

# TINJAUAN BACAAN: PENGHASILAN PROTEASE MELALUI KAEDAH FERMENTASI MIKROB

Nursyuhadah Othman<sup>1</sup>, Darah Ibrahim<sup>2</sup> and Wan Nordini Hasnor Wan Ismail<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Faculty of Pharmacy, Universiti Teknologi MARA (Pulau Pinang), 13200 Kepala Batas, Pulau Pinang, Malaysia.

<sup>2</sup>Industrial Biotechnology Research Laboratory, School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, 11800, Pulau Pinang, Malaysia.

<sup>1</sup>syuhadah@ppinang.uitm.edu.my; <sup>2</sup>darah@usm.my; <sup>3</sup>nordini.hasnor@ppinang.uitm.edu.my

## ABSTRACT

*Enzymes are globular protein produced by living cells used to catalyze specific biochemical reactions. Enzymes are specific in each reaction, acting on a high conversion rate and the reaction is optimum at specific physiological conditions. Protease is an enzyme that catalyzes the breakdown of the molecular bonds in the polypeptide complex. Protease (EC 3.4.21-24), can be found in microorganisms, plants and animals. However, microorganisms are the most preferred source due to their rapid growth, minimal space requirement for culturing processes and easily manipulated genetically in order to produce beneficial enzymes. Protease production from microbial fermentation has been known worldwide because it optimizes the usage of agriculture and domestic wastes as substrate. Subsequently, it will reduce the cost involved. Proteases have many applications in various disciplines. In this modern world, demands for microbial protease keep increasing as more people aware of the green environment. Microbial proteases provide safer alternatives to the industry and can replace the usage of synthetic materials which can pollute our environment.*

**Keywords:** Enzyme; protease; catalyst; microbes; fermentation.

## ABSTRAK

*Enzim adalah suatu protein globul yang dihasilkan oleh sel-sel hidup yang seterusnya akan digunakan untuk memungkinkan tindak balas biokimia yang spesifik. Ciri enzim adalah bersifat spesifik dalam setiap tindak balas yang dimangkinkannya, bertindak pada kadar penukaran yang tinggi dan mempamerkan tindak balasnya pada keadaan fisiologi yang tertentu. Enzim protease merupakan enzim yang memungkinkan penguraian ikatan polipeptida di dalam molekul protein kompleks. Enzim protease, (EC 3.4.21-24), terdapat di dalam mikroorganisma, tumbuhan dan haiwan. Walau bagaimanapun, mikroorganisma adalah sumber yang lebih digemari kerana pertumbuhannya yang cepat, tidak menggunakan ruang yang luas untuk proses pengkulturan dan mudah dimanipulasi secara genetik untuk menghasilkan enzim-enzim baru yang boleh digunakan untuk pelbagai tujuan. Kaedah pemfermentasian*

*mikroorganisma bagi menghasilkan protease lebih digemari kerana ia dapat mengurangkan kos apabila substrat yang digunakan terdiri daripada sisa pertanian atau sisa domestik. Enzim protease mempunyai pelbagai kegunaan dalam pelbagai industri bagi memudahkan kehidupan kita seharian. Selain itu, kesedaran masyarakat tentang betapa pentingnya menggunakan produk-produk bioteknologi dalam urusan harian berbanding penggunaan bahan sintetik yang boleh mencemarkan alam sekitar dan memerlukan tenaga buruh yang ramai, misalnya dalam pengurusan dan pemprosesan sisa, telah meningkatkan lagi permintaan terhadap penghasilan enzim protease.*

**Kata kunci:** Enzim; protease; pemangkin mikro; fermentasi.

## 1. MIKROORGANISMA PENGHASIL PROTEASE

Protease merupakan salah satu enzim yang utama dalam kehidupan seharian kerana penggunaannya yang luas di mana ia terlibat dalam kedua-dua jenis tindak balas penguraian dan sintesis. Kepentingannya dalam proses fisiologi hidupan sama ada tumbuh-tumbuhan dan organisma lain menyebabkan ia boleh didapati walau di mana sahaja. Mikroorganisma sering digunakan dalam penghasilan enzim protease di peringkat industri kerana kepelbagaiannya dari segi teknikal dan lebih ekonomi. Mikroorganisma penghasil protease terdiri daripada bakteria, kulat, yis.

### 1.1 Bacteria

Protease daripada bakteria digunakan dengan meluas untuk proses fermentasi kultur tenggelam pada skala besar. Tempoh penghasilan protease oleh bakteria adalah lebih cepat berbanding mikrob lain kerana kitar hidupnya yang singkat. Contoh bakteria penghasil protease adalah *Bacillus* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Aeromonas hydrophilia* (Shafee, Aris, Rahman, Basri, & Salleh, 2005). Sesetengah bakteria berupaya menguraikan protein secara anaerob, dan hasilnya adalah sebatian-sebatian busuk seperti asid lemak, amina dan indol seperti yang dihasilkan oleh *Clostridium* sp. *Lactobacillus* sp. digunakan sebagai kultur awal bagi pemprosesan keju, di mana strain ini digunakan untuk penggumpalan kasein susu kerana strain ini mempunyai aktiviti kaseinolisis yang tinggi. Bacteria asid laktik ini mempengaruhi kualiti dan pengawetan produk akhirnya. Peranan penting bacteria asid laktik ini adalah menghasilkan asid laktik, seterusnya menurunkan pH dan menjalankan proteolisis terhadap substrat untuk membebaskan peptida dan asid amino, yang menyebabkan rasa dan tekstur produk akhir menjadi lebih baik. Sistem proteolisis bacteria asid laktik mengandungi protease dalam sel, peptida khusus, sistem pengangkutan asid amino dan sebahagian peptidase sitoplasma (Piuri, Sanchez-Rivas, & Ruzal, 2003). Bacteria ruminan, *Prevotella ruminicola* digunakan dalam kajian sebagai penghasil protease bagi memeriksa keadaan optimum sintesis protease (Wang & Hsu, 2005). Bacteria ini dapat tumbuh dengan baik walaupun tanpa kehadiran cecair rumen berbanding spesies yang lain bagi genus yang sama (Bryant & Robinson, 1962; Griswold & Mackie, 1997; Depardon, Debros, & Blanchart, 1998) dan sesuai digunakan dalam kultur *in vitro*. Kebanyakan aktiviti protease yang dihasilkan oleh *Prevotella ruminicola* terletak pada bahagian ekstrasel dan permukaan sel, manakala pada preplasma adalah rendah iaitu sebanyak 14% dan bahagian intrasel sebanyak 4% (Wang & Hsu, 2005). Keadaan ini mencadangkan bahawa kebanyakan protease dirembes di dalam medium pengkulturan ataupun terletak pada permukaan sel.

Semasa fasa eksponen pertumbuhan *Prevotella ruminicola*, aktiviti protease adalah berkadar terus dengan bilangan sel, namun apabila pertumbuhannya menjadi semakin lambat dan memasuki fasa pegun, kebanyakan aktiviti dipindahkan kepada medium pengkulturan (Michael & Russell, 1997).

Aktiviti protease ekstrasel juga ditemui pada pencilan bakteria yang diperolehi daripada keadaan yang ekstrem seperti kolam air panas. Bacteria yang dipencilkan daripada keadaan ini adalah *Bacillus brevis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. macerans* dan *B. subtilis* (Olajuyigbe & Ajele, 2005). Penggunaan protease termostabil mempunyai banyak faedah dari segi penggunaannya dalam industri kerana dapat menggunakan suhu pemrosesan yang tinggi seterusnya mempercepatkan kadar tindak balas, mengurangkan kontaminasi oleh mikroba mesofilik dan meningkatkan keterlarutan reaktan tidak bergas. Keperluan global terhadap pemangkin termostabil meningkat sebanyak dua pertiga berbanding protease yang dihasilkan oleh mikroba mesofili (Beg, Sahai, & Gupta, 2003).

## 1.2 Kulat

Kulat berfilamen dikenali sebagai penghasil pelbagai jenis enzim. Terdapat banyak kajian dan aplikasi di peringkat industri tentang penghasilan metabolit sekunder oleh kulat berfilamen hasil daripada penerokaan pengetahuan tentang genetik kulat dan tapak jalan kulat. Kebanyakan spesies kulat yang digunakan adalah tidak patogen dan dikelaskan secara umumnya sebagai selamat atau GRAS (*Generally Regarded As Safe*) sekaligus membolehkannya digunakan dalam industri makanan, farmaseutikal atau sebarang industri yang memerlukan penggunaannya. Dalam pengkulturan kultur tenggelam, sesetengah aktiviti enzim dipengaruhi oleh dinding sel miselium. Walau bagaimanapun, dalam sistem fermentasi substrat pepejal, aktiviti enzim terdapat pada medium, sementara hanya sedikit aktiviti yang terdapat pada miselium (Iwaihiia, Todoroki, Kimura, Shimoi, & Ito 1998; Hashimoto et al., 1999). Kulat menunjukkan bentuk yang berbeza sepanjang kitar hidupnya dan bentuk yang ditunjukkan adalah disebabkan genetik spesies kulat, medium pertumbuhan dan juga keadaan fizikal pengkulturan seperti pH, suhu dan goncangan (Papagianni, 2004).

Protease yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. digunakan dalam pelbagai tujuan terutamanya dalam industri. *Aspergillus oryzae* misalnya, berupaya untuk menghidrolisis gluten gandum, dalam industri barangan kulit (Godfrey & West, 1996), industri farmaseutik (Chiplonkar et al., 1985) dan hidrolisis protein soya. Dalam sistem fermentasi substrat tenggelam, kulat berfilamen biasanya menghasilkan protease yang sedikit berbanding dalam sistem fermentasi substrat pepejal. Bagi mengatasi masalah ini, pencilan *Aspergillus oryzae* telah dimanipulasi secara genetik oleh Samarantam, Cheevadhanarak, dan Tanticharoen (1999) dan hasilnya, kandungan protease yang terhasil adalah lebih banyak berbanding strain yang asal. Medium yang digunakan adalah medium kompleks yang sangat ekonomi, di mana kacang soya yang telah dinyah lemak telah digunakan dalam kajian ini. Enzim yang dihasilkan oleh pencilan ini mempunyai ciri sebagai protease serin apabila ia menunjukkan perencatan apabila ditambah dengan fenilmetilsulfonil flourida (PMSF). Wang, Law, dan Webb (2003) pula menghasilkan enzim protease daripada kombinasi kacang soya dan tepung gandum menggunakan sistem fermentasi substrat tenggelam daripada pencilan *Aspergillus oryzae*. Pencilan *Penicillium expansum* pula berupaya menghasilkan protease alkali seperti yang dilaporkan oleh Dahot (1994). Enzim protease daripada pencilan ini dihasilkan menggunakan medium asal yang ditambahkan dengan serbuk sekam padi. Aktiviti protease adalah maksimum pada pH 10.5

dan suhu 35°C. Selain *Penicillium* sp., genus kulat penghasil protease yang lain adalah seperti *Trichoderma* (Manonmani & Joseph, 1993), *Rhizopus* (Tunga, Banerjee, & Bhattacharya, 1998) dan *Beuveria* (Urtz & Rice, 2000). Bagi menghasilkan enzim protease alkali untuk memperbaiki rasa soya. Agrawal, Patidar, Banerjee, dan Patil (2003) telah menggunakan bran gandum sebagai bahan utama. Pencilan *Penicillium* sp. ini telah dipencilkan daripada tanah di kawasan industri pemprosesan soya. Suhu optimum bagi penghasilan protease tersebut adalah 28°C.

### 1.3 Yis

Yis merupakan sumber mikroorganisma yang berpotensi dalam penghasilan enzim protease. Penghasilan protease ekstrasel oleh yis digemari kerana boleh digunakan secara terus dalam industri dan pengekspresan sistemnya dapat digunakan bagi penghasilan protein heterologus (Ogrydziak, 1993). Terdapat pelbagai kajian yang melibatkan penghasilan protease daripada yis antaranya, *Candida lipolytica* dan *Yarrowia lipolytica* (Tobe, Takami, Ikeda, & Horikoshi, 1976; Ogrydziak, 1993). *Yarrowia lipolytica* menghasilkan enzim protease ekstrasel sehingga mencecah beberapa gram bagi setiap liter pada keadaan pemfermentasian yang optimum (Barth & Garlardin, 1996). Chi, Ma, Wang, dan Li (2007) melaporkan penghasilan protease alkali daripada *Aureobasidium pullulans* yang dipencilkan daripada mendakan pasir sekitar pesisiran pantai Qingdao, China. Penghasilan protease mencatatkan jumlah maksimum pada pH 9.0 dan suhu 45°C. Penghasilan enzim meningkat dengan penambahan kanji terlarut sebagai sumber karbon. Ini menunjukkan strain tersebut berkemungkinan mengeluarkan enzim ekstrasel amilase untuk menghidrolisis kanji di dalam medium dan menggunakannya sebagai sumber karbon tunggal dalam pengeluaran protease. Kajian mengenai kebolehan yis yang dipencilkan daripada suhu ekstrem oleh Ray, Devi, Kumar, dan Shivaji (1992) membuktikan bahawa jenis mikrob ini boleh menghasilkan protease ekstrasel. Penghasilan protease daripada *Candida humicola* amat bergantung kepada komposisi medium. Yis ini aktif pada julat suhu 0 hingga 45°C, dengan aktiviti maksimum pada 37°C. Yis psikrotrofi lain yang mampu menghasilkan protease terdiri daripada genus *Kluyveromyces*, *Endomycopsis*, *Chephalosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycopsis*, *Rhodotorula* dan *Candida* (Ray et al., 1992).

## 2. PENGHASILAN PROTEASE MELALUI PEMFERMENTASIAN KULTUR TENGGELAM

Fermentasi kultur tenggelam adalah pertumbuhan mikroorganisma secara ampaian di mana pelbagai nutrien dicampurkan (Frost & Moss, 1987) dan kebanyakan medium adalah komersial. Kaedah fermentasi kultur tenggelam kerap digunakan dalam penghasilan enzim pada skala besar kerana prosesnya mudah dikawal dan langkah-langkah pensterilan mudah dikendalikan. Contoh-contoh fermentasi kultur tenggelam adalah kelalang goncangan dan fermenter seperti fermenter tangki teraduk dan fermenter angkut udara. Fermentasi kultur tenggelam dipengaruhi oleh dua faktor utama iaitu fisiologi dan fizikal.

Faktor fizikal kultur yang mempengaruhi penghasilan enzim protease adalah suhu, pH, oksigen dan tekanan. Fermentasi enzim banyak dipengaruhi suhu, walau bagaimanapun suhu optimum bagi sesuatu enzim mungkin berbeza mengikut suhu optimum pertumbuhan (Frost & Moss, 1987). Suhu optimum bagi penghasilan protease bagi kebanyakan kes kulat adalah pada 30°C, dan bagi kebanyakan bakteria dan yis masing-masing memerlukan suhu sekitar

37°C (Olajuyigbe & Ajele, 2005) dan 25°C (Chi et al., 2007) bagi yis. Kadar tindak balas enzim meningkat dengan peningkatan suhu manakala pada suhu melebihi suhu optimum akan menyebabkan berlakunya penurunan kadar tindak balas atau penyahaktifan aktiviti enzim.

Enzim adalah sejenis protein yang mempunyai kumpulan terion, di mana pH bagi kultur medium yang berbeza akan mempengaruhi struktur, fungsi dan penghasilan enzim oleh sesuatu mikroorganisma (Frost & Moss, 1987). Kebanyakan enzim ekstrasel yang dihasilkan pada pH pertumbuhan optimum oleh mikroorganisma menghasilkan aktiviti enzim maksimum yang menghampiri nilai pH tersebut (Volesky & Loung, 1995). pH medium pengkulturan mempengaruhi proses penghasilan enzim dan pengangkutan komponen-komponen tertentu melalui membran sel (Moon & Parulekar, 1991). Kepelbagaian pH mungkin boleh memberi maklumat berkaitan kinetik tentang penghasilan protease, seperti tempoh bermula dan berakhirnya penghasilan protease kerana perubahan pH berkait rapat dengan sintesis protease dan komponen nitrogen.

Enzim protease terbahagi kepada protease asidik, protease neutral dan protease alkali berdasarkan julat pH aktiviti optimum (Sandhya, Sumantha, Szakacs, & Pandey 2005). Protease asidik yang mempunyai julat nilai pH optimum 3-5, dirembeskan oleh kulat dan yis dalam kebanyakan kes. Pada tahun 1971, Matsubara dan Feder (1971) telah mengklasifikasikan mikrob protease asidik kepada dua bahagian iaitu enzim seperti-pepsin yang dirembeskan oleh *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., dan *Rhizopus* sp. serta enzim seperti-kimosin yang dihasilkan oleh *Mucor* sp. Protease neutral pula dirembeskan oleh kebanyakan mikrob. Aktiviti enzim bagi protease neutral adalah optimum pada pH 7 (Owen, 1983) dan enzim ini adalah tidak stabil (Ibrahim, 1994). Contoh mikroorganisma penghasil protease neutral ialah daripada mikroorganisma seperti *Bacillus*, *Aspergillus oryzae*, *Clostridium histolyticum* (Seifter & Harper, 1971). Protease alkali aktif di antara julat pH 9-11. Protease alkali stabil pada suhu tinggi, oleh itu ia mempunyai kegunaan yang meluas dalam industri makanan, formulasi ubat-ubatan, detergen dan dalam penggunaan rawatan sisa kumbahan. Mikrob penghasil protease alkali termasuklah daripada spesies *Trichoderma* (Mannonmani & Joseph, 1993), *Penicillium griesofulvin* (Dixit & Verma, 1995), *Aspergillus flavus* (Malathi & Chakraborty, 1991).

Kadar pemindahan oksigen semasa proses pengkulturan memainkan peranan penting dalam pertumbuhan dan penghasilan metabolit sekunder oleh mikroorganisma. Kadar goncangan memberi kesan terhadap percampuran nutrien dan kadar pemindahan oksigen di dalam proses fermentasi kultur tenggelam dan memberi kesan terhadap penghasilan produk dan morfologi sel. Kadar goncangan dan pengudaraan perlu berada dalam keadaan yang malar sepanjang proses fermentasi untuk membolehkan aras oksigen terlarut sama dengan pertumbuhan sel untuk sintesis enzim yang lebih baik (Nik Ida Mardiana, 2005). Namun, pada kadar goncangan yang tinggi, sintesis protease adalah kurang baik berkemungkinan kerana keperluan oksigen bagi sesuatu mikrob berkurangan (Genckal & Tari, 2006).

Medium kultur merupakan faktor penting dalam menggalakkan pertumbuhan sel dan pembentukan produk dalam fermentasi. Ia bukan sahaja membekalkan nutrien dan persekitaran yang diperlukan untuk mengoptimumkan pertumbuhan sel, tetapi juga mengaruh penghasilan produk yang diinginkan, merencatkan pembentukan produk yang tidak diinginkan dan memberi anggaran kos bagi penghasilan sesuatu produk (Yuan, 2003). Unsur-unsur seperti karbon, nitrogen, bahan pengaruh dan unsur surih adalah amat diperlukan di dalam medium

pengkulturan. Sumber karbon seperti glukosa, sukrosa, kanji, laktosa dan fruktosa amat diperlukan dalam proses fermentasi. Selain sumber-sumber karbohidrat yang digunakan sebagai sumber karbon dalam penghasilan enzim protease, asid organik juga telah dilaporkan bertindak sebagai sumber karbon yang berjaya menghasilkan enzim protease alkali dalam kuantiti yang banyak oleh *Bacillus* sp., *Candida lipolytica* dan *Rhodotorula glutinis* (Owen, 1983).

Protein atau peptida telah menunjukkan kemampuannya dalam menggalakkan sintesis enzim protease dalam kebanyakan kumpulan enzim protease. Medium pengkulturan *Aspergillus terricola* yang ditambah dengan aspartat, methionin, arginin, isoleusin, leusin atau valin, sebagai sumber nitrogen menggalakkan penghasilan enzim protease. Pepton, kasein, asid amino tertentu boleh merangsang pembentukan enzim protease oleh *Aspergillus niger*. Walau bagaimanapun, asid amino pada kepekatan yang tinggi akan menghalang pembentukan enzim protease (Owen, 1983). Unsur-unsur surih merupakan elemen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel dalam kuantiti yang sedikit, kerana kehadirannya pada kepekatan yang tinggi boleh menyebabkan toksik kepada mikrob tersebut (Yuan, 2003).

### **2.1 Penghasilan Protease Melalui Pemfermentasian Substrat Pepejal**

Enzim protease juga boleh dihasilkan melalui kaedah pemfermentasian substrat pepejal (*solid state fermentation*; SSF). Kaedah ini melibatkan pengkulturan mikrob pada substrat pepejal terutamanya sisa-sisa pertanian yang kaya dengan lignoselulosa seperti hampas tebu, sekam padi, bran gandum, sisa kelapa sawit (pelepah, batang, dan isirong), kulit buah koko, hampas kelapa dan hampas kayu. Sistem fermentasi ini adalah amat sesuai dalam menukarkan sisa pertanian kepada penghasilan bahan bernilai tambah sekaligus mengurangkan risiko pencemaran alam sekitar oleh sisa pertanian.

Kebanyakan mikroorganisma seperti kulat, bakteria dan yis boleh menghasilkan produk melalui SSF. Namun begitu, kulat merupakan sumber mikroorganisma yang lebih digemari bagi sistem ini kerana ciri-ciri fisiologi, enzimologi dan biokimia yang dimilikinya. Mod hifa dalam pertumbuhan kulat dan toleransinya terhadap aktiviti air ( $A_w$ ) yang rendah serta ketahanan terhadap tekanan osmosis yang tinggi menjadikan kulat lebih efisien dan kompetitif dalam biopenukaran substrat pepejal (Raimbault, 1998). Kebaikan SSF dari segi ekonomi adalah keperluan penggunaan mesin yang ringkas, proses hiliran yang mudah, substrat yang murah dan tenaga yang diperlukan adalah rendah (Cannel & Moo-Young, 1980; Malathi & Dhar, 1987). Keburukan kaedah ini pula ialah berkemungkinan terdapat risiko kontaminasi bagi kulat yang mempunyai kitaran tumbuh yang perlahan. Faktor-faktor penting yang mempengaruhi penghasilan enzim protease di dalam SSF adalah pemilihan mikrob yang sesuai, substrat yang betul, kelembapan relatif, pH, prapengolahan substrat, suhu eraman, pertambahan nutrien, dan sebagainya (Pandey, 2003). Kelembapan relatif merupakan faktor utama dalam penghasilan enzim melalui kaedah ini kerana kelembapan medium menentukan pertumbuhan mikrob dan penghasilan produk (Nishio, Tai, & Nagai, 1979; Ramesh & Lonsane, 1990). Kelembapan yang rendah mengurangkan keterlarutan nutrien di dalam substrat pepejal, di mana semakin kecut substrat itu, maka semakin tinggilah tekanan air (Zandrazil & Brunert, 1981). Kelembapan yang tinggi pula menyebabkan kehilangan struktur partikel, pembentukan lekit, pengurangan isipadu gas, meningkatkan pertukaran gas dan meningkatkan pembentukan miselium udara (Lekha & Lonsane, 1994). Malathi dan Chakraborty (1991), melaporkan bahawa penghasilan protease maksimum adalah pada

kelembapan relatif 63% dan Agrawal et al. (2003), melaporkan bahawa penghasilan protease maksimum pada kelembapan relatif 50%.

Pemilihan substrat juga mempengaruhi penghasilan protease. Substrat yang dapat memenuhi keperluan protein mikroorganisma bagi sintesis protease dianggap sebagai substrat terbaik (Pandey & Radhakrishnan, 1993). Fungsi substrat tidak hanya terbatas sebagai pembekal nutrien kepada mikrob, malah juga sebagai tapak untuk sel tersebut menetap dan tumbuh. Bran gandum telah digunakan sebagai substrat oleh Sandhya et al., (2005) bagi penghasilan protease oleh *Aspergillus oryzae*, sementara Malathi dan Chakborty (1991) pula menggunakannya pada *Aspergillus flavus*. Sementara itu, Ikasari dan Mitchell (1994) pula menghasilkan protease daripada *Rhizopus oligosporus* menggunakan bran padi. Walaupun substrat merupakan sumber pembekalan nutrien bagi mikrob, unsur-unsur tambahan juga diperlukan dalam penghasilan protease maksimum. Ini termasuklah sumber karbon, nitrogen dan bahan pengaruh. Misalnya, dengan penambahan glukosa sebanyak 0.3% (b/b) memberi nilai protease optimum yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* (Syarifah Najiha, 2005). Kajian yang dijalankan oleh Malathi dan Chakraborty (1991) mendapati ketiadaan sumber nitrogen tambahan pada bran gandum menyebabkan aktiviti protease yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* menurun. Fenomena yang sama turut direkodkan oleh Tsuchiya dan Kimura (1984) dalam kes penghasilan protease oleh *Cephalosporium* sp.

### 3. KESIMPULAN

Enzim protease merupakan enzim yang mempunyai banyak kegunaan di dalam pelbagai cabang industri di negara kita. Protease boleh dihasilkan melalui pemfermentasian mikroorganisma seperti kulat, bakteria atau yis. Kaedah pemfermentasian yang popular untuk menghasilkan protease adalah pemfermentasian kultur tenggelam atau pemfermentasian substrat pepejal. Bagi mendapatkan aktiviti protease yang optimum, beberapa parameter pemfermentasian perlu dikaji. Ini melibatkan parameter fizikal seperti kelajuan goncangan, suhu pengeraman, pH medium dan kelembapan relatif. Manakala parameter kimia yang terlibat adalah sumber glukosa yang digunakandan kepekatannya, sumber nitrogen dan kepekatannya, unsur-unsur surih yang terlibat serta agen penggalak yang digunakan. Bagi mengurangkan kos pemfermentasian sekaligus menjaga alam sekitar, adalah dicadangkan supaya sisa pertanian digunakan sebagai substrat bagi penghasilan protease.

### RUJUKAN

- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T., & Patil, S. (2003). Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 39, 977-981.
- Barth, G., & Garlardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In K. Wolf (Ed.), *Non-conventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin: Spinger-Verlag.
- Beg, K. B., Sahai, V., & Gupta, R. (2003). Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39, 2003-2009.
- Bryant, M. P., & Robinson, I. M. (1962). Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology*, 84,605-614.

- Cannel, E., & Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. *Process Biochemistry*, 6,2-7.
- Chi, Z., Ma, C., Wang, P., & Li, H. F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98, 534-538.
- Chiplonkar, J. M., Gangodkar, S. V., Wagh, U. V., Ghadge, G. D., Rele, M. V., & Srinivasan, M. C. (1985). Applications of alkaline protease from *Conidiobolus* in animal cell culture. *Biotechnology Letter*, 7, 665-668.
- Dahot, M. U. (1994). Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum*. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 7(2), 100-105.
- Depardon, N., Debroas, D., & Blanchart, G. (1998). In vitro study of molecular weight, hydrophobicity and amino acid composition of peptides during breakdown of a casein hydrolysate by two strains of *Prevotella ruminicola*. *Reproduction Nutritional Development*, 38, 567-576.
- Dixit, G., & Verma, S. C. (1995). Production of alkaline proteases by *Penicillium griseofuvarum*. *Indian Journal of Microbiology*, 33, 257-60.
- Frost, G. M., & Moss D. A. (1987). *Production of enzymes by fermentation*. In J. F. Kennedy (Ed.), *Biotechnology*, vol 7. Verlag Chemie: Weinheim.
- Genckal, H., & Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 703-710.
- Godfrey, T., & West, S. (1996). *Industrial Enzymology* (2nd ed.). New York: Macmillan Publishers Inc.
- Griswold, K. E., & Mackie, R. I. (1997). Degradation of protein and utilization of the hydrolytic products by a predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola* B1(4). *Journal of Dairy Science*, 80, 167-175.
- Ibrahim, C. O. (1994). *Pengantar mikrobiologi industri*. Pulau Pinang : Penerbit Universiti Sains Malaysia.
- Ikasari, L., & Mitchell, D. A. (1994). Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 320-324.
- Iwaihiia, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi, H., & Ito, K. (1998). Purification and characterization of extracellular and cell wall bound S-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 1938-1946.
- Hashimoto, T., Morishita, M., Iwashita, K., Shimoi, H., Nakata, Y., Tsuii, Y., & Ito, K. (1999). Production and some properties of salt tolerant  $\beta$ -glucosidases from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* in solid and liquid cultures. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 88, 479-483.



- Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. (1994). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid state, liquid surface and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 29, 497-503.
- Malathi, S., & Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as depletion agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (3), 712-716.
- Malathi, S., & Dhar, S. C. (1987). Production of extracellular proteases by an *Aspergillus flavus* isolate and its application in the depletion of skins. *Leather Science*, 34, 67-76.
- Manonmani, H. K., & Joseph, R. (1993). Purification and extracellular proteinase of *Trichoderma koningii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 624-628.
- Matsubara, H., & Feder, J. (1971). Other bacterial, mold and yeast proteinases. In P. D., Boyer (Ed.). *The Enzymes* (3rd ed.). New York: Academic Press.
- Michael, A. C., & Russell, J. B. (1997). Digestion of nitrogen in a rumen: a model for metabolism of nitrogen compounds in gastrointestinal environments. In R. I. Mackie & B. A. White (Eds.), *Gastrointestinal microbiology*. New York: Chapman & Hall.
- Moon, S. H., & Parulekar, S. J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology Bioengineering*, 37, 467-483.
- Nik Ida Mardiana, N. P. (2005). *Pengoptimuman penghasilan enzim tanase daripada Aspergillus niger pencilan tempatan secara kultur tenggelam*. (Unpublished Master's Thesis). Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.
- Nishio, N., Tai, K., & Nagai, S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 8, 263-270.
- Ogrydziak, D. M. (1993) Yeast extracellular proteases. *Critical Review Biotechnology*, 13, 1-55.
- Olajuyigbe, F. M., & Ajele, J. O. (2005). Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 776-779.
- Owen, P. W. (1983). Proteinases. In W. M. Fogarty (Ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. London and New York: Applied Science Publishers.
- Pandey, A., & Radhakrishnan, S. (1993). The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245. *Process Biochemistry*, 28(5), 305-309.
- Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. *Biochemical Engineering*, 13, 81-84.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes: a review. *Biotechnology Advances*, 22, 189-259.

- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 372-379.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of Solid Substrate Fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 1-15.
- Ramesh, M. V., & Lonsane, B. K. (1990). Critical importance of moisture content of content of the medium in alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* M 27 in solid state fermentation system. *Applied Microbiology Biotechnology*, 33, 501-505.
- Ray, M. K., Devi, K. U., Kumar, G. S., & Shivaji, S. (1992). Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1918-1923.
- Samarntarn, W., Cheevadhanarak, S., & Tanticharoen, M. (1999). Productin of alkaline protease by genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 99-103.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2689-2694.
- Seifter, S., & Harper, E. (1971). The collagenases. In P. D. Boyer (Ed.), *The enzymes vol 3*. New York: Academic Press New York.
- Shafee, N., Aris, S. N., Rahman, R. N. Z., Basri, M., & Salleh, A. B. (2005). Optimization of envirometal and nutritional conditions for the production of alkaline protease by newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *Journal of Applied Sciences Research*, 1(1), 1-8.
- Syarifah Najiha, S. S., (2005). *Pengoptimuman penghasilan enzim protease secara pemfermentasian substrat pepejal menggunakan sistem dulang*. (Unpublished Bachelor Degree's Thesis). Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang.
- Tobe, S., Takami, T., Ikeda, S., & Horikoshi, K. (1976). Production of some enzymatic properties of alkaline protease of *Candida lipolytica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40, 1087-1092.
- Tsuchiya, K., & Kimura, T. (1984). Decrease in protease activity by the addition of glucose to the culture of *Cephalosporium* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 35-39.
- Tunga, R., Banerjee, R., & Bhattacharrya, B. C. (1998). Optimizing some factors affecting protease production under solid-state fermentation. *Bioprocess Engineering*, 19, 187-190.
- Urtz, B. E., & Rice, W. C. (2000). Purification and characterization of novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 104, 180-186.

- Volesky, B. N., & Loung, J. H. (1995). Microbial Enzymes: Production, purification and Isolation. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 2, 119-146.
- Wang, H. T., & Hsu, J. T. (2005). Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extracellular crude protease. *Anaerobe*, 11, 155-162.
- Wang, R., Law, R. C. S., & Webb, C. (2003). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 217-227.
- Yuan, K. L. (2003) Bioprocess technology. In Y. K. Lee (Ed.), *Microbial biotechnology: Principles and application*. Singapore: World Scientific.
- Zandrazil, F., & Brunert, H. (1981). Investigation of physical parameters important for solid-state fermentation of straw by white rot fungi. *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*, 11, 183-188.