

**PENGHASILAN ENZIM TANASE OLEH *PENICILLIUM* SP. PENCILAN
TEMPATAN SECARA FERMENTASI KULTUR TENGGELAM**

Oleh

DOBLIN ANAK SANDAI

Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi Ijazah

Sarjana Sains

Mac 2007

PENGHARGAAN

Pertama kali saya ingin mengucapkan setinggi-tinggi terima kasih kepada penyelia utama saya Prof. Darah Ibrahim, penyelia bersama saya Prof. Madya Mohd. Jain Noordin Mohd. Kassim atas segala bantuan, teguran dan nasihat yang membina serta bimbingan yang berkesan yang membolehkan saya menyempurnakan penyelidikan ini.

Ribuan terima kasih juga kepada Prof. Ibrahim Che Omar di atas segala tunjuk ajar sepanjang kajian ini. Terima kasih juga buat kakitangan Unit Mikroskop Elektron di atas segala bantuan yang diberikan.

Selain itu, saya ingin mengucapkan ribuan terima kasih kepada semua rakan sepejuangan di Makmal Fermentasi dan Teknologi Enzim, Pusat Pengajian Sains Kajahayat, terima kasih atas segala bantuan dan kerjasama yang diberikan sepanjang tempoh kita bersama di sini.

Akhir sekali tidak lupa buat ahli keluarga saya, terima kasih atas segala sokongan selama ini. Segala yang dilakukan selama ini akan diingati selalu.

Doblin

2007

KANDUNGAN

	Muka surat
PENGHARGAAN	i
KANDUNGAN	ii
SENARAI JADUAL	xi
SENARAI RAJAH	xiii
SENARAI GAMBAR FOTO	xx
SENARAI LAMPIRAN	xxii
ABSTRAK	xxiii
ABSTRACT	xxv
BAB 1 PENGENALAN DAN TINJAUAN BACAAN	1
1.1 Enzim Tanase	1
1.2 Substrat bagi tanase	9
1.3 Mekanisme penghasilan enzim tanase oleh mikroorganisma	13
1.4 Penghasilan enzim tanase melalui fermentasi kultur tenggelam	15
1.4.1 Faktor fizikal	15
1.4.2 Faktor fisiologi	20
1.5 Pengekstrakan tanase	24
1.6 Tanase tersekat gerak	24
1.7 Mikroorganisma penghasil enzim tanase	25

1.7.1	Bakteria	27
1.7.2	Kulat	29
1.7.2.1	<i>Aspergillus</i> sp.	29
1.7.2.2	<i>Penicillium</i> sp.	31
1.7.3	Yis	33
1.8	Sifat-sifat Fiziko-Kimia tanase tulen	34
1.9	Kegunaan enzim tanase	36
1.9.1	Pembuatan teh segera	36
1.9.2	Pembuatan asid galik	42
1.9.3	Pembuatan wain	42
1.9.4	Pembuatan propil-gallat	43
1.9.5	Pra-rawatan makanan tambahan haiwan	47
1.9.6	Kegunaan lain tanase yang berpotensi	48
BAB 2	OBJEKTIF KAJIAN	49
BAB 3	BAHAN DAN KAEDAH	50
3.1	Kaedah am	50
3.1.1	Penimbangan bahan	50
3.1.2	Penentuan pH	50
3.1.3	Penentuan ketumpatan optik	50
3.1.4	Kaedah pensterilan	50
3.2	Penentuan berat kering mikroorganisma	51
3.3	Asai aktiviti enzim tanase	51
3.4	Penentuan jumlah kepekatan protein	52

3.5	Penentuan jumlah tanin akhir	53
3.6	Penentuan jumlah glukosa	53
3.7	Penentuan aktiviti enzim protease	54
3.8	Penyaringan dan pengecaman mikroorganisma penghasil enzim tanase	55
3.8.1	Pemencilan mikroorganisma daripada tanah paya bakau	55
3.8.2	Penyaringan mikroorganisma penghasil enzim tanase	56
3.8.3	Penyaringan untuk pemilihan pencilan penghasil tanase terbaik	56
3.8.4	Pengecaman spesies	57
3.9	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium sp.</i> dalam sistem kelalang goncangan	57
3.9.1	Mikroorganisma dan pengkulturan	57
3.9.2	Kesan kadar goncangan	57
3.9.3	Kesan pH awal medium pengkulturan	58
3.9.4	Kesan suhu pengkulturan	58
3.9.5	Kesan saiz inokulum	59
3.9.6	Profil penghasilan enzim tanase pada keadaan pengkulturan optimum	59
3.9.7	Pengoptimuman medium pengkulturan	60
3.9.8	Kesan pelbagai kepekatan asid tanik	61
3.9.9	Kesan pelbagai jenis sumber karbon	61

3.9.10	Kesan pelbagai kepekatan sorbitol	61
3.9.11	Kesan pelbagai jenis sumber nitrogen	61
3.9.12	Kesan pelbagai kepekatan ammonium klorida	62
3.9.13	Profil penghasilan enzim tanase di dalam medium asid tanik selepas pengoptimuman	62
3.10	Fermentasi penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp. secara sel bebas dan tersekat gerak	62
3.10.1	Penyekat gerakan dengan kiub span nilon	64
3.10.1.1	Kesan bilangan kiub span nilon terhadap penghasilan tanase	64
3.10.1.2	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan tanase	64
3.10.2	Penyekat gerakan dengan bintilan gel kalsium alginat	65
3.10.1.1	Kesan kepekatan natrium alginat dan bilangan bintilan kalsium alginat	66
3.10.1.2	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan tanase	66
3.10.1.3	Kesan kadar goncangan terhadap penghasilan tanase oleh sel tersekat gerak dengan gel kalsium alginat	66
3.10.2	Profil penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh sel bebas dan sel tersekat gerak pada bintilan kalsium alginat	67
3.11	Penghasilan enzim tanase sel bebas dan sel	67

**tersekat gerak pada bintilan kalsium alginat dalam
fermenter angkut udara tubular**

3.11.1	Kesan bilangan bintilan gel kalsium alginat	69
3.11.2	Kesan saiz inokulum	70
3.11.3	Kesan kadar pengudaraan	70
3.11.4	Profil selepas pengoptimuman	70
3.12	Penulenan enzim tanase daripada <i>Penicillium</i> sp.	71
3.12.1	Pemendakan ammonium sulfat	71
3.12.2	Kromatografi penurasan Gel Sefadeks G-200	72
3.12.3	Kromatografi penukaran Anion DEAE-Sepharose CL-4B	72
3.12.4	Elektroforesis Gel Poliakrilamida Natrium Dodesil Sulfat (SDS-PAGE)	73
3.13	Pencirian enzim tanase kasar dan tulen	75
3.13.1	Kesan pH ke atas aktiviti enzim tanase kasar dan tulen	75
3.13.2	Kesan suhu ke atas aktiviti enzim tanase kasar dan tulen	75
3.13.3	Kestabilan enzim tanase kasar dan tulen apabila didedahkan pada suhu 40°C	75
BAB 4	KEPUTUSAN	
4.1	Pengecaman penciran pilihan yang digunakan	77
4.2	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp. di dalam sistem kelalang goncangan secara sel bebas.	80

4.2.1	Profil awal penghasilan enzim tanase sebelum pengoptimuman dilakukan	80
4.2.2	Pengoptimuman keadaan pengkulturan	83
4.2.2.1	Kesan pH awal medium pengkulturan	83
4.2.2.2	Kesan suhu pengkulturan	83
4.2.2.3	Kesan kadar goncangan	87
4.2.2.4	Kesan saiz awal inokulum	99
4.2.2.5	Profil selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan	99
4.2.3	Pengoptimuman komposisi medium pengkulturan	102
4.2.3.1	Kesan sumber karbon dan asid tanik	103
4.2.3.2	Kesan sumber nitrogen	109
4.2.3.3	Kesan bahan aruh	111
4.2.3.4	Kesan asid amino	111
4.2.3.5	Pengoptimuman ekstrak tanin	113
4.2.3.6	Profil penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp. selepas pengoptimuman komposisi medium	115
4.2.4	Ringkasan pengoptimuman keadan pengkulturan dan komposisi medium	117
4.3	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase oleh sistem tersekat gerak di kelalang goncangan <i>Penicillium</i> sp secara sel bebas dan sel dalam.	119
4.3.1	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase	119

	menggunakan kiub span nilon	
4.3.1.1	Pengoptimuman bilangan kiub span nilon	119
4.3.1.2	Pengoptimuman saiz inokulum pengkulturan menggunakan kiub span nilon	122
4.3.1.3	Pengoptimuman kadar goncangan pengkulturan menggunakan kiub span nilon	124
4.3.2	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase menggunakan bintilan gel kalsium alginat	127
4.3.2.1	Pengoptimuman kepekatan natrium alginat	127
4.3.2.2	Pengoptimuman bilangan bintilan gel kalsium alginat	129
4.3.2.3	Pengoptimuman saiz inokulum pengkulturan menggunakan bintilan kalsium alginat	129
4.3.2.4	Pengoptimuman kadar goncangan pengkulturan menggunakan bintilan kalsium alginat	132
4.3.3	Profil penghasilan enzim tanase oleh sel bebas dan sel tersekat gerak pada tiub span nilon dan bintilan gel kalsium alginat	135
4.4	Peningkatan skala dalam penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp.	137
4.4.1	Profil penghasilan tanase enzim secara sel bebas dan sel tersekat gerak (kiub span nilon) menggunakan kelalang Erlenmeyer berisipadu 500 ml	137
4.4.2	Peningkatan skala penghasilan enzim menggunakan	140

	fermenter angkut udara jenis tubular	
4.4.2.1	Profil penghasilan enzim tanase secara sel bebas	140
4.4.2.2	Pengoptimuman bilangan bintil alginat	142
4.4.2.3	Pengoptimuman saiz inokulum	142
4.4.2.4	Pengoptimuman kadar pengudaraan	145
4.4.2.5	Profil penghasilan enzim tanase secara sel tersekat gerak menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	147
4.5	Penulenan dan pencirian enzim tanase <i>Penicillium</i> sp.	151
4.5.1	Penulenan enzim tanase daripada <i>Penicillium</i> sp.	151
4.5.1.1	Ketulenan enzim tanase	155
4.5.1.2	Penentuan berat molekul enzim tanase tulen daripada <i>Penicillium</i> sp.	155
4.5.2	Pencirian enzim tanase kasar dan tulen yang dihasilkan oleh <i>Penicillium</i> sp.	158
4.5.2.1	Kesan pH terhadap aktiviti enzim tanase	158
4.5.2.2	Kesan suhu dan kestabilan masa terhadap aktiviti enzim tanase	158
BAB 5	PERBINCANGAN	
5.1	<i>Penicillium</i> sp. pencilan tempatan yang bagus sebagai penghasil enzim tanase	162
5.2	Pengoptimuman penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp. di dalam sistem kelalang	164

	goncangan secara sel bebas	
5.3	Fermentasi penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp. sel tersekat gerak	179
5.4	Proses peningkatan skala dalam penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp.	185
5.5	Penulenan dan pencirian enzim tanase yang dihasilkan oleh <i>Penicillium</i> sp.	189
BAB 6	KESIMPULAN DAN CADANGAN KAJIAN	193
	RUJUKAN	197
	LAMPIRAN	209

SENARAI JADUAL

		muka surat
Jadual 1.1	Keadaan fermentasi untuk penghasilan tanase bagi pelbagai mikroorganisma di bawah keadaan fermentasi kultur tenggelam	18
Jadual 1.2	Medium kultur yang tipikal untuk penghasilan tanase oleh <i>Aspergillus niger</i>	20
Jadual 1.3	Mikroorganisma-mikroorganisma yang berupaya menghasilkan tanase	27
Jadual 1.4	Sifat-sifat enzim tanase daripada <i>Aspergillius Niger</i> LCF8	32
Jadual 1.5	Optimum pH dan kestabilan pH tanase	35
Jadual 1.6	Optimum suhu dan kestabilan suhu tanase	36
Jadual 1.7	Paten berkaitan penghasilan tanase dan aplikasi tanase	38
Jadual 3.1	Dimensi fermenter angkut udara jenis tubular	70
Jadual 4.1	Kesan pelbagai sumber karbon dan juga kesan penambahan 4% sumber karbon kepada 4% asid tanik terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering	108
Jadual 4.2	Kesan sumber nitrogen ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering	111

Jadual 4.3	Ringkasan perbandingan peratusan peningkatan penghasilan enzim tanase selepas menggunakan kelalang Erlenmeyer dan fermenter angkut udara dalam sel bebas dan secara tersekat gerak	151
Jadual 4.4	Ringkasan penulenan enzim tanase dari <i>Penicillium</i> sp.	155

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 1.1	Tindak balas hidrolisis asid tanik oleh tanase (Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001; Mondal <i>et al.</i> , 2001)	4
Rajah 1.2	Aktiviti esterase dan dehidrase oleh tanase (Haslam & Stangroom, 1996)	5
Rajah 1.3	Tanin terhidrolisis dan konstituennya. A. Gallotanin B. Ellagitanin, C. Asid Ellagik, D. Heksahidroksifenik dan E. Asid Galik	11
Rajah 1.4	Tanin terkondensasi atau Proantosianidin	12
Rajah 1.5	Laluan hidrolisis asid tanik oleh tanase (Libuchi <i>et al.</i> , 1972)	14
Rajah 1.6	Deesterifikasi polifenol teh menggunakan tanase (Sanderson <i>et al.</i> , 1974)	41
Rajah 1.7	Pembentukan asid epitheflavik semasa proses penukaran daun teh selepas rawatan dengan tanase (Sanderson <i>et al.</i> , 1974)	42
Rajah 1.8	Transesterifikasi asid tanik kepada propil gallat dalam sistem <i>n</i> -propanol menggunakan tanase (Gaathon <i>et al.</i> , 1989; Sharma & Gupta, 2003)	46
Rajah 1.9	Pengesterifikasian asid galik kepada propil	47

gallat secara enzimatik di dalam sistem 1-propanol menggunakan tanase (Weetal, 1985)

Rajah 3.1	Reka bentuk fermenter angkut udara jenis tubular	69
Rajah 4.1	Profil awal penghasilan enzim tanase oleh <i>Penicillium</i> sp.	83
Rajah 4.2	Kesan pH awal medium ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	86
Rajah 4.3	Kesan pH awal medium setelah dikecilkan julatnya ke penghasilan enzim tanase dan berat kering <i>Penicillium</i> sp.	86
Rajah 4.4	Kesan suhu pengkulturan ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	87
Rajah 4.5	Kesan kadar goncangan ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	89
Rajah 4.6	Kesan kadar goncangan dikecilkan julatnya ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	89
Rajah 4.7	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i>	101

	sp.	
Rajah 4.8	Profil penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. selepas pengoptimuman keadaan pengkulturan	102
Rajah 4.9	Kesan asid tanik ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. Pengkulturan dilakukan selama 4 hari pada suhu 30°C	105
Rajah 4.10	Kesan peratusan glukosa dan 4% asid tanik ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. Pengkulturan dilakukan selama 4 hari pada suhu 30°C	107
Rajah 4.11	Kesan penambahan pelbagai bahan aruh ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.. Pengkulturan dilakukan selama 4 hari pada suhu 30°C	113
Rajah 4.12	Kesan penambahan asid amino ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp..Pengkulturan dilakukan selama 4 hari pada suhu 30°C	113
Rajah 4.13	Kesan kepekatan ekstrak tanin ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp..Pengkulturan dilakukan	115

	selama 4 hari pada suhu 30°C	
Rajah 4.14	Profil penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. selepas pengoptimuman komposisi medium	117
Rajah 4.15	Ringkasan pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium yang dilakukan untuk meningkatkan penghasilan enzim tanase	119
Rajah 4.16	Kesan bilangan kiub span nilon terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	122
Rajah 4.17	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh sel tersekat gerak menggunakan kiub span nilon	124
Rajah 4.18	Kesan kadar goncangan terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh sel tersekat gerak menggunakan kiub span nilon	126
Rajah 4.19	Kesan kepekatan natrium alginat terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	129
Rajah 4.20	Kesan bilangan bintilan gel kalsium alginat terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp.	131

Rajah 4.21	Kesan saiz inokulum terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. sel secara tersekat gerak menggunakan bintilan kalsium alginat	132
Rajah 4.22	Kesan kadar goncangan terhadap penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. secara sel tersekat gerak menggunakan bintilan kalsium alginat	134
Rajah 4.23	Profil penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. secara sel bebas dan sel tersekat gerak	137
Rajah 4.24	Profil penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. menggunakan kelalang Erlenmeyer berisipadu 500 ml	140
Rajah 4.25	Profil penghasilan enzim tanase dan protease oleh <i>Penicillium</i> sp. dengan menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	142
Rajah 4.26	Kesan bilangan bintilan kalsium alginat ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	144
Rajah 4.27	Kesan saiz inokulum ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh	145

	<i>Penicillium</i> sp. menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	
Rajah 4.28	Kesan kadar pengudaraan ke atas penghasilan enzim tanase dan berat kering oleh <i>Penicillium</i> sp. menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	147
Rajah 4.29	Profil akhir penghasilan enzim tanase setelah pengoptimuman oleh <i>Penicillium</i> sp. menggunakan fermenter angkut udara jenis tubular	150
Rajah 4.30	Pemendakan enzim tanase kasar dengan menggunakan pelbagai peratusan ammonium sulfat	153
Rajah 4.31	Profil pengelutan protein tanase dari <i>Penicillium</i> sp. melalui kromatografi turus penurasan gel Sefadeks G-200, kali pertama	154
Rajah 4.32	Profil pengelutan protein tanase dari <i>Penicillium</i> sp. melalui kromatografi turus penurasan gel Sefadeks G-200, kali kedua	154
Rajah 4.33	Penentuan berat molekul enzim tanase dengan kaedah SDS-PAGE	158
Rajah 4.34	Kesan pH terhadap penghasilan enzim tanase kasar dan enzim tanase tulen	160

Rajah 4.35	Kesan suhu terhadap enzim tanase kasar dan enzim tanase tulen	160
Rajah 4.36	Kestabilan enzim tanase kasar dan tulen apabila didedahkan pada suhu 40°C	161

SENARAI GAMBAR FOTO

	muka surat	
Gambar foto 4.1	Pertumbuhan kulat di atas medium agar selepas 7 hari pengeraman pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	79
Gambar foto 4.2	Mikrograf SEM yang menunjukkan keadaan konida (A) dan miselium (B) <i>Penicillium</i> sp. selepas 4 hari pertumbuhan di atas medium agar ekstrak malta	80
Gambar foto 4.3	Mikrograf SEM menunjukkan kesan kadar goncangan terhadap konidia <i>Penicillium</i> sp.	90
Gambar foto 4.4	Mikrograf SEM menunjukkan kesan kadar goncangan ke atas miselium <i>Penicillium</i> sp.	92
Gambar foto 4.5	Mikrograf TEM menunjukkan kesan kadar goncangan ke atas miselium <i>Penicillium</i> sp.	94
Gambar foto 4.6	Mikrograf TEM menunjukkan kadar goncangan pada keadaan statik ke atas sel <i>Penicillium</i> sp.	95
Gambar foto 4.7	Mikrograf TEM menunjukkan kesan kadar goncangan 50 psm ke atas sel <i>Penicillium</i> sp.	96
Gambar foto 4.8	Mikrograf TEM menunjukkan kesan kadar goncangan 170 psm ke atas sel <i>Penicillium</i> sp.	98
Gambar foto 4.9	Mikrograf TEM menunjukkan kesan kadar goncangan 200 psm ke atas sel <i>Penicillium</i> sp.	99

Gambar foto 4.10	Mikrograf SEM menunjukkan kesan goncangan 170 psm ke atas <i>Penicillium</i> sp. di dalam kiub span nilon	127
Gambar foto 4.11	Mikrograf SEM menunjukkan kesan goncangan 170 psm ke atas <i>Penicillium</i> sp. di dalam bintilan gel kalsium alginat	135
Gambar foto 4.12	Jalur protein tunggal yang terhasil selepas larutan protein puncak tunggal (P1) kromatografi penurasan gel Sefadeks G-200 dituliskan dengan kaedah elektroforesis SDS-PAGE	157

SENARAI LAMPIRAN

		muka surat
Lampiran 1	Keluk piawai asid galik bagi penentuan aktiviti enzim tanase	210
Lampiran 2	Keluk piawai kepekatan protein bagi penentuan protein	210
Lampiran 3	Keluk piawai bagi kepekatan tanin akhir	211
Lampiran 4	Keluk piawai bagi glukosa	211

**PENGHASILAN ENZIM TANASE OLEH *PENICILLIUM* SP. PENCILAN
TEMPATAN SECARA FERMENTASI KULTUR TENGSELAM**

ABSTRAK

Pencilan yang digunakan dalam penghasilan enzim tanase dicamkan sebagai *Penicillium* sp. Pencilan ini telah dipencilkan daripada kawasan buangan kulit kayu *R. apiculata* di kawasan paya bakau, di Larut-Matang, Perak. Pengoptimuman keadaan pengkulturan dan komposisi medium telah meningkatkan penghasilan enzim tanase sebanyak 578% atau 4.983 U/ml berbanding sebelum pengoptimuman iaitu 0.735 U/ml. Keadaan pengkulturan yang optimum adalah pH awal medium 6.0, suhu pengkulturan 30°C, kadar goncangan 170 psm dan saiz inokulum 1.0% (1.53×10^6 spora per ml). Manakala, medium pengkulturan yang optimum adalah (%; b/i) NH_4Cl , 0.25%; KH_2PO_4 , 0.1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; KCl, 0.05% dan asid tanik, 4%. Penyekat gerakan sel *Penicillium* sp. pada bintilan gel natrium alginat dan kiub span nilon menghasilkan aktiviti enzim tanase sebanyak 7.066 U/ml dan 5.124 U/ml, masing-masing. Ini menunjukkan peningkatan sebanyak 44.2% bagi penggunaan bintilan natrium alginat dan 4.57% bagi penggunaan kiub span nilon. Penghasilan enzim tanase secara sel bebas di dalam fermenter angkut udara jenis tubular telah menunjukkan peningkatan sebanyak 71.7% berbanding kelalang Erlenmeyer berisipadu 500 ml dan 73.5% berbanding kelalang Erlenmeyer berisipadu 250 ml. Penghasilan enzim tanase yang maksimum di dalam fermenter angkut udara jenis tubular adalah sebanyak 11.76 U/ml iaitu peningkatan sebanyak 33.4% sebelum dioptimumkan. Parameter-parameter yang telah dioptimumkan di dalam fermenter angkut udara jenis tubular

adalah bilangan bintilan natrium alginat iaitu sebanyak 400 biji, saiz inokulum sebanyak 1.0% (1.53×10^6 spora per ml) dan kadar pengudaraan sebanyak 2.0 vvm. Enzim tanase ditulenkan dengan kaedah pemendakan ammonium sulfat dan kromatografi penurasan gel dengan Sefadeks G-200 sebanyak 2 kali. Penulenan dilakukan 44.35 kali ganda dan hasil sebanyak 0.69% diperolehi dengan aktiviti spesifik 0.8 U/mg protein. Berat molekul bagi enzim tanase dianggarkan pada 76,1000 Dalton menggunakan SDS-PAGE. Enzim tanase kasar dan tulen mempunyai suhu optimum 40°C serta stabil terhadap suhu 40°C selama 90 minit dan 75 minit, masing-masing.

**PRODUCTION OF TANNASE BY A LOCAL ISOLATE OF *PENICILLIUM* SP.
VIA SUBMERGED CULTURE FERMENTATION.**

ABSTRACT

The isolate that was used in the production of tannase was identified as *Penicillium* sp. This isolate was isolated from a *R. apiculata* barks dumping area, at the mangrove area in Larut-Matang, Perak. Optimization of physical parameters and medium compositions showed an increment of 578% or 4.983 U/ml compared with the activity before optimization which was 0.735 U/ml. The optimal physical parameters were initial pH 6.0, temperature of 30⁰C, agitation speed of 170 rpm and inoculum size of 1.0% (v/v) of 1.53 x 10⁶ spores per ml. Meanwhile, optimal medium compositions were (%; w/v) NHCl₄, 0.25%; KH₂PO₄, 0.1%; MgSO₄.7H₂O, 0.05%; KCl, 0.05% and tannic acid, 4%. Cell immobilization of *Penicillium* sp. on sodium alginate beads and nylon sponge cubes produced tannase activity as much as 7.066 U/ml and 5.124 U/ml respectively. The results showed an increment of 44.2% for calcium alginate beads and 4.57% for nylon sponge cubes. Production of tannase by free cells in a tubular air-lift fermenter showed an increment of 71.7% compared to Erlenmeyer shake flask volume 500 ml and 73.5% compared to Erlenmeyer shake flask volume 250 ml. Maximal production of tannase in a tubular air-lift fermenter was 11.76 U/ml with increment of 38.4% before optimization. The optimized production parameters used in the fermenter were 400 of sodium alginate beads, inoculum size at 1.0% (v/v) of 1.53 x 10⁶ spores per ml and aeration of 2.0 vvm. Tannase was purified by ammonium sulphate precipitation and

gel filtration chromatography using Sephadex G-200, twice. The peak obtained was purified about 44.35 fold with a yield of 0.69% and specific activity of 6.12 U/mg protein. Its molecular weight was estimated to be around 76,1000 Dalton by SDS-PAGE. Crude and purified tannase had the optimum temperature of 40⁰C and stable at that temperature for 90 minutes and 75 minutes, respectively.

BAB 1 PENGENALAN DAN TINJAUAN BACAAN

Enzim adalah suatu protein globul yang berasal daripada hidupan dan ia penting sebagai mangkin biokimia. Ciri enzim yang jelas adalah tindak balas katalisnya yang bersifat khusus dan memilih di mana setiap satu enzim hanya memangkinkan satu tindak balas yang melibatkan substrat tertentu sahaja.

1.1 Enzim tanase

Asid galik atau asid trihidroksibenzoik boleh didapati secara semulajadi di dalam tumbuhan seperti 'gall nuts', pokok renik, walnut, teh, dan sebagainya (Belmares *et al.*, 2004). Penghasilan asid galik boleh didapati dengan menghidrolisiskan tanin. Pembentukan asid galik dengan hidrolisis tanin ini sebenarnya dimangkin oleh enzim tanase (Prescott *et al.*, 1990).

Enzim tanase yang juga dikenali sebagai tanin asil hidrolase (EC 3.1.1.20) yang berupaya menghidrolisiskan asid tanik dan menghasilkan glukosa dan asid galik (Iibuchi *et al.*, 1972; Belmares *et al.*, 2004). Walaupun tanase terdapat dalam tumbuhan, haiwan dan mikroorganisma, tetapi mikroorganisma merupakan penghasil tanase yang utama (Ayed & Hamdi, 2002; Nishitani & Osawa, 2003).

Enzim tanase atau tanin asil hidrolase merupakan suatu mangkin yang memecahkan tanin terhidrolisis atau ikatan-ikatan ester asid galik, seperti galotanin dan asid tanik (Aoki *et al.*, 1976; Bajpai & Patil, 1997; Lekha &

Lonsane, 1997). Tanase ialah enzim yang boleh menghidrolisiskan ikatan-ikatan ester (ester 'galloil' separuh alkohol) dan memotong rangka ikatan (ester galloil asid galik) dalam substrat seperti asid tanik, metil galat dan asid *m*-digalat. Enzim tanase bertindak ke atas ikatan ester yang wujud dalam tanin terhidrolisis dan tidak menguraikan tanin penurun (George & Sen, 1960). Enzim tanase juga memotong ikatan ester dan depsida tanin terhidrolisis contohnya asid tanik.

Enzim tanase menguraikan substrat yang mengandungi sekurang-kurangnya dua kumpulan fenol dan OH dalam komponen asid tanik. Kumpulan COOH diesterifikasikan ke atas rantai benzena yang dioksidakan dan tidak boleh berada pada kedudukan ortho pada salah satu kumpulan OH.

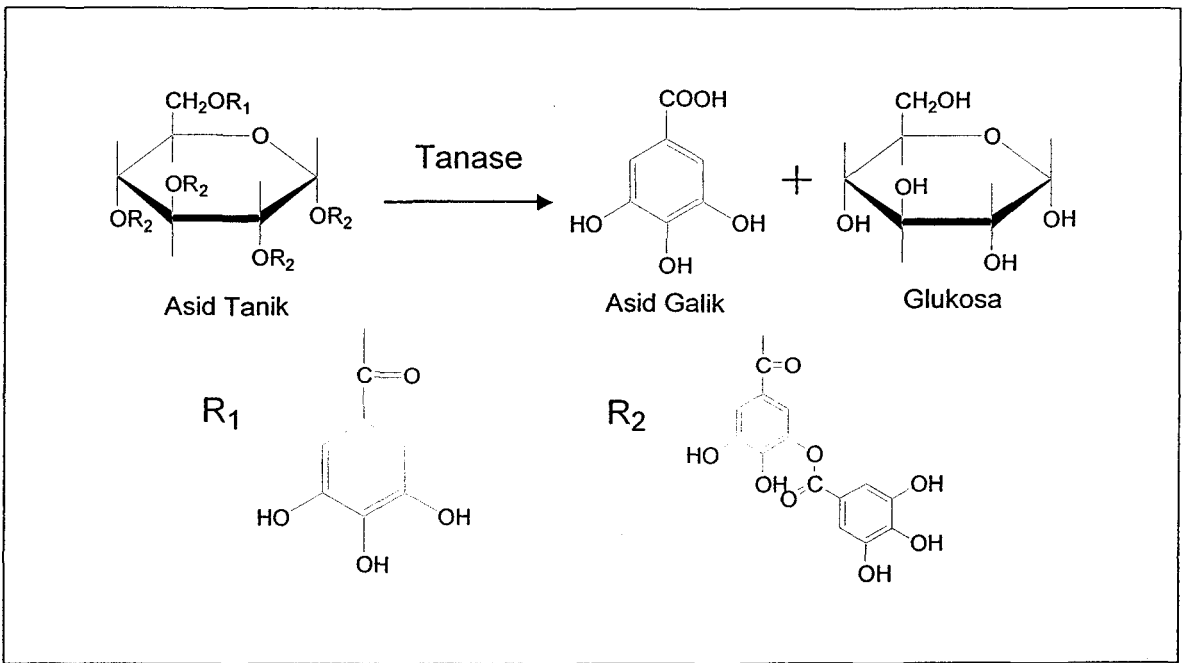
Tindak balas hidrolisis asid tanik oleh enzim tanase ditunjukkan dalam Rajah 1.1. Enzim tanase ini adalah dominan pada peringkat awal pertumbuhan, ia akan menghidrolisiskan ikatan ester asid fenolik. Enzim ini juga adalah enzim diikat membran ataupun 'membrane bound enzyme' (Ganga *et al.*, 1977) dan juga dihasilkan secara ekstrasel (Yamada *et al.*, 1968). Satu unit enzim tanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan 1 μmol asid galik per 1 ml hasil fermentasi.

Enzim tanase ialah enzim teraruh oleh asid tanik dan bertindak sebagai sumber karbon dan juga sebagai bahan pengaruh (Yamada *et al.*, 1968; Aoki *et al.*, 1976), malahan kepekatan asid tanik adalah faktor utama yang mempengaruhi tahap penghasilan enzim ini. Tanase pengurai galotanin

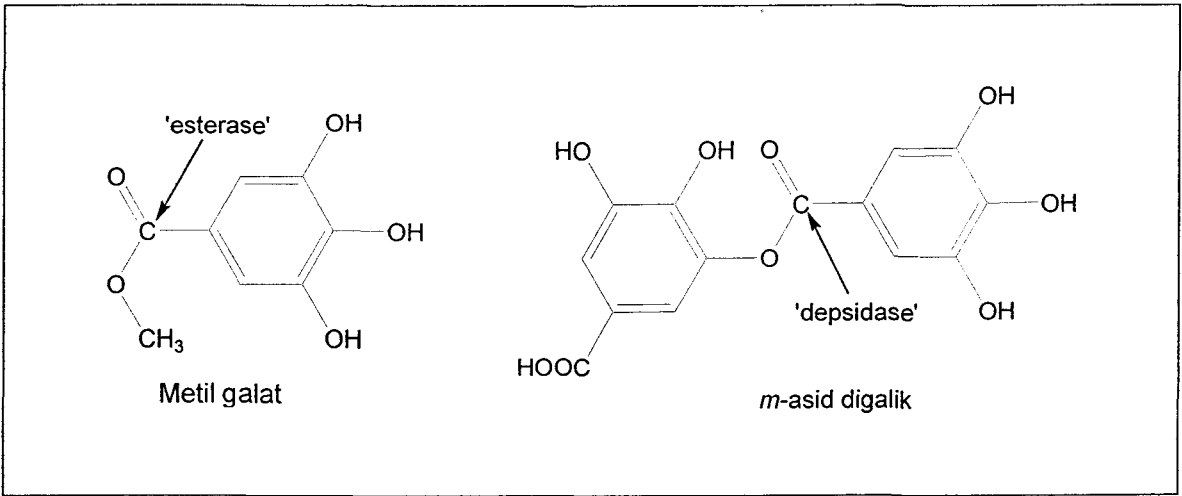
mengandung dua sifat enzim berbeza yang utama iaitu esterase dan dehidrase di mana masing-masing adalah untuk menghidrolisis ikatan ester dan ester asid *m*-digallic (Rajah 1.2). Enzim tanase adalah gabungan kedua-dua sifat ini (Toth & Hensler, 1952). Enzim tanase bertindak ke atas ikatan ester dan dehidra pada metil galat dan asid *m*-digallic. Enzim tanase juga dilaporkan dapat bertindak terhadap substrat seperti asid Klorogenik, (2)-epikatecin galat, dan (2)-epigalokatecin-3-galat. Aktiviti bagi tanase didapati menurun secara mendadak dengan kehadiran florofosfat diisofropil dan ini dicadangkan ianya merupakan suatu contoh enzim 'serine esterase'.

Asid galik ditemui oleh Sheele pada tahun 1787 apabila beliau mengkaji kesan penyerapan air pada kulat di dalam 'gall nuts' (Prescott *et al.*, 1990). Menurut kajiannya, beliau mendapati bahawa 'gall nuts' mengandungi komponen tanin yang banyak dan secara prinsipnya dihasilkan oleh pokok oak dan pokok renek akibat daripada kecederaan oleh serangga.

Kajian ini seterusnya diteruskan oleh Van Tieghem pada tahun 1867 dan beliau telah memerhatikan bahawa *Aspergillus niger* merupakan kulat utama dalam fermentasi asid galik (Prescott *et al.*, 1990). Namun, *Penicillium glaucum* juga mempunyai keupayaan untuk menfermentasikan tanin menjadi asid galik. Menurut beliau juga, udara amat diperlukan dalam pertumbuhan kulat dan untuk berjaya menghasilkan asid galik daripada 'gall nuts'.



Rajah 1.1: Tindak balas hidrolisis asid tanik oleh tanase (Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001; Mondal et al., 2001).



Rajah 1.2: Aktiviti esterase dan depsidase oleh tanase (Haslam & Stangroom, 1966).

Salah satu kaedah yang tertua untuk menghasilkan asid galik adalah melalui proses fermentasi iaitu dengan mengumpalkan substrat yang mengandungi tanin yang dibasahkan dengan air. Kulat akan bertumbuh melalui gumpalan ini pada suhu 30°C dengan digoncangkan secara berterusan. Kini, ekstrak tanin yang steril digunakan dan *Aspergillus* sp. diinokulkan dengan kultur tulen. Kaldu ini boleh digoncangkan secara mekanikal dan udara boleh dipam masuk serta suhu fermentasi ini dapat dikawal dengan berhati-hati.

Fernbach dan Pottevin telah menunjukkan yang *Aspergillus niger* dapat menghasilkan tanase dengan kehadiran tanin dan bahan nutrien (Prescott *et al.*, 1990). Knudson (1913) pula mendapati bahawa terdapat peningkatan yang mendadak dalam penghasilan tanase apabila gula di dalam medium Czapek Dox digantikan dengan asid tanik. Beliau mendapati bahawa penghasilan tanase yang maksimum boleh diperolehi apabila 10% (b/i) gula digantikan dengan 2% (b/i) asid tanik.

Penguraian tanin terhidrolisis, terutamanya galotanin senang difahami terutamanya dalam sistem kulat (Nishira, 1961). Penguraian oksida tanin terhidrolisis telah dikaji pada *Aspergillus* sp. dan laluan hidrolisis asid galik juga telah dikaji secara terperinci (Watanabe, 1965). Proses hidrolisis itu menguraikan heksahidrosilifenol, bifenil yang berkaitan, struktur biorileter, dan proant oksianidin akan berlaku perlahan-lahan.

Di dalam *Aspergillus niger*, asid galik oksigendase memotong yang bertindak sebagai monomer fenolik tanin terlarut, untuk membentuk asid trikarboksilik

yang kurang stabil. Kemudian ia akan menjadi dekarboksilat oleh oksidatif dekarboksilase untuk membentuk asid cis-akonitik di mana ia akan memasuki kitaran asid sitrik (Watanabe, 1965). Walau bagaimanapun, bagi *Aspergillus flavus*, asid galik terus diuraikan kepada asid trikarbosilik (William *et. al.*, 1986). Di dalam *Aspergillus niger*, derivatif dekarboksilat asid galik, pirogallol turut diuraikan secara oksidatif kepada asid cis-akonitik oleh mekanisme yang sama seperti proses asid galik.

Enzim tanase diaruhkan oleh metil galat dan asid tanik tetapi tidak oleh fenol ringkas seperti asid galik, asid salisilik ataupun metil salisilat (Dhar & Bose, 1964; Haslam & Stangroom, 1966; Adachi *et al.*, 1971; Otuk & Deschamps, 1983). Tanase adalah enzim teraruh yang dihasilkan dengan kehadiran asid tanik atau proses akhirnya ialah asid galik (Knudson, 1913; Nishira & Mugibayashi, 1953). Struktur minimum yang diperlukan untuk menghasilkan tanase ialah asid galik (Nishira & Mugibayashi, 1959).

Walaupun bagaimanapun, mekanisme aruhan oleh asid tanik masih tidak diketahui. Saiz yang besar dan reaktiviti asid tanik menghalang pengambilan molekul melalui membran sel. Tindak balas asid tanik dengan dinding sel adalah untuk mengurangkan keterlapan (Herz & Kaplan, 1968). Oleh sebab itu, asid tanik bukan agen pengaruh. Mekanisme pengaruh adalah sama dengan selulase (Singh & Hayashi, 1995), iaitu, mikroorganisma menghasilkan enzim tanase yang sedikit yang dapat menghidrolisiskan asid tanik kepada glukosa dan asid galik. Kemudian ia akan memasuki sel mikrob dan berfungsi sebagai

pengaruh. Kadar aruhan meningkat apabila asid galik digunakan sebagai pengaruh (Lekha & Lonsane, 1997).

Tanase digunakan untuk menguraikan tanin. Tanin terbahagi kepada dua bahagian iaitu tanin terhidrolisis dan tanin terturun. Tanin terhidrolisis terdiri daripada alkohol polhidrus yang diesterifikasikan dengan asid galik atau hasil asid galik (Rajah 1.3). Tanin terhidrolisis terbahagi kepada dua kumpulan iaitu galotannin dan elagitanin. Semasa hidrolisis, galotanin membebaskan glukosa dan asid fenolik, asid galik yang dihasilkan lebih banyak berbanding dengan yang lain. Apabila elagitanin dihidrolisiskan, ia akan menghasilkan glukosa dan asid elagik bersama asid galik dan juga struktur asid yang lain yang berkaitan dengan asid galik (Haslam *et. al.*, 1961).

Tanin terturun terbentuk daripada fenol dari jenis flavon atau flavolan kerana ia adalah terdiri daripada flavon-3-*o*-is- (katekin) atau flavon-3, 4-drols (leukosianidin). Tanin yang terturun tidak mengandungi gula (Goodwin & Mercer, 1983). Tanin terturun yang ringkas boleh diwakili oleh dimer prosianidin di mana molekul flavon boleh dijadikan penunjuk (Rajah 1.4). Tanin terturun kurang dipengaruhi oleh tindak balas mikrob dan kimia (Lewis & Starkey, 1969).

1.2 Substrat bagi Tanase

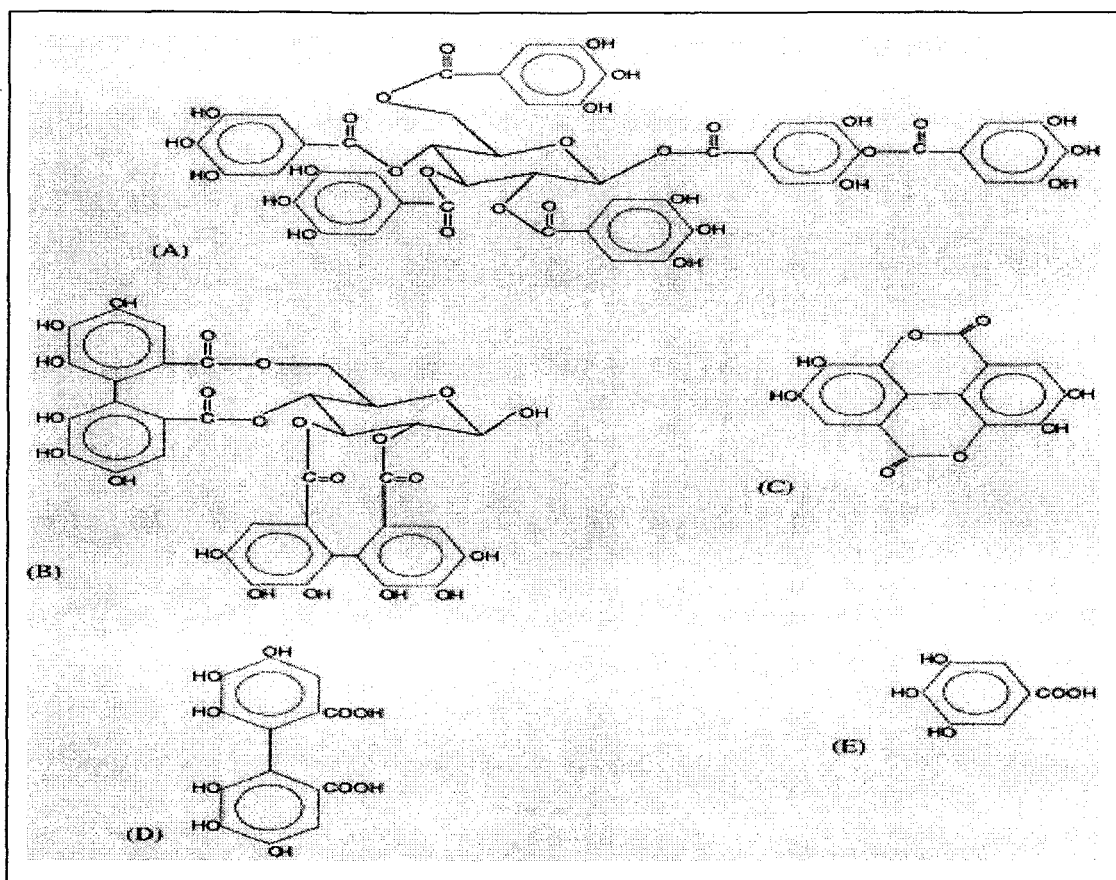
Tanin biasanya terdapat pada pelbagai bahagian vaskular tumbuhan. Tanin merupakan suatu kumpulan kompleks rantai oligomerik yang dicirikan oleh komponen polifenol. Mereka mempunyai berat molekul lebih daripada 500 hingga 20000 kDa. Salah satu sifat tanin yang penting adalah kebolehnya untuk membentuk kompleks yang kuat dengan protein dan makromolekul yang lain seperti kanji, selulosa dan garam mineral. Tanin diklasifikasikan kepada dua kumpulan utama iaitu terhidrolisis dan tanin terkondensasi (Lekha & Lonsane, 1997; Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001).

Tanin terhidrolisis terdiri daripada beberapa molekul asid organik seperti galik, elagik, digalik, asid kebulik yang diesterifikasikan dengan molekul glukosa. Molekul yang terikat kepada asid kuinik sebagai alternatif kepada glukosa juga dianggap sebagai tanin terhidrolisis. Rajah 1.3 menunjukkan beberapa contoh tanin terhidrolisis (Mueller-Harvey, 2001).

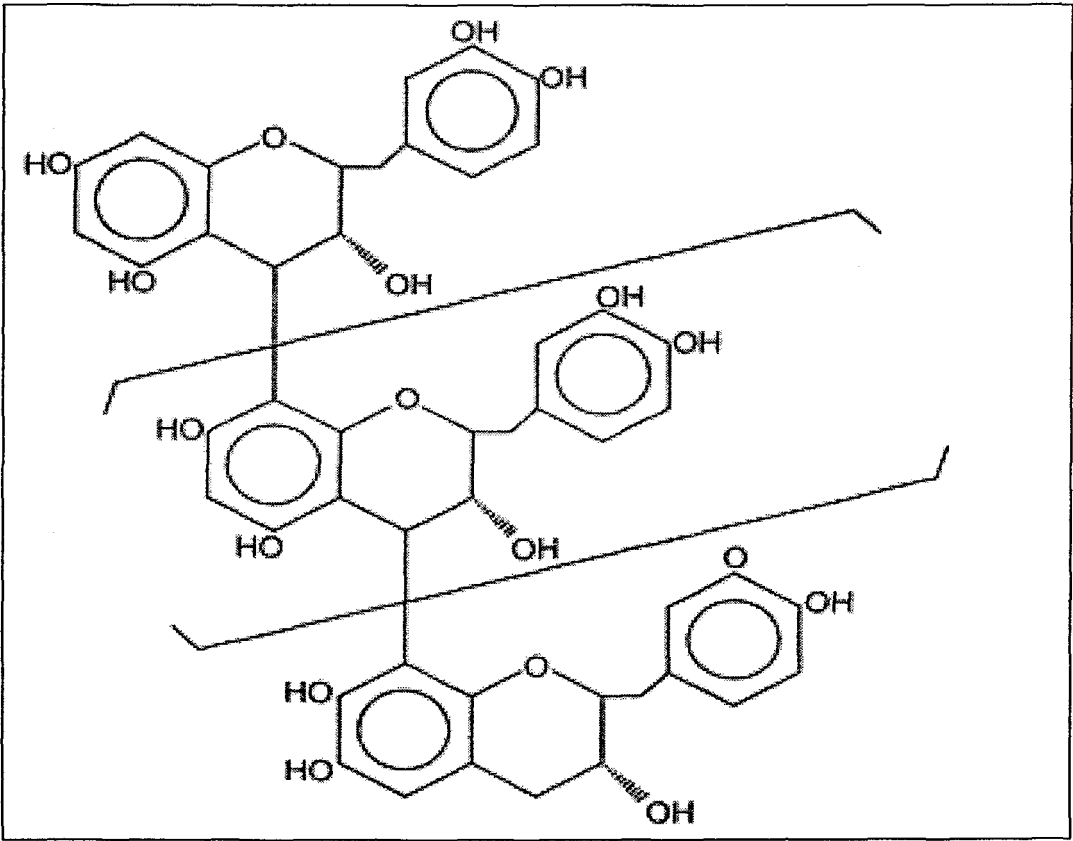
Tanin terhidrolisis boleh dihidrolisis dengan mudah pada keadaan asid atau alkali yang sederhana; dengan air panas atau secara enzimatik (López-Ríos, 1984). Tanin terkondensasi atau Proantosianidin (Rajah 1.4) merupakan suatu komponen yang kompleks yang terdiri daripada kumpulan flavonoid (daripada 2 hingga 50) yang tidak dapat dihidrolisiskan. Konstituen utama tanin terkondensasi ialah sianidin dan delphinidin yang menyebabkan rasa yang kelat pada buah-buahan dan wain.

Kesan negatif tanin dalam makanan haiwan ialah kebolehan tanin untuk mengikat makromolekul menjadikan bahan makanan tersebut sukar untuk

dicernakan. Tanin juga menyebabkan rasa pahit yang mengurangi pengambilan makanan oleh haiwan. Akan tetapi, kepekatan tanin yang rendah dalam makanan telah mempamerkan peningkatan dalam asimilasi nitrogen di dalam ruminan, seterusnya meningkatkan pertumbuhan dan hasil susu haiwan ternakan (Nip & Burns, 1969).



Rajah 1.3 Tanin terhidrolisis dan konstituennya. A. Gallotanin, B. Ellagitanin, C. Asid Ellagik , D. Heksahidroksifenik dan E. Asid galik.



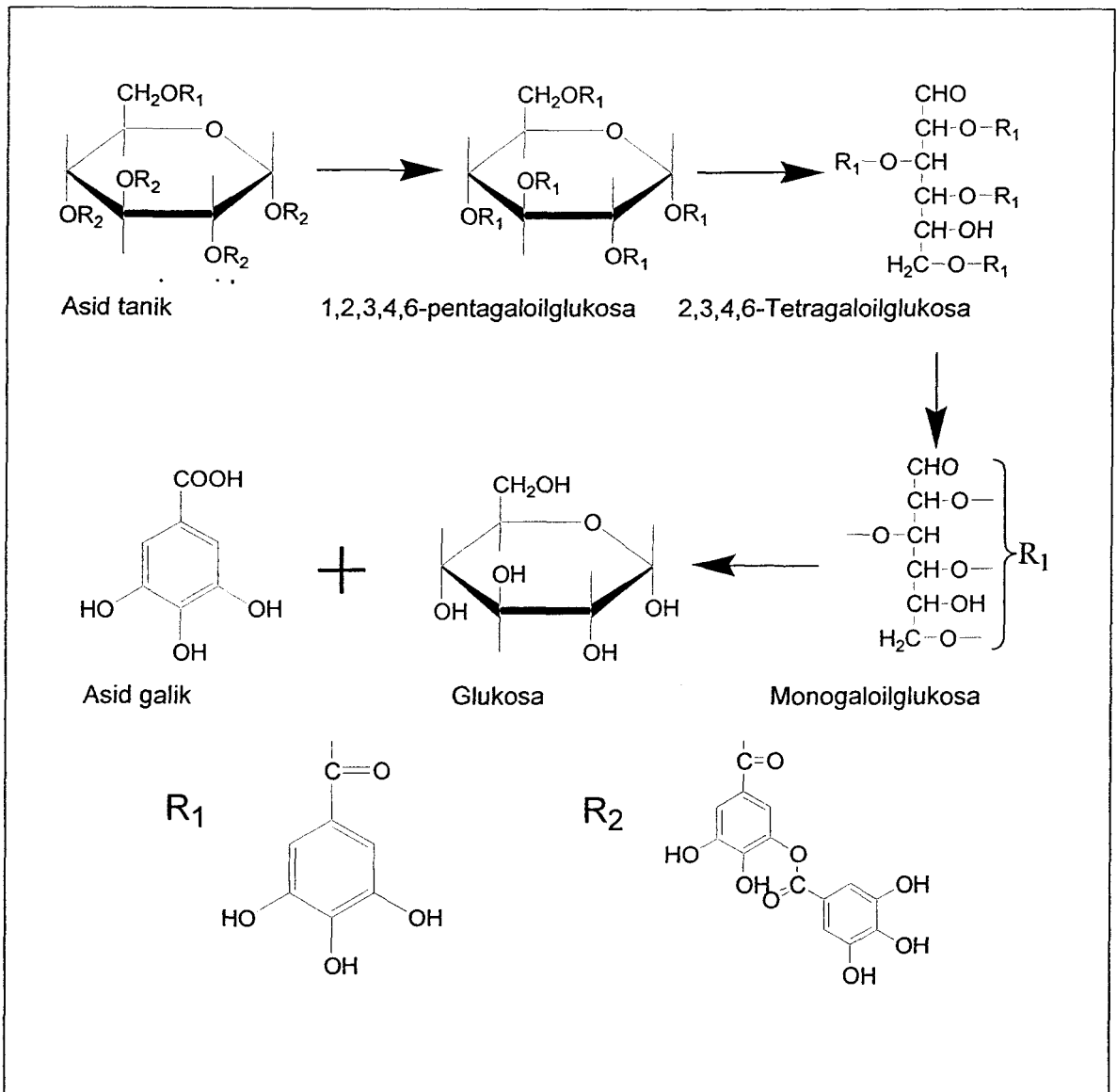
Rajah 1.4 Tanin terkondensasi atau Proantosianidin.

1.3 Mekanisme Penghasilan Enzim Tanase Oleh Mikroorganisma

Enzim tanase yang dihasilkan oleh *Aspergillus sp.* dapat menghidrolisiskan asid tanik untuk membebaskan asid galik dan glukosa. Enzim tanase akan menghidrolisiskan ikatan ester di dalam asid tanik. Bahan perantaraan dari hidrolisis ini ialah 1,2,3,4,6-pentagaloglukosa, 2,3,4,6-tetragaloglukosa dan monogaloglukosa (libuchi *et al.*, 1972). Menurut libuchi *et al.* (1972), asid tanik yang telah dihidrolisiskan dikaji dengan menggunakan kromatogram kertas dan Sefadeks G-10. Keputusan menunjukkan bahawa dari lapisan air, dua jenis monogalo glukosa, asid galik dan pirogalo (mungkin) didapati.

Manakala dari lapisan etilasetat pula, asid galik dan sedikit 2,3,4,6-tetragalo glukosa didapati. Lualan hidrolisis boleh diringkaskan dengan 1,2,3,4,6-pentagaloglukosa dan 2,3,4,6-tetragaloglukosa didapati melalui metanolisis dari asid tanik (Rajah 1.5). Kemudian enzim tanase menghidrolisiskannya menjadi monogaloglukosa. Monogaloglukosa ini boleh dihidrolisiskan kepada hasil akhir iaitu asid galik dan glukosa.

Kepekatan glukosa di dalam hidrolisis ini ditentukan dengan alat Warburg dengan menggunakan sistem katalase glukosa oksidase dan kaedah kolometri dengan fenol dan asid sulfurik. Kepekatan asid galik pula boleh ditentukan dengan menggunakan penitratan dengan sodium hidroksida menggunakan autotitrater (Metrohm potentia graph E336, metrohm, swiss) dan penyerapan UV pada jarak gelombang 260 nm.



Rajah 1.5: Lalan hidrolisis asid tanik oleh tanase (libuchi *et al.*, 1972).

1.4 Penghasilan Tanase Melalui Fermentasi Kultur Tenggelam

Fermentasi kultur tenggelam adalah pertumbuhan mikroorganisma secara ampaian di dalam medium cecair di mana pelbagai nutrien dilarutkan (Frost & Moss, 1987). Fermentasi kultur tenggelam adalah kaedah yang lebih disukai bagi penghasilan enzim komersil yang penting disebabkan pensterilan dan mudah mengawal proses diesterifikasian dalam sistem seperti ini (Aunstrup *et al.*, 1979). Fermentasi kultur tenggelam melibatkan dua kumpulan utama iaitu faktor fizikal dan fisiologi.

1.4.1 Faktor Fizikal

Secara umumnya, faktor fizikal ataupun keadaan fizikal kultur contohnya suhu, pH, oksigen, dan tekanan boleh memberi kesan yang besar terhadap pertumbuhan mikroorganisma dan penghasilan tanase. Fermentasi enzim banyak dipengaruhi oleh suhu, walau bagaimanapun, suhu optimum untuk sintesis sesuatu enzim mungkin berbeza dengan suhu pertumbuhan optimum (Frost & Moss, 1987). Suhu optimum untuk penghasilan tanase bagi kebanyakan kes didapati adalah lebih kurang 30°C seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1.1. Walau bagaimanapun, untuk kes *Rhizopus oryzae*, *A. awamori*, dan *Lactobacillus plantarum* suhu yang lebih tinggi, iaitu lebih kurang 37°C diperlukan. Sementara, penghasilan tanase oleh *Bacillus* sp. pula memerlukan suhu yang paling tinggi iaitu 40°C dan suhu terendah, 25 ° C diperlukan untuk penghasilan tanase oleh *A. niger* dan *P. chrysogenum* (Jadual 1.1).

Medium pengkulturan yang mempunyai pH yang berlainan boleh mempengaruhi struktur dan fungsi sesuatu enzim. Ini adalah kerana enzim yang merupakan protein mempunyai kumpulan terion yang boleh dipengaruhi oleh pH yang berlainan (Frost & Moss, 1987). Kebanyakan enzim ekstrasel mikrob dihasilkan pada kadar yang tinggi pada pH pertumbuhan optimum mikrob tersebut, dan berkemungkinan nilai pH tersebut hampir dengan nilai yang memberi aktiviti enzim yang maksimum. pH medium pengkulturan boleh dimanipulasikan supaya penghasilan metabolit sekunder berlaku dengan maksimumnya. Selain daripada memberi kesan ke atas penghasilan enzim, pH medium pengkulturan juga boleh merangsangkan penukaran morfologi sel, dan juga memberi kesan terhadap kestabilan produk dalam medium (Gupta *et al.*, 2003).

Untuk kes tanase yang dihasilkan di dalam fermentasi kultur tenggelam, pH awal medium yang baik adalah di antara 4.5 dan 6.5 (Lekha & Lonsane, 1997). Penghasilan tanase di dalam fermenter 20 liter yang menggunakan *A. niger* dengan pengawalan pH oleh regulasi automatik ammonia atau asid ortofosforik yang mempunyai pH optimal 7 (Pourrat *et al.*, 1982). Bagi fermentasi yang lain pula, iaitu fermenter 3 liter yang menggunakan *A. awamori*, nilai pH optimum adalah 5.0 yang dikawal dengan larutan akues ammonia dan asid hidroklorik (Seth & Chand, 2000). Walau bagaimanapun, Barthelemy *et al.*, (1994) melaporkan bahawa penghasilan tanase menggunakan *A. niger* mempunyai pH optimum 5.5.

Jadual 1.1: Keadaan fermentasi untuk penghasilan tanase bagi pelbagai mikroorganisma di bawah keadaan fermentasi kultur tenggelam.

Mikroorganisma	Media	Kepekatan (%)	Masa (h) / pH	Suhu (°C)	Rujukan
<i>A. aculeatus</i>	Asid tanik Glukosa (NH ₄)HPO ₄ MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ CaCl ₂	2.0 0.1 0.3 0.1 0.05 0.03	24-36 pH 5.5	30	Banerjee <i>et al.</i> , (2001)
<i>A. awamori</i>	Asid tanik NaNO ₃ KCl MgSO ₄ ·5H ₂ O KH ₂ PO ₄ CuSO ₄ ·5H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O ZnSO ₄ ·2H ₂ O	3.5 0.3 0.05 0.05 0.1 0.001 0.001 0.001	60 pH 5.0	37	Seth & Chand, (2000)
<i>A. flavus</i>	Asid tanik NaNO ₃ MgSO ₄ ·7H ₂ O KCl	0.1 0.2 0.05 0.005	96 pH 6.0	30	Yamada <i>et al.</i> , (1968)
<i>A. japonicus</i>	Asid tanik Glukosa Czapek Dox	2.0 0.2	24 pH 6.0	30	Bradoo <i>et al.</i> , (1997)
<i>A. niger</i>	Asid tanik Sukrosa NaNO ₃ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ KCl FeSO ₄	2.0 3.0 0.3 0.1 0.05 0.05 0.001	144 pH 6.5	25	Dhar & Bose, (1964)
<i>A. niger</i>	Ekstrak tanin daripada serbuk "gall nut" 72.6 %		29 pH 4.5	33	Barthomeuf <i>et al.</i> , (1994)
<i>A. niger</i>	Asid tanik KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O MnCl ₂ ·6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 0.1 0.2 0.02 0.002 0.0004 0.0002 0.00025	96 pH 5.5	30	Lekha & Lonsane, (1994)

Jadual 1.1: ... Sambungan.

<i>A. niger</i> van Tieghem	Asid tanik NaNO ₃ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ KCl	2.0 0.3 0.1 0.05 0.05	120 pH 5.0	30	Sharma <i>et al.</i> , (1999)
<i>A. oryzae</i>	Asid tanik NH ₄ Cl KHPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O AlCl ₃ ·6H ₂ O	2.0 0.2 0.2 0.1 0.001	70- 120 pH 6.0	30	Yamada <i>et al.</i> , (1967)
<i>A. oryzae</i>	Asid tanik Glukosa NH ₄ H ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 1.0 1.4 0.2 0.05	48 pH 5.5	30	Fumihiko & Kiyoshi, (1975)
<i>B. licheniformis</i>	Asid tanik Glukosa K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ NH ₄ NO ₃	1.0 0.1 0.05 0.05 0.05 0.3	30-36 pH 5.0	35	Mondal & Pati, (2000)
<i>Bacillus sp.</i>	Ekstrak "chestnut" komersial	1.0	6 pH 6.8	40	Deschamps <i>et al.</i> , (1983)
<i>Candida sp.</i>	Asid tanik Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O K ₂ HPO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O Monosodium glutamat	3.0 0.3 0.3 0.05 1.0	144 pH 6.0	35	Aoki <i>et al.</i> , (1976)
<i>Citrobacter freundii</i>	Asid tanik M9 Medium	1.0	6	30	Kumar <i>et al.</i> , (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Asid tanik Glukosa (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄ FeSO ₄ ·7H ₂ O Asid cas amino	0.6 0.2 0.6 0.04 0.7 0.002 0.3	24 pH 6	37	Ayed & Hamdi, (2002)
<i>P. chrysogenum</i>	Asid tanik Czapek-Dox Medium	2.0	120 pH 5.8	40	Rajakumar & Nandy, (1983)
<i>R. oryzae</i>	Asid tanik Czapek-dox	10	48 pH 5.0	37	Kar & Banerjee, (2000)

Kadar goncangan memberi kesan terhadap pencampuran dan kadar pengangkutan oksigen di dalam fermentasi kultur tenggelam, dan biasanya memberi kesan terhadap pembentukan produk dan morfologi sel terutamanya miselium. Telah dilaporkan bahawa kadar goncangan yang tinggi boleh menjejaskan pertumbuhan miselium dan seterusnya merendahkan penghasilan enzim (Gupta *et al.*, 2003). Kadar goncangan di antara 150 dan 200 psm biasanya dikenakan terhadap kultur goncangan di dalam fermentasi kelalang. Seth & Chand (2000) telah mengoncangkan kultur mereka, *A. awamori* pada kelajuan 250 psm untuk mencapai penghasilan tanase maksimum. Dilaporkan bahawa pengudaraan yang tidak cukup boleh menyekat pertumbuhan di mana pengudaraan yang berlebihan boleh mengakibatkan oksidasi tanin dan keadaan ini akan memberi kesan perencatan terhadap biosintesis tanase (Barthomeuf *et al.*, 1994; Seth & Chand, 2000).

Morfologi kulat banyak dipengaruhi oleh kelajuan goncangan selain daripada komposisi medium, pH, kekuatan ionik, dan saiz inokulum. Walau bagaimanapun, kadar goncangan yang terlalu tinggi boleh merendahkan penghasilan metabolit. Apabila kadar goncangan tinggi digunakan, kekuatan mekanikal yang terlalu tinggi atau kekuatan ricihan yang dijanakan boleh meningkatkan kadar pemusnahan sel dan seterusnya merendahkan penghasilan enzim (Darah & Ibrahim, 1996). Di bawah keadaan ini, kandungan oksigen yang berlebihan tidak mengurangkan kerosakkan morfologi sel yang dikenakan oleh kekuatan tersebut. Oleh itu, oksigen merupakan suatu parameter yang pertama perlu dioptimumkan dalam fermentasi di mana ia bertindak sebagai faktor terhad yang umum.

1.4.2 Faktor Fisiologi

Penghasilan metabolit sekunder adalah sangat dipengaruhi oleh komposisi medium iaitu kandungan nutrien medium seperti sumber karbon dan sumber nitrogen, dan kandungan unsur surih (Stanbury *et al.*, 1995). Maka, kajian formulasi komposisi medium untuk penghasilan enzim mesti melibatkan kandungan komposisi medium yang dapat memaksimumkan penghasilan enzim pada kadar yang tinggi. Jadual 1.2. menunjukkan kandungan medium untuk menghasilkan enzim tanase oleh *A. niger* (Belmares *et al.*, 2004).

Jadual 1.2 Medium kultur yang tipikal untuk penghasilan tanase oleh *Aspergillus niger*

Konstituen	Kepekatan Awal (g/l)
Tanin	50
Glukosa	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
NaCl	0.005

Oleh kerana enzim tanase adalah enzim teraruh, asid tanik sendiri boleh digunakan sebagai satu-satunya sumber karbon dan juga sebagai bahan pengaruh (Yamada *et al.*, 1968; Aoki *et al.*, 1976). Walau bagaimanapun, penambahan sumber karbon tambahan seperti glukosa pada kepekatan 1% (b/i) dan sukrosa pada 3% (b/i) bersama asid tanik dapat meningkatkan penghasilan tanase untuk *A. oryzae* dan *A. niger* masing-masing (Fumihiko & Kiyoshi, 1975; Dhar & Bose, 1964). Pada masa yang sama, terdapat laporan yang menyatakan bahawa kepekatan glukosa yang melebihi 1% (b/i) bersama asid tanik menunjukkan kesan perencatan terhadap pertumbuhan dan penghasilan tanase oleh *A. japonicus* (Bradoo *et al.*, 1997). Banerjee *et al.*, (2001) juga menunjukkan bahawa kepekatan glukosa yang melebihi 0.1% (b/i), merencatkan penghasilan tanase tetapi tidak pada pertumbuhan mikroorganisma. Maklumat ini menunjukkan bahawa kepekatan glukosa yang tinggi merencatkan penghasilan enzim tanase disebabkan oleh sumber karbon yang sedia ada iaitu glukosa (Bradoo *et al.*, 1997; Banerjee *et al.*, 2001) yang menggunakan strain *A. japonicus* melaporkan bahawa tanase dihasilkan dengan sangat rendah ataupun secara konstitutif pada gula ringkas dan gula kompleks tetapi aktiviti tanase digandakan dengan kehadiran asid tanik di dalam medium. Mondal & Pati (2000) yang menggunakan strain *Bacillus licheniformis* melaporkan bahawa tanase dihasilkan dengan tinggi sekali apabila sumber karbon (0.1%; b/i) hadir bersama asid tanik (1%; b/i) di dalam medium asas. Keadaan ini adalah disebabkan oleh rangsangan katabolik oleh glukosa terhadap penghasilan tanase (Mondal & Pati, 2000). Kepekatan asid tanik juga didapati adalah faktor genting yang mempengaruhi aras penghasilan tanase (Lekha & Lonsane, 1997). Di dalam fermentasi kultur tenggelam

kepekatan asid tanik biasanya terletak di antara julat 0.1 dan 10% (b/l) (Nishira & Mugibayashi, 1959; Yamada *et al.*, 1968). Akan tetapi, dalam fermentasi kultur tenggelam yang menggunakan *A. oryzae* dan *A. japonicus*, pertumbuhan dan aktiviti tanase menjadi rendah apabila kepekatan asid tanik di dalam medium pengkulturan adalah melebihi 0.5% (b/i) dan 3.0% (b/i) masing-masing (Ganga *et al.*, 1977; Bradoo *et al.*, 1997). Selain daripada asid tanik, ekstrak "gall nut" mentah yang mengandungi lebih kurang 72.6 g/l tanin juga dilaporkan bagus untuk penghasilan tanase menggunakan strain *A. niger* di bawah fermentasi kultur tenggelam (Barthomeuf *et al.*, 1994).

Seperti sumber karbon, sumber nitrogen telah menunjukkan regulasi dalam metabolisme sekunder bagi kebanyakan mikroorganisma. Kebanyakan mikroorganisma kegunaan industri boleh menggunakan sumber nitrogen organik dan tak organik. Walau bagaimanapun untuk penghasilan tanase, sumber nitrogen tak organik seperti natrium nitrat (Dhar & Bose, 1964; Yamada *et al.*, 1968), ammonium sulfat (Vandamme *et al.*, 1989), amonium oksalat (Reshetnikova *et al.*, 1984), dan amonium sulfat (Fumihiko & Kiyoshi, 1975) telah dilaporkan menghasilkan aktiviti tanase yang tinggi.

Selain daripada itu, pelbagai sumber nitrogen organik contohnya mononatrium glutamat (Aoki *et al.*, 1976), asid glutamik, dan hidrosilat kasein telah digunakan untuk penghasilan tanase. Secara umumnya, sumber nitrogen tak organik lebih menjadi pilihan untuk penghasilan tanase. Penggunaan sumber nitrogen yang tidak sesuai boleh merencatkan penghasilan enzim. Didapati bahawa aras

sumber nitrogen yang terlalu tinggi boleh menyebabkan represi penghasilan metabolit sekunder.

Dalam sesetengah mikroorganisma, penambahan unsur surih adalah penting untuk meningkatkan penghasilan metabolit sekunder. Unsur surih seperti Fe, Zn, dan Cu telah dilaporkan menjadi keperluan untuk penghasilan tanase bagi *A. niger* manakala Fe tidak mempunyai kesan terhadap penghasilan tanase dalam kes *Penicillium* (Nishira, 1961).

Penambahan garam mineral ke dalam medium pengkulturan mempunyai kesan terhadap penghasilan enzim. Fosfat sebagai contohnya, diperlukan untuk pertumbuhan sel, tetapi pada sesetengah kepekatan ia boleh menyebabkan represi dalam metabolisme sekunder sel. Fosfat tak organik boleh menyebabkan represi di dalam sintesis fosfatase di mana ia menyebabkan aras ATP sentiasa tinggi. Masa yang diperlukan untuk penghasilan tanase di dalam fermentasi kultur tenggelam mungkin mengambil masa antara 1 sehingga 10 hari bergantung kepada mikroorganisma yang digunakan (Lekha & Lonsane, 1997). Untuk kes *A. niger* dan *Candida* sp., fermentasi berterusan sehingga 6 hari diperlukan, sementara untuk *A. oryzae* pula, masa fermentasi yang diperlukan adalah di antara 2 hingga 5 hari. Masa fermentasi yang lebih pendek iaitu selama 29 jam telah dilaporkan, yang dihasilkan oleh *A. niger* (Barthomeuf *et al.*, 1994). Penghasilan tanase maksimum bagi bakteria telah didapati selama 6 jam perfermentasian (Deschamps *et al.*, 1983)

1.5 Pengekstrakan tanase

Pengekstrakan tanase bergantung sepenuhnya pada sistem fermentasi yang digunakan. Oleh kerana kebanyakan enzim tanase merupakan ekstrasel apabila dihasilkan melalui fermentasi keadaan pepejal, ia mudah diekstrakkan dengan air atau larutan penimbal. Dua hingga tiga kali ganda isipadu agen pengekstrakan dicampurkan dengan hasil akhir fermentasi dan ditekan sehingga memperolehi ekstrak yang mengandungi enzim.

Kedudukan tanase semasa penghasilannya bergantung pada masa penghasilannya (Rajakumar & Nandy, 1983). Ia adalah intrasel pada masa awal pengkulturan kultur tersebut dan kemudiannya ia dirembeskan ke dalam medium. Akan tetapi, sehingga 80% daripada tanase terikat pada miselium apabila kepekatan maksimum tanase dicapai. Tanase terikat dapat diekstrak selepas hidrolisis dinding sel dengan menggunakan enzim seperti kitinase. Sel tersebut juga dapat dipecahkan secara mekanikal.

1.6 Tanase tersekat gerak

Oleh kerana suatu fraksi tanase yang terhasil semasa fermentasi permukaan cecair masih terikat pada sel, maka biojisim yang terhasil boleh diguna semula sebagai mangkin biologi. Beberapa pendekatan boleh digunakan untuk memekatkan tanase atau penulenan dan immobilisasi selepas pengekstrakan daripada biojisim (fermentasi permukaan cecair) atau daripada kultur medium (fermentasi permukaan cecair atau fermentasi keadaan pepejal).