



Peningkatan akumulasi tiamin pada kultur *Escherichia coli* melalui peningkatan oksigenasi dan penghilangan *rpoS*

Nuraliah Rusman^{1*}, Prayoga Suryadarma^{1,2}, Nisa Rachmania Mubarik³

¹*Biotechnologi, Sekolah Pascasarjana, IPB University, Bogor, Indonesia*

²*Teknologi Industri Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia*

³*Biologi, IPB University, Bogor, Indonesia*

Article history

Diterima:

9 Juli 2021

Diperbaiki:

17 September 2021

Disetujui:

27 September 2021

Keyword

Escherichia coli;

Thiamine accumulation;

Deletion rpoS;

Oxygenation treatment

ABSTRACT

Microorganisms as cell factories in producing a product are strongly influenced by their metabolism. engineering microbial metabolism by increasing coenzymes that play a role in enzyme activity. Thiamine diphosphate is one of the coenzymes that are commonly found in the metabolic pathways of microbial cells. Increasing the thiamine formation pathway as a precursor in the thiamine metabolic pathway is a strategy in this study. Enhancing thiamine accumulation in Escherichia coli culture by inducing oxygenation level and deleting rpoS was investigated. The investigation was conducted by comparing the cultivation of Escherichia coli BW25113 (parent strain) and BW25113-ΔrpoS (rpoS mutant) cultures under aerobic conditions at different shaking rotation rates of 150 and 200 rpm. The measured parameters were thiamine accumulation, dry cell weight, acetate concentration and glucose consumption of the cultures. Inducing oxygenation level of parent strain cultures through increasing shaking rotation rate from 150 to 200 rpm induced 40 % thiamine accumulation. Meanwhile, deletion of rpoS increased 9,5 % thiamine accumulation compared to parent strain culture.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

* Penulis korespondensi

Email : nuraliah.rusman@gmail.com

DOI 10.21107/agrointek.v19i1.11110

PENDAHULUAN

Dunia industri saat ini memanfaatkan mikroorganisme untuk memproduksi berbagai jenis produk bernilai tambah tinggi seperti bioenergi, farmasi, pertanian, pangan dan lainnya. Efektivitas penggunaan mikroorganisme sebagai pabrik sel dalam menghasilkan produk sangat ditentukan oleh metabolismenya (Kumar dan Prasad, 2011). Proses metabolisme yang terjadi pada mikroorganisme melibatkan enzim-enzim pada setiap jalurnya. Keterlibatan enzim-enzim tersebut tentunya membutuhkan koenzim untuk memaksimalkan kinerjanya. Salah satu koenzim yang pada umumnya terdapat pada jalur metabolisme mikroorganisme adalah tiamin difosfat (Lonsdale 2006). Tiamin difosfat (ThDP) memainkan peran penting sebagai koenzim pada berbagai proses metabolisme sel, seperti metabolisme karbohidrat, lipid dan asam amino (Du et al. 2011). Tiamin difosfat merupakan bentuk turunan dari tiamin yang merupakan prekursor pada jalur metabolisme pusat tiamin difosfat (ThDP) (Aleshin et al. 2019).

Enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme karbohidrat dan aktivitasnya yang bergantung pada tiamin difosfat meliputi piruvat dekarboksilase, piruvat dehidrogenase kompleks, α -ketoglutarat dehidrogenase, transketolase, asam aseto hidroksi, aseto laktat sintase dan benzaldehid liase serta sebagai koenzim terhadap agregasi makromolekul yang mende karboksilasi asam keto yang berasal dari leusin, isoleusin dan valin sebagai cabang dari rantai asam amino (Lonsdale 2006). Peran tiamin difosfat sebagai koenzim pada enzim-enzim tertentu akan mempengaruhi hasil dari produk akhir pada suatu jalur metabolisme, seperti pembentukan etanol yang dipengaruhi oleh aktivitas enzim piruvat dekarboksilase serta peningkatan aktivitas siklus krebs yang dipengaruhi oleh enzim piruvat dehidrogenase kompleks.

Biosintesis tiamin difosfat (ThDP) terjadi secara *de novo* melalui purin *pathway* dengan menghasilkan HMP-PP (Hidroksimetil-pirimidin-pirofosfat) dan reaksi 1-deoksi-D-xilulos5-fosfat, sistein, dan tirosin dengan melibatkan gen *thiFSGH* dan *thiI* sehingga menghasilkan THZ-P (Tiazol fosfat). Gabungan HMP-PP (Hidroksimetil-pirimidin-pirofosfat) dan THZ-P (Tiazol fosfat) membentuk tiamin monofosfat (TMP). Tiamin monofosfat (TMP) mengalami defosforilasi sehingga terbentuk tiamin kemudian

mengalami fosforilasi dari ATP sehingga terbentuk tiamin difosfat (ThDP) (Kawasaki et al. 1969). Dengan demikian, strategi peningkatan ketersediaan tiamin sebagai prekursor tiamin difosfat (ThDP) dalam metabolisme mikroorganisme merupakan hal esensial untuk dikaji.

Beberapa strategi untuk meningkatkan ketersediaan tiamin dalam sel diantaranya, Lakaye et al. (2004) melaporkan bahwa biosintesis tiamin difosfat pada *Escherichia coli* dapat dilakukan melalui kondisi pertumbuhan anaerob. Namun, kondisi ini tidak efektif karena fosforilasi tiamin dalam bentuk tiamin difosfat pada jalur biosintesis tiamin membutuhkan 4 ATP, sedangkan kondisi pertumbuhan anaerob hanya menghasilkan 2 ATP. Penambahan tiamin secara terbatas pada medium pertumbuhan sebagaimana yang dilakukan Tian et al. (2016) untuk meningkatkan pertumbuhan *Escherichia coli* sehingga berpengaruh terhadap pembentukan laktat. Strategi ini memiliki kekurangan karena keberadaan tiamin pada konsentrasi 0,1 μM akan mereduksi aktivitas enzim yang terlibat dalam biosintesis tiamin (Kawasaki et al. 1969) dan sistem transpor tiamin melalui membran sel dapat dihambat oleh *N-ethylmaleimide* (Hollenbach et al. 2002).

Berdasarkan kelemahan tersebut, maka dilakukan strategi peningkatan akumulasi tiamin pada *Escherichia coli* melalui peningkatan oksigenasi dan penghilangan *rpoS*. Efektivitas penggunaan *Escherichia coli* disebabkan pertumbuhannya cepat, memiliki informasi genetik dan fisiologis yang mudah dianalisis serta mudah beradaptasi pada kondisi lingkungan stres karena terdapat global regulator *rpoS* yang dapat mengatur beberapa gen regulator dan gen struktural lainnya (Eisentark et al. 1996). Pada umumnya *Escherichia coli* dapat mensintesis tiamin secara *de novo* yang berperan sebagai prekursor koenzim bagi enzim yang bergantung pada tiamin difosfat (ThDP) dalam metabolisme sel. Salah satu strategi untuk menginduksi tiamin dalam sel melalui paparan stres oksidatif (Jung and Kim 2003) secara fisik dengan perlakuan pengadukan pada kultur bergoyang sehingga dapat memenuhi ketersediaan oksigen, namun tiamin yang terbentuk berperan sebagai intensifikasi metabolisme sel (Kowalska et al. 2012) sehingga dalam kondisi tersebut terjadi persaingan dengan *rpoS*. Dengan demikian melalui penelitian ini dilakukan strategi peningkatan tiamin melalui peningkatan

oksigenasi dan penghilangan *rpoS*, sehingga diharapkan lebih efektif terhadap peningkatan akumulasi tiamin karena *rpoS* memiliki regulasi negatif terhadap gen struktural *thiI* dan metabolisme purin yang merupakan gen dan jalur metabolisme berperan dalam pembentukan tiamin (Dong and Schellhorn 2009b). Selain itu, *rpoS* juga berperan dalam regulasi gen penyandi jalur metabolisme konsumsi piruvat menjadi produk samping asetat (*poxB*). Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengevaluasi apakah terjadi peningkatan akumulasi tiamin melalui peningkatan oksigenasi dan penghilangan *rpoS* pada sel *Escherichia coli*.

METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan *Escherichia coli* BW25113- Δ *rpoS* yang berasal dari *National BioResources Project, National Institute of Genetic* (NIG) Mishima Jepang. Selain itu juga digunakan media Luria Bertani (LB), glukosa dan bahan-bahan kimia lainnya sebagai media kultivasi dan untuk analisis. Peralatan yang digunakan antara lain inkubator kultur bergoyang (*rotary shaking incubator*) *baffle flask* dan peralatan gelas lainnya. Selain itu juga digunakan laminar, *sentrifuge*, spektrofotometer dan HPLC untuk analisis cuplikan (*sample*).

Prakultivasi dan Kultivasi

Tahapan ini dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing sel *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan *Escherichia coli* BW25113- Δ *rpoS* (galur mutan) dari stok gliserol ke dalam masing-masing 50 ml media LB dan diinkubasi pada kultur bergoyang dengan kecepatan putaran 120 rpm selama 12 jam pada suhu 37°C. Kemudian dihitung nilai OD₆₆₀ dengan rentang nilai absorbansi 1-1,5, selanjutnya sampel dikultivasi.

Tahapan kultivasi dengan cara memindahkan 2 mL prakultivasi *Escherichia coli* ke medium LB baru yang diperkaya glukosa sebanyak 40 g/l dengan perbandingan 20 % glukosa dan 80 % LB (sterilisasi terpisah), 20 g/l CaCO₃, kultur tersebut diinkubasi dalam kultur bergoyang pada suhu 37 °C dengan kecepatan rotasi 150 dan 200 rpm (Suryadarma *et al.* 2012) selama 24 jam.

Analisis Bobot Sel Kering (*Dry Cell Weight*)

Pengenceran sampel 1:10 yaitu menyiapkan sebanyak 4500 μ L HCl 1 N dalam tabung ulir dan menambahkan 500 μ L sampel hasil kultivasi serta menghomogenkan dengan menggunakan *vorteks*. Kemudian mengukur OD nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Selanjutnya menghitung bobot sel kering (g/l) dihitung dengan mengalikan 0,36 dengan nilai OD₆₆₀ yang diperoleh (Ojima *et al.* 2012).

Analisis Glukosa Sisa

Analisis konsumsi substrat menggunakan metode DNS. Sampel yang telah dipreparasi ditambahkan DNS sebanyak 3 ml dan dihomogenkan menggunakan *vorteks*. Setelah itu, sampel dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit. Kemudian sampel tersebut didinginkan dan diukur OD nya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Nilai OD yang tercatat dikonversi menjadi bobot glukosa sisa berdasarkan kurva standar yang telah dibuat. Konsumsi substrat (g/l) dihitung dengan mengurangkan glukosa awal dengan glukosa sisa (Miller 1959).

Analisis Tiamin

Sel dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm, suhu 5°C selama 5 menit, kemudian pellet disuspensikan dengan 300 μ l 12% TCA (*trichloroacetic acid*). Setelah itu, sampel tersebut disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm, suhu 5°C selama 15 menit, supernatannya diambil dan dicuci dengan dietil eter 500 μ l, kemudian sampel tersebut disentrifuse pada kecepatan 3500 rpm, suhu 5°C selama 5 menit. Setelah itu, fase atas yang terbentuk dibuang dan fase bawah disaring untuk digunakan analisis tiamin menggunakan HPLC. Kolom yang digunakan adalah kolom C-18 (Agilent) dengan laju alir 1,0 mL/min, suhu 35°C, dan dideteksi pada panjang gelombang 220 nm. Fase gerak yang digunakan yaitu 50% asetonitril dan 50% NaH₂PO₄ (Bettendorff and Wins 2009; Lakaye *et al.* 2004).

Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil penelitian ini merupakan nilai rata-rata dan standar deviasi dari tiga ulangan untuk analisis bobot sel kering (*dry cell weight*) dan analisis konsumsi substrat serta dua ulangan untuk analisis konsentrasi tiamin dan konsentrasi asetat. Adapun signifikansi data untuk bobot sel kering, konsumsi substrat, konsentrasi

tiamin dan asetat dilakukan dengan analisis ANOVA menggunakan *minitab versi 17*.

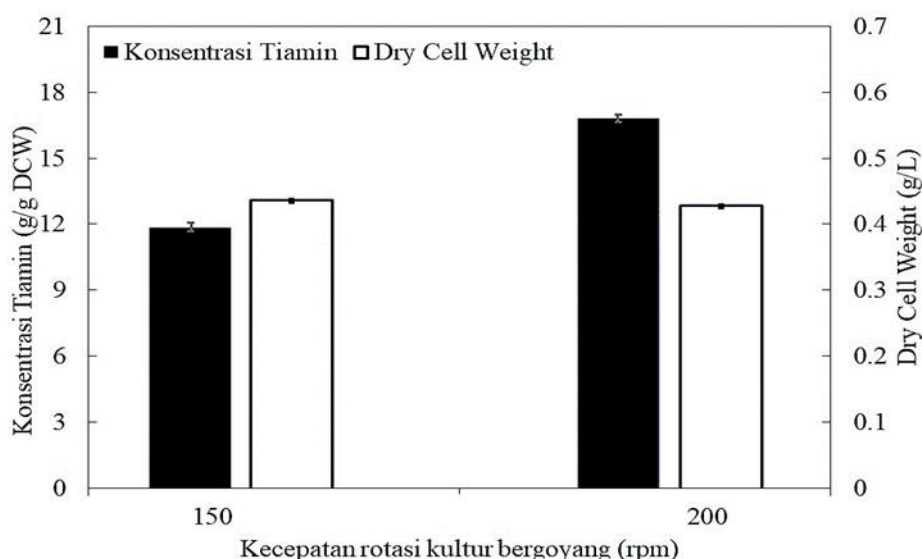
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Peningkatan Oksigenasi terhadap Akumulasi Tiamin pada Sel *Escherichia coli*

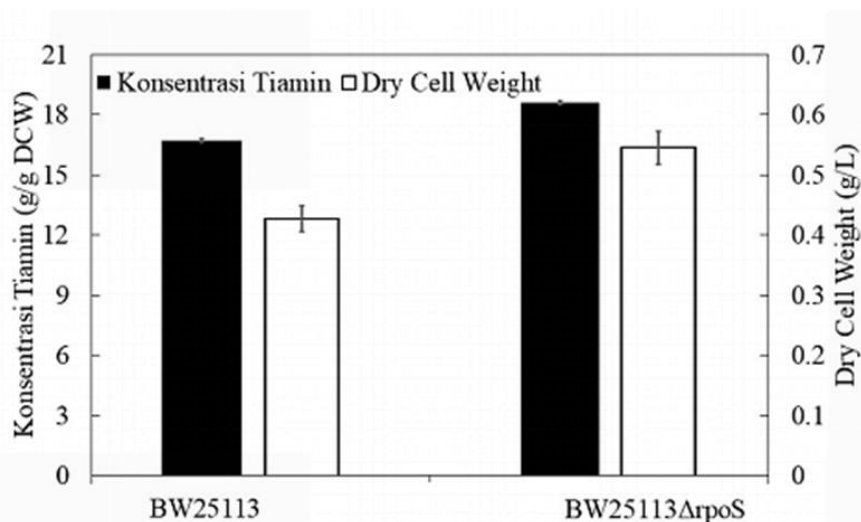
Pada tahapan penelitian ini, dilakukan kultivasi *Escherichia coli* BW25113 dengan memberikan pengaruh tingkat oksigenasi melalui pengaturan kecepatan rotasi kultur bergoyang 150 rpm dan 200 rpm pada media dengan konsentrasi glukosa tinggi (40 g/l) (Suryadarma *et al.* 2012) selama 24 jam untuk mengetahui pengaruh laju pengadukan terhadap akumulasi tiamin. Pada kondisi pertumbuhan aerob, kelarutan oksigen pada media pertumbuhan dipengaruhi oleh kecepatan rotasi kultur bergoyang sehingga dapat menyebabkan transfer dan penyerapan oksigen secara efisien dalam kultur pertumbuhan dan homogenisasi nutrisi dengan sempurna. Berdasarkan penelitian Suryadarma *et al.* (2012) melaporkan bahwa kecepatan rotasi kultur bergoyang 100 rpm hingga 150 rpm menggunakan *rotary shaker incubator* merupakan kecepatan rotasi rendah yang memiliki nilai kLa 1,5/menit dan tidak menyebabkan stres oksidatif fisik. Adapun kecepatan rotasi 200 rpm merupakan kecepatan rotasi tinggi yang memiliki nilai kLa 4,9/menit dan menyebabkan stres oksidatif fisik sehingga berdampak pada aktifnya *rpoS*. Hasil penelitian ini, terjadi akumulasi tiamin pada pengadukan 150 rpm yaitu 11,870 g/g DCW dan

mengalami peningkatan akumulasi tiamin secara signifikan yaitu 16,811 g/g DCW atau sebesar 40 % dari kecepatan rotasi terendah ($\alpha \geq 95\%$). Peningkatan akumulasi tiamin ini tidak diikuti oleh peningkatan bobot sel kering atau DCW yang tidak mengalami peningkatan secara signifikan yaitu 0,437 g/l dan 0,428 g/l (Gambar 1).

Fenomena peningkatan akumulasi tiamin pada kecepatan rotasi 200 rpm dapat terjadi pada metabolisme *Escherichia coli* karena dipengaruhi oleh stres oksidatif secara fisik yang diberikan dalam hal ini oksigen dengan perlakuan kecepatan rotasi bertingkat. Gigliobianco *et al.* (2010) menyatakan bahwa bahwa keberadaan oksigen pada medium pertumbuhan akan menyebabkan terjadinya oksidasi piruvat melalui siklus krebs dan rantai respirasi serta kondisi tersebut membutuhkan tiamin sebagai prekursor tiamin difosfat. Selain itu, kondisi stres yang diberikan juga sejalan dengan pemaparan (Jung and Kim 2003) dan (Gigliobianco *et al.* 2010) bahwa kondisi stres lingkungan seperti stres oksidatif, kekurangan nutrisi, dan terpaparnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) memicu biosintesis tiamin secara *de novo* (Gambar 5B). Hal ini diduga sebagai indikasi kebutuhan untuk intensifikasi proses metabolisme sel termasuk jalur yang bergantung pada tiamin difosfat serta mengambil keuntungan dari peran protektif tiamin untuk mempertahankan proses pertumbuhan yang sangat terganggu di bawah stres oksidatif (Zakrzewska *et al.* 2011, Kowalska *et al.* 2012).



Gambar 1 Bobot sel kering dan akumulasi tiamin pada *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) pada kecepatan rotasi kultur bergoyang 150 rpm dan 200 rpm selama 24 jam



Gambar 2 Bobot sel kering dan akumulasi tiamin pada *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan BW25113- Δ rpoS (galur mutan) pada kecepatan rotasi kultur bergoyang 200 rpm selama 24 jam

Peningkatan akumulasi tiamin pada galur induk tidak diikuti dengan peningkatan pertumbuhannya. Hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi stres oksidatif kontribusi pertumbuhan *Escherichia coli* galur induk tidak hanya mengarah pada jalur siklus krebs akan tetapi pertumbuhannya juga mengarah ke jalur pembentukan produk samping yaitu asetat (Gambar 3 dan 5A). Pembentukan asetat sejalan dengan aktifnya *rpoS* ketika pertumbuhan memasuki fase stasioner dan dalam keadaan stress oksidatif akibat dari kecepatan rotasi tinggi kultur bergoyang. Regulator *rpoS* akan meningkatkan regulasi pada gen struktural jalur pembentukan asetat yaitu *poxB* atau jalur *ackA-pta* (Dong dan Schellhorn, 2009a).

Berdasarkan pemaparan sebelumnya, nampak adanya kompetisi pertahanan sel pada *Escherichia coli* galur induk yaitu terjadinya akumulasi tiamin pada kondisi stres diduga sebagai bentuk intensifikasi proses metabolisme sel serta di sisi lain adanya *rpoS* yang juga sebagai global regulator yang aktif ketika terpapar kondisi stres lingkungan, namun masih belum efektif karena kontribusi pertumbuhannya lebih dominan menghasilkan produk samping dalam hal ini terjadinya *overflow metabolism*. Sebagai konfirmasi lanjutan, dilakukan kultivasi pada *E.coli* mutan *rpoS* yang dibandingkan dengan galur induk sebagai langkah evaluasi terhadap peningkatan akumulasi tiamin pada non *rpoS* dengan perlakuan kecepatan rotasi 200 rpm.

Pengaruh Penghilangan *rpoS* terhadap Akumulasi Tiamin

Pada tahapan ini, dilakukan kajian terkait hubungan penghilangan *rpoS* terhadap akumulasi tiamin yang dibandingkan dengan galur induk pada kultivasi selama 24 jam dalam kondisi oksigen tinggi (200 rpm) dan glukosa tinggi (40 g/l) (Suryadarma et al. 2012). Berdasarkan hasil penelitian ini, pada kultivasi 24 jam galur BW25113- Δ *rpoS* memiliki konsentrasi tiamin yang lebih tinggi dari galur induk BW25113 yaitu 18,574 g/g DCW dan 16,811 g/g DCW (Gambar 2). Konsentrasi tiamin yang terbentuk pada mutan *rpoS* mengalami peningkatan sebesar 9,5% dari galur induk ($\alpha \geq 95\%$). Terjadinya akumulasi tiamin pada mutan *rpoS* dalam kultivasi aerob dimana pada fase stasioner gen struktural yang memiliki regulasi negatif pada *rpoS* akan meningkat ekspresinya. Hal ini sejalan dengan pemaparan (Dong and Schellhorn 2009b) menyatakan bahwa global regulator *rpoS* memiliki regulasi negatif terhadap gen struktural *thiI* dan metabolisme purin yang merupakan gen dan jalur metabolisme berperan dalam pembentukan tiamin secara *de novo* (Gambar 5B). Peningkatan pertumbuhan juga dapat terjadi karena tiamin berperan sebagai senyawa intermediet sintesis tiamin difosfat yang merupakan koenzim pada beberapa enzim yang berperan dalam metabolisme karbohidrat diantaranya piruvat dehidrogenase kompleks (PDHc), oxoglutarat dehidrogenase (OGDH), α -ketoglutarat dehidrogenase dan transketolase (TK) (Jordan 2003, Lonsdale 2006b, Bunik et al. 2013).

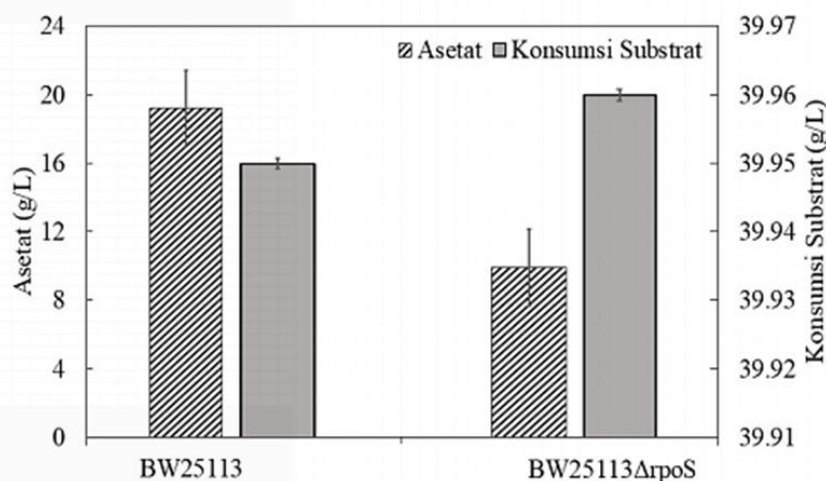
Peningkatan aktivitas siklus krebs berdasarkan nilai bobot sel kering pada kondisi aerob dan glukosa tinggi yaitu pada galur induk sebesar 0,428 g/l dan mutan *rpoS* sebesar 0,547 g/l (Gambar 2) disebabkan oleh mutan *rpoS* menstimulus ekspresi gen *gltA* dan menekan ekspresi gen *arcA* yang memiliki respon negatif terhadap *gltA* (Dong and Schellhorn 2009a; Suryadarma *et al.* 2012). Selain itu, peningkatan pertumbuhan mutan *rpoS* berdasarkan nilai bobot sel kering juga sejalan dengan biosintesis molekul esensial pada metabolisme sel *Escherichia coli* yaitu tiamin. Namun, akumulasi tiamin tersebut bukan berasal dari metabolisme karbon sentral akan tetapi biosintesis tiamin secara *de novo* melalui jalur metabolisme purin dan sistein (Gambar 5B).

Menurut Lakaye *et al.* (2004), akumulasi tiamin juga dipengaruhi oleh keberadaan substrat pada proses kultivasi. Keberadaan substrat pada medium kultivasi berperan sebagai sumber karbon yang digunakan pada aktivitas glikolisis hingga menuju jalur siklus krebs atau pembentukan metabolit lainnya. Berdasarkan hasil kultivasi selama 24 jam, kedua galur tersebut memiliki konsumsi substrat sebesar 39,96 g/l dan 39,95 g/l (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan glukosa kedua galur tersebut hampir sama dimana konsentrasi glukosa awal hampir seluruhnya dikonsumsi pada jam ke-24. Penggunaan substrat pada galur mutan *rpoS* saat kondisi oksigen tinggi dan glukosa tinggi lebih mengarah pada aktivitas pertumbuhannya atau

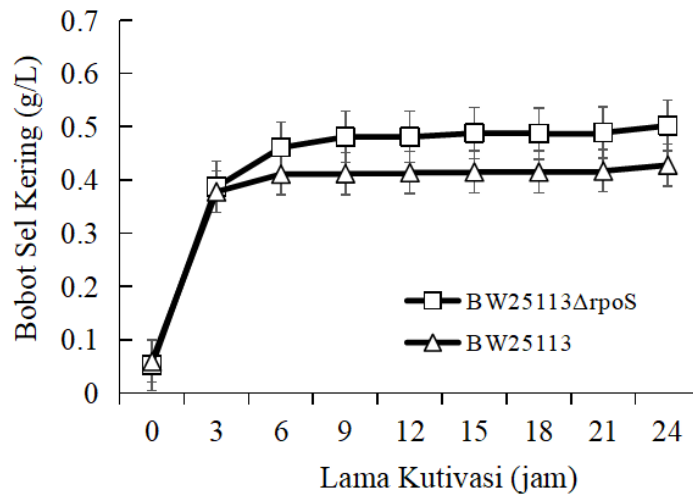
jalur siklus krebs. Hal ini dapat terlihat pada Gambar 4 dimana mutan *rpoS* ketika memasuki jam ke-6 hingga jam ke-24 terus mengalami peningkatan pertumbuhan berdasarkan dari nilai DCW nya dibandingkan dengan galur induk.

Adapun penggunaan substrat pada galur induk lebih berkontribusi pada jalur pembentukan asetat karena kondisi stres oksidatif membuat *rpoS* meningkat regulasinya terhadap gen yang terlibat pada jalur pembentukan asetat yaitu *poxB* (Rahman *et al.* 2006, Suryadarma *et al.* 2012). Hal ini terdapat pada Gambar 3, asetat yang terbentuk pada galur induk lebih tinggi yaitu sebesar 19,204 g/L dari mutan *rpoS* yaitu 9,88 g/l. Pada penelitian lain, dimana mutan *rpoS* dikultivasi selama 72 jam pada kondisi oksigen tinggi dan glukosa tinggi menunjukkan bahwa pada galur BW25113- $\Delta rpoS$ lebih cepat menggunakan substrat pada jam ke-24 hingga habis digunakan pada jam ke-72 (Suryadarma *et al.* 2012).

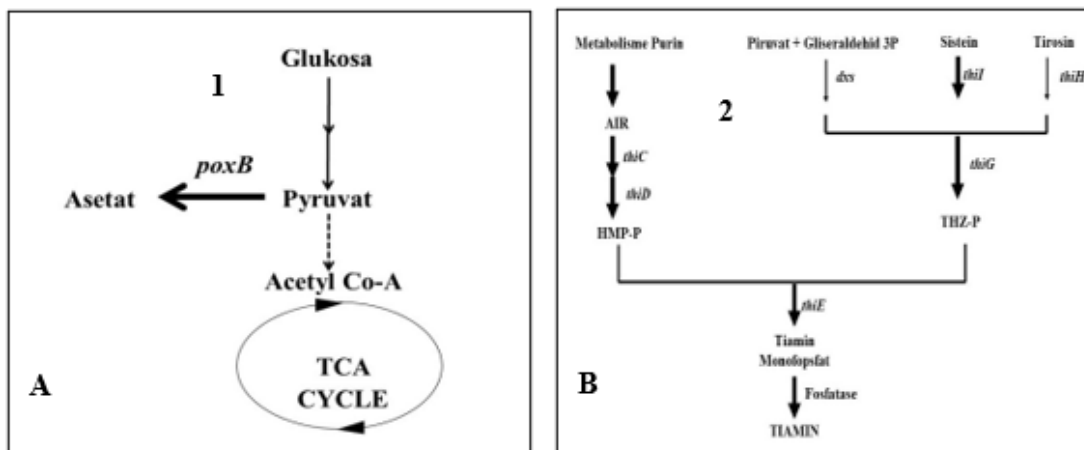
Fenomena pertumbuhan pada *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan BW25113- $\Delta rpoS$ (galur mutan) sebagai pendukung data sebelumnya juga dapat dikonfirmasi melalui profil pertumbuhan kedua galur tersebut pada kondisi aerob dan glukosa tinggi. Hasil penelitian ini, galur induk dan mutan *rpoS* memiliki nilai bobot sel kering atau *dry cell weight* (DCW) yang sama pada fase eksponensial atau saat memasuki jam ke-3. Namun, ketika memasuki jam ke-6 dan ke-9 mutan *rpoS* memiliki DCW lebih tinggi dan terus mengalami peningkatan hingga jam ke-24 dari galur induk (Gambar 4).



Gambar 3 Nilai asetat dan konsumsi substrat pada *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan BW25113- $\Delta rpoS$ (galur mutan) pada kecepatan rotasi kultur bergoyang 200 rpm selama 24 jam



Gambar 4 Profil pertumbuhan *Escherichia coli* BW25113 (galur induk) dan BW25113- $\Delta rpoS$ pada kecepatan rotasi kultur bergoyang 200 rpm



Keterangan : \leftarrow = Regulasi positif *rpoS*; \leftarrow - - - =Regulasi negatif *rpoS*; 1. Efek Oksigenasi; 2. Efek mutan *rpoS* (Dong dan Schellhorn 2009b); AIR (Aminoimidazol Ribotid); HMP-P (Hidroksimetil-pirimidin-pirofosfat); THZ-P (Tiazol fosfat)

Gambar 5 (A) Metabolisme karbon pusat pada *E.coli* BW25113 (galur induk) (B) Biosintesis timin secara de novo melalui metabolime purin pada *E.coli* BW25113- $\Delta rpoS$

Peningkatan DCW yang terjadi pada mutan *rpoS* menunjukkan bahwa pada kondisi aerob dan glukosa tinggi pertumbuhan mutan *rpoS* lebih mengarah ke jalur siklus krebs dan terhindar dari jalur metabolisme pembentukan produk samping yaitu asetat. Selain itu, hal ini dapat terjadi karena gen global regulator *rpoS* memiliki regulasi negatif terhadap beberapa gen yang berperan pada siklus krebs (*gltA*, *icdA*, *mdh*, *sdhA*, *sdhC*) dan memiliki regulasi positif pada jalur pembentukan asetat sehingga arah sentral karbon galur induk lebih cenderung mengarah ke pembentukan asetat melalui jalur *poxB* atau jalur *ackA-pta* (Gambar 3) (Rahman *et al.* 2006, Suryadarma *et al.* 2012).

Kondisi oksigenasi tinggi dan glukosa tinggi pada mutan *rpoS* tetap dapat mempertahankan akumulasi tiamin dan pertumbuhannya dibandingkan dengan galur induk karena keberadaan tiamin sebagai respon stres lingkungan dan juga enzim-enzim yang berperan pada jalur pertumbuhan bergantung pada tiamin difosfat yang merupakan derivatif dari tiamin. Hal tersebut sejalan dengan pemaparan (Gigliobianco *et al.* 2013) peristiwa proton *motive force* pada aliran elektron rantai respirasi untuk menghasilkan ATP membutuhkan sintesis tiamin.

Strategi peningkatan akumulasi tiamin melalui peningkatan oksigenasi dan penghilangan *rpoS* dapat terjadi karena adanya oksigen tinggi

dan glukosa tinggi pada kultur sel *Escherichia coli* sehingga mengalami stres oksidatif yang akan menstimulus biosintesis tiamin sebagai prekursor koenzim pada enzim – enzim yang berperan dalam metabolisme karbon pusat, namun pertumbuhannya terhambat karena terjadinya *overflow metabolism* (peningkatan asetat) (Gambar 5A). Adapun penghilangan *rpoS* metabolisme karbon sentral cenderung mengarah ke jalur pertumbuhan sel dan juga akan berpengaruh pada akumulasi peningkatan tiamin karena gen *rpoS* memiliki regulasi negatif terhadap metabolisme purin dan gen yang berperan pada jalur biosintesis tiamin (Gambar 5B).

KESIMPULAN

Peningkatan oksigenasi pada kultur sel *Escherichia coli* mampu meningkatkan akumulasi tiamin dari 11,870 g/g DCW menjadi 16,811 g/g DCW atau mengalami peningkatan sebesar 40 %. Peningkatan akumulasi tiamin lebih lanjut diperoleh melalui penghilangan *rpoS* dan mampu meningkatkan akumulasi tiamin dari 16,811 g/g DCW menjadi 18,574 g/g DCW atau mengalami peningkatan sebesar 9,5 % dari galur induk yang dikultivasi pada tingkat oksigenasi yang tinggi (kecepatan rotasi kultur bergoyang 200 rpm).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan atas dukungan biaya penelitian dan juga terima kasih kepada National BioResource Project National Institute of Genetic (NIG), Mishima, Japan atas kultur *Escherichia coli* BW25113 dan BW25113- Δ *rpoS*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aleshin, V.A., Mkrtychyan, G.V., Bunik, V.I. 2019. Mechanisms of Non-coenzyme Action of Thiamine: Protein Targets and Medical Significance. *Biochemistry (Moscow)*, 84(8), 829–850. <https://doi.org/10.1134/S0006297919080017>
- Bettendorff, L., Wins, P. 2009. Thiamin diphosphate in biological chemistry: New aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. *FEBS Journal*, 276(11), 2917–2925. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07019.x>
- Bunik, V.I., Tylicki, A., Lukashev, N.V. 2013. Thiamin diphosphate-dependent enzymes: From enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. *FEBS Journal*, 280(24), 6412–6442. <https://doi.org/10.1111/febs.12512>
- Dong, T., Schellhorn, A.E.H. 2009a. Control of *rpoS* in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. *Mol Genet Genomics*, 281, 19–33. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0389-3>
- Dong, T., Schellhorn, H.E. 2009b. Global effect of *rpoS* on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics*, 10, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-349>
- Du, Q., Wang, H., Xie, J. 2011. Thiamin (vitamin B1) biosynthesis and regulation: A rich source of antimicrobial drug targets? *International Journal of Biological Sciences*, 7(1), 41–52. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7.41>
- Eisentark, A., Calcutt, M.J., Becker-Hapak, M., Ivanova, A. 1996. Role of *Escherichia coli rpoS* and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 21(7), 975–993.
- Gigliobianco, T., Gangolf, M., Lakaye, B., Pirson, B., Von Ballmoos, C., Wins, P., Bettendorff, L. 2013. An alternative role of FoF1-ATP synthase in *Escherichia coli*: Synthesis of thiamine triphosphate. *Scientific Reports*, 3(1071), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01071>
- Gigliobianco, T., Lakaye, B., Wins, P., El Moualij, B., Zorzi, W., Bettendorff, L. 2010. Adenosine thiamine triphosphate accumulates in *Escherichia coli* cells in response to specific conditions of metabolic stress. *BMC Microbiology*, 10, 148. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-148>
- Hollenbach, A.D., Dickson, K.A., Washabaugh, M.W. 2002. Thiamin transport in *Escherichia coli*: The mechanism of inhibition by the sulfhydryl-specific modifier N-ethylmaleimide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1564(2), 421–428. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00477-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00477-7)
- Jordan, F. 2003. Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Natural*

- Product Reports*, 20(2), 184–201. <https://doi.org/10.1039/b111348h>
- Jung, I.L., Kim, I.G. 2003. Thiamine protects against paraquat-induced damage: Scavenging activity of reactive oxygen species. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 15(1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2003.08.001>
- Kawasaki, T., Iwashima, A., Nose, Y. 1969. Regulation of thiamine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 65(3), 407–416. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129028>
- Kowalska, E., Kujda, M., Wolak, N., Kozik, A. 2012. Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress. *FEMS Yeast Research*, 12(5), 534–546. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00804.x>
- Kumar, R.R., Prasad, S. 2011. Metabolic Engineering of Bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), 403–409. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0172-8>
- Lakaye, B., Wirtzfeld, B., Wins, P., Grisar, T., Bettendorff, L. 2004. Thiamine Triphosphate, a New Signal Required for Optimal Growth of *Escherichia coli* during Amino Acid Starvation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 17142–17147. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313569200>
- Lonsdale, D. 2006a. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/ecam/nek009>
- Lonsdale, D. 2006b. A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/ecam/nek009>
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ojima, Y., Suryadarma, P., Tsuchida, K., Taya, M. 2012. Accumulation of pyruvate by changing the redox status in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 34, 889–893. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0842-y>
- Rahman, M., Hasan, M.R., Oba, T., Shimizu, K. 2006. Effect of *rpoS* Gene Knockout on the Metabolism of *Escherichia coli* During Exponential Growth Phase and Early Stationary Phase Based on Gene Expressions, Enzyme Activities and Intracellular Metabolite Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(3), 585–595. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Suryadarma, P., Ojima, Y., Fukuda, Y., Akamatsu, N., Taya, M. 2012. The *rpoS* deficiency suppresses acetate accumulation in glucose-enriched culture of *Escherichia coli* under an aerobic condition. *Front. Chem. Sci. Eng*, 6(2), 152–157. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1287-0>
- Tian, K., Niu, D., Liu, X., Prior, B. A., Zhou, L., Lu, F., Singh, S., Wang, Z. 2016. Limitation of thiamine pyrophosphate supply to growing *Escherichia coli* switches metabolism to efficient d-lactate formation. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(1), 182–188. <https://doi.org/10.1002/bit.25699>
- Zakrzewska, A., Van Eikenhorst, G., Burggraaff, J.E.C., Vis, D.J., Hoefsloot, H., Delneri, D., Oliver, S.G., Brul, S., Smits, G.J. 2011. Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), 4435–4446. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0721>