

Expression and Characterization of Thermostable Recombinant Alpha-Amylase from *Geobacillus* sp. DS3 with *Escherichia coli* BL21(DE3) Host

Dina Clarissa Kurniawan

22/501378/PMU/11210

ABSTRACT

Continuous efforts are underway to explore new enzyme sources in order to identify enzymes with unique characteristics suitable for various enzymatic processes such as thermostability, halophilicity, and pH stability. The discovery of a novel *Geobacillus* sp. DS3 strain, isolated from Sikidang Crater in Dieng, has revealed its ability to produce thermostable α -amylase. To address challenges associated with high-temperature production, recombinant technology was employed to enhance the expression of the thermostable α -amylase in the *E. coli* BL21(DE3) host. This study aimed to express, purify, and characterize the novel thermostable α -amylase for future application in industries. The enzyme was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) at 18°C for 20 hours with 0.5 mM IPTG induction. The purification with the Ni-NTA column yielded 69.23% from the initial crude enzyme with increased specific activity to 3.6 fold. The recombinant thermostable α -amylase had a total molecular weight of ± 70 kDa (± 58 kDa enzyme + 11 kDa SUMO protein). This enzyme was active from 30-90°C and pH 6-8, optimum at 70°C at pH 6. The enzyme remained stable for above 30 minutes at 60°C. The K_m and V_{max} values of the enzyme were 324.03 mg/mL and 36.5 U/mg respectively with dextrin as the substrate. As a metalloenzyme, it exhibited the highest activity in the presence of Ca^{2+} . The functionality of the enzyme was confirmed through HPLC analysis.

Keywords: recombinant expression, thermostable α -amylase, purification, characterization

Ekspresi dan Karakterisasi Enzim Rekombinan Alfa-Amilase Termostabil dari *Geobacillus* sp. DS3 dengan Inang *Escherichia coli* BL21(DE3)

Dina Clarissa Kurniawan

22/501378/PMU/11210

INTISARI

Eksplorasi sumber-sumber enzim baru terus dilakukan untuk menemukan enzim dengan karakter spesifik seperti termostabilitas, halofilitas, dan enzim yang stabil pH untuk proses enzimatik dengan kondisi tertentu. Bakteri *Geobacillus* sp. DS3 telah berhasil diisolasi dari Kawah Sikidang di Dieng dan ditemukan mampu menghasilkan enzyme α -amilase yang termostabil. Untuk mengatasi tantangan dalam produksi enzim tersebut dengan suhu tinggi, maka teknologi rekombinan digunakan untuk mengekspresikan α -amilase termostabil secara berlebih dengan inang *E. coli* BL21(DE3). Penelitian ini bertujuan untuk mengekspresikan, memurnikan, dan mengkarakterisasi enzim α -amilase termostabil ini untuk penerapannya di industri. Enzim ini berhasil diekspresikan dengan *E. coli* BL21(DE3) pada suhu 18°C selama 20 jam dengan induksi 0.5 mM IPTG. Pemurnian menggunakan kolom Ni-NTA menghasilkan 69.23% dari hasil isolasi protein kasar dengan peningkatan aktivitas spesifik hingga 3.6 kali. Enzim rekombinan α -amilase termostabil ini memiliki berat molekul ± 70 kDa (± 58 kDa enzim + 11 kDa protein SUMO). Enzim ini aktif pada suhu 30-90°C dan pH 6-8, dan optimal pada suhu 70°C dan pH 6. Enzim ini tetap stabil setelah 30 menit pada suhu 60°C. Nilai Km dan Vmax dari enzim ini secara berturut-turut adalah 324.03 mg/mL dan 36.5 U/mg dengan dekstrin sebagai substrat. Sebagai metaloenzim, penambahan Ca^{2+} memberikan aktivitas enzim paling tinggi. Enzim ini terbukti fungsional berdasarkan hasil analisis menggunakan HPLC.

Kata kunci: ekspresi rekombinan, α -amilase termostabil, pemurnian, karakterisasi