

**PENGOPTIMUMAN PENGHASILAN DAN PENULENAN ENZIM
KERATINASE DARIPADA *MICROSPORUM GYPSEUM* S(F)23
PENCILAN TEMPATAN MENGGUNAKAN FERMENTASI
KULTUR TENGGELAM**

oleh

SYAZNI ZAINUL KAMAL

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi keperluan bagi
Ijazah Sarjana Sains**

Julai 2009

PENGHARGAAN

Syukur kepada Allah swt, kerana atas limpah rahmat dan kurnianya dapat saya menyiapkan kajian ini.

Saya ingin mengucapkan jutaan terima kasih kepada penyelia saya, Prof Darah Ibrahim di atas segala tunjuk ajar, bimbingan dan bantuan sepanjang tempoh kajian ini. Pendapat beliau telah banyak membantu saya di dalam kajian ini.

Selain itu, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih buat kakitangan Unit Mikroskop Elektron serta semua staf USM di atas segala bantuan yang diberikan.

Buat teman-teman seperjuangan di Makmal Penyelidikan Industrial Bioteknologi, Pusat Pengajian Sains Kaji Hayat, terima kasih di atas dorongan serta kata-kata perangsang dari kalian. Tunjuk ajar, bimbingan serta nasihat dari kalian sentiasa menjadi pedoman dan jasa kalian sentiasa dikenang. Semoga kalian beroleh kejayaan yang cemerlang.

Akhir sekali, tidak dilupakan buat mak, abah, adik-adik serta suami yang sentiasa menjadi perangsang dan pembakar semangat untuk saya menyiapkan tesis ini. Terima kasih buat doa kalian.

KANDUNGAN

	muka surat
PENGHARGAAN	II
KANDUNGAN	III
SENARAI JADUAL	XI
SENARAI RAJAH	XII
SENARAI GAMBARFOTO	XV
SENARAI LAMPIRAN	XVI
SENARAI SINGKATAN	XVII
ABSTRAK	XVIII
ABSTRACT	XX
BAB 1 PENGENALAN	1
1.1 Bulu ayam dan masalah pencemaran	1
1.2 Objektif penyelidikan	5
BAB 2 TINJAUAN BACAAN	7
2.1 Keratin	7
2.2 Enzim keratinase	8
2.3 Mekanisme keratinolisis	10
2.3.1 Keratinolisis mekanikal	10
2.3.2 Sulfitolisis	12

2.3.3	Turutan tindak balas di dalam mekanisme keratinolisis	15
2.4	Mikroorganisma penghasil enzim keratinase	16
2.4.1	Kulat	18
2.4.1.1	Kulat dermatofit	19
2.4.2	Bakteria	22
2.4.3	Aktinomiset	25
2.5	Pemilihan sumber pencilan	26
2.6	Teknik pemencilan	26
2.7	Cara penghasilan enzim keratinase	28
2.7.1	Fermentasi kultur tenggelam	28
2.7.1.1	Faktor fisiologi	29
2.7.1.2	Faktor fizik	30
2.7.2	Fermentasi keadaan pepejal	32
2.8	Penulenan dan pencirian enzim keratinase	36
2.8.1	Sifat-sifat fiziko-kimia enzim keratinase tulen	38
2.9	Aplikasi keratinase	42
2.9.1	Protein bulu ayam sebagai makanan tambahan ternakan	42
2.9.2	Protein bulu ayam sebagai baja organik	44
2.9.3	Industri kulit	46
2.9.4	Penguraian protein prion	47
2.9.5	Penghasilan biohidrogen	48
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	49
3.1	Kaedah am	49

3.1.1	Penimbangan bahan	49
3.1.2	Penentuan pH	49
3.1.3	Penentuan ketumpatan optik	49
3.1.4	Pensterilan	49
3.2	Pemencilan kulat keratinolisis dan keratinofili dari kawasan sekitar Pulau Pinang	50
3.3	Penyaringan kulat penghasil enzim keratinase menggunakan medium cecair	51
3.4	Penyediaan substrat berkeratin daripada sumber bulu ayam	52
3.5	Penyediaan ampaian inokulum	52
3.6	Analisis parameter pemfermentasian	54
3.6.1	Penentuan aktiviti enzim keratinase	54
3.6.2	Penentuan protein	55
3.6.3	Penentuan berat kering bahan tidak larut	56
3.7	Pengecaman pencilan kulat terpilih	56
3.7.1	Pengecaman ciri koloni kultur pada medium agar	57
3.7.2	Pengecaman secara mikroskopik melalui mikroskop cahaya	57
3.7.3	Pengecaman secara mikroskopik melalui mikroskop elektron penskanan (SEM)	57
3.8	Pengoptimuman penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporum gypseum</i> S(F)23 menggunakan fermentasi kultur tenggelam	58
3.8.1	Mikroorganisma dan penyelenggaraannya	58
3.8.2	Pengoptimuman keadaan pengkulturan	59
3.8.2.1	Penentuan kadar goncangan optimum bagi penghasilan enzim keratinase	59

	3.8.2.2	Penentuan nilai pH optimum bagi penghasilan enzim keratinase	60
	3.8.2.3	Penentuan saiz inokulum optimum bagi penghasilan enzim keratinase	60
	3.8.2.4	Penentuan suhu optimum bagi penghasilan enzim keratinase	60
	3.8.2.5	Profil penghasilan enzim keratinase selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan	61
	3.8.3	Pengoptimuman komposisi medium	61
	3.8.3.1	Kesan penambahan sumber karbon terhadap penghasilan enzim keratinase	62
	3.8.3.2	Kesan penambahan sumber nitrogen terhadap penghasilan enzim keratinase	62
	3.8.3.3	Penentuan kepekatan pepton yang optimum sebagai sumber nitrogen bagi penghasilan enzim keratinase	63
	3.8.3.4	Kesan penambahan bahan aruh berbeza terhadap penghasilan enzim keratinase	63
	3.8.3.5	Penentuan kepekatan bulu ayam dikisar sebagai bahan aruh bagi penghasilan enzim keratinase	63
	3.8.3.6	Profil penghasilan enzim keratinase selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium	64
3.9		Penulenan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	64
	3.9.1	Penghasilan enzim keratinase untuk penulenan enzim	64
	3.9.2	Penentuan aktiviti enzim keratinase dan kepekatan protein	65
	3.9.3	Penulenan enzim keratinase	65
	3.9.3.1	Pemekatan enzim menggunakan sistem	65

	Amicon Centricon 3 kDa	
	3.9.3.2 Kromatografi penurasan gel Sefadeks G-75	65
	3.9.3.3 Penentuan protein	66
	3.9.3.4 Penentuan ketulenan enzim keratinase	67
3.10	Pencirian enzim keratinase kasar dan tulen	69
3.10.1	Kesan pH ke atas aktiviti enzim keratinase kasar dan tulen	69
3.10.2	Kestabilan pH ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	69
3.10.3	Kesan suhu ke atas aktiviti enzim keratinase kasar dan tulen	70
3.10.4	Kestabilan suhu ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	70
3.10.5	Kesan ion logam ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	70
3.10.6	Spesifikasi substrat ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	71
BAB 4	KEPUTUSAN	72
4.1	Pemencilan kulat keratinolisis dan keratinofili dari kawasan sekitar Pulau Pinang	72
4.2	Penyaringan kuantitatif penghasilan enzim keratinase menggunakan sistem pemfermentasian kultur tenggelam	76
4.3	Pengecaman pencilan kulat terpilih	83
4.4	Pengoptimuman penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 menggunakan fermentasi kultur tenggelam	86
4.4.1	Profil awal penghasilan enzim keratinase sebelum pengoptimuman oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	88
4.4.2	Pengoptimuman keadaan pengkulturan	90
4.4.2.1	Kesan kadar goncangan terhadap penghasilan	90

	enzim keratinase	
4.4.2.2	Kesan pH awal medium pengkulturan terhadap penghasilan keratinase	92
4.4.2.3	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan enzim keratinase	94
4.4.2.4	Kesan suhu pengkulturan terhadap penghasilan enzim keratinase	96
4.4.2.5	Profil penghasilan enzim keratinase pada keadaan pengkulturan optimum	98
4.4.3	Pengoptimuman komposisi medium pengkulturan	100
4.4.3.1	Kesan penambahan sumber karbon ke atas penghasilan enzim keratinase	100
4.4.3.2	Kesan penambahan sumber nitrogen ke atas penghasilan enzim keratinase	103
4.4.3.3	Kesan penambahan pepton dengan kepekatan berbeza	105
4.4.3.4	Kesan penambahan bahan aruh yang berbeza ke atas penghasilan enzim keratinase	107
4.4.3.5	Kesan penambahan bulu ayam dikisar pada kepekatan berbeza	109
4.4.3.6	Profil penghasilan enzim keratinase selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium	111
4.4.4	Ringkasan pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium	113
4.5	Penulenan dan pencirian enzim keratinase daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	115
4.5.1	Penulenan enzim keratinase daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	115
4.5.2	Ketulenan enzim keratinase	119

4.5.3	Penentuan berat molekul enzim keratinase tulen daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	119
4.5.4	Pencirian enzim keratinase kasar dan tulen yang dihasilkan oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	122
4.5.4.1	Kesan pH terhadap aktiviti enzim keratinase kasar dan tulen	122
4.5.4.2	Kesan pH ke atas kestabilan enzim keratinase tulen	122
4.5.4.3	Kesan suhu terhadap aktiviti enzim keratinase kasar dan tulen	124
4.5.4.4	Kesan suhu ke atas kestabilan enzim keratinase tulen	124
4.5.4.5	Kesan penambahan ion logam ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	126
4.5.4.6	Spesifikasi substrat ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	126
BAB 5	PERBINCANGAN	129
5.1	Pemilihan kawasan bagi penyampelan	129
5.2	Kulat penghasil enzim keratinase	130
5.3	Pengoptimuman penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 menggunakan fermentasi kultur tenggelam	133
5.4	Penulenan dan pencirian enzim keratinase daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23	150
BAB 6	KESIMPULAN	156
	RUJUKAN	160
	LAMPIRAN	174

SENARAI JADUAL

	muka surat
Jadual 1.1 Kandungan (g/kg) protein dan asid amino bagi protein bulu ayam yang telah diproses berbanding yang belum diproses	3
Jadual 2.1 Mikroorganisma penghasil enzim keratinase	17
Jadual 2.2 Spesies dermatofit mengikut pengelasan ekologi	21
Jadual 2.3 Keadaan pengkulturan bagi penghasilan enzim keratinase melalui fermentasi kultur tenggelam	33
Jadual 2.4 Strategi penulenan enzim keratinase	37
Jadual 2.5 pH optimum dan kestabilan pH enzim keratinase tulen	39
Jadual 2.6 Suhu optimum dan kestabilan suhu enzim keratinase tulen	41
Jadual 4.1 Pemencilan kulat keratinolisis dan keratinofili daripada sampel tanah di sekitar Pulau Pinang melalui teknik pengumpanan bahan berkeratin.	75
Jadual 4.2 Penyaringan awal kulat keratinolisis dan keratinofili	77
Jadual 4.3 Ringkasan penulenan enzim keratinase daripada <i>Microsporum gypseum</i> S(F)23	118
Jadual 4.4 Kesan penambahan ion logam terhadap aktiviti enzim keratinase tulen	127
Jadual 4.5 Kesan substrat protein ke atas aktiviti enzim keratinase tulen	128

SENARAI RAJAH

		muka surat
Rajah 4.1	Profil penghasilan enzim keratinase oleh pencilan S(F)23 (A), S(H)15 (B), CP(F)5 (C), M(F)17 (D) dan CP(H)27 (E).	82
Rajah 4.2	Profil penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 sebelum pengoptimuman. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	89
Rajah 4.3	Kesan kadar goncangan ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	91
Rajah 4.4	Kesan pH awal medium ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	93
Rajah 4.5	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	95
Rajah 4.6	Kesan suhu pengkulturan ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	97
Rajah 4.7	Profil penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 pada keadaan pengkulturan yang optimum. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	99
Rajah 4.8	Kesan penambahan sumber karbon 0.1% (b/i) ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	101
Rajah 4.9	Kesan penambahan sumber nitrogen 0.1% (b/i) ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i>	104

S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.

Rajah 4.10	Kesan penambahan pelbagai kepekatan pepton (%;b/i) ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	106
Rajah 4.11	Kesan penambahan pelbagai bahan aruh (%;b/i) ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	108
Rajah 4.12	Kesan penambahan pelbagai kepekatan bulu ayam dikisar (%;b/i) ke atas penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	110
Rajah 4.13	Profil penghasilan enzim keratinase selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23. (A) Aktiviti keratinase dan protein. (B) pH akhir dan berat kering bahan tidak larut.	112
Rajah 4.14	Ringkasan pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium yang dilakukan untuk meningkatkan penghasilan enzim keratinase oleh <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23.	114
Rajah 4.15	Profil pengelutan protein keratinase daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 melalui kromatografi turus penurasan gel Sefadeks G-75, kali pertama.	116
Rajah 4.16	Profil pengelutan protein keratinase daripada <i>Microsporium gypseum</i> S(F)23 melalui kromatografi turus penurasan gel Sefadeks G-75, kali kedua.	117
Rajah 4.17	Penentuan berat molekul enzim keratinase dengan kaedah SDS-PAGE.	121
Rajah 4.18	Kesan pH terhadap aktiviti enzim keratinase kasar dan enzim keratinase tulen.	123

Rajah 4.19	Kesan pH terhadap kestabilan enzim keratinase tulen	123
Rajah 4.20	Kesan suhu terhadap aktiviti enzim keratinase kasar dan enzim keratinase tulen	125
Rajah 4.21	Kesan suhu terhadap kestabilan enzim keratinase tulen	125

SENARAI GAMBARFOTO

		muka surat
Gambarfoto 2.1	Rambut yang dikoloni oleh <i>Chrysosporium queenslandicum</i> . (a) hakisan permukaan (b) hifa pengorek menggelembung (c) hifa pengorek lebar	13
Gambarfoto 2.2	Gambarajah SEM pembentukan hifa pengorek di atas rambut manusia	13
Gambarfoto 2.3	Langkah-langkah yang terlibat di dalam pemprosesan protein bulu ayam melalui degradasi oleh enzim keratinase PWD-1	45
Gambarfoto 3.1	Proses penghasilan substrat berkeratin daripada sumber bulu ayam	53
Gambarfoto 4.1	Pertumbuhan kulat di atas umpan selepas 4 minggu pengeraman pada suhu bilik ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	73
Gambarfoto 4.2	Pertumbuhan pencilan S(F)23 di atas medium agar dekstrosa Sabouraud selepas 10 hari pengeraman pada suhu bilik ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$)	84
Gambarfoto 4.3	Mikrograf pencilan S(F)23 di bawah mikroskop cahaya selepas 10 hari pertumbuhan di atas agar dekstrosa Sabouraud. Makrokonidia (MA), Mikrokonidia (MI).	85
Gambarfoto 4.4	Mikrograf pencilan S(F)23 di bawah mikroskop elektron penskanan (SEM) selepas 10 hari pertumbuhan di atas medium agar dekstrosa Sabouraud	87
Gambarfoto 4.5	Jalur protein tunggal yang terhasil selepas larutan protein puncak tunggal kromatografi gel Sefadex G-75 dituliskan dengan kaedah elektroforesis SDS-PAGE	120

SENARAI LAMPIRAN

	muka surat
Lampiran 1 Graf piawai bagi protein	174

SENARAI SINGKATAN

BSA	Bovin serum albumin
b/b	Berat per berat
b/i	Berat per isipadu
EDTA	Asid diamina tetraasetik
HCl	Asid hidroklorik
i/i	Isipadu per isipadu
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
mM	Milimolar
NaOH	Natrium hidroksida
psm	Pusingan per minit
SDS-PAGE	Elektroforesis gel poliakrilamida natrium dodesil sulfat
U	Unit

ABSTRAK

Bulu ayam yang mengandungi 90% keratin merupakan bahan buangan industri ternakan yang dihasilkan dalam kuantiti yang besar setiap tahun. Oleh itu, penyelidikan ini dirangka bagi menghasilkan enzim keratinase yang berupaya menghidrolisis keratin bulu ayam kepada protein serta asid amino yang berpotensi digunakan di dalam makanan ternakan. Pencilan yang digunakan dalam penghasilan enzim keratinase dicamkan sebagai *Microsporium gypseum*. Pencilan ini telah dipencilkan melalui kaedah pengumpanan substrat keratin dari sampel tanah kawasan kandang kuda di Georgetown, Pulau Pinang. *Microsporium gypseum* S(F)23 menghasilkan enzim keratinase secara ekstrasel dan mencapai aktiviti maksimum selepas 6 hari pengkulturan di dalam medium asas keratin. Pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium telah meningkatkan penghasilan enzim keratinase sebanyak 287.6% atau 0.903 U/ml berbanding sebelum sebarang pengoptimuman iaitu 0.233 U/ml. Keadaan pengkulturan yang optimum adalah kadar goncangan 150 psm, pH awal medium pengkulturan 8.0, suhu pengkulturan 30°C dan saiz inokulum 15% (i/i) 1.0×10^5 spora per ml. Manakala medium pengkulturan yang optimum adalah (b/i) bulu ayam, 1%; NaCl, 0.05%; KH_2PO_4 , 0.04%; K_2HPO_4 , 0.03% dan pepton, 0.5%. Keratinase adalah enzim aruhan dan hanya dihasilkan oleh *Microsporium gypseum* S(F)23 dengan kehadiran substrat keratin iaitu bulu ayam. Kehadiran glukosa di dalam medium kultur pada kepekatan yang rendah merencat aktiviti enzim keratinase. Enzim keratinase telah ditulenkan daripada kaldu fermentasi melalui penurasan ultra (sistem Amicon Centricon 3 kDa) dan kromatografi penurasan gel Sefadex G-75 sebanyak 2 kali. Penulenan dilakukan 7.411 kali ganda dan

hasil sebanyak 0.831% diperoleh dengan aktiviti spesifik 0.704 U/mg protein. Berat molekul enzim keratinase dianggarkan pada 27 000 Dalton menggunakan SDS-PAGE. Beberapa ciri biokimia enzim keratinase telah dikenalpasti. Keratinase tulen mempunyai pH optimum 8.0 dan stabil pada julat pH 7.0 hingga 8.0 serta mengekalkan 100% aktiviti setelah 2 jam pendedahan. Manakala suhu optimum bagi keratinase tulen adalah 40°C dan stabil pada julat suhu 37°C hingga 40°C dan mengekalkan lebih 80% aktiviti setelah 2 jam pendedahan. 1 mM Ca^{2+} dan Na^{2+} didapati meningkatkan aktiviti enzim keratinase. Manakala 1 mM Mg^{2+} , Zn^{2+} , Hg^+ , Ba^{2+} , Co^{2+} , K^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} dan EDTA merencatkan aktiviti enzim keratinase. Enzim keratinase mempunyai spesifikasi substrat yang luas dan aktif terhadap pelbagai substrat protein larut dan protein tidak larut.

**OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION AND PURIFICATION OF
KERATINASE BY A LOCAL ISOLATE OF *MICROSPORUM GYPSEUM* S(F)23
IN SUBMERGED FERMENTATION SYSTEM**

ABSTRACT

Chicken feathers which consist 90% keratin are produce as a waste by poultry processing industries in huge quantities every year. So, this research was developed to produce keratinase that are able to degrade keratin into protein and amino acid to be use in poultry dietary. The isolate that was used in the production of keratinase was identified as *Microsporium gypseum*. The isolate was isolated using a baiting technique from soil sample from a horse stable located in Georgetown, Pulau Pinang. *Microsporium gypseum* S(F)23 achieved maximum extracellular keratinase activity after 6 days of incubation. Optimization of cultural conditions and medium compositions showed an increment of 287.6% or 0.903 U/ml compared with the activity before optimization which was 0.233 U/ml. The optimum cultural conditions were agitation speed of 150 rpm, initial pH medium of 8.0, incubation temperature of 30°C and inoculum size 15% (v/v) 1.0×10^5 spores per ml. Meanwhile, optimal medium composition were (w/v) ground chicken feathers, 1%; NaCl, 0.05%; KH_2PO_4 , 0.04%; K_2HPO_4 , 0.03% and peptone, 0.5%. Keratinase is an inducible enzyme and only produced by *Microsporium gypseum* S(F)23 culture in the presence of keratin substrate, which are chicken feathers. The presence of glucose in the culture medium at low concentration inhibits keratinase activity. Keratinase was purified from the culture broth by ultrafiltration (Amicon Centricon 3 kDa system) and Sephadex G-75 gel filtration chromatography, twice. Peak was purified about 7.411 fold with a yield of 0.831% and specific activity of 0.704 U/mg protein. Its

molecular weight was estimated to be around 27 000 Dalton by SDS-PAGE. Some of the biochemical characteristics were identified. The purified keratinase had the optimum pH of 8.0 and stable at pH range of 8.0 to 9.0 and retained 100% activity after 2 hours. While optimum temperature for purified keratinase was 40°C and stable at temperature range from 37°C to 40°C and retained more than 80% activity after 2 hours. Furthermore, 1 mM of Ca²⁺ and Na²⁺ were found to activate keratinase activity while 1 mM of Mg²⁺, Zn²⁺, Hg⁺, Ba²⁺, Co²⁺, K⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ and EDTA inhibited keratinase activity. Keratinase had broad substrate specification and active towards soluble proteins and insoluble proteins.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Bulu ayam dan masalah pencemaran

Industri penternakan ayam di Malaysia semakin berkembang setiap tahun dengan disokong oleh sistem penternakan yang cekap menggunakan teknologi moden. Penghasilan daging ayam meningkat setiap tahun selaras dengan peningkatan permintaan, kesan daripada pertambahan bilangan penduduk, peningkatan ekonomi, perubahan corak hidup dan gaya pemakanan.

Bulu merupakan struktur vertebrata yang penting dan paling kompleks. Ia berfungsi dalam pergerakan dan membantu melindungi daripada air dan suhu sejuk (Onifade *et al.*, 1998). Bulu meliputi 10% daripada berat ayam. Setiap tahun, lebih daripada 7.7×10^8 kg bulu ayam dihasilkan daripada industri ternakan Eropah sebagai bahan buangan. Bulu ayam ini terkumpul dan menjadi punca kepada pencemaran alam sekitar (Grazziotin *et al.*, 2006). Masalah pencemaran oleh bulu ayam telah menarik perhatian ramai kerana ia sukar didegradasi secara semula jadi dengan kadar yang cepat. Sekitar 90% komponen bulu ayam terdiri daripada protein, di mana komponen utamanya adalah keratin (Gessesse *et al.*, 2003). Di Malaysia, sisa bulu ayam dari pasar atau pusat pemprosesan ayam akan dihantar ke kawasan pembuangan sampah setiap hari. Ini jelas menunjukkan rakyat Malaysia masih lagi tidak peka dengan potensi kitaran semula sisa bulu ayam dan

ini merupakan suatu kerugian yang besar kepada negara kerana jumlah sisa buangan bulu ayam di Malaysia adalah tinggi.

Industri penternakan masa kini sangat bergantung kepada input bahan mentah untuk penghasilan makanan ternakan dan ini menjadikan kos penghasilan makanan ternakan semakin tinggi. MARDI di dalam buku Lawatan Kerja Perdana Menteri ke Mardi pada tahun 2001 telah melaporkan, bahawa usaha ke arah memajukan makanan ternakan alternatif telah pun dilakukan. Antaranya termasuklah penggunaan hampas isirong kelapa sawit (PKC), kulit koko, kulit nenas, pelepah daun kelapa sawit (OPF), foraj, beras hancur, kacang, dedak ayam, sagu dan jerami sebagai makanan ternakan. Namun begitu, segala usaha yang dilakukan masih lagi tidak memenuhi permintaan makanan ternakan yang terus meningkat setiap tahun (Ramli, 2005).

Jika dilihat dari sudut positif, bulu ayam bukanlah sisa yang tidak berguna tetapi ia berpotensi untuk dikitar semula. Penyelidik antarabangsa telah mula membuka mata terhadap potensi bulu ayam menjadi sumber protein dan asid amino. Pakar nutrisi haiwan berpendapat protein daripada sumber bulu ayam boleh diformulasi sebagai makanan ternakan. Jadual 1.1 jelas menunjukkan makanan ternakan berasaskan bulu ayam atau dikenali sebagai protein bulu ayam mengandungi protein dan asid amino yang tinggi.

Penggunaan bulu ayam sebagai makanan ternakan telah lama dikaji oleh ramai penyelidik. Apple *et al.*, (2003) melaporkan bulu ayam dilihat berpotensi bagi

Jadual 1.1: Kandungan (g/kg) protein dan asid amino bagi protein bulu ayam yang telah diproses berbanding yang belum diproses (Sumber : Onifade *et al.*, 1998)

Protein dan asid amino	Latshaw <i>et al.</i>, (1994), belum diproses	Latshaw <i>et al.</i>, (1994), telah diproses pada 207 kPa selama 24 minit	Wang & Parsons, (1997), telah diproses pada 160°C selama 15 minit
Protein	922.0	866.0	880.0
Alanina	28.8	37.7	39.6
Glisina	51.8	50.7	68.7
Isoleusina	39.4	41.3	42.3
Leusina	56.9	68.8	70.9
Valina	53.0	44.0	59.6
Fenilalanina	34.6	40.1	42.1
Arginina	67.6	62.5	61.0
Histidina	2.3	8.6	5.7
Lisina	15.4	22.6	18.8
Asid aspartik	41.8	55.9	55.2
Asid glutamik	82.2	72.3	97.2
Serina	87.3	72.1	100.0
Treonina	34.5	36.5	40.2
Prolina	73.9	74.8	88.4
Sistina	65.8	48.7	42.9
Metionina	7.1	6.3	6.5

menggantikan makanan ternakan yang sedia ada kerana mengandungi protein, sistina, valina dan treonina yang tinggi berbanding hampas kacang soya. Kaedah yang biasa digunakan bagi menghasilkan makanan ternakan berasaskan bulu ayam atau dikenali sebagai protein bulu ayam adalah melalui penguraian hidroterma yang menggunakan suhu dan tekanan yang tinggi (Latshaw *et al.*, 1994; Wang & Parsons, 1997). Penggunaan teknik ini dilihat tidak sesuai kerana selain daripada memakan belanja yang tinggi, ia juga menghasilkan produk yang sukar dihadam serta memusnahkan beberapa asid amino perlu seperti metionina, lisina dan triptofan (Baker *et al.*, 1981). Selain itu, terdapat juga laporan menyatakan kandungan asid amino perlu bulu ayam seperti metionina, lisina dan histidina didapati berkurang selari dengan peningkatan umur ayam (Stilborn *et al.*, 1997). Oleh itu, kajian yang lebih mendalam perlu dijalankan bagi mencari teknologi alternatif dalam pemprosesan bulu ayam bagi menghasilkan protein bulu ayam di samping meningkatkan nilai pemakanan dan memperbaiki keupayaan penghadaman oleh haiwan ternakan. Pendekatan bioteknologi yang melibatkan penggunaan mikroorganisma dan enzim keratinase dalam pemprosesan bulu ayam dilihat merupakan kaedah yang lebih efektif dari segi kos, selain dapat meningkatkan nilai nutrisi dan mesra alam (Onifade *et al.*, 1998).

Penulenan dan pencirian enzim keratinase telah membawa kepada penemuan aplikasi enzim ini dalam beberapa bidang seperti industri kulit, makanan ternakan, kosmetik, baja, ubat-ubatan dan sebagainya (Farag & Hassan, 2004). Walaupun kebanyakan daripada aplikasi enzim keratinase ini masih lagi di tahap kajian awal, terdapat juga produk yang telah dikomersialkan seperti Versazyme. Versazyme merupakan bahan tambahan di

dalam makanan ternakan yang berasaskan enzim keratinase. Versazyme telah dihasilkan oleh bakteria termofili *Bacillus licheniformis* PWD-1 yang tumbuh pada suhu 50°C dan mempunyai aktiviti keratinolisis yang tinggi (Wang *et al.*, 2006).

1.2 Objektif penyelidikan

Enzim keratinase mempunyai pelbagai kegunaan dalam industri tetapi ia belum lagi dieksploitasi di Malaysia. Ini disebabkan oleh pengetahuan yang kurang terhadap sifat asasnya, sifat fiziko-kimia, mekanisme regulasi dan keadaan optimum penghasilan enzim ini. Setakat ini, tiada lagi laporan daripada penyelidik dari Malaysia berkenaan penulenan dan pencirian enzim ini. Dengan demikian, penyelidikan ini dirancang untuk memilih mikroorganisma terbaik yang dapat menghasilkan enzim keratinase dan membangunkan sistem penghasilannya. Objektif-objektif yang ingin dicapai di dalam penyelidikan ini adalah :

1. Untuk memencilkan mikroorganisma penghasil enzim keratinase daripada sumber semula jadi melalui teknik pengumpanan.
2. Untuk mengecam dan melakukan pencirian pada mikroorganisma penghasil enzim keratinase yang terbaik. Pengecaman dilakukan berdasarkan ciri-ciri kultur, morfologi dan penelitian di bawah mikroskop cahaya serta mikroskop elektron penskanan.

3. Untuk mengoptimalkan keadaan pengkulturan dan komposisi medium bagi menghasilkan enzim keratinase yang maksimum di dalam sistem fermentasi kultur tenggelam menggunakan kelalang goncangan.

4. Untuk menuliskan dan menentukan ciri-ciri enzim yang dihasilkan di bawah keadaan yang optimum.

BAB 2

TINJAUAN BACAAN

2.1 Keratin

Keratin adalah protein haiwan yang paling stabil di muka bumi ini dan rintang terhadap degradasi oleh enzim proteolisis seperti tripsin, pepsin dan papain. Keratin pada bulu ayam/itik mengandungi asid amino glisina, alanina, serina, sistina dan valina yang tinggi. Manakala kandungan asid amino lisina, metionina dan triptofan yang rendah (Grazziotin *et al.*, 2006). Ciri keratin yang unik ini adalah bergantung kepada struktur konformasinya. Kestabilan keratin disebabkan oleh wujudnya ikatan disulfida, ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang tinggi di dalam struktur keratin (Ignatova *et al.*, 1999). Walaupun ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik merupakan satu interaksi yang lemah, namun jumlahnya yang tinggi menstabilkan struktur protein dan memberikan bentuk tertentu. Manakala kehadiran ikatan disulfida yang tinggi meneguhkan lagi struktur protein keratin. Ikatan disulfida terbentuk apabila 2 monomer sistena ($C_3H_7NO_2S$) dioksidakan membentuk sistina ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$). Sistina merupakan dimer asid amino sistena (Campbell *et al.*, 1999a). Oleh kerana keratin mengandungi ikatan disulfida yang tinggi, sistena merupakan asid amino yang paling banyak terdapat di dalam struktur keratin (Bockle & Muller, 1997).

Keratin juga boleh didapati sebagai komponen utama epidermis, rambut, bulu burung, paruh, kuku, tanduk, sisik dan bulu biri-biri. Berdasarkan struktur konformasinya, keratin

dibahagikan kepada dua kumpulan iaitu keratin alfa (α keratin) dan keratin beta (β keratin) (Anbu *et al.*, 2005). Keratin alfa sangat kuat dan tidak anjal. Seperti namanya, keratin alfa mempamerkan bentuk alfa helik protein. Untuk membentuk alfa helik fibril, dua rantaian keratin alfa bergulung menghasilkan struktur seperti tangga. Keratin alfa banyak terdapat di dalam kulit haiwan, rambut, tanduk, kuku manusia dan haiwan. Keratin beta adalah lebih kuat berbanding keratin alfa. Keratin beta mempunyai struktur berlipat yang memental membentuk mikrofibril (Zerdani *et al.*, 2004). Keratin beta didapati pada kulit reptilia (sisik), bulu burung, paruh serta cangkerang kura-kura dan penyus. Keratin beta mempunyai kandungan glisina, alanina, serina dan lisina yang tinggi berbanding keratin alfa (Chitte *et al.*, 1999).

Keratin juga dikelaskan kepada keratin keras dan keratin lembut bergantung kepada kandungan ikatan disulfidanya. Keratin keras didapati di dalam struktur bulu ayam, rambut, tapak kaki haiwan dan kuku, di mana kandungan ikatan disulfida adalah tinggi. Sementara itu, keratin lembut adalah seperti kulit dan kalus, di mana kandungan ikatan disulfida adalah rendah (Schrooyen *et al.*, 2001).

2.2 Enzim keratinase

Enzim keratinase ialah sejenis enzim proteolisis yang boleh menghidrolisis keratin kepada molekul yang lebih kecil yang boleh diserap oleh sel. Enzim keratinase tulen adalah dalam kumpulan protease serine atau protease metallo yang mempunyai aktiviti yang tinggi pada bahan protein tidak larut seperti bulu, rambut, kuku, sisik dan

sebagainya. Keupayaan mengurai substrat keratin merupakan ciri yang membezakan enzim keratinase dengan enzim proteolisis lain seperti protease dan peptidase (Bernal *et al.*, 2006). Gupta & Ramnani (2006) menyatakan bahawa berat molekul enzim ini adalah dalam julat antara 18 kDa hingga 200 kDa, berbeza mengikut mikroorganisma yang menghasilkannya. Enzim keratinase yang telah dituliskan daripada strain bakteria Gram positif *Kocuria rosea* menunjukkan berat molekul yang tinggi iaitu 240 kDa (Bernal *et al.*, 2006). Manakala enzim keratinase daripada aktinomiset *Streptomyces albidoflavus* mempunyai berat molekul serendah 18 kDa (Bressollier *et al.*, 1999).

Enzim keratinase telah dilaporkan dapat dihasilkan melalui sistem fermentasi kultur tenggelam dan fermentasi kultur statik. Tiada laporan berkenaan penghasilan enzim keratinase melalui fermentasi kultur pepejal sehingga tahun 2005 (Gupta & Ramnani, 2006). Walau bagaimanapun pada tahun 2006, penghasilan enzim keratinase melalui fermentasi kultur pepejal telah mula dieksploitasi (De Azerado *et al.*, 2006). Mikroorganisma sering digunakan dalam penghasilan enzim keratinase di peringkat industri kerana kepelbagaian biokimia dan manfaatnya dari segi teknikal dan ekonomi. Ini kerana mikroorganisma mampu dikulturkan dalam kuantiti yang banyak dalam masa yang singkat menggunakan kaedah fermentasi. Mikroorganisma yang sering digunakan dalam penghasilan enzim keratinase adalah *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Microsporium* sp. dan *Trichophyton* sp. dengan kehadiran keratin di dalam medium (Gradisar *et al.*, 2005). Enzim keratinase yang dihasilkan oleh bakteria *Bacillus licheniformis* (Lin *et al.*, 1992), *Streptomyces* sp. (Noval & Nickerson, 1959; Bockle *et al.*, 1995) serta kulat *Aspergillus fumigatus* (Santos *et al.*, 1996), telah dilaporkan penting

bagi proses mengitar semula bahan buangan berkeratin. Selain itu, enzim keratinase memainkan peranan penting di dalam proses infeksi kulit dan bahagian-bahagian lain dalam tubuh manusia dan haiwan oleh kulat dermatofit. Enzim keratinase daripada kulat dermatofit seperti *Trichophyton* sp. (Yu *et al.*, 1968; Tsuboi *et al.*, 1989) dan *Microsporum* sp. (Page & Stock, 1974) telah dikaji dari aspek perubatan.

2.3 Mekanisme keratinolisis

Terdapat banyak laporan dari penyelidik seluruh dunia yang berjaya membuktikan molekul keratin yang rintang terhadap degradasi oleh enzim proteolisis seperti pepsin dan papain boleh diuraikan oleh enzim keratinase yang dihasilkan oleh mikroorganisma keratinolisis. Walau bagaimanapun, mekanisme penguraian keratin atau keratinolisis oleh mikroorganisma keratinolisis ini masih lagi menjadi perdebatan. Sehingga kini, terdapat pelbagai teori serta hipotesis telah dihasilkan oleh beberapa kumpulan penyelidik dan kajian masih lagi dijalankan bagi membongkar rahsia penguraian keratin yang unik ini (Onifade *et al.*, 1998). Walaupun pemahaman tentang mekanisme penguraian keratin masih lagi kurang, terdapat bukti yang menunjukkan kemungkinan wujudnya proses sulfitolisis dan keratinolisis mekanikal yang terlibat dalam penguraian keratin.

2.3.1 Keratinolisis mekanikal

Hipotesis ini hanya boleh digunapakai pada kulat serta mikroorganisma pengurai keratin yang menghasilkan miselium. Keratinolisis mekanikal ditafsirkan sebagai penguraian

keratin yang berlaku akibat daripada tekanan yang dihasilkan oleh miselium dan penembusannya ke atas substrat keratin (Onifade *et al.*, 1998). Sehingga kini, struktur kulat yang terlibat di dalam keratinolisis mekanikal telah dikaji dengan lebih mendalam menggunakan mikroskop cahaya dan mikroskop elektron pensakanan (SEM).

Kajian oleh English (1963; 1968) telah menyumbang huraian terperinci tentang perubahan yang berlaku ke atas hifa kulat dermatofit semasa mengkoloni rambut. Beliau menjelaskan terdapat dua bentuk serangan oleh kulat semasa penguraian keratin iaitu hakisan permukaan dan penembusan radial. English (1963) menghuraikan bahawa terdapat 4 peringkat yang berlaku semasa serangan kulat ke atas rambut. Pada peringkat pertama, lapisan kutikel rambut ditanggalkan. Seterusnya berlakunya hakisan terhadap lapisan korteks rambut. Pada peringkat yang seterusnya, kulat tersebut akan membentuk organ penembusan. Pada peringkat akhir, bahagian medula rambut akan dikoloni oleh kulat tersebut.

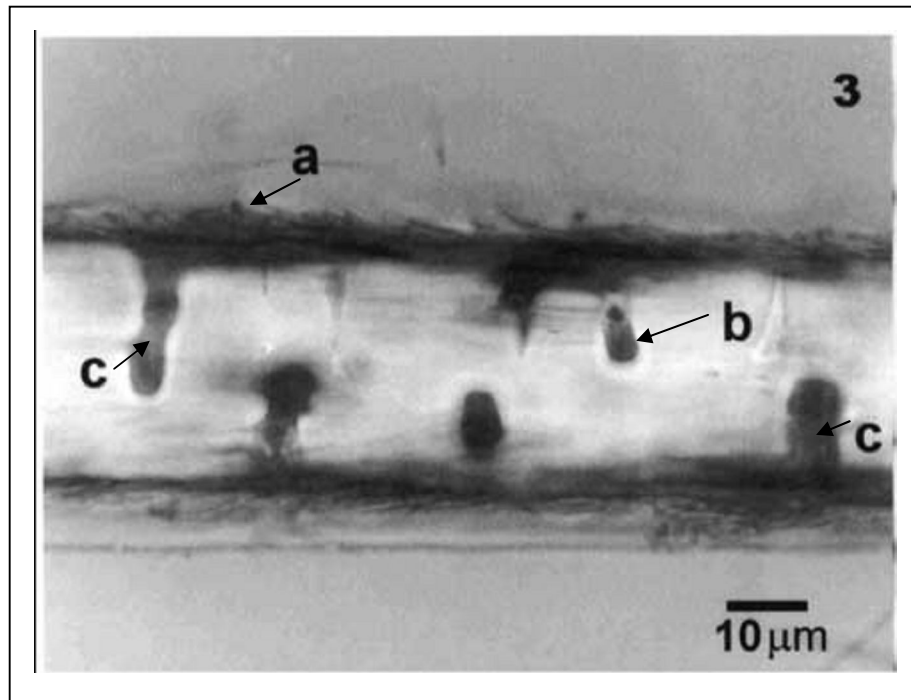
Bagi serangan kulat melalui cara hakisan permukaan, berlakunya pemusnahan permukaan rambut secara perlahan-lahan oleh hifa. English (1968) menjelaskan kebanyakan hifa kulat berkembang dalam bentuk filamen di sepanjang sisi sisik kutikel rambut. Sesetengah daripada hifa tersebut menembusi lapisan kutikel. Hifa yang terlibat di dalam aktiviti ini akan mengekalkan bentuk normalnya atau berkembang bagi membentuk cabang-cabang pendek. Di dalam lapisan korteks, hifa ini akan terus berkembang dan sesetengahnya membentuk cabang-cabang pelepah leper. Seterusnya, organ penembusan akan terbentuk melalui pelepah hifa tersebut. Pemerhatian yang sama juga telah direkod

oleh Kanbe & Tanaka (1982) di dalam kajiannya ke atas rambut yang diceroboh oleh kulat *Microsporium gypseum*. Miselium yang menceroboh bahagian korteks rambut membentuk cabang-cabang leper, berbeza dengan bentuk filamen yang biasanya dilihat secara mata kasar.

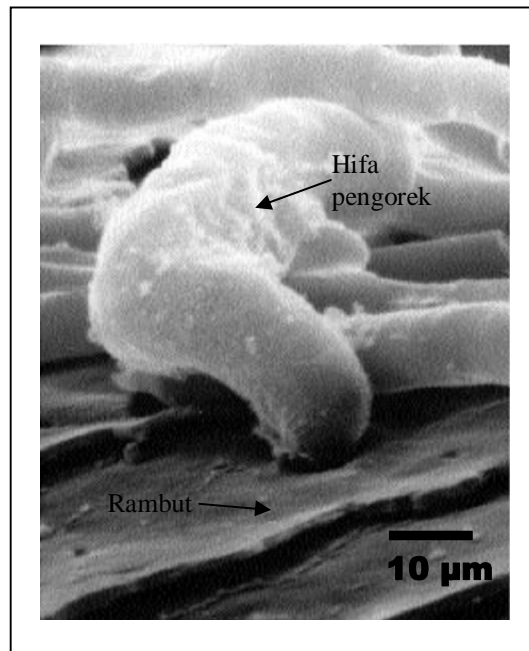
Manakala bagi penembusan radial pula, berlakunya serangan secara rawak oleh pelbagai hifa khusus seperti hifa pengorek dan organ penembusan yang menembusi rambut pada sudut tertentu. Terdapat dua jenis hifa pengorek iaitu hifa pengorek lebar dan hifa pengorek menggelembung (Mitola *et al.*, 2002). Gambarfoto 2.1 dan 2.2 menunjukkan struktur hifa yang terlibat di dalam keratinolisis mekanikal ke atas rambut manusia. Pertumbuhan dan pemanjangan miselium kulat adalah diperlukan bagi menghasilkan tekanan terhadap substrat keratin dan mendedahkan lebih banyak tapak aktif kepada tindakan enzim (Onifade *et al.*, 1998).

2.3.2 Sulfitolisis

Keratin mempunyai kandungan asid amino sulfur yang tinggi seperti sistiena, sistina dan metionina. Oleh itu, ikatan disulfida yang terbentuk antara asid amino sulfur bertanggungjawab terhadap kestabilan dan kerintangan keratin terhadap degradasi oleh enzim (Muhsin & Hadi, 2001). Disebabkan sifat keratin yang unik ini, ramai penyelidik percaya bahawa penguraian keratin bermula dengan pemecahan ikatan disulfida, kemudian barulah berlakunya degradasi oleh enzim keratinase. Proses pemecahan ikatan

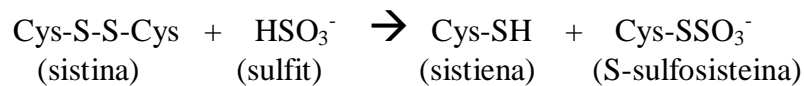


Gambarfoto 2.1 : Rambut yang dikoloni oleh *Chrysosporium queenslandicum*. (a) hakisan permukaan (b) hifa pengorek menggelembung (c) hifa pengorek lebar (Mitola *et al.*, 2002)



Gambarfoto 2.2 : Gambarajah SEM pembentukan hifa pengorek di atas rambut manusia (Fusconi & Filipello, 1991)

disulfida ini dikenali sebagai sulfitolisis (Gupta & Ramnani, 2006). Lechenne *et al.*, (2007) menyatakan bahawa penguraian keratin tidak boleh berlaku dengan tindak balas enzim semata-mata. Mekanisme keratinolisis perlu didahului oleh proses pemecahan ikatan disulfida (sulfitolisis). Kunert (1992) di dalam kajiannya menyatakan bahawa kulat dermatofit dan kulat bukan dermatofit memetabolismekan sistina atau sisteina sebagai sumber sulfur dan nitrogen. Produk yang terhasil daripada metabolisme sistina adalah sulfur tak organik. Lebihan sulfur yang terhasil akan dibebaskan semula ke dalam medium dalam bentuk sulfat dan sulfit. Sulfit bertindak balas dengan sistina pada pH neutral hingga alkali dan membebaskan sistiena dan S-sulfosisteina seperti persamaan berikut :



Menurut Kunert (1992), tindak balas yang sama juga berlaku terhadap sistina yang terdapat pada protein seperti keratin. Beliau menyimpulkan bahawa penguraian keratin bermula dengan pemecahan ikatan disulfida sistina dengan kehadiran sulfit yang memangkinkan proses sulfitolisis. Setelah itu, barulah degradasi keratin oleh enzim berlaku. Malviya *et al.*, (1992) juga menyokong bahawa wujudnya proses penguraian keratin tanpa kehadiran enzim pada awal pengkulturan. Aktiviti enzim keratinase hanya dapat dikesan setelah hampir separuh keratin yang dibekalkan diurai. Kajian yang dijalankan oleh beberapa penyelidik juga membuktikan wujudnya proses sulfitolisis dengan kehadiran produk-produk daripada proses tersebut seperti sulfosistiena, thiosulfat, sulfat dan sistiena di dalam medium kultur (Safranek & Goos, 1982). Walau

bagaimanapun, kajian oleh Deshmukh & Agrawal (1982) dan Lin *et al.*, (1992) mendapati kandungan sistiena di dalam medium kultur adalah sangat rendah. Penurunan kandungan sistiena di dalam medium kultur adalah disebabkan ia digunakan semula oleh kulat sebagai sumber sulfur.

Proses sulfitolisis memerlukan kehadiran sel hidup (Bockle & Muller, 1997) atau agen penurunan seperti natrium sulfit, DTT (dithiothreitol), merkaptotanol, glutantiona, sistiena dan thioglikolat (Bockle *et al.*, 1995) bagi memangkinkan pemecahan ikatan disulfida. Semasa penguraian keratin, dermatofit dan kulat berfilamen menghasilkan sulfit sebagai agen penurun. Dengan kehadiran sulfit, ikatan disulfida pada molekul keratin dipecahkan menjadi sistiena dan S-sulfosisteina. Kunert (1992) telah membandingkan kesan agen penurunan yang berlainan seperti natrium sulfit, sistiena, glutantiona, merkaptotanol dan dithiothreitol terhadap aktiviti keratinase oleh *Microsporum gypseum*. Beliau mendapati natrium sulfit telah meninggikan aktiviti keratinase berbanding agen penurun yang lain. Bockle *et al.*, (1995) telah melaporkan kesan katalitik DTT terhadap aktiviti enzim keratinase. Beliau mendapati hanya 10% degradasi keratin berlaku tanpa penambahan DTT. Manakala 70% degradasi keratin berlaku dengan penambahan 1% DTT.

2.3.3 Turutan tindak balas di dalam mekanisme keratinolisis

Adalah sukar untuk menyimpulkan turutan tindak balas yang berlaku semasa penguraian keratin dengan tepat kerana terdapat pelbagai hipotesis yang dikeluarkan oleh ramai

penyelidik. Mekanisme keratinolisis bagi kulat dan aktinomiset berfilamen mungkin bermula dengan pertumbuhan miselium di atas substrat keratin (keratinolisis mekanikal) dan diikuti dengan penghasilan sulfit untuk memecahkan ikatan disulfida (sulfitolisis). Seterusnya enzim keratinase akan bertindak menguraikan keratin dengan sepenuhnya. Hipotesis ini disokong oleh kebanyakan penyelidik seperti Wawrzkievicz *et al.*, (1991) dan Mitola *et al.*, (2002). Mekanisme keratinolisis bagi bakteria, enzim keratinase tulen dan enzim keratinase kasar pula mungkin berbeza kerana ia tidak melibatkan keratinolisis mekanikal. Sebaliknya, hanya pemecahan substrat keratin oleh enzim sahaja yang berlaku.

2.4 Mikroorganisma penghasil enzim keratinase

Keratin merupakan struktur protein utama yang terdapat pada bulu ayam, kuku, sisik, tanduk, rambut dan sebagainya. Ia sangat stabil dan sukar didegradasi oleh enzim proteolisis seperti pepsin, tripsin dan papain (Riffel *et al.*, 2003). Walau bagaimanapun, keratin tidak terkumpul di alam semula jadi ini. Hal ini jelas membuktikan kewujudan mikroorganisma pengurai keratin atau dikenali mikroorganisma keratinolisis yang boleh menghasilkan enzim keratinase. Mikroorganisma penghasil enzim keratinase ini adalah sangat penting dalam ekologi dan industri. Disebabkan kepentingan kumpulan mikroorganisma ini, banyak kajian telah dilakukan oleh penyelidik-penyelidik dari seluruh dunia. Jadual 2.1 menunjukkan mikroorganisma yang telah dilaporkan berpotensi menghasil enzim keratinase.

Jadual 2.1 : Mikroorganisma penghasil enzim keratinase

Kulat	
<i>Microsporium gypseum</i>	Page & Stock (1974)
<i>Chrysosporium georgiae</i>	El-Naghy <i>et al.</i> , (1998)
<i>Doratomyces microsporus</i>	Gradisar <i>et al.</i> , (2000)
<i>Microsporium canis</i>	Mignon <i>et al.</i> , (1998)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Siesenop & Bohm (1995)
<i>Trichophyton simii</i>	Singh (1997)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Farag & Hassan (2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Noronha <i>et al.</i> , (2002)
Bakteria	
<i>Bacillus licheniformis</i> PWD61	Williams <i>et al.</i> , (1990)
<i>Bacillus</i> sp. FK 46	Suntornsuk & Suntornsuk (2003)
<i>Bacillus pumilus</i> FH9	El-Refai <i>et al.</i> , (2005)
<i>Bacillus cereus</i>	Rodziewicz & Laba (2008)
<i>Kocuria rosea</i>	Bernal <i>et al.</i> , (2006)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Riffel & Brandelli (2002)
<i>Stenotrophomonas</i> sp. strain D-1	Yamamura <i>et al.</i> , (2002)
<i>Lysobacter</i> NCIMB 9697	Allpress <i>et al.</i> , (2002)
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Nam <i>et al.</i> , (2002)
<i>Vibrio</i> sp.	Sangali & Brandelli (2000)
Aktinomiset	
<i>Streptomyces pactum</i> DSM40530	Bockle <i>et al.</i> , (1995)
<i>Streptomyces fradiae</i>	Noval & Nickerson (1959)
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	Szabo <i>et al.</i> , (2000)

2.4.1 Kulat

Kulat boleh dibahagikan kepada tiga kategori iaitu saprofit, parasit dan simbiosis (Darah & Ibrahim, 2004). Walaupun kulat seringkali dikaitkan sebagai organisma perosak, namun begitu ekosistem kita akan lumpuh sekiranya tiada kewujudan organisma ini. Secara semula jadi, kulat berfungsi mengurai organisma yang telah mati, daun-daun yang gugur, bahan-bahan organik dan dengan itu ia mengitar semula elemen-elemen kimia kepada alam sekitar. Kulat terdiri daripada struktur asas seperti bebenang yang dipanggil hifa. Seterusnya hifa ini akan membentuk jalinan yang dipanggil miselium (Campbell *et al.*, 1999b). Apabila ia dibiakkan di dalam kultur tenggelam, ia akan menunjukkan pertumbuhan yang berbeza, di mana ia akan membentuk miselium dan akan membentuk pelet. Bentuk yang ditunjukkan bukan sahaja disebabkan oleh genetik spesies kulat tetapi juga disebabkan oleh medium pertumbuhan dan juga keadaan fizikal pertumbuhan iaitu suhu, pH dan goncangan (Papagianni, 2004).

Kumpulan kulat yang berupaya menghidrolisis keratin dikenali sebagai kulat keratinolisis. Kumpulan kulat ini adalah unik kerana ia boleh menguraikan molekul keratin dan menggunakannya sebagai sumber karbon dan nitrogen (Kaul & Sumbali, 1997). Kulat keratinolisis boleh didapati di pelbagai habitat di muka bumi ini. Mikroorganisma ini biasanya hadir dalam komuniti bersama kumpulan kulat keratinofili, yang hanya menggunakan produk hasil daripada hidrolisis keratin (Ulfig, 2003). Mitola *et al.*, (2002) menjelaskan bahawa kewujudan sesetengah pertumbuhan kulat pada bahan berkeratin tidak semestinya adalah disebabkan tindakan keratinolisisnya. Sebaliknya,

kulat ini hanya menjadi parasit yang mengkoloni bahan berkeratin tersebut dan menggunakan produk yang terhasil daripada hidrolisis keratin oleh kulat keratinolisis. Griffin (1960) telah mengekstrak rambut manusia dan haiwan yang sempurna. Beliau mendapati selain keratin, terdapat juga kandungan asid urik, urea, ammonia, pentosa, glikogen, fenol dan asid amino yang boleh menyokong pertumbuhan kulat. Oleh itu, perbezaan antara kulat keratinofili dan keratinolisis bergantung kepada penggunaan keratin. Beliau juga telah menjalankan pemerhatian terhadap pertumbuhan kulat di atas rambut. Koloni primer merupakan chytrids diikuti dengan spesies *Fusarium*, *Penicillium* dan *Mucor* yang berupaya menggunakan substrat intersel. Seterusnya, spesies *Chaetomium*, *Gliocladium* dan *Humicola* yang berupaya memecahkan substrat yang lebih kompleks. Kumpulan yang terakhir yang mengkoloni rambut merupakan kulat keratinolisis seperti spesies *Trichophyton* dan *Microsporum*. Filipello *et al.*, (1994) mendefinisikan kulat keratinolisis sebagai kumpulan kulat yang berupaya menguraikan sepenuhnya molekul keratin serta mempunyai ciri yang sama seperti kulat dermatofit dan berpotensi menjadi patogen kepada manusia dan haiwan.

2.4.1.1 Kulat dermatofit

Dermatofit adalah kumpulan kulat yang berupaya menggunakan tisu keratin (rambut, kulit dan kuku) manusia serta haiwan yang menyebabkan masalah infeksi atau dermatofitosis dan lebih dikenali sebagai kurap (Weitzman & Summerbell, 1995). Infeksi ini boleh bersifat akut atau kronik. Dermatofit mempunyai tiga genus iaitu *Epidermophyton*, *Microsporum* dan *Trichophyton* (Zainordin, 1989). Selain itu,

dermatofit juga dikelaskan kepada tiga kumpulan ekologi iaitu geofili, zoofili dan antropili. Jadual 2.2 menunjukkan pengelasan spesies dermatofit mengikut ekologi.

Dermatofit geofili wujud sebagai kulat saprofit di dalam tanah dan berupaya mengkoloni bahan berkeratin. Sebaran dermatofit geofili bergantung kepada pelbagai faktor ekologi, antaranya kehadiran bahan berkeratin daripada manusia dan haiwan (Darah & Shaharudin, 1995) serta pH tanah yang menghampiri neutral (Bohme & Ziegler, 1969). Walaupun dermatofit geofili merupakan kulat saprofit di dalam tanah, terdapat sesetengah spesies mampu menjadi patogen kepada manusia dan haiwan seperti *Microsporum gypseum*. Dermatofit ini biasanya dijangkiti melalui tanah yang mengandungi spora yang banyak (Bentubo *et al.*, 2006). Papini *et al.*, (1998) telah memencilkan kulat dermatofit geofili seperti *Microsporum gypseum* (39%), *Trichophyton ajelloi* (31%) dan *Chrysosporium keratinophilum* (14%) daripada kawasan taman Pisa, Italy menggunakan teknik pengumpanan rambut.

Dermatofit zoofili pula merupakan patogen kepada haiwan (Tawfik & Talal, 2000). *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* dan *Trichophyton verrucosum* merupakan organisma penyebab penyakit kurap terhadap haiwan dan kadangkala menginfeksi manusia. *Microsporum canis* biasanya menginfeksi haiwan peliharaan seperti kucing dan anjing (Marchisio *et al.*, 1995; Simpanya & Baxter, 1996; Brilhante *et al.*, 2003) dan seterusnya akan menyebarkan partikel terinfeksi ke kawasan persekitaran yang akan menjadi sumber infeksi terhadap manusia (Mantovani, 1978). Dermatofitosis terhadap kuda telah dilaporkan disebabkan oleh *Trichophyton equinum* (Connole, 1990).

Jadual 2.2 : Spesies dermatofit mengikut pengelasan ekologi (Sumber: Weitzman & Summerbell, 1995)

<p>Spesies antrofilii</p>	<p><i>Epidermophyton floccosum</i> <i>Microsporum audouinii</i> <i>Microsporum ferrugineum</i> <i>Trichophyton concentricum</i> <i>Trichophyton gourvilii</i> <i>Trichophyton kanei</i> <i>Trichophyton megninii</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton raubitschekii</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton schoenleinii</i> <i>Trichophyton soudanense</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton violaceum</i> <i>Trichophyton yaoundei</i></p>
<p>Spesies zoofili</p>	<p><i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum equinum</i> <i>Microsporum gallinae</i> <i>Microsporum persicolor</i> <i>Trichophyton equinum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton sarkisorii</i> <i>Trichophyton simii</i> <i>Trichophyton verrucosum</i></p>
<p>Spesies geofili</p>	<p><i>Epidermophyton stockdaleae</i> <i>Microsporum amazonicum</i> <i>Microsporum boullardii</i> <i>Microsporum cookei</i> <i>Microsporum gypseum</i> <i>Microsporum nanum</i> <i>Microsporum praecox</i> <i>Microsporum racemosum</i> <i>Microsporum ripariae</i> <i>Microsporum vanbreuseghenii</i> <i>Trichophyton ajelloi</i> <i>Trichophyton flavescens</i> <i>Trichophyton gloriae</i> <i>Trichophyton phaseoliforme</i> <i>Trichophyton terrestre</i> <i>Trichophyton vanbreuseghemii</i></p>

Manakala bagi lembu dan kambing, dermatofitosis telah dikenalpasti disebabkan oleh *Trichophyton verrucosum* (Weitzman & Summerbell, 1995).

Dermatofit antropili pula merupakan parasit kepada manusia, tetapi terdapat sesetengah spesies dilaporkan menjangkiti haiwan. Jangkitan oleh dermatofit antropili biasanya berlaku melalui sentuhan secara langsung sesama manusia. Sebaran dermatofit ini paling tinggi di dalam lingkungan komuniti seperti keluarga, sekolah, penjara, pusat jagaan kanak-kanak dan hospital. Namun begitu, jangkitan boleh juga berlaku melalui sentuhan terhadap objek yang mengandungi spora dermatofit antropili. Ini berlaku melalui perkongsian kemudahan awam seperti kolam renang, tuala serta pakaian (Weitzman & Summerbell, 1995). *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* dan *Epidermophyton floccosum* merupakan dermatofit antropili yang biasanya dipencilkan dari lantai kolam renang dan kaki perenang serta merupakan agen penyebab tinea pedis (Kamihama *et al.*, 1997). Kontaminasi oleh kulat ini ke atas lantai kolam renang dibawa oleh pengunjung yang selalunya berjalan dengan kaki yang terdedah (Ali-Shtayeh *et al.*, 2002).

2.4.2 Bakteria

Mikrob keratinolisis merupakan antara komponen penting di dalam tanah di mana ia bertindak mengurai bahan berkeratin di dalamnya. Laporan daripada penyelidik seluruh dunia jelas menunjukkan ciri keratinolisis boleh dilihat dalam kebanyakan strain bakteria di seluruh dunia (Lal *et al.*, 1999). Degradasi keratin selalunya dikaitkan dengan bakteria

Gram positif seperti *Bacillus* (El-Refai *et al.*, 2005), *Lysobacter* (Allpress *et al.*, 2002), *Kocuria* (Bertsch & Coello, 2005) dan *Microbacterium* (Gupta & Ramnani, 2006). Namun begitu, hanya segelintir strain bakteria ini sahaja yang telah dieksploitasi secara komersial. Sebagai contoh, enzim keratinase daripada strain *Bacillus* sp. seperti *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus subtilis* telah dijalankan kajian dengan mendalam kerana didapati enzim yang dihasilkan oleh spesies ini mampu mendegradasi bulu ayam dengan berkesan.

Williams *et al.*, (1990) telah berjaya memencilkan bakteria yang tumbuh dan hidup dengan hanya menggunakan bulu ayam sebagai sumber tenaga, karbon dan sulfur. Bakteria ini dipencilkan daripada makmal pelupusan sisa ternakan. Bakteria tersebut telah dikenalpasti sebagai *Bacillus licheniformis* PWD-1. Hidrolisis bulu ayam ini terbukti dengan pembebasan asid amino di dalam medium kultur. Seterusnya, Lin *et al.*, (1992) meneruskan kajian terhadap *Bacillus licheniformis* PWD-1 dengan menuliskan dan mencirikan enzim yang terlibat dalam degradasi bulu ayam ini. Enzim tersebut dikenalpasti sebagai keratinase dan mempunyai berat molekul 33 kDa. pH dan suhu optimum bagi enzim tersebut adalah pH 7.2 dan suhu 50°C. Selain itu, enzim ini juga didapati berupaya menghidrolisis pelbagai protein larut dan tidak larut seperti albumin serum bovin (BSA), kasein, kolagen dan elastin.

Terdapat sebilangan kecil bakteria Gram negatif dilaporkan menghasilkan enzim keratinase seperti *Vibrio* (Sangali & Brandelli, 2000), *Xanthomonas* (De Toni *et al.*, 2002), *Stenotrophomonas* (Yamamura *et al.*, 2002) dan *Chryseobacterium* (Riffel *et al.*,

2003). Fermentasi kultur tenggelam merupakan kaedah yang lazim digunakan bagi penghasilan metabolit sekunder seperti enzim. Ini mungkin disebabkan pensterilan dan proses fermentasi lebih mudah dikawal (Aunstrup *et al.*, 1979). Penghasilan enzim keratinase oleh bakteria banyak dilaporkan melalui kaedah fermentasi kultur tenggelam. Riffel *et al.*, (2003) telah menggunakan kaedah fermentasi kultur tenggelam menggunakan kelalang goncangan dalam penghasilan enzim keratinase. Beliau telah melakukan pengoptimuman terhadap keadaan pengkulturan dan mendapati *Chryseobacterium* sp. kr6 menghasilkan enzim keratinase yang optimum pada suhu 30°C dan pH antara 6.0 hingga 8.0.

Beberapa penyelidik telah melaporkan penulenan dan pencirian enzim keratinase daripada strain bakteria termofili dan termotoleran. Bakteria termofili merujuk kepada bakteria yang tumbuh pada julat suhu 45°C hingga 100°C atau lebih (Stahl, 1993). Friedrich & Antranikian (1996) telah memencilkan 19 strain bakteria termofili dari kawasan air panas Pulau Azores, Portugal. Daripada 19 strain bakteria tersebut, 1 strain telah menunjukkan kebolehan mengurai bulu ayam. Strain tersebut dikenalpasti sebagai *Fervidobacterium pennavorans*. Enzim keratinase yang dihasilkan oleh strain ini aktif pada suhu tinggi iaitu 80°C. Sifat enzim ini yang stabil pada suhu tinggi memberikan kelebihan, di mana proses industri boleh dilakukan pada suhu sekitar 70°C dan dapat mengurangkan risiko kontaminasi. Selain itu, *Fervidobacterium islandicum* AW-1 dilaporkan menunjukkan keupayaan untuk mengurai bulu ayam berbanding 29 strain termofili lain yang dipencilkan dari kawasan gunung berapi di Indonesia. Strain ini dilihat mengurai bulu ayam sepenuhnya selepas 48 jam pengkulturan pada suhu 70°C dan