



## **Isolation and Cloning Partial *Pall* Gene from Isomaltulose Producing Bacteria *Klebsiella* sp. Ax11S and *Klebsiella* sp. AxMC**

**Student** : Eli Komalawati  
Final Project (2010), Degree program in Microbiology, School of Life Sciences and Technology-ITB,  
email: eli\_komalawati@yahoo.com

**Advisors** : Dr.Sony Suhandono  
School of Life Sciences and Technology-ITB,  
email: sony@sith.itb.ac.id

**Degree** : Degree Sains (S.Si), Conferred October 2010

### **Abstract**

Isomaltulose ( $\alpha$ -D-glucosylpyranosyl-1,6-D-fructofuranose) or palatinosa is a functional isomer of sucrose which has physical and organoleptic properties similar to sucrose except its sweetness level is about 42% of sucrose. Isomaltulose is non-cariogenic, non-mutagenic, and digested in a longer period than sucrose so it is safe for diabetics and ideal sugar as a sucrose substitute. Several species of bacteria have been known to produce isomaltulose. Isomaltulose synthase or sucrose isomerase is an enzyme that plays a role in isomerization of sucrose into isomaltulose which is encoded by the *Pall* gene. Results from previous studies, it was found that *Klebsiella* sp. Ax11S isolated from sapodilla (*Manilkara zapota* (L) P. Van Royen) and *Klebsiella* sp. AxMC isolated from *Mangifera indica* L. var. Cengkir was able to produce isomaltulose. The aim of this research is to isolate *Pall* genes from both bacteria and to clone those genes into pJET1.2/blunt cloning vector. Amplification of *Pall* genes by PCR produce fragments of size ~1600 bp. DNA fragment was successfully ligated into the pJET1.2/blunt cloning vector and transformed *Escherichia coli* Top10. Nucleotide sequences from sequencing results was translated into amino acid sequences. Amino acid alignment using BLAST P programme showed 97% homology of *Klebsiella* sp. Ax11S with the amino acid sequences of 'isomaltulose synthase' *Klebsiella* sp. LX3 (accession number AAK82938.1), whereas *Klebsiella* sp. AxMC showed 99% homology with *Klebsiella* sp. LX3. Others characteristic in *Klebsiella* sp. LX3 like the five important residues in *Pall* i.e. D<sup>241</sup>, E<sup>295</sup>, D<sup>369</sup>, H<sup>145</sup> and H<sup>368</sup>, and also <sup>325</sup>RLDRD<sup>329</sup> isomerization motif presented in both fragments. This

results proved that the *Pall* genes from both fragments is a partial *Pall* genes and suggesting that both fragments may have similar enzyme activity as *Pall* from *Klebsiella* sp. LX3.

Keyword : Isomaltulose, *Pall* gene, Sucrose isomerase, Palatinose

## **Isolasi dan Kloning Gen *Pall* Parsial dari Bakteri Penghasil Isomaltulosa *Klebsiella* sp. Ax11S dan *Klebsiella* sp. AxMC**

**Mahasiswa** : Eli Komalawati

Skripsi (2010), Program Studi Sarjana Mikrobiologi SITH-ITB,  
email: eli\_komalawati@yahoo.com

**Pembimbing** : Dr. Sony Suhandono

SITH-ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

**Gelar** : Sarjana Sains (S.Si), Wisuda Oktober 2010

### **Abstrak**

Isomaltulosa ( $\alpha$ -D-glukosilpiranosil-1,6-D-fruktofuranosa) atau palatinosa merupakan isomer fungsional dari sukrosa yang memiliki sifat fisika dan organoleptik yang mirip dengan sukrosa kecuali tingkat kemanisannya yang hanya 42% dari sukrosa. Isomaltulosa bersifat non-kariogenik, non-mutagenik, dan dicerna dalam jangka waktu yang lebih lama daripada sukrosa sehingga aman bagi penderita diabetes dan merupakan gula yang ideal sebagai pengganti sukrosa. Beberapa spesies bakteri telah diketahui dapat menghasilkan isomaltulosa. Isomaltulosa sintase atau sukrosa isomerase merupakan enzim yang berperan dalam proses isomerisasi sukrosa menjadi isomaltulosa yang dikode oleh gen *Pall*. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan ada dua bakteri yang dapat menghasilkan isomaltulosa yaitu isolat *Klebsiella* sp. Ax11S yang diisolasi dari buah sawo (*Manilkara zapota* (L) P. Van Royen) dan *Klebsiella* sp. AxMC yang diisolasi dari *Mangifera indica* L var. Cengkir. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi gen *Pall* dari bakteri tersebut dan memperbanyak gen tersebut dalam vektor kloning pJET1.2/blunt. Amplifikasi gen *Pall* dari kedua isolat bakteri dengan metode PCR menghasilkan fragmen berukuran ~1600 pb. Fragmen DNA tersebut telah berhasil diligasikan ke dalam vektor kloning pJET1.2/blunt dan diklon pada *Escherichia coli* Top10. Urutan basa nukleotida hasil sekuensing kemudian ditranslasi ke dalam urutan asam amino dan disejajarkan menggunakan program BLAST P. Berdasarkan hasil peninjauan asam amino terhadap data *Gene Bank*, diperoleh hasil isolat *Klebsiella* sp. Ax11S memiliki homologi sebesar 97% dengan *Klebsiella* sp. LX3 (nomor akses AAK82938.1), sedangkan isolat *Klebsiella* sp. AxMC memiliki homologi sebesar 99% dengan *Klebsiella* sp. LX3. Beberapa karakteristik seperti lima residu penting pada *Pall* yaitu D<sup>241</sup>, E<sup>295</sup>, D<sup>369</sup>, H<sup>145</sup> dan H<sup>368</sup> dan motif isomerisasi <sup>325</sup>RLDRD<sup>329</sup> yang terdapat pada *Klebsiella* sp. LX3 juga terdapat dalam sekuen kedua fragmen tersebut. Hasil ini membuktikan bahwa fragmen DNA berukuran ~1600 pb yang berhasil diisolasi dari kedua isolat merupakan fragmen gen *Pall* parsial dan kedua fragmen mungkin memiliki aktivitas enzim yang sama dengan *Pall* dari *Klebsiella* sp. LX3.

Kata kunci: Isomaltulosa, Gen *Pall*, Sukrosa isomerase, Palatinosa