

Pembangunan Inokulum untuk Penghasilan Lipid dan Asid Gamma Linolenik (GLA) oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1

(Inoculum Development for Lipid and Gamma Linoenic Acids Production by
Cunninghamella bainieri 2A1)

FARHILA MUHID, ABDUL JALIL ABDUL KADER, WAN MOHTAR WAN YUSOFF,
OTHMAN OMAR & AIDIL ABDUL HAMID*

ABSTRAK

Ciri inokulum bagi pengkulturan kulat oleaginus pencilan tempatan, Cunninghamella bainieri 2A1 dibangunkan dengan mengenal pasti kesan jenis, umur dan saiz inokulum terhadap pertumbuhan, penghasilan lipid dan GLA. Pengkulturan dijalankan pada suhu 30°C dengan kadar goncangan 250 rpm dalam kelalang goncangan 500 mL yang mengandungi 200 mL medium terhad nitrogen. Inokulum spora didapati lebih sesuai berdasarkan produktiviti penghasilan lipid yang tinggi iaitu 0.71 (g/L/hari) berbanding penggunaan inokulum sel vegetatif vegetatif 24 jam dan 48 jam yang masing-masing memberikan produktiviti hanya 0.51 dan 0.45 (g/L/hari). Selain itu, penghasilan GLA (5.3×10^{-2} g/g biojisim tanpa lipid) dalam kultur yang dimulakan dengan inokulum spora (1×10^5 spora/mL) didapati lebih tinggi sebanyak 23% berbanding inokulum sel vegetatif. Kepekatan spora sebanyak 1×10^3 spora/mL menghasilkan morfologi pelet bersaiz 1.04 mm dan berkadar dengan kandungan lipid dan GLA masing-masing sebanyak 40% (g/g biojisim) dan 8.34×10^{-2} (g/g biojisim tanpa lipid).

Kata kunci: Asid gamma linolenik; Cunninghamella bainier; inokulum; lipid; pelet

ABSTRACT

Inoculum for a local isolate of oleaginus fungi, Cunninghamella bainieri 2A1 was developed by establishing the inoculum types, age and size for growth, lipid and gamma linolenic acid (GLA) production. Cultivation was carried out in 500 mL shake flask containing 200 mL of nitrogen limiting medium at 30°C and 250 rpm agitation. Direct inoculation of spores into the production cultures gave higher productivity of lipid production 0.71 (g/L/day) than using 24 and 48 vegetative cells cultures which gave only 0.51 and 0.45 (g/L/day), respectively. Besides, production of GLA (5.3×10^{-2} g/g lipid less biomass) in the cultures which directly inoculated with spores (1×10^5 spores/mL) was 23% higher than those produced in the cultures started with vegetative cells. Spore concentration of 1×10^3 spores/mL produced pelletal growth in size of 1.04 mm which contain 40% (g/g biomass) lipid and 8.34×10^{-2} (g/g lipid less biomass).

Keywords: Cunninghamella bainieri ; gamma linolenic acid; inoculum; lipid; pellet

PENGENALAN

Asid γ -linolenik merupakan asid lemak poli tidak tepu (PUFA) yang paling unik di kalangan semua asid lemak dalam kumpulan ω -6 kerana keistimewaannya dalam bidang farmaseutikal terutama potensinya untuk menyekat pertumbuhan tumor dan metastasis (Fan et al. 1998). Ia juga digelar 'King's Cure-All' di Eropah kerana kehebatannya bertindak sebagai pelopor bagi sintesis hormon lipid seperti prostaglandin, leukotrien dan tromboksan yang berfungsi menurunkan kepekatan kolesterol darah, mengawal inflamasi kronik dan akut, bertindak dalam perawatan penyakit ekzema (Horrobin 1992), serta kawalan diabetes dan sindrom premenstrual (Certik et al. 1996). GLA tidak dapat disintesis dalam tubuh manusia kerana ketiadaan enzim desaturase yang terlibat dalam pembentukan asid linoleik daripada asid oleik (Anderson & Wynn 2001). Berdasarkan kepentingan

GLA dalam nutirisi dan perubatan ini, pelbagai kajian untuk meningkatkan penghasilan GLA daripada pelbagai sumber termasuk kulat oleaginus telah dan sedang dijalankan. Salah satu perkara penting yang perlu dititikberatkan dalam sesuatu proses adalah pembangunan inokulum.

Kualiti inokulum yang digunakan dalam proses fermentasi bergantung pada jenis, umur dan saiz inokulum yang digunakan (Calam 1976). Inokulum yang biasa diguna untuk diinokulatkan ke dalam kultur penghasilan adalah inokulum sel vegetatif atau lebih dikenali sebagai kultur benih. Peringkat kultur benih ini diperlukan bagi menyediakan sel yang aktif untuk memulakan fasa penghasilan. Bagaimanapun, penggunaan ampai spora secara langsung ke dalam kultur penghasilan boleh juga digunakan bergantung kepada kesesuaian dan penghasilan produk yang diinginkan. Penggunaan

ampaian spora secara langsung boleh mengurangkan masa proses fermentasi berbanding sel vegetatif. Ini kerana, masa yang perlu diperuntukkan untuk penyediaan kultur benih dapat di 'omit'. Namun, penggunaan jenis inokulum ini bergantung kepada kesesuaian keadaan proses fermentasi dan produk yang ingin dihasilkan. Kultur benih yang disediakan daripada kultur yang dituai semasa fasa pertumbuhan eksponen memberikan fasa lag yang pendek apabila diinokulkan ke dalam medium untuk proses penghasilan. Apabila sel yang sedang aktif membahagi ini digunakan sebagai kultur benih, fasa lag yang terhasil dalam kultur penghasilan dapat dikurangkan. Berdasarkan lengkung pertumbuhan, umur kultur benih perlu dikenalpasti untuk memastikan sel benar-benar bersedia untuk bertumbuh dengan baik dan menghasilkan lipid dan GLA yang maksimum pada peringkat kultur penghasilan (Bajpai et al. 1991).

Selain jenis dan umur, saiz inokulum juga merupakan parameter yang perlu diambil kira bagi memastikan inokulum yang digunakan berkualiti untuk penghasilan produk (Papagianni & Moo-Young 2001). Ini kerana, saiz inokulum mempengaruhi pembentukan morfologi khususnya terhadap kulat berfilamen, yang seterusnya mempengaruhi penghasilan produk fermentasi (Chen & Liu 1997). Apabila dikulturkan dalam medium cecair, kulat berfilamen dapat tumbuh dalam pelbagai bentuk morfologi bermula daripada bentuk cabang miselia yang bebas sehingga membentuk gumpalan padat miselia yang dinamakan pelet. Hiruta et al. (1996) melaporkan bahawa kandungan GLA dalam kultur *Mortierella ramanniana* MM15-1 yang berbentuk pelet lebih tinggi berbanding bentuk filamen. Oleh itu, bagi menghasilkan lipid dan GLA yang maksimum, pembangunan inokulum dalam fermentasi kulat berfilamen boleh dimanipulasi dengan mengoptimalkan saiz inokulum, yang akan mempengaruhi jenis morfologi kultur dan secara langsung mempengaruhi penghasilan produk.

Kajian ini melaporkan kesan penggunaan dua jenis inokulum iaitu spora dan sel vegetatif serta mengenalpasti umur dan saiz inokulum yang sesuai untuk penghasilan lipid dan GLA oleh kulat oleaginus pencilan tempatan, *Cunninghamella bainieri* sp. 2A1

BAHAN DAN KAEDAH

MIKROORGANISMA DAN PENYEDIAAN KULTUR STOK

Cunninghamella bainieri 2A1 diperoleh daripada koleksi makmal Biokimia dan Fisiologi Kulat, Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Kultur simpanan pencilan ini disubkulturkan setiap tiga minggu secara memindahkan cm^2 kultur ke atas agar kentang dekstrosa (PDA). Kultur dieram pada suhu 30°C selama 3 hari untuk dijadikan kultur simpanan dan 7 hari digunakan untuk penghasilan ampaian spora. Kultur disimpan pada suhu 4°C .

PENYEDIAAN AMPAIAN SPORA

Air suling steril sebanyak 15 mL dimasukkan ke dalam piring agar yang mengandungi kultur *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang berumur 7 hari. Bahagian permukaan koloni kulat dikikis menggunakan dawai gelung bagi mendapatkan ampaian spora. Ampaian dipipetkan ke dalam botol universal steril dan disimpan pada suhu 4°C .

PENGKULTURAN DI DALAM MEDIUM CECAIR (PENYEDIAAN SEL VEGETATIF)

Pengkulturan dilakukan dalam medium cecair terhad nitrogen berdasarkan modifikasi medium Kendrick dan Ratledge (1992) yang mengandungi (g/L): $\text{NH}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 1.0; KH_2PO_4 7.0; Na_2HPO_4 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5; ekstrak yis 1.5; CaCl_2 0.1; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0001; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0001; dan glukosa 43 g/L yang diautoklaf secara berasingan. Ampaian spora dengan kepekatan akhir 1×10^5 spora/mL dipindahkan ke dalam kelalang goncangan 500 mL yang mengandungi 200 mL medium terhad nitrogen sebagai kultur benih. Pengkulturan dilakukan selama 48 jam pada suhu 30°C dengan goncangan 250 rpm. Kultur penghasilan disediakan dengan menginokulkan 10% (v/v) kultur benih ke dalam kelalang goncangan 500 mL yang juga mengandungi 200 mL medium terhad nitrogen. Bagi kajian kesan penggunaan spora secara terus terhadap penghasilan lipid dan GLA, pengkulturan dilakukan dengan menginokulat spora terus ke dalam kultur penghasilan dan tidak melibatkan penggunaan kultur benih.

PENCERAPAN DAN PENCIRIAN MORFOLOGI KULTUR

Sedikit sampel miselium diletakkan di atas slaid kaca dan cecair medium yang masih ada pada sampel tersebut dikeringkan terlebih dahulu sebelum dicerap di bawah mikroskop elektron (Scanning electron microscope, SEM) TM-1000 *table top* (HITACHI). Morfologi miselium yang terhasil diperhatikan dan saiz pelet *Cunninghamella bainieri* 2A1 ditentukan.

PENENTUAN BERAT KERING BIOJISIM

Miselium daripada setiap kultur (200 mL) yang dituai, dituras dan dibilas dengan air suling. Miselium pada baki turas dibekukan pada -4°C semalaman, seterusnya dikeringbekukan selama 24 jam dan ditimbang.

PENENTUAN KEPEKATAN AMMONIUM DAN GLUKOSA DALAM MEDIUM KULTUR

Kepekatan ammonium dalam medium kultur ditentukan menggunakan ujian Indofenol berdasarkan kaedah Chaney dan Marbach (1962), manakala kepekatan glukosa dalam medium kultur ditentukan dengan menggunakan kit ujian GOD-PERID (Boehringer Mannheim).

PENGKSTRAKAN LIPID DAN PENENTUAN
PROFIL ASID LEMAK

Lipid sel diekstrak menggunakan 150 mL klorofom/ methanol (2:1 v/v) berdasarkan kaedah Folch et al. (1957). Sampel lipid yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan kaedah kromatografi gas. Kromatografi gas dilakukan dengan menyuntikkan metil ester asid lemak (disediakan melalui tindak balas dengan natrium metoksida) ke dalam kapilari gas (Shimadzu GC7A) yang disambungkan kepada HP23 turus (30 m panjang dan 0.32 μm lebar). Asid lemak yang termetilasi diukur dan dikenalpasti menggunakan piawai metil ester yang dibekalkan oleh Sigma Chemical Co. (#189-19). Kandungan GLA dikira sebagai g GLA/ g biojisim tanpa lipid. Biojisim tanpa lipid diguna disebabkan kandungan lipid di dalam kulat ini menyumbang secara signifikan terhadap berat kering miselium.

HASIL DAN PERBINCANGAN

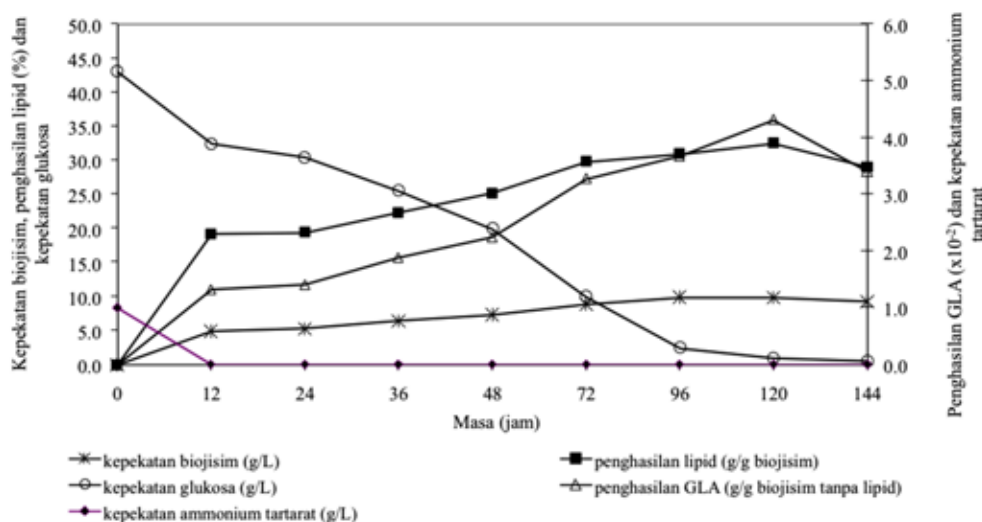
KESAN UMUR KULTUR BENIH DAN JENIS INOKULUM

Rajah 1(a) dan 1(b) menunjukkan profil pertumbuhan, penghasilan lipid dan GLA bagi kultur *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang masing-masing dimulakan dengan inokulum sel vegetatif 48 jam dan 24 jam. Keadaan terhad nitrogen bagi kedua-dua kultur dicapai pada 12 jam pengkulturan dengan peningkatan kepekatan biojisim menjadi perlahan memandangkan kehabisan sumber nitrogen dalam medium kultur. Kepekatan biojisim maksimum bagi kedua-dua kultur dicapai bermula pada 48 jam pengkulturan iaitu 9.66 g/L untuk kultur yang menggunakan sel vegetatif berusia 24 jam dan 9.79 g/L bagi kultur yang menggunakan sel vegetatif berusia 48 jam. Ini menunjukkan bahawa perbezaan umur inokulum diperingkat kultur benih yang dikaji tidak mempengaruhi

penghasilan biojisim oleh *Cunninghamella bainieri* sp. 2A1. Bajpai et al. (1991) juga telah melaporkan bahawa umur inokulum tidak mempengaruhi penghasilan biojisim *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 di mana 3.9 g/L biojisim terhasil apabila pencencil ini dikulturkan menggunakan inokulum yang berbeza-beza usia iaitu 24, 48 dan 72 jam.

Biosintesis lipid dalam *Cunninghamella bainieri* 2A1 berlaku apabila keadaan terhad nitrogen dalam medium kultur dicapai iaitu selepas 12 jam pengkulturan. Keadaan ini tercetus apabila sel-sel telah habis menggunakan sumber nitrogen dalam medium kultur untuk proliferasi sel mengakibatkan pertumbuhan sel terhenti dan karbon yang berlebihan digunakan untuk penghasilan lipid (Ratldge 1997). Menurut Yongmanitchai dan Ward (1991), penghasilan lipid dalam mikroorganisma oleaginus meningkat sehingga mencecah nilai maksimum di akhir fasa log (eksponen) atau di awal fasa pegun. Penghasilan lipid kemudiannya menurun pada lewat fasa pegun dan pada fasa kematian.

Walaupun masih terdapat 1.04 g/L glukosa pada 120 jam pengkulturan, penghasilan lipid didapati menurun kepada 29% (g/g biojisim) pada 144 jam pengkulturan bagi kedua-dua kultur yang dimulakan dengan inokulum sel vegetatif 24 jam dan 48 jam. Hal ini berlaku mungkin kerana sel menggunakan glukosa yang masih ada dalam medium pengkulturan hanya untuk terus memandiri dalam keadaan kehabisan sumber-sumber nutrien lain memandangkan sel-sel masih perlu terus menjaga metabolit penting untuk mandiri. Selain itu, penurunan lipid yang mendadak mungkin disebabkan oleh penggunaan molekul lipid dalam sel untuk menghasilkan tenaga tambahan memandangkan kandungan sumber nutrien lain termasuk glukosa semakin terhad dalam medium pengkulturan.



RAJAH 1. (a) Profil pertumbuhan, penghasilan lipid dan GLA oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 dalam kultur kelompok menggunakan sel vegetatif 48 jam sebagai inokulum

Penghasilan lipid dalam kultur *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang menggunakan inokulum sel vegetatif 24 jam dan 48 jam masing-masing adalah 31.86 % dan 32.47 % (g/g biojisim) iaitu pada 120 jam pengkulturan. Walau bagaimanapun, perbezaan ini adalah tidak signifikan, menunjukkan bahawa penghasilan lipid juga tidak dipengaruhi oleh umur inokulum yang dikaji. Namun, hal ini berbeza dengan kultur *T. Aureum* ATCC 34304 dengan penghasilan lipid dalam kultur yang menggunakan inokulum 48 jam dan 72 jam didapati jauh lebih sedikit iaitu masing-masing sebanyak 5.6% dan 4.2% (g/g biojisim) berbanding kultur yang menggunakan inokulum 24 jam yang menghasilkan 18.9 % (g/g biojisim) lipid (Bajpai et al. 1991). Kajian ini tidak melibatkan inokulum berumur 72 jam kerana *Cunninghamella bainieri* sp. 2A1 telah memasuki fasa pegun dalam lengkung pertumbuhannya yang tidak sesuai digunakan sebagai inokulum.

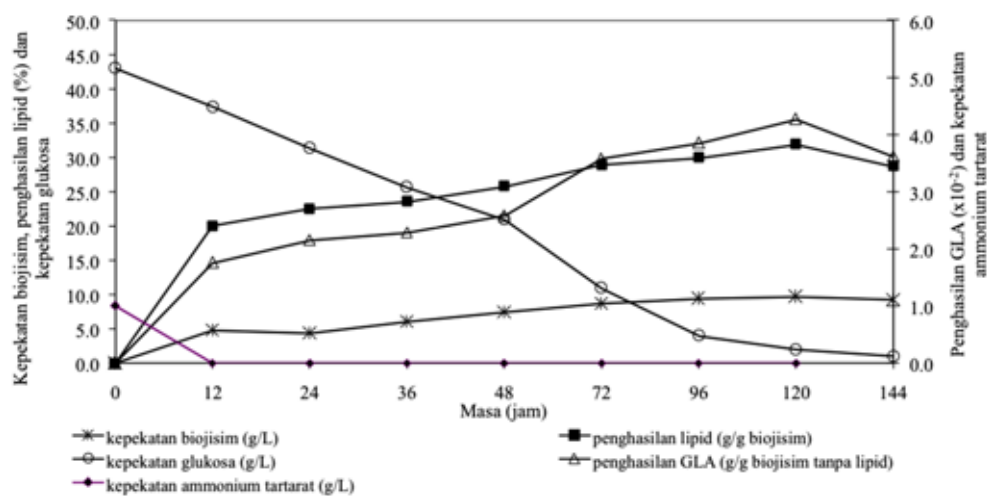
Seperti juga lipid, penghasilan GLA juga didapati tidak dipengaruhi oleh umur inokulum dan tiada perbezaan signifikan dapat dicerap pada penghasilan GLA dalam kultur yang dimulakan dengan inokulum 24 jam dan 48 jam. Penghasilan GLA tertinggi yang dicapai pada 120 jam pengkulturan bagi kultur yang dimulakan dengan inokulum berumur 24 jam dan 48 jam masing-masing adalah 4.26×10^{-2} g/g dan 4.31×10^{-2} g/g biojisim tanpa lipid.

Rajah 2 menunjukkan profil pertumbuhan, penghasilan lipid dan GLA serta penggunaan sumber karbon dan nitrogen dalam kultur *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang menggunakan spora (kepekatan akhir 1×10^5 spora/mL) sebagai inokulum. Kepekatan biojisim yang dicapai selepas 12 jam pengkulturan adalah 2.55 g/L dan terus meningkat sehingga 24 jam pengkulturan (6.25 g/L). Selepas 24 jam, peningkatan kepekatan biojisim didapati semakin perlahan dan mendatar selepas 48 jam pengkulturan berikutan kehabisan sumber nitrogen

dalam medium kultur yang diperlukan untuk pembinaan sel-sel baru semasa proliferasi sel. Kepekatan biojisim tertinggi dicapai pada 120 jam pengkulturan (9.88 g/L), serupa seperti hasil yang dicerap daripada kultur yang menggunakan miselium sebagai inokulum. Fasa kematian sel berlaku selepas 120 jam pengkulturan berdasarkan penurunan dalam kepekatan biojisim akibat kehabisan sumber nutrien yang terkandung dalam medium kultur.

Penghasilan lipid didapati menurun selepas 120 jam pengkulturan berikutan kekurangan sumber glukosa yang semakin habis digunakan oleh sel sama seperti hasil yang diperolehi daripada kultur yang menggunakan inokulum sel vegetatif. Penghasilan lipid tertinggi dalam kultur yang menggunakan spora sebagai inokulum adalah 36.1 % (g/g biojisim). Nilai ini didapati lebih tinggi secara signifikan daripada nilai lipid tertinggi dalam kultur yang menggunakan sel vegetatif sebagai inokulum (32%) (Rajah 1). Pencilan ini juga didapati menghasilkan kandungan GLA yang lebih tinggi apabila pengkulturan dimulakan dengan spora sebagai inokulum (Rajah 2) dengan peratusan peningkatan sebanyak 23 % berbanding kultur yang menggunakan sel vegetatif sebagai inokulum (Rajah 1). Penghasilan GLA tertinggi dalam kultur yang menggunakan spora, sel vegetatif 24 jam dan 48 jam sebagai inokulum masing-masing adalah 5.31×10^{-2} g/g, 4.26×10^{-2} g/g dan 4.31×10^{-2} g/g biojisim tanpa lipid yang juga dicapai pada 120 jam pengkulturan. Oleh yang demikian, uji kaji ini menunjukkan bahawa proses penghasilan GLA oleh pencilan ini boleh dilakukan dengan menginokulat spora secara terus tanpa penyediaan kultur benih dan ini akan dapat meningkatkan produktiviti secara signifikan.

Bagi menentukan jenis inokulum yang sesuai bagi penghasilan lipid dan GLA, produktiviti penghasilan lipid dan GLA bagi ketiga-tiga kultur (inokulum spora, inokulum miselium 24 jam dan 48 jam) dibandingkan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1. Produktiviti penghasilan lipid



RAJAH 2 (b) Profil pertumbuhan, penghasilan lipid dan GLA oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 dalam kultur kelompok yang menggunakan inokulum sel vegetatif 24 jam

JADUAL 1. Produktiviti penghasilan lipid dan GLA oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 bagi kultur yang menggunakan inokulum berbeza

Saiz inokulum (spora/mL)	Diameter pelet (mm)	Kepekatan biojisim (g/L)	%Lipid (g/g biojisim)	Penghasilan GLA (g/g biojisim tanpa lipid)	Kepekatan GLA (g/L)
1×10^2	1.8±0.01	6.16±0.02	39.88±0.02a	0.080±0.001	0.30±0.02
1×10^3	1.04±0.04	8.87±0.01	40.03±0.02b	0.083±0.002	0.44±0.01
1×10^4	0.36±0.17	9.29±0.01	33.76±0.05	0.050±0.003	0.31±0.01
1×10^5	berfilamen	10.67±0.01	32.40±0.01	0.053±0.002	0.38±0.01

Data diperolehi daripada tiga replikasi dan signifikan (ANOVA) pada $p > 0.05$, a dan b tidak signifikan ($p < 0.05$)

(0.71 g/L/hari) dalam kultur yang menggunakan spora didapati lebih tinggi berbanding kultur yang dimulakan dengan inokulum sel vegetatif 24 jam dan 48 jam yang masing-masing memberikan produktiviti hanya 0.51 dan 0.45 (g/L/hari). Pengiraan produktiviti ini mengambilkira hari yang diperlukan untuk penyediaan kultur benih. Selain itu, produktiviti penghasilan GLA (0.07 g/L/hari) dalam kultur yang menggunakan spora sebagai inokulum juga didapati lebih tinggi berbanding kultur yang dimulakan dengan inokulum sel vegetatif 24 jam dan 48 jam yang masing-masing memberikan produktiviti hanya 0.04 (g/L/hari).

Ini menunjukkan bahawa inokulum spora lebih sesuai digunakan untuk penghasilan lipid oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1. Hasil yang diperolehi ini memberikan kaedah pengkulturan yang lebih ringkas apabila kultur benih tidak perlu disediakan dan membolehkan pengurangan dalam penggunaan substrat serta dapat memendekkan masa pengkulturan dan seterusnya meningkatkan produktiviti keseluruhan proses kerana masa bagi proses pengkulturan dapat dikurangkan dua hari.

KESAN KEPEKATAN SPORA TERHADAP MORFOLOGI, PENGHASILAN LIPID DAN GLA

Jadual 2 menunjukkan bahawa penggunaan kepekatan inokulum spora yang berbeza-beza memberi kesan terhadap pertumbuhan biojisim *Cunninghamella bainieri* 2A1. Peningkatan kepekatan biojisim maksimum dapat diperhatikan apabila kepekatan spora ditingkatkan daripada 1×10^2 hingga 1×10^5 . Ini menunjukkan bahawa pengkulturan yang memerlukan kepekatan biojisim yang tinggi perlu dimulakan dengan inokulum pada kepekatan yang lebih tinggi di mana lebih banyak sel permulaan

dapat bercambah supaya menghasilkan lebih banyak biojisim.

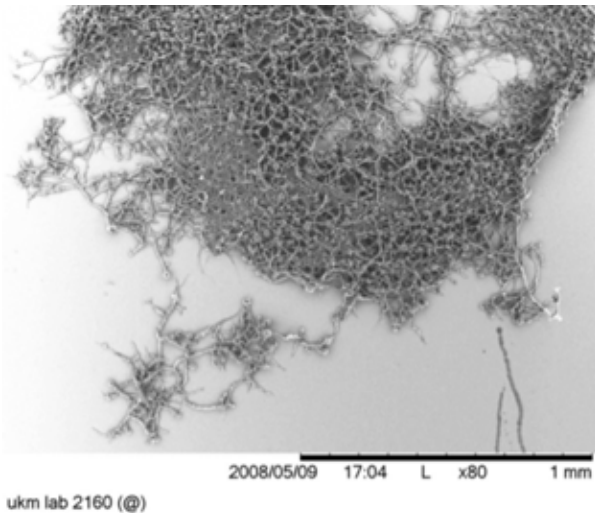
Kepekatan spora juga didapati mempengaruhi penghasilan morfologi pencilan ini di mana pertumbuhan dalam bentuk pelet berlaku pada kepekatan spora yang rendah dan pertumbuhan dalam bentuk berfilamen longgar berlaku pada kepekatan spora yang lebih tinggi (Jadual 2). Apabila kultur dimulakan dengan kepekatan spora 1×10^5 morfologi yang terhasil adalah miselium berfilamen yang terjalin dengan longgar seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 3. Apabila kepekatan spora dikurangkan kepada 1×10^4 miselium yang terhasil adalah dalam morfologi pelet kecil (Rajah 4) dan berdiameter 0.36 mm (Jadual 2). Rajah 4 juga menunjukkan bahawa terdapat campuran morfologi iaitu pelet dan jalinan miselium yang longgar dihasilkan di dalam kultur ini.

Dapat diperhatikan daripada Jadual 2, pengurangan kepekatan spora daripada 1×10^4 kepada 1×10^2 menghasilkan diameter pelet yang semakin besar iaitu dari 0.36 mm kepada 1.8 mm. Ini ditunjukkan dalam Rajah 5 dan 6 dengan pelet yang terbentuk terdiri daripada jalinan miselium yang lebih padat dengan bentuk pelet yang lebih jelas. Cerapan ini serupa seperti dalam kajian menggunakan *Penicillium chrysogenum* yang menunjukkan bahawa kultur yang dimulakan dengan kepekatan 10^3 spora/mL menghasilkan pelet yang lebih besar berbanding kultur yang dimulakan dengan kepekatan inokulum 10^4 spora/mL (Calam 1987).

Penghasilan lipid bagi setiap morfologi *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang terhasil daripada penggunaan kepekatan spora yang berbeza-beza juga memberikan penghasilan lipid yang berbeza-beza di mana kandungan lipid yang tinggi terhasil dalam kultur yang

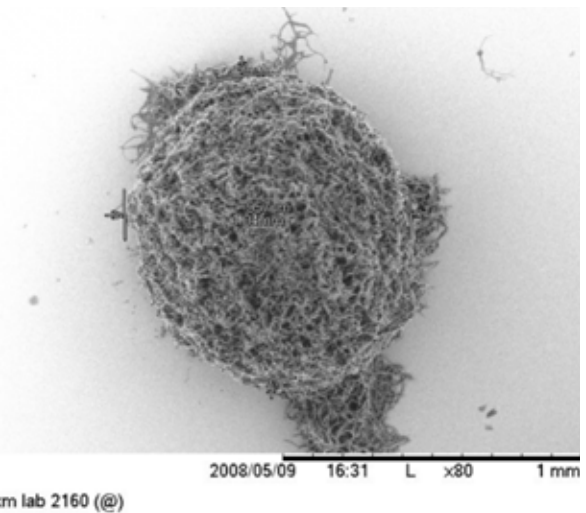
JADUAL 2. Kesan kepekatan spora keatas morfologi, penghasilan biojisim, lipid dan GLA oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang dikulturkan selama 120 jam

Jenis inokulum	Produktiviti (g/L/hari)	
	Lipid	GLA
Spora	0.44	0.04
Sel vegetatif 24 jam	0.45	0.04
sel vegetatif 48 jam	0.71	0.07



ukm lab 2160 (@)

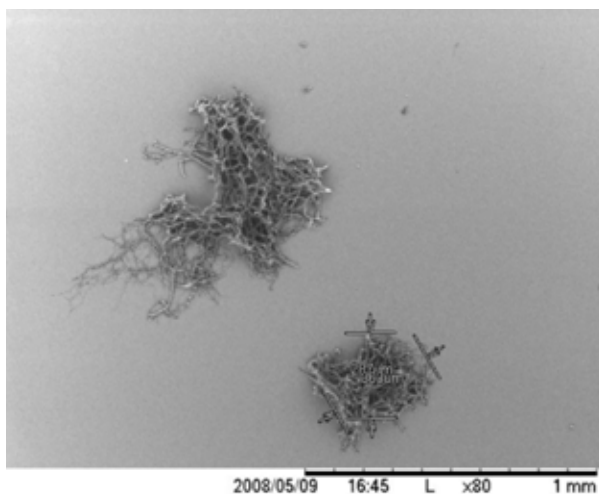
RAJAH 3. Pencerapan di bawah mikroskop elektron (SEM) dengan kuasa pembesaran 80x bagi morfologi berfilamen *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang terhasil daripada pengkulturan yang dimulakan dengan inokulum spora 1×10^5



ukm lab 2160 (@)

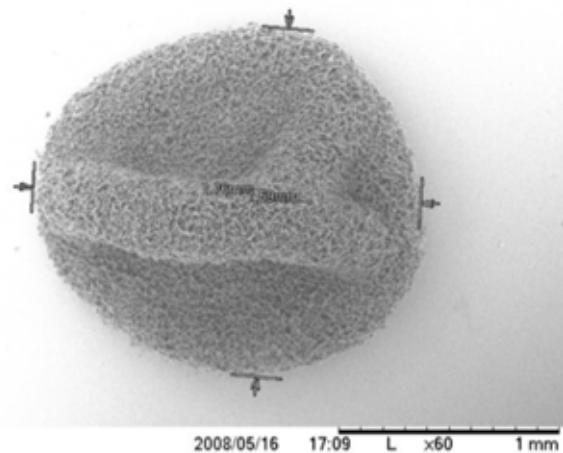
RAJAH 5. Pencerapan di bawah mikroskop elektron (SEM) dengan kuasa pembesaran 80x bagi morfologi pelet *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang terhasil daripada pengkulturan yang dimulakan dengan inokulum spora 1×10^3

dimulakan dengan kepekatan spora 1×10^2 dan 1×10^3 berbanding kultur dengan inokulum spora berkepekatan 1×10^4 dan 10^5 (Jadual 2). Ini menunjukkan bahawa terdapat perkadaran songsang antara hubungan kepekatan spora yang digunakan dengan kandungan lipid yang terhasil. Bagaimanapun, tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) dapat diperhatikan pada kandungan lipid yang terhasil dalam kultur yang dimulakan dengan kepekatan spora 1×10^2 dan 1×10^3 . Hasil ini disokong oleh Hiruta et al. (1996) yang melaporkan bahawa kepekatan spora inokulum mempengaruhi pembentukan pelet, yang seterusnya memberi kesan terhadap penghasilan lipid dan GLA oleh *Mortierella rammanniana* MM 15-1.



ukm lab 2160 (@)

RAJAH 4. Pencerapan di bawah mikroskop elektron (SEM) dengan kuasa pembesaran 80x bagi morfologi pelet *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang terhasil daripada pengkulturan yang dimulakan dengan inokulum spora 1×10^4



ukm lab 2160 (@)

RAJAH 6. Pencerapan di bawah mikroskop elektron (SEM) dengan kuasa pembesaran 80x bagi morfologi pelet *Cunninghamella bainieri* 2A1 yang terhasil daripada pengkulturan yang dimulakan dengan inokulum spora 1×10^2

Kepekatan spora yang digunakan juga didapati berhubung secara songsang dengan penghasilan GLA oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 dengan morfologi pelet yang bersaiz besar (1.78 mm dan 1.04 mm) memberikan penghasilan GLA yang lebih tinggi berbanding semua kultur (Jadual 2). Pertumbuhan dalam bentuk pelet mengurangkan kelikatan medium yang membolehkan kadar pemindahan oksigen dalam medium kultur dengan permukaan sel menjadi lebih tinggi dan seterusnya meningkatkan penghasilan GLA memandangkan aktiviti desaturase memerlukan oksigen untuk penghasilan PUFA. Walau bagaimanapun, penyelenggaraan menggunakan pertumbuhan pelet yang bersaiz terlalu besar menyukarkan

proses penyelenggaraan. Oleh yang demikian, morfologi pelet yang bersaiz lebih kecil (1.04 mm) tetapi mengandungi GLA yang tinggi lebih sesuai digunakan iaitu dengan memulakan pengkulturan menggunakan inokulum spora berkepekatan 1×10^3 .

Oleh itu, dapat disimpulkan bahawa inokulum spora lebih sesuai digunakan untuk penghasilan lipid oleh *Cunninghamella bainieri* 2A1 kerana memberikan kaedah pengkulturan yang lebih ringkas apabila kultur benih tidak perlu disediakan dan membolehkan pengurangan dalam penggunaan substrat serta dapat memendekkan masa pengkulturan dan seterusnya akan meningkatkan produktiviti keseluruhan proses kerana masa bagi proses pengkulturan dapat dikurangkan dua hari. Kepekatan spora yang paling sesuai digunakan pula adalah 1×10^3 spora/mL yang menghasilkan morfologi pelet bersaiz 1.04 mm dengan kandungan lipid dan GLA yang tinggi iaitu masing-masing 40% (g/g biojisim) dan 8.34×10^{-2} (g/g biojisim tanpa lipid).

PENGHARGAAN

Penghargaan ditujukan kepada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi di atas pembiayaan di bawah geran penyelidikan IRPA 09-02-02-0001 (BTK/TD/001).

RUJUKAN

- Bajpai, P.K., Bajpai, P. & Ward, O.P. 1991. Arachidonic acid production by fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1255-1258.
- Certik, M., Andradi, P. & Sajbidor, J. 1996. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ -Linolenic acid extracted from fungi. *JAOCs* 73: 357-365.
- Chaney, A.L. & Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for the determination of ammonium and urea. *Clinical Chemistry* 8: 130-132.
- Fan, Yang-Yi & Chapkin, R.S. 1998. Importance of Dietary γ -Linolenic Acid in Human Health and Nutrition. *Journal of Nutrition* 128 (9): 1411-1414.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for isolation of total lipids from animal tissues. *Journal Biology Chemistry* 226: 497-509.
- Hiruta, O., Futamura, T., Takebe, H., Satoh, A., Kami-saka, Y., Yokochi, T., Nakahara, T. & Suzuki, O. 1996. Optimization and scale up of γ -linolenic acid production by *Mortierella ramanniana* MM15-1, a high γ -linolenic acid producing mutant. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82: 366-370.
- Horrobin, D.F. 1992. Nutritional and medical importance of γ -linolenic acid. *Progress in Lipid Research* 31: 163-194.
- Kendrick, A. & Ratledge, C. 1992. Lipids of selected molds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 27: 15-20.
- Ratledge, C. 1997. Microbial Lipids: Products of Secondary Metabolism. *Biotechnology* 7: 135-137.
- Farhila Muhid, Wan Mohtar Wan Yusoff, Othman Omar & Aidil Abdul Hamid
 Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
 Fakulti Sains dan Teknologi
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 43600 UKM Bangi, Selangor
 Malaysia
- Abdul Jalil Abdul Kader,
 Fakulti Sains dan Teknologi
 Universiti Sains Islam Malaysia,
 Bandar Baru Nilai
 71800 Nilai,
 Negeri Sembilan,
 Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: aidilah@ukm.my
- Diserahkan: 5 Februari 2010
 Diterima : 2 November 2011