

Subklona gen sintetik Lipase Rhizomucor Miehei (Cooney & R. Emers.) schipper 1978 dengan Peptida Sinyal Alami di dalam Pichia Pastoris Guillerm. phaff 1956 dan karakterisasi produk gennya = Subcloning Synthetic Rhizomucor Miehei (Cooney & R. Emers) Schipper 1978 lipase gene with the original signal peptide into Pichia Pastoris Guillerm phaff 1956 and characterization of gene products

Martha Eka Cahyani, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20455021&lokasi=lokal>

Abstrak

Lipase EC 3.1.1.3 merupakan enzim hidrolase yang berpotensi dalam berbagai aplikasi di bidang bioteknologi dan industri. Pada penelitian di Pusat Teknologi Bioindustri, LAPTIAB-BPPT, gen sintetik lipase Rhizomucor miehei RMLip telah diklona menggunakan vektor pUC57 ke dalam Escherichia coli DH5^α, pengekspresian enzim lipase masih dihasilkan secara intraseluler.

Penelitian ini bertujuan melakukan subklona gen RMLip dengan peptida sinyal alaminya ke dalam vektor ekspresi Pichia pastoris dan mengkarakterisasi produk gennya. Gen RMLip dengan peptida sinyal alami diperoleh dengan PCR, dipotong dengan XhoI dan XbaI, kemudian diligasi ke dalam pPICZ⁺ A yang telah dilinearisasi dengan enzim yang sama. Kontruksi plasmid rekombinan tersebut dianalisis dengan enzim restriksi dan pengurutan DNA. Plasmid rekombinan dengan urutan DNA yang tepat kemudian ditransformasikan ke P. pastoris X33. Transforman yang tahan terhadap zeocin dan menghasilkan zona bening dianalisis dengan PCR koloni dan enzim restriksi.

Transforman yang mengandung RMLip digunakan untuk produksi lipase. Kultivasi dilakukan dengan penambahan 1,5 metanol setiap hari dengan aerasi yang sesuai. Perkiraan berat molekul dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Karakterisasi enzim dilakukan terhadap suhu dan pH. Rentang suhu yang diujikan yaitu 30 m-80oC, sedangkan variasi pH yaitu 5 m-10.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen RMLip sebesar 1.132 pb berhasil disubklona ke pPICZ⁺ A, sehingga diperoleh total ukuran DNA sebesar 4.629 pb. Lipase rekombinan yang diproduksi oleh P. pastoris X33 yang mengandung gen RMLip di dalam kromosonnya, mempunyai berat molekul sebesar 32,9 kDa. Aktivitas enzim lipasenya memiliki suhu dan pH optimum pada suhu 30oC dan pH 9.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa gen RMLip yang mengandung peptida sinyal alami dapat disubklona dan diekspresikan pada P. pastoris X33 dan lipase yang diekspresikan secara ekstraseluler memiliki karakter tertentu.

.....

Lipases EC 3.1.1.3 are a hydrolases enzyme that potential in many applications in the field of biotechnology and industrial. In the studies at the Center of Bioindustrial Technology, LAPTIAB BPPT, the synthetic Rhizomucor miehei lipase gene RMLip have been cloned using the vector pUC57 in Escherichia coli DH5^α, the expression of lipase was produced intracellularly.

This study aims to subcloning RMLip gene with the original signal peptide into Pichia pastoris expression vector and characterize gene products. The RMLip gene with the original signal peptide had been obtained by PCR, cut by XhoI and XbaI and then ligated into pPICZ⁺ A linearized with the same enzymes. The construction of the recombinant plasmid was analyzed by DNA sequenced. The recombinant plasmid with

the correct DNA sequence was transformed into *P. pastoris* X33. Zeocin resistant transformants and form a clear zone around colonies were analyzed by colony PCR and restriction enzymes analyses.

Transformants that containing RMIip is used for the production of lipase. Cultivation of recombinant *P. pastoris* was carried out with the addition of 1.5 methanol every day with appropriate aeration. Estimated molecular weight was carried out by using SDS PAGE. Enzyme characterization focused on the effect of temperature and pH. Variations in temperature tested were 30 mdash 80oC, while the pH variations pH 5.0 mdash 10.0.

As the result, a RMIip gene with the size of 1.132 bp was successfully subcloned to pPICZ A, thus obtained the total size of DNA is 4.629 bp. The recombinant lipase produced by *P. pastoris* X33 containing RMIip in its chromosomal DNA, had a molecular weight of 32.9 kDa. Lipase activity had an optimal temperature and pH 30oC and 9.0, respectively.

It can be concluded that, RMIip gene containing the original signal peptide can be subcloned and expressed into *P. pastoris* X33 and the lipase expressed extracellularly has a certain character.