

University of Groningen

## Unique features of several microbial $\alpha$ -amylases active on soluble and native starch

Sarian, Fean Davisunjaya

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Sarian, F. D. (2016). *Unique features of several microbial  $\alpha$ -amylases active on soluble and native starch.* University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

# Samenvatting

voor de leek



Fotosynthese is zonder twijfel één van de meest fundamentele processen welke het leven op Aarde voedt. Groene planten maken tijdens fotosynthese zuurstof en twee eenvoudige suikers, fructose en glucose, uit water en kooldioxide. Deze eenvoudige suikers worden of direct gebruikt voor het genereren van energie of worden omgezet in verschillende soorten onoplosbare koolhydraten zoals cellulose en zetmeel. Zetmeel is een onoplosbaar natuurlijk polymeer dat veelvuldig voorkomt in granen (mais, boon), wortels (tapioca, zoete aardappel), knollen (aardappel), fruit (banaan, mango) en merg (palm). Zetmeel wordt gebruikt in allerlei voedingsmiddelen, pillen, tabletten en een scala aan alledaagse producten zoals behangplaksel, tegellijm en verf. Veel energie en tijd is de afgelopen tien jaar gestoken in de omzetting van zetmeel in ethanol dat als biobrandstof of als basis voor allerlei chemicaliën gebruikt wordt.

Vanuit een chemisch perspectief bestaat zetmeel uit twee glucose polymeren: amylose en amylopectine. Deze twee polymeren worden gedeponerd in een korrel in de vorm van alternerende amorfe en kristallijne delen. De kristallijne structuur zorgt ervoor dat zetmeel korrels bij gematigde temperaturen niet oplosbaar zijn in water en daarom zijn de korrels moeilijk enzymatisch af te breken (**Hoofdstuk 1**). Wanneer zetmeel korrels in aanwezigheid van een overmaat aan water worden verwarmd, zwellen ze en lekt amylose uit de korrel. Op deze manier wordt het zetmeel gevoelig voor enzymatische afbraak.

In de Natuur wordt zetmeel door enzymen met de naam  $\alpha$ -amylase afgebroken. Deze enzymen verbreken de glucosidische binding tussen de glucose eenheden van het polymeer waarbij korte oligosachariden en glucose gevormd worden.  $\alpha$ -Amylasen hebben een beperkte interactie met de zetmeel korrel als gevolg van de fysische en chemische eigenschappen van de korrel en het zetmeel. Enzymatische afbraak van zetmeel korrels is de afgelopen tientallen jaren intensief bestudeerd. Verschillen in de afbraak van de korrel zijn het gevolg van het type en de morfologie van de korrel, de mate van kristalliniteit en de aan/af-wezigheid van poriën en kanalen (**Hoofdstuk 1**). Kennis van de factoren die van invloed zijn op de toegankelijkheid

van de zetmeel korrel voor  $\alpha$ -amylasen is van belang voor het gebruik van zetmeel in allerlei industriële toepassingen en voor het vergroten van ons inzicht in de vertering van zetmeel door mens en dier. Dit proefschrift gaat in op verschillende van deze aspecten en beschrijft de resultaten van onderzoek aan de enzymatische afbraak van verschillende typen zetmelen door verschillende soorten microbiële enzymen. De actie van  $\alpha$ -amylasen op verschillende typen zetmeel werd geanalyseerd door het bepalen van de mate van afbraak van deze zetmelen met behulp van spectrofotometrie, vloeistof chromatografie en scanning elektronen microscopie (SEM).

De mate waarin enkele tropische zetmelen werden afgebroken, werd vergeleken met de mate van afbraak van mais zetmeel door de hoeveelheid zetmeel welke overbleef en de hoeveelheid glucose welke werd gevormd, te bepalen (**Hoofdstuk 2**). Met het commercieel verkrijgbare enzym preparaat Stargen<sup>TM</sup> 002, een mengsel van  $\alpha$ -amylase en glucoamylase, werd meer dan 70% afbraak van sago en zoete aardappel zetmeel korrels gevonden. Deze waarden waren vergelijkbaar met die van mais zetmeel korrels (75%). In tegenstelling hiermee was de mate van afbraak van pijlwortel (arrow root), eetbare canna en aardappel zetmeel korrels (25% of minder). De korrels die overbleven na enzymatische afbraak werden bestudeerd met behulp van SEM. Hieruit bleek dat met Stargen<sup>TM</sup> 002 behandelde mais en sago zetmeel korrels een sterke erosie van het oppervlakte was opgetreden. Een heel beperkt aantal planten welke zetmeel produceren worden op dit moment gebruikt als grondstof voor industriële verwerking; mais, tarwe en rijst (zaden) en aardappel en tapioca (wortels en knollen). De resultaten van **Hoofdstuk 2** laten zien dat ook sago en zoete aardappel zetmeel gebruikt kan worden voor de duurzame productie van glucose en daarmee ook als grondstof voor de productie van ethanol.

Nieuwe bacterie stammen geïsoleerd van plekken rijk aan zetmeel kunnen veelbelovende bronnen zijn van nieuwe amylasen. Amylase-producerende micro-organismen zijn geïsoleerd van allerlei plekken zoals de bodem rondom graan molens, traditionele boeren markten, boerderijen en zetmeel fabrieken. In dit

---

onderzoek werd een aardappel zetmeel-afbrekende bacterie stam geïsoleerd uit de afvalwater zuivering van een aardappelzetmeel fabriek van AVEBE. (**Hoofdstuk 3**). Deze nieuwe stam bleek te behoren tot de soort *Microbacterium aurum* en kreeg de naam *M. aurum* B8.A. Een  $\alpha$ -amylase kon gedeeltelijk gezuiverd worden uit een kweek van *M. aurum* B8.A (**Hoofdstuk 3**). Het bleek dat dit enzym verschillende soorten zetmeelkorrels (tarwe en aardappel) goed kon afbreken.

In een vervolg onderzoek werd het gen dat codeert voor het amylase van *M. aurum* B8.A opgespoord en in kaart gebracht (**Hoofdstuk 4**). Gedetailleerde analyse van de aminozuur volgorde van het corresponderende eiwit, MaAmyA, liet zien dat dit een ongewoon groot eiwit is dat naast een typisch katalytisch domein ook nog verschillende zetmeel bindingsdomeinen (CBM25), fibronectine-achtige domeinen alsook een 300 aminozuur groot C-terminaal deel bevat (verdere details zijn in **Hoofdstuk 1** en **4** te vinden). Het C-terminale domein heeft geen enkele overeenkomst met bekende  $\alpha$ -amylase domeinen. Het is nog niet duidelijk welke rol dit C-terminale domein speelt; het kan een verlenging zijn van het bindingsdomein maar ook net zo goed betrokken zijn bij de zetmeel afbraak. De rol van de CBM25 domeinen werd nader bestudeerd door deze domeinen te verwijderen uit het enzym. Dit leidde tot verlies van enzym activiteit (**Hoofdstuk 4**).

De aanwezigheid van  $\alpha$ -amylasen in bacteriën uit zee is verrassend omdat er geen zetmeel in zee te vinden is. Acht van de twintig bacteriële isolaten uit het Jelly Fish meer op Kakaban eiland, Indonesië, een van zee afgesloten zout meer, hadden een duidelijke zetmeel-afbrekende activiteit (**Hoofdstuk 5**). Eén van deze isolaten, *Bacillus megaterium* NL3, welke van een zee anemoon afkomstig is, vertoonde de hoogste  $\alpha$ -amylase activiteit. Dit  $\alpha$ -amylase, aangeduid als BmaN1, heeft net als vijf andere *Bacillus* amylasen, twee afwijkende kenmerken (**Hoofdstuk 5**). Op basis van een vergelijking van de aminozuur volgorde van BmaN1 en de vijf andere *Bacillus*  $\alpha$ -amylasen met bekende  $\alpha$ -amylasen en de vergelijking van een 3D eiwit model van BmaN1 met een bekende  $\alpha$ -amylase eiwit 3D structuur werd geconcludeerd dat in BmaN1 één van de twee geconserveerde aspartaat residuen welke betrokken is bij

de katalyse niet aanwezig was. Normaal zijn  $\alpha$ -amylasen welke één of meerdere van de drie katalytische aminozuur residuen missen enzymatisch niet actief. De resultaten in **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift laten zien dat BmaN1 in staat is om zetmeel af te breken tot glucose en oligosachariden. Ook suggereren deze resultaten dat BmaN1 en de andere vijf nauw verwante *Bacillus*  $\alpha$ -amylasen een nieuwe subfamilie van de  $\alpha$ -amylasen vertegenwoordigen. Verdere studies aan deze enzymen, inclusief mutagenese en kristallisatie van het eiwit in combinatie met 3D structuur analyse zullen meer licht moeten werpen op deze nieuwe  $\alpha$ -amylasen.

In dit proefschrift wordt naast de identificatie van nieuwe type  $\alpha$ -amylasen de verspreiding van extracellulaire amylasen in verschillende milieus alsook de biotechnologische toepassing van amylase-producerende bacteriën beschreven.

