pastoris*, metanol, sorbitol, manitol

**ABSTRACT**

*Pichia pastoris* has been widely used as host for heterologous protein expression for commercial purposes. The advantages of *P. pastoris* as protein expression host is its ability to grow with high cell density and the presence of a gene promoter that can be induced tightly, named *AOX1* encoding alcohol oxidase. Improvement of recombinant protein production under control of *AOX1* promoter in *P. pastoris* expression system is still a major concern. Optimization of methanol concentration as inducer and addition of carbon sources, is one of the strategies to improve the expression level. This research aims to study the effect of methanol as inducer as well as sorbitol and mannitol as additional carbon source to the expression level of recombinant *Saccharomycopsis fibuligera*  $\alpha$ -amylase (Sfamy) by *P. pastoris* (*Mut*<sup>+</sup>). Sorbitol and mannitol known as non-repressive carbon source, to increase the growth of *P. pastoris*, but not inhibit the *AOX1* promoter and foreign proteins expression. Sfamy was expressed in *P. pastoris* GS115 (*His*<sup>-</sup>, *Mut*<sup>+</sup>) with addition of carbon source, sorbitol and mannitol separately to the expression medium. The result showed that, the optimum concentration of methanol inducer for Sfamy production is 0.75%. The addition of sorbitol or mannitol increased Sfamy production. Concentrations of sorbitol and mannitol 2% with 0.75% methanol inducer increase the secretion level of recombinant Sfamy 2.13 times and 1.94 times respectively, compared with no additional carbon source. This result indicated that addition of carbon source can improved recombinant protein production by *P. pastoris*, and the used of sorbitol as additional carbon source is more effective compared to mannitol.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, *Pichia pastoris*, methanol, sorbitol, mannitol

## PENDAHULUAN

*P. pastoris* adalah ragi metilotropik yang dapat ditumbuhkan menggunakan metanol sebagai satu-satunya sumber karbon. Enzim pertama pada jalur metabolisme metanol, yaitu alkohol oksidase (AOX) yang mengkatalisis oksidasi metanol menjadi formaldehid ditemukan mencapai 35% dari total protein dalam sel, bila *P. pastoris* ditumbuhkan pada medium yang mengandung metanol<sup>(1)</sup>. Enzim ini tidak terdeteksi bila sel ditumbuhkan pada sumber karbon selain metanol seperti glukosa, etanol atau gliserol, yang menunjukkan bahwa sintesis enzim ini diinduksi oleh metanol<sup>(1, 2)</sup>. Promotor gen *AOX1* yang diregulasi dengan ketat ini telah disisipkan pada vektor ekspresi dan digunakan untuk ekspresi protein heterolog dalam *P. pastoris*. Lebih dari 550 protein yang berasal dari bakteri, ragi, protista, tumbuhan, invertebrata, manusia dan virus telah diekspresikan menggunakan *P. pastoris*<sup>(3)</sup>. Genom *P. pastoris* memiliki dua gen yang mengode alkohol oksidase, yaitu *AOX1* dan *AOX2*. Alkohol oksidase yang terdapat dalam sel, terutama merupakan produk gen *AOX1*. Gen *AOX2* 97% homolog dengan *AOX1*, namun terekspresi lebih lambat bila sel ditumbuhkan pada medium metanol dibandingkan *AOX1*<sup>(4)</sup>.

Terdapat tiga fenotip *P. pastoris* berdasarkan kemampuan tumbuh pada metanol, yaitu Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>s</sup>, dan Mut<sup>-</sup>. Galur *P. pastoris* tipe liar dapat tumbuh subur pada media yang mengandung metanol. Fenotipe ini disebut Mut<sup>+</sup> (*methanol utilization plus*). Fenotipe Mut<sup>s</sup> (*methanol utilization slow*) terbentuk bila gen *AOX1* di mutasi atau didelesi, sehingga galur ini tumbuh lambat (kurang subur) pada media yang mengandung metanol karena hanya mengandalkan produk gen *AOX2* untuk memetabolisme metanol. Pada fenotipe Mut<sup>-</sup> (*methanol utilization minus*) terjadi delesi gen *AOX1* dan *AOX2*, sehingga galur ini tidak dapat tumbuh pada metanol<sup>(1,5)</sup>. Galur GS115 (*AOX1, his4*) merupakan galur yang mirip dengan tipe liar, memiliki gen *AOX1* dan *AOX2* yang fungsional namun gen histidinol dehidrogenase-nya telah rusak sehingga fenotipenya adalah Mut<sup>+</sup> dan his<sup>-</sup>. Galur ini tumbuh subur pada sumber karbon metanol namun tidak dapat tumbuh bila tidak ada histidin. Galur KM71 (*his4 arg4 aox1Δ:: SARG4*) merupakan galur Mut<sup>s</sup> dimana *AOX1* telah didelesi secara parsial dan diganti dengan gen *ARG4* dari *Saccharomyces cerevisiae*. Karena galur ini harus mengandalkan *AOX2* dalam metabolisme metanol, maka galur ini tumbuh lambat pada sumber karbon metanol<sup>(1, 6)</sup>. Galur yang lain yaitu, MC100-3 (*his4 arg4 aox1::SARG4 aox2:: Phis4*) mengalami delesi pada kedua gen *AOX* sehingga tidak dapat tumbuh pada sumber karbon metanol (Mut<sup>-</sup>, *methanol utilization minus*)<sup>(1)</sup>.

Galur Mut<sup>+</sup> memerlukan konsentrasi penginduksi metanol lebih tinggi dibanding galur Mut<sup>s</sup> dan Mut<sup>-</sup> (7,8). Peningkatan konsentrasi metanol dapat meningkatkan level ekspresi  $\beta$ -2-glikoprotein I domain V manusia<sup>(7)</sup> dan karboksipeptidase A<sup>(8)</sup>. Pada umumnya metanol dengan konsentrasi 0,5-1,0% v/v digunakan pada sistem ekspresi *P. pastoris*. Namun akumulasi metanol dapat memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan sel dan dapat menurunkan level ekspresi<sup>(9)</sup>. Sehingga konsentrasi metanol optimum yang dibutuhkan perlu diuji untuk masing-masing protein. Contohnya, konsentrasi metanol 3,1% v/v menghambat pertumbuhan sel pada produksi  $\beta$ -2-glikoprotein I domain V manusia<sup>(7)</sup>, sementara level ekspresi prokarboksipeptidase A2 meningkat 3-kali dengan meningkatnya konsentrasi metanol pada media induksi dari 0,5-5% v/v pada transforman fenotip Mut<sup>+</sup>.

Galur Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>s</sup> juga memerlukan sumber karbon tambahan untuk meningkatkan pertumbuhan, termasuk pada tahap produksi<sup>(10)</sup>. Sumber karbon tambahan yang bersifat tidak merepresi AOX dapat digunakan, seperti sorbitol, manitol, alanin atau trehalosa<sup>(2, 11)</sup>. Manitol, sorbitol, dan alanin, merupakan sumber karbon tambahan yang dapat meningkatkan pertumbuhan dan ekspresi  $\beta$ -galaktosidase dalam *P. pastoris* dengan fenotipe Mut<sup>-</sup><sup>(11)</sup>. Penambahan sorbitol ke medium ekspresi meningkatkan ekspresi  $\beta$ -glukosidase oleh *P. pastoris* Mut<sup>-</sup> yaitu 1116 Unit Miller dibandingkan 70 Unit Miller pada tanpa penambahan sumber karbon. Fenotipe Mut<sup>+</sup> dan Mut<sup>s</sup> juga membutuhkan sumber karbon tambahan untuk pertumbuhannya, sehingga dibutuhkan juga pengujiannya untuk produksi protein tertentu<sup>(10)</sup>.

$\alpha$ -Amilase *S. fibuligera* R64 (Sfamy) telah diekspresikan dalam *P. pastoris* galur Mut<sup>+</sup> dibawah kontrol promotor *AOXI* menggunakan konsentrasi penginduksi metanol 0,5% dan sumber karbon gliserol<sup>(12, 13)</sup>. Penelitian tentang konsentrasi penginduksi metanol yang optimal dan konsentrasi sumber karbon tambahan, perlu dilakukan untuk mendapatkan level ekspresi Sfamy yang optimum. Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh konsentrasi penginduksi metanol serta penambahan sumber karbon sorbitol dan manitol terhadap produksi Sfamy oleh *P. pastoris*.

## BAHAN DAN METODE

### *Galur, media pertumbuhan dan reagen*

Galur yang digunakan adalah *P. pastoris* MS-20 [pPICZA-MSALP1] Mut<sup>+</sup>, His<sup>-</sup> <sup>(13)</sup>. Galur ini telah mengandung gen pengode  $\alpha$ -amilase *S. fibuligera*. Semua bahan kimia adalah dari Sigma Aldrich dan Merck. Media pertumbuhan dari Pronadisa dan Oxoid.

### *Pembuatan Kurva Pertumbuhan*

*P. pastoris* ditumbuhkan pada media YPD cair (*Yeast Peptone Dextrose*: ekstrak ragi 1%, pepton 2% dan dekstrosa 2%) selama semalam, 1 mL kultur dipindahkan ke dalam 10 mL media MGY (*minimal glycerol medium*: 1.34% YNB, 1% glycerol,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin) dalam labu erlenmeyer 100 mL dengan penambahan sorbitol atau manitol 1% <sup>(11)</sup>. Kultur diinkubasi pada 28-30°C dalam inkubator pengocok pada kecepatan ~200 rpm. OD  $\lambda_{600}$  ditentukan setiap jam.

### *Penentuan konsentrasi penginduksi Metanol*

*P. pastoris* ditumbuhkan dalam media YPD cair selama semalam. Satu mL kultur dipindahkan ke dalam 10 mL media BMGY (*buffered glycerol complex medium*: ekstrak ragi 1%, bakto pepton 2%, kalium fosfat 100 mM pH 6, YNB 1,34%, biotin  $4 \times 10^{-5}$ %, gliserol 1%) dalam labu erlenmeyer 100 mL. Diinkubasi pada 28-30°C dalam inkubator pengocok pada kecepatan ~200 x g selama 16-18 jam, (sampai OD  $\lambda_{600}$  ~10-12). Kultur *P. pastoris* dari media BMGY disentrifugasi pada 3000 x g selama 5 menit pada suhu ruangan. Supernatan didekantasi dan pelet sel diresuspensi dengan 25 mL media BMMH (*buffered minimal methanol-histidin*: YNB 1,34%, kalium fosfat 100 mM pH 6, biotin  $4 \times 10^{-5}$ %, metanol 1%, dan histidin 0,004%), menggunakan erlenmeyer 250 mL. Inkubasi dilanjutkan kembali pada 28-30°C dalam inkubator pengocok pada kecepatan ~200 x g. Metanol ditambahkan dengan variasi konsentrasi 0,5, 0,75, 1, 2, 3 dan 4% setiap 24 jam sampai jam ke 144 (6 hari). Sampel diambil setiap 24 jam pada waktu penambahan metanol, OD<sub>600</sub> ditentukan, pelet dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi, disimpan pada -20°C sebelum dianalisis <sup>(14)</sup>.

### **Ekspresi $\alpha$ -amilase oleh *P. pastoris* MS-20 (Optimasi konsentrasi sorbitol dan manitol)**

Satu mL kultur *P. pastoris* dalam media YPD dipindahkan ke dalam 10 mL media BMGY dalam labu erlenmeyer 100 mL yang sudah mengandung 1, 2, 3, 4, dan 5% (b/v) sorbitol atau manitol. Kultur diinkubasi pada 28-30°C dalam inkubator pengocok pada kecepatan  $\sim 200 \times g$  selama 16-18 jam dengan  $OD_{\lambda 600} \sim 10-12$ . Kultur *P. pastoris* dari media BMGY dipindahkan ke dalam 25 mL media BMMH, seperti prosedur di atas, diinkubasi pada 28-30°C dalam inkubator pengocok pada kecepatan  $\sim 200 \times g$ . Metanol ditambahkan hingga konsentrasi akhir 0,75% setiap 24 jam sampai jam ke 144<sup>(14)</sup>. Pengambilan sampel dilakukan setiap 24 jam sesuai waktu induksi dan setelah 144 jam, sel dipanen dengan sentrifugasi pada 3000 g selama 20 menit pada 4°C dan kultur supernatan dianalisis aktivitas  $\alpha$ -amilase dengan metoda DNS<sup>(15)</sup> dan kadar protein ditentukan dengan metoda Bradford<sup>(16)</sup>.

### **Analisis SDS-PAGE.**

*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* dilakukan pada kondisi tereduksi menggunakan *running gel* 10% dan *stacking gel* 4%. Dua puluh lima mikro liter supernatan kultur ekspresi dianalisis dengan SDS-PAGE. Pita protein pada gel dideteksi dengan pewarnaan *Coomassie brilliant blue*<sup>(17)</sup>.

### **Analisis aktivitas Sfamy.**

Lima puluh mikro liter sampel ditambahkan ke 325  $\mu\text{L}$  pati terlarut 2% (w/v). Buffer fosfat 20 mM ditambahkan hingga mencapai volume 1 mL. Campuran reaksi diinkubasi selama 10 menit pada 50°C. Sebanyak 50  $\mu\text{L}$  campuran reaksi ditambahkan ke 50  $\mu\text{L}$  reagen DNS dan dididihkan selama 7 menit. Setelah didinginkan, sampel dilarutkan 10-kali dengan aqua bidest. Absorbansi diukur pada 500 nm. Satu unit aktivitas  $\alpha$ -amilase adalah jumlah enzim yang dapat membebaskan 1  $\mu\text{mol}$  gula pereduksi per menit pada kondisi uji.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

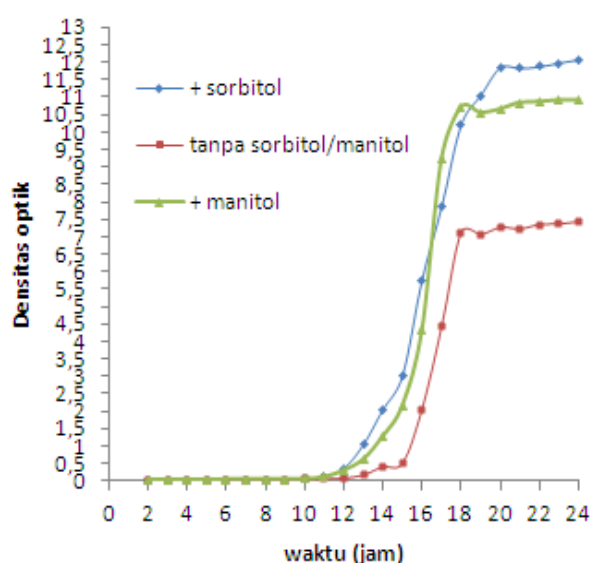
$\alpha$ -Amilase *S. fibuligera* (Sfamy) merupakan salah satu enzim yang potensial untuk industri makanan, kertas, tekstil dan detergen<sup>(18)</sup>. Studi ekspresi Sfamy dengan peptida

sinyal termodifikasi telah dilakukan dalam *P. pastoris* <sup>(12, 13)</sup>, dan telah diperoleh galur *P. pastoris* yang mengekspresikan Sfamy dengan level yang cukup tinggi, yaitu MS-20 <sup>(13)</sup>.

Penelitian ini melaporkan upaya peningkatan pertumbuhan *P. pastoris* dan ekspresi Sfamy rekombinan melalui variasi konsentrasi penginduksi metanol dan penambahan sumber karbon lain selain metanol, yaitu sorbitol dan manitol. Konsentrasi optimum metanol sebagai penginduksi perlu ditentukan untuk produksi Sfamy rekombinan oleh *P. pastoris* karena penelitian membuktikan bahwa konsentrasi metanol optimum yang dibutuhkan perlu diuji untuk masing-masing protein <sup>(7, 8, 9)</sup>. Sumber karbon tambahan yang tidak menghambat promotor AOX diperlukan untuk meningkatkan densitas sel sehingga dapat meningkatkan level ekspresi <sup>(10)</sup>. Kedua jenis sumber karbon, sorbitol dan manitol diketahui dapat meningkatkan pertumbuhan *P. pastoris* dan tidak menghambat promotor *AOXI* <sup>(11)</sup>.

#### Evaluasi kurva pertumbuhan dengan dan tanpa penambahan sorbitol atau manitol

*P. pastoris* MS-20 (MS-ALP1) ditumbuhkan pada minimal media yang mengandung tambahan sumber karbon sorbitol atau manitol 1% <sup>(11)</sup>. MS-20 tanpa tambahan sumber karbon digunakan sebagai kontrol. Kurva pertumbuhan (Gambar 1) memperlihatkan bahwa penambahan sorbitol atau manitol meningkatkan pertumbuhan *P. pastoris* Mut<sup>+</sup>. Bila diperhatikan nilai OD<sub>600</sub> kultur dengan penambahan sorbitol, hampir mencapai dua kali OD<sub>600</sub> kultur tanpa tambahan sumber karbon. Penambahan kedua sumber karbon ini juga meningkatkan pertumbuhan inang *P. pastoris* Mut<sup>-</sup> <sup>(11)</sup>.

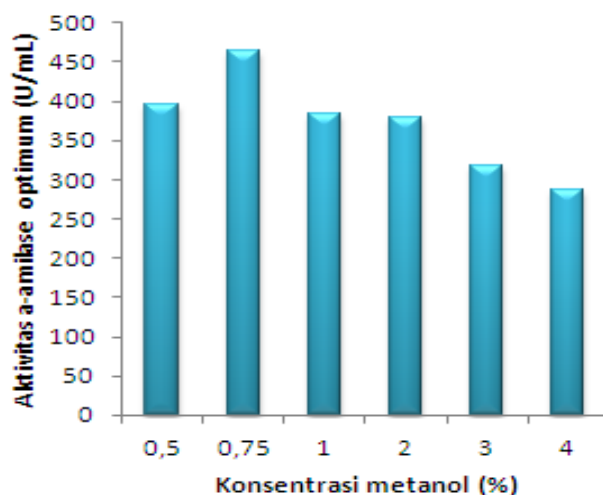


**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *P. pastoris* MS-20 rekombinan dengan dan tanpa penambahan sumber karbon tambahan

Berbeda dengan *Sacharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* bukan merupakan ragi fermentatif, yaitu tidak menghasilkan etanol yang bersifat racun bagi sel, sehingga dapat ditumbuhkan hingga mencapai densitas sel yang tinggi <sup>(1)</sup>. Kenyataan ini sangat menguntungkan pada produksi protein rekombinan skala fermentor.

### Konsentrasi penginduksi metanol

Untuk mengetahui konsentrasi penginduksi metanol optimum, maka digunakan variasi konsentrasi metanol 0,5-4%. Gambar 2 memperlihatkan bahwa konsentrasi metanol yang menghasilkan aktivitas  $\alpha$ -amilase paling tinggi adalah 0,75%. Variasi konsentrasi metanol 0,5-4% perlu dilakukan untuk mengetahui konsentrasi metanol yang cocok untuk induksi protein rekombinan tertentu, namun konsentrasi metanol terlalu besar juga dapat memberikan pengaruh negatif terhadap pertumbuhan sel dan dapat menurunkan level ekspresi <sup>(9)</sup>. Induksi dengan metanol dilakukan setiap 24 jam <sup>(14)</sup>.

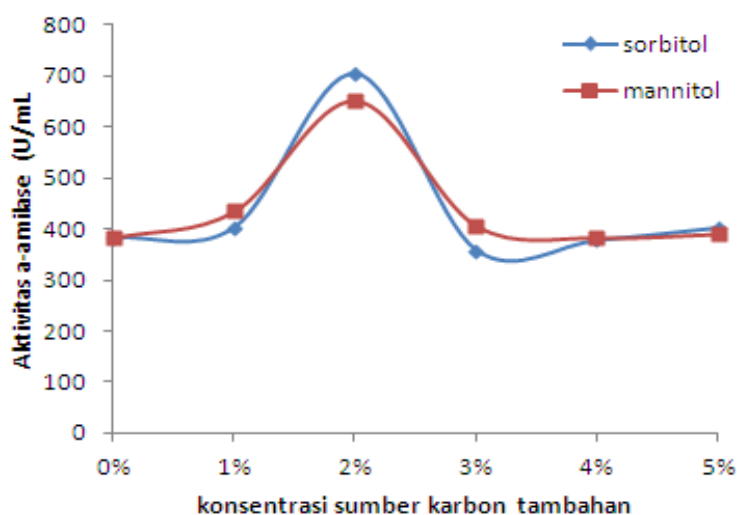


**Gambar 2.** Diagram perbandingan aktivitas optimum Sfamy menggunakan variasi konsentrasi penginduksi metanol.

Penambahan metanol akan menyebabkan gen *AOX1* dan *AOX2* pada galur  $Mut^+$  diekspresikan menghasilkan enzim alkohol oksidase. Enzim ini merupakan enzim pertama pada jalur metabolisme metanol. Selain itu karena Sfamy diekspresikan dibawah kontrol promotor *AOX1*, maka penambahan metanol juga akan menginduksi ekspresi Sfamy oleh *P. pastoris*.

### Konsentrasi sumber karbon tambahan

Konsentrasi karbon tambahan 1% telah berhasil meningkatkan produksi  $\beta$ -galaktosidase oleh inang *P. pastoris* Mut<sup>-</sup> (11). Untuk mengetahui konsentrasi optimum sumber karbon tambahan untuk produksi Sfamy, maka pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi sorbitol dan manitol. Hasil menunjukkan konsentrasi sorbitol atau manitol 2% menghasilkan aktivitas Sfamy yang paling tinggi, yaitu diperoleh aktivitas berturut-turut 704,3 dan 650,28 U/mL dibandingkan dengan 382,9 U/mL tanpa sumber karbon tambahan (Gambar 3). Sehingga untuk produksi Sfamy selanjutnya digunakan tambahan sorbitol atau manitol 2% dan konsentrasi penginduksi metanol 0,75%.

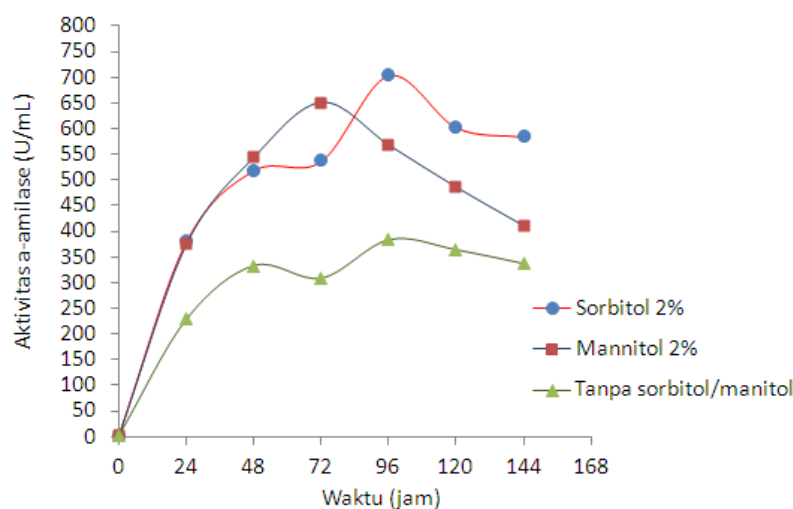


**Gambar 3.** Kurva variasi konsentrasi sorbitol atau manitol terhadap aktivitas  $\alpha$ -amilase. Konsentrasi sorbitol atau manitol 2% menghasilkan aktivitas paling tinggi.

### Pengaruh penambahan sorbitol atau manitol terhadap produksi $\alpha$ -amilase

Hasil analisis aktivitas Sfamy yang disekresikan oleh *P. pastoris* MS-20 dengan penambahan sumber karbon sorbitol atau manitol menunjukkan terjadi peningkatan sekresi Sfamy pada *P. pastoris* yang diberi tambahan sumber karbon (Gambar 4). Aktivitas Sfamy optimum dengan penambahan sorbitol diperoleh pada jam ke-96 dan dengan penambahan manitol pada jam ke-72. Hasil analisis SDS-PAGE (Gambar 6) memperlihatkan pita Sfamy dengan ukuran 54 kDa (19).

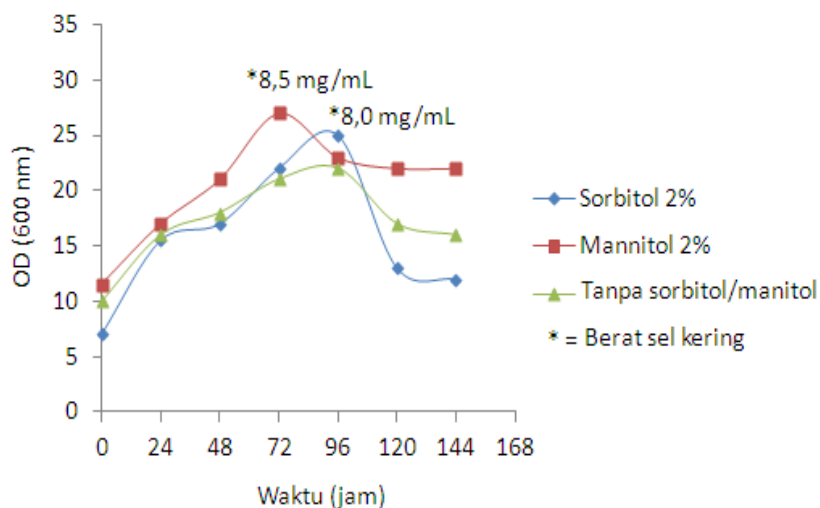




**Gambar 4.** Kurva perbandingan aktivitas  $\alpha$ -amilase selama 144 jam induksi dengan dan tanpa sumber karbon tambahan.

a

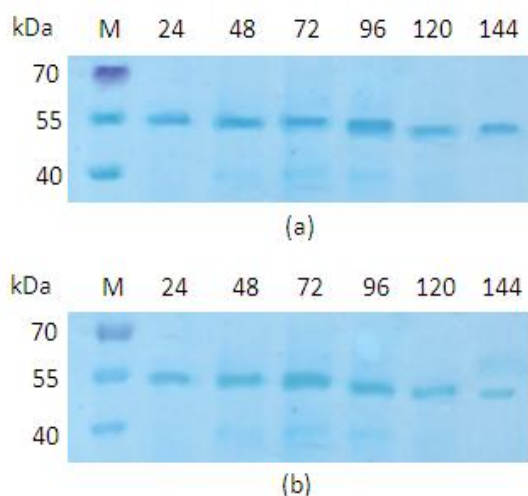
sumber karbon ini meningkatkan pertumbuhan sel *P. pastoris* selama waktu induksi (Gambar 5). Penelitian ini membuktikan bahwa sorbitol dan manitol merupakan sumber karbon tambahan yang bersifat non-represif, yaitu meningkatkan pertumbuhan dan tidak menghambat ekspresi protein asing.



**Gambar 5.** Densitas optik dan berat sel kering sel *P. pastoris* rekombinan dengan dan tanpa penambahan sumber karbon.

Bila dibandingkan tingkat sekresi Sfamy oleh *P. pastoris* MS-20, dengan penambahan sorbitol dan manitol, maka terjadi peningkatan sekresi Sfamy berturut-turut 2,13-kali dan 1,94-kali (Tabel 1). Walaupun hasil ini tidak terlalu besar, dibandingkan dengan peningkatan produksi  $\beta$ -glukosidase oleh inang *P. pastoris* Mut<sup>-</sup> (11), sorbitol dan manitol

sepertinya dapat digunakan sebagai sumber karbon tambahan yang tidak menghambat produksi Sfamy oleh *P. pastoris* Mut<sup>+</sup>.



**Gambar 6.** Analisis SDS-PAGE Sfamy pada setiap jam induksi (a) dengan penambahan sorbitol, (b) dengan penambahan manitol.

**Tabel 1.** Perbandingan tingkat sekresi Sfamy oleh *P. pastoris* dengan dan tanpa penambahan sorbitol atau manitol.

	Tanpa sorbitol/ manitol	Dengan sorbitol 2%	Dengan manitol 2%
U/mL	382,96	704,3	650,28
µg/mL	1140	1320	1300
U/µg	436574,4	929676	845364
Peningkatan	1x	2,13x	1,94x

Sorbitol dan manitol sudah diketahui dapat digunakan sebagai sumber karbon tambahan pada produksi protein rekombinan dalam sistem ekspresi *P. pastoris* dibawah kontrol promotor *AOXI*. Namun konsentrasi optimum sumber karbon tambahan dipengaruhi oleh inang yang digunakan dan protein rekombinan yang diekspresikan. Pada penelitian ini diperoleh informasi sumber karbon tambahan yang paling cocok digunakan untuk produksi Sfamy oleh inang *P. pastoris* Mut<sup>+</sup> adalah sorbitol dengan konsentrasi 2%. Studi tentang pengaruh sumber karbon tambahan terhadap produksi  $\alpha$ -amilase ragi oleh *P. pastoris* Mut<sup>+</sup> belum pernah dilaporkan. Namun bila dibandingkan dengan hasil penelitian Inan & Meager (2001) yang menggunakan inang *P. pastoris* Mut<sup>-</sup> untuk produksi  $\beta$ -glukosidase, ternyata pengaruh sumber karbon tambahan pada inang Mut<sup>-</sup> lebih besar dibanding inang Mut<sup>+</sup>.

Kondisi kultur yang digunakan untuk sistem ekspresi *P. pastoris* juga merupakan faktor yang penting untuk dipertimbangkan dalam rangka meningkatkan produktivitas protein rekombinan. Metoda ekspresi skala kecil pada umumnya merupakan tahap awal yang dilakukan dalam rangka optimasi produksi dan pemilihan kondisi kultur ekspresi. Level protein yang diperoleh pada kultur curah pada umumnya 10 kali lebih rendah dibandingkan kultur fermentor karena densitas sel yang rendah <sup>(20)</sup> dan karena terbatasnya aerasi <sup>(9)</sup>. Aerasi yang terbatas merupakan faktor penentu pada kultur galur Mut<sup>+</sup> menggunakan sistem curah, karena tidak adanya suplai oksigen atau metanol yang konstan dan galur ini mengkonsumsi metanol dengan cepat. Pada galur Mut<sup>-</sup> yang sama sekali tidak dapat mengkonsumsi metanol, penambahan metanol hanya berfungsi untuk ekspresi gen asing, jadi metanol tidak digunakan sebagai sumber energi. Sumber karbon tambahan sangat diperlukan untuk menambah densitas sel.

Hasil penelitian ini memberikan informasi konsentrasi penginduksi metanol dan karbon tambahan yang cocok digunakan untuk produksi Sfamy oleh *P. pastoris* galur Mut<sup>+</sup>. Informasi ini dapat digunakan untuk peningkatan skala produksi Sfamy ke sistem fermentor.

### KESIMPULAN

Penambahan sorbitol atau manitol ke medium ekspresi *P. pastoris* meningkatkan produksi Sfamy rekombinan. Konsentrasi penginduksi metanol 0,75% dan sorbitol 2% sebagai sumber karbon tambahan cocok digunakan untuk produksi Sfamy rekombinan oleh *P. pastoris* galur Mut<sup>+</sup>.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada: Idar Kardi, S.Si dan Rizki Amalia, M.Si atas bantuan teknis dan diskusi. Penelitian ini didanai oleh Research Grant *IMHERE Project Unpad-DIKTI*, Departemen Pendidikan Nasional.

### DAFTAR PUSTAKA

1. J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45-66 (2000)
2. K. Sreekrishna, R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J.D. Wierschke, A. Subramaniam, L.A. Birkenberger. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55-62 (1997)
3. G.P. Lin-Cereghino, L. Godfre, B. J. de la Cruz, S. Johnson, S. Khuongsathiene, I. Tolstorukov, M. Yan, J. L. Cereghino, M. Veenhuis, S. Subramani, and J. M.

- Cregg. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 26: 883-897 (2000)
4. J. M. Cregg, K. R. Madden, K. J. Barringer, G.P. Thill, G.P. and C. A. Stillman. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1316-1323 (1989)
  5. J. M. Cregg, K.J. Barringer, A.Y. Hessler, and K.R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376-3385 (1985)
  6. J. M. Cregg and K.R. Madden. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruptions. *Biol. Rest. Ind. Yeast.* 2: 118 (1989)
  7. Y. Katakura, W. H. Zhang, G.Q. Zhuang, T. Omasa, M. Kishimoto, W. Goto, K.I Suga. Effect of methanol concentration on the production of human beta(2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferment. Bioengng* 86: 482–487 (1998)
  8. D. Reverter, S. Ventura, V. Villegas, J. Vendrell, F.X. Aviles.. Overexpression of human procarboxypeptidase A2 in *Pichia pastoris* and detailed characterization of its activation pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 3535–3541 (1998)
  9. M.A. Romanos. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 527–533 (1995)
  10. R. Daly and M.T.W. Hearn. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138 (2005)
  11. M. Inan and M.M, Meagher. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioengng* 92: 585–589 (2001)
  12. S. Gaffar, D. Natalia, M. R. Moeis, O. Suprijana, and S. Soemitro. Signal Peptide Modification of  $\alpha$ -amylase Gene (*ALPI*) and construction of pPICZA-MSALPI plasmid for improving secretory production of  $\alpha$ -amilase in *Pichia pastoris*, Proceeding International Seminar on Chemistry, Bandung, Indonesia. 2008.
  13. S. Gaffar. Effect of genetic manipulation combinatnion on *Saccharomycospsis fibuligera* R64  $\alpha$ -amylase secretion in *Pichia pastoris*. PhD Thesis, Universitas Padjadjaran (2011).
  14. Invitrogen. A manual of methods for expresion of recombinant proteins in *Pichia Pastoris*. California, 2008, pp 10-15.
  15. G.L. Miller. Use of dinitrosalisylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31. 426-428 (1959)
  16. M.M. Bradford. 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 (1976)
  17. R.W. Blakesley & J.A. Boezi. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue G-250. *Anal. Biochem.* 82: 580–582 (1977).
  18. M.J.E.C. Van der Maarel, B. Van der Veen, B., J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis,, and L. Dijkhuizen. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.* 94:137-155 (2002)

19. K. Hasan, W.T. Ismaya, I. Kardi, Y. Andiyana, S. Kusumawidjaya, S. Ishmayana, T. Subroto, and S. Soemitro. Proteolysis of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: characterization of digestion products. *Biologia*. **63**: 1044-1050 (2008).
20. C.E. White, N.M. Kempf, E.A. Komives. Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure* 2: 1003-1005 (1994)