

**LAPORAN AKHIR PROJEK PENYELIDIKAN IRPA  
JANGKA PENDEK**

**MEI 2000 – OGOS 2001**

**PENINGKATAN PENGHASILAN ENZIM XILANASE OLEH KULAT  
BASIDIOMYCETES *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*  
ME 446 SECARA FERMENTASI KULTUR TENGGELAM  
DAN KEADAAN PEPEJAL, MENGGUNAKAN SISA  
PERTANIAN TEMPATAN SEBAGAI SUBSTRAT**

**(NO. AKAUN: 305/PBIOLOGI/622212)**

**Profesor Madya Dr. Darah Ibrahim,  
Pusat Pengajian Sains Kajihayat  
Universiti Sains Malaysia  
Pulau Pinang**

---

**Penghargaan**

Penyelidik ingin mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada MOSTE dan USM yang telah menyediakan geran penyelidikan ini, Dekan P. P. Sains Kajihayat di atas sokongannya, kepada kakitangan P. P. Sains Kajihayat yang terlibat, juga kepada semua pelajar-pelajarnya yang telah menjayakan projek penyelidikan ini.

## LATAR BELAKANG

Enzim xilanase atau secara formalnya dikenali sebagai 1,4- $\beta$ -D-xilanohidrolase (EC 3.2.1.8) adalah sejenis enzim yang terlibat di dalam penguraian bahan hemiselulosa yang terkandung di dalam bahan berlignoselulosa. Enzim ini mempunyai banyak kegunaannya di bidang industri. Salah satu daripada kegunaan xilanase diperingkat awal era bioteknologi ialah dalam proses biopengubahan bahan berlignoselulosa menjadi produk yang lebih bernilai seperti protein sel tunggal, bahan api, bahan kimia dan lain-lain lagi. Penghasilan protein sel tunggal oleh mikroorganisma menggunakan pulpa gula beet di dalam sistem fermentasi keadaan pepejal telah dilaporkan. Xilanase yang hadir secara ekstrasel didapati penting untuk menghidrolisiskan komponen hemiselulosa sebelum ia dapat digunakan oleh mikroorganisma untuk pertumbuhan dan juga untuk pembentukan protein. Peranan xilanase dalam proses pengolahan bahan berlignoselulosa untuk dijadikan bahan makanan haiwan juga sangat penting. Contohnya ialah di dalam pengolahan jerami gandum dan jagung dengan menggunakan mikroorganisma xilanolisis. Penambahan enzim termasuk xilanase ke dalam bahan makanan haiwan dapat meningkatkan tenaga yang boleh diperolehi daripada makanan tersebut. Disamping itu, ia juga membantu proses penguraian serat pada haiwan muda yang masih belum mempunyai enzim pengurai lignoselulosa yang mencukupi di dalam usus mereka. Xilanase juga sering dicampurkan bersama rai sebagai makanan ayam untuk mengurangkan kelikatan usus, dan campuran xilanase di dalam produk sampingan gandum untuk makanan ayam dapat memperbaiki nilai nutrisi dengan meningkatkan pencernaan protein dan lemak. Malah, pengolahan makanan haiwan dengan enzim termasuk xilanase juga dapat mengurangkan buangan najis daripada haiwan ternakan kerana enzim tersebut meningkatkan penyerapan yang boleh digunakan oleh haiwan tersebut.

Enzim xilanase juga turut membantu penghasilan bahan api etanol. Xilanase bertindak menghidrolisiskan xilan menjadi unit-unit gula pentosa iaitu xilosa yang seterusnya dapat ditukarkan kepada etanol oleh mikroorganisma seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* dan *Candida utilis*. Selain daripada etanol, minyak daripada sumber mikroorganisma seperti simpanan lipid iaitu trigliserida juga berpotensi untuk dimajukan

sebagai bahan api. Daripada kajian lalu, didapati *Cryptococcus* dan *Trichosporon* mampu mensakarifikasikan xilan dan mengumpulkan lipid. *Cryptococcus albidus* pula didapati mampu mensintesiskan trigliserida secara terus daripada xilan kerana ia mempunyai aktiviti xilanase ekstrasel. Sebaliknya, *Cryptococcus terricolus* pula hanya dapat mengasimilasikan xilosa dan xilobiosa untuk ditukarkan kepada trigliserida, sekiranya xilanase ditambah ke dalam medium pengkulturannya.

Kegunaan lain xilanase termasuklah di dalam industri pembuatan pulpa dan kertas, dalam industri makanan, pemprosesan dan penjernihan jus buah-buahan dan penghasilan xilitol iaitu sejenis pemanis makanan. Xilitol didapati lebih sesuai untuk pesakit diabetes dan dapat mencegah karies gigi. Xilitol dapat dihasilkan oleh beberapa jenis yis dengan menggunakan unit xilosa yang terhasil oleh tindakan xilanase terhadap polimer xilan. Xilanase juga berpotensi untuk digunakan dalam proses penyahdakwatan daripada kertas bercetak terpakai kerana kaedah penyahdakwatan secara konvensional tanpa pengolahan dengan enzim adalah kurang berkesan, dan ditambah pula dengan kosnya yang tinggi. Terdapat banyak lagi kegunaan enzim xilanase yang penting dibidang industri.

Oleh itu, adalah menjadi matlamat kajian ini untuk meningkatkan lagi penghasilan enzim xilanase secara fermentasi sama ada fermentasi keadaan pepejal (medium pepejal) atau fermentasi kultur tenggelam (medium cecair), menggunakan kulat basidiomiset penyebab penyakit busuk putih pada tumbuhan iaitu *Phanerochaete chrysosporium* ME 446. Tambahan pula, Malaysia adalah sebuah negara yang berasaskan pertanian dan industri pertanian merupakan penyumbang kepada sektor ekonomi yang amat penting bagi negara. Sehubungan dengan itu, terdapat banyak bahan buangan berlignoselulosa yang dibiarkan begitu sahaja sama ada diladang atau ditempat-tempat buangan tertentu. Statistik yang lengkap tentang jumlah bahan buangan dan sisa pertanian di Malaysia sukar diperolehi, memandangkan jumlah yang dihasilkan adalah meningkat pada setiap tahun. Antara sisa pertanian yang banyak didapati di negara ini termasuklah jerami dan sekam padi, batang kelapa sawit dan daun kelapa sawit, batang rembia dan sisa buangan industri perkayuan. Di antara sisa dari industri pertanian pula termasuklah kulit dan sisa pemprosesan kelapa sawit, kulit buah koko, hampas tebu, kulit dan empulur nenas dan

sebagainya. Dalam kajian ini bahan berlignoselulosa daripada sisa buangan pertanian dan industri pertanian akan digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan kulat *P. chrysosporium* bagi peningkatan penghasilan enzim xilanase yang banyak kegunaannya diperingkat industri.

## **RINGKASAN HASIL PENYELIDIKAN**

### **Peningkatan penghasilan enzim xilanase di dalam fermentasi kultur tenggelam oleh *Phanerochaete chrysosporium***

Kajian penghasilan enzim xilanase ini bermula dengan penggunaan pengkulturan tenggelam. Kajian ini adalah penting memandangkan kulat *P. chrysosporium* merupakan kulat yang tumbuh dipermukaan pepejal. Oleh yang demikian, kajian tentang pengaruh beberapa faktor persekitaran ke atas penghasilan enzim xilanase adalah diperlukan. Dalam kajian ini tumpuan diberikan kepada penggunaan sel bebas dan sel tersekat gerak di dalam sistem kelalang goncangan. Bagi sel tersekat gerak pembawa yang digunakan ialah gabus pencuci dan natrium alginat. Pengoptimuman beberapa parameter penting dalam penghasilan xilanase menunjukkan terdapat pertambahan penghasilan sebanyak 400% apabila menggunakan medium yang mengandungi sumber karbon 0.1% (b/i), selulosa dan 0.1% (b/i) ammonium klorida sebagai sumber nitrogen. Pengkulturan dijalankan pada suhu 30°C, dengan kadar goncangan 150 psm dan inokulum berkepekatan  $6 \times 10^6$  spora/ml. Penghasilan xilanase didapati signifikan di dalam medium yang mengandungi polisakarida rencam seperti hampas tebu. Pertambahan xilan sebagai bahan pengaruh adalah amat diperlukan. Aktiviti xilanase yang maksimum diperolehi selepas enam hari pengkulturan iaitu sebanyak 17.8 U/ml. Saiz inokulum dan kadar goncangan didapati mempengaruhi penghasilan xilanase. Kepekatan inokulum yang melebihi  $6 \times 10^6$  spora/ml menghasilkan bilangan bintilan miselium yang rendah, sedangkan kadar goncangan yang melebihi 150 psm menyebabkan berlakunya penglisisan sel. Penghasilan xilanase juga amat bergantung kepada pertumbuhan kulat dan keadaan ini dapat dikawal dengan mengawasi kepekatan karbon dan nitrogen di dalam medium pengkulturan. Walau bagaimanapun, aktiviti xilanase didapati jatuh

mendadak selepas mencapai penghasilan maksimum, yang didapati berkaitan dengan aktiviti enzim protease. Kulat *P. chrysosporium* didapati menghasilkan dua jenis enzim protease iaitu asid dan neutral. Protease neutral didapati bertanggung jawab dalam penguraian protein enzim xilanase. Walau bagaimanapun, keadaan penguraian protein enzim xilanase ini dapat diatasi dengan menambahkan 20 mg/l asid para-kloromerkurik benzoik, iaitu sejenis sebatian perencat protease thiol, ke dalam medium pengkulturan. Penambahan sebatian ini didapati berupaya menstabilkan aktiviti dan juga penghasilan enzim xilanase.

Maklumat yang diperolehi daripada sistem kelalang goncangan telah dipindahkan pula ke dalam sistem fermenter. Dua sistem fermenter iaitu fermenter tangki teraduk dan angkut udara (jenis tubular dan gelung) digunakan. Dengan menggunakan sistem fermenter ini, pertumbuhan kulat dan penghasilan enzim xilanase dapat dipertingkatkan. Penghasilan enzim xilanase yang tinggi yang dihasilkan oleh sel-sel bebas *P. chrysosporium* sebanyak 48.3 U/ml diperolehi apabila kulat dikulturkan di dalam fermenter angkut udara tubular berbanding dengan fermenter angkut udara gelung atau tangki teraduk. Parameter-parameter yang telah dioptimumkan untuk digunakan di dalam fermenter tersebut ialah kadar pengudaraan sebanyak 1.0 vvm, selulosa 0.1% (b/i) dan kepekatan inokulum sebanyak 2.5% (i/i) dari  $6 \times 10^6$  spora/ml. Penghasilan enzim dipertingkatkan lagi dengan memerangkap sel-sel kulat tersebut di dalam gabus penggosok dan ditumbuhkan di dalam medium pertumbuhan yang serupa. Penghasilan maksimum xilanase ialah sebanyak 159.3 U/ml dicapai selepas lapan hari pengkulturan. Gabus penggosok yang dibuat dari bahan nilon yang menyekatgerak sel-sel kulat itu menunjukkan kestabilan yang signifikan sehingga dua kali ulangan.

### **Peningkatan penghasilan enzim xilanase di dalam fermentasi keadaan pepejal oleh *Phanerochaete chrysosporium***

Selain daripada sistem pengkulturan tenggelam, kajian juga dilakukan menggunakan sistem pengkulturan menggunakan substrat pepejal. Dalam sistem ini, beberapa jenis sisa buangan pertanian telah digunakan seperti sekam padi, jerami padi, habuk kayu, hampas

batang kelapa sawit dan hampas tebu, namun hampas tebu telah didapati sesuai untuk digunakan dalam kajian ini. Dalam fermentasi menggunakan hampas tebu, didapati sistem fermentasi yang telah dioptimumkan iaitu 200g hampas tebu, kandungan air sebanyak 35%/g substrat, ammonium klorida sebanyak 0.1% (b/b), ekstrak yis sebanyak 0.1% (b/b), xilan 0.1 % (b/b), saiz inokulum sebanyak 1.0 ml mengandungi  $6 \times 10^6$  spora/ml dan pengeraman pada suhu bilik ( $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ) telah menghasilkan aktiviti xilanase maksimum iaitu sebanyak 100.1 U/ml selama tujuh hari pengkulturan. Keadaan ini merupakan suatu peningkatan penghasilan xilanase yang amat tinggi berbanding dengan system kultur tenggelam secara relatif.

## **KESIMPULAN**

Hasil daripada penyelidikan ini menunjukkan yang penghasilan enzim xilanase oleh kulat *P. chrysosporium* dapat dipertingkatkan dengan menggunakan sistem fermenter dan penyekatgerakan sel bagi kultur tenggelam. Malah cara yang lebih baik lagi ialah dengan menggunakan sistem fermentasi keadaan pepejal dengan hampas tebu sebagai substrat. Walau bagaimanapun, xilan harus ditambahkan sebagai bahan pengaruh kerana penghasilan xilanase adalah berdasarkan aruhan. Oleh itu, adalah menjadi matlamat kajian ini untuk menggunakan hasil yang diperolehi agar ia dapat diterjemahkan kepada suatu proses yang lebih sesuai.

## PENERBITAN

### A. Kertas Kerja Persidangan

1. Sattam, M.O. and Darah, I. (2000). The production of xylanase by immobilized cells of *Phanerochaete chrysosporium* in scouring mesh cubes and calcium alginate beads. Abstract of the First Biology Postgraduate Conference "The Beginning: Millenium Spirit", 21-23 October, Penang, Malaysia. P: 34. 26440 26139

2. Sattam, M. O. and Darah, I. (2000). The effects of agitation and inoculum size on the production of xylanase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture system. Abstract of the First Biology Postgraduate Conference "The Beginning: Millenium Spirit", 21-23 October, Penang, Malaysia. P: 69. 26139 26138

### B. Tesis

#### Sarjana Sains (Master of Science):

1. Sattam Mohammad Ali Obeidat (2001). Xylanase production by *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 (ATCC 34541) in a submerged culture system. USM.

#### Sarjana Muda (Bachelor of Science)

1. Linda binti Md. Nor (2000/2001). Perkaitan diantara enzim xilanase dan enzim protease yang dihasilkan oleh kulat *Phanerochaete chrysosporium*. USM.

2. Lim Kok Weng (2001/2002). Kesan penambahan pelbagai sumber karbon, nitrogen dan bahan aruh ke atas penghasilan xilanase oleh *Trichoderma viride* secara fermentasi substrat pepejal. USM.