



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**KAJIAN KESESUAIAN POLI(2-HIDROKSIEKIL METAKRILAT-ko-METIL
HETAKRILAT) SEBAGAI PENYOKONG PENYEKATGERAKAN LIPASE**

NORHAIZAN BINTI MOHD. ESA

FSAS 1996 9

**KAJIAN KESESUAIAN POLI(2-HIDROKSIETIL METAKRILAT-ko-METIL
METAKRILAT) SEBAGAI PENYOKONG PENYEKATGERAKAN LIPASE**

Oleh

NORHAIZAN BINTI MOHD. ESA

Tesis ini dikemukakan bagi memenuhi keperluan Ijazah
Master Sains, di Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar
Universiti Pertanian Malaysia

Jun, 1996



PENGHARGAAN

Bersyukur ke hadrat Allah Subhanallahuwataala kerana dengan limpahan rahmat, keizinan dan ketabahan yang diberikanNya, maka dapat saya menyempurnakan tesis ini bagi program Master saya.

Terlebih dahulu setinggi Penghargaan dan Terima Kasih yang tidak terhingga kepada Pengerusi Jawatan Kuasa Penyeliaan saya, Prof. Dr. Abu Bakar Salleh atas bimbingan, dorongan, kata-kata perangsang dan nasihat di dalam menjayakan projek ini, juga kepada Dr. Mansor Hj. Ahmad, Prof. Madya Dr. Wan Mohd. Zin Wan Yunus, Prof. Madya Dr. Mahiran Basri dan Prof. Madya Dr. Che Nyonya Abdul Razak.

Tidak ketinggalan juga penghargaan ini dirakamkan kepada Kak Yati, Encik Kamal di Jabatan Kimia, teman-teman seperjuangan Yam, Rizal, Kak Nab, Kak Farid, Encik Guna dan Roila yang begitu banyak membantu dan memberikan nasihat serta tunjuk ajar yang amat berharga terutamanya dari segi teknikal.

Akhir sekali kepada Kak Nor, Dr. Khatijah Yusoff yang sering memberikan galakan, semua adik-adik di Makmal Bakteriologi 140, pensyarah dan semua kakitangan di Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi yang terlibat secara langsung atau tidak. Jasa kalian akan tetap dikenang hingga ke akhir hayat, hanya Allah sahaja yang dapat membalasnya. Buat keluarga yang tersayang dan memahami, terima kasih atas doa, dorongan dan galakan yang diberi.



ISI KANDUNGAN

mukasurat

PENGHARGAAN.....	iii
SENARAI JADUAL.....	vii
SENARAI RAJAH.....	viii
SENARAI SINGKATAN.....	x
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT.....	xiii

BAB

1	Pengenalan.....	1
2	Sorotan Literatur	
	Sekatgerak enzim.....	6
	Kebaikan proses sekatgerak.....	6
	Kaedah sekatgerak.....	8
	Faktor-faktor pemilihan penyokong.....	10
	Polimer.....	13
	Hidrogel.....	13
	Ciri-ciri hidrogel.....	14
	Penggunaan hidrogel.....	15
	Sekatgerak lipase.....	17
	Aktiviti air (a_w).....	19



3	BAHAN DAN KAEDAH.....	23
	Penyediaan polimer.....	25
	Pengekstrakan lipase mentah.....	28
	Proses sekatgerak.....	28
	Penentuan protein.....	29
	Penentuan aktiviti lipase.....	29
	Aktiviti hidrolisis.....	29
	Aktiviti pengesteran.....	30
	Penentuan peratus kandungan air keseimbangan (%KAK).....	31
	Penentuan kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester oleh lipase <i>Candida cylindracea</i>	31
4	KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	
	Penyediaan polimer.....	33
	Pencirian polimer.....	34
	Kesan saiz penyokong terhadap aktiviti lipase sekatgerak.....	35
	Kesan kandungan air polimer terhadap proses sekatgerak.....	37
	Penentuan peratus kandungan air keseimbangan (%KAK).....	38
	Kesan pra-olah polimer dengan etanol terhadap aktiviti lipase sekatgerak.....	43
	Kesan komposisi monomer-monomer terhadap aktiviti hidrolisis dan pengesteran.....	48



	Kesan jenis dan kepekatan agen rangkai silang terhadap aktiviti hidrolisis dan pengesteran.....	56
	Perbandingan aktiviti lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) dengan polimer sintesis yang lain.....	59
	Aktiviti air (a_w) dan kesannya terhadap kadar tindak balas pengesteran.....	64
5	KESIMPULAN DAN CADANGAN	
	Kesimpulan.....	76
	Cadangan.....	78
	BIBLIOGRAFI.....	79
	LAMPIRAN.....	91
	VITA.....	94
	SENARAI PENERBITAN.....	95



SENARAI JADUAL

Jadual		mukasurat
1	Komposisi monomer-monomer dan peratus agen rangkai silang dalam penyediaan polimer.....	26
2	Kesan saiz penyokong terhadap aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak.....	36
3	Kesan saiz penyokong terhadap aktiviti pengesteran lipase sekatgerak.....	36
4	Kesan kandungan air di dalam polimer ke atas aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak.....	39
5	Kesan kandungan air di dalam polimer ke atas aktiviti pengesteran lipase sekatgerak.....	40
6	Peratus kandungan air keseimbangan polimer- polimer (%KAK).....	42
7	Kesan penambahan etanol terhadap aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak.....	44
8	Kesan pra-olah polimer dengan etanol ke atas aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak.....	46
9	Kesan pra-olah polimer dengan etanol ke atas aktiviti pengesteran lipase sekatgerak.....	47
10	Perbandingan aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) berlainan nisbah monomer, peratus dan jenis agen rangkai silang.....	51
11	Perbandingan aktiviti pengesteran lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) berlainan nisbah monomer, peratus dan jenis agen rangkai silang.....	52
12	Perbandingan aktiviti hidrolisis lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) dengan polimer-polimer sintesis lain.....	60
13	Perbandingan aktiviti pengesteran lipase sekat-gerak pada poli(HEMA-ko-MMA) dengan polimer-polimer sintesis lain.....	61



SENARAI RAJAH

Rajah		mukasurat
1	Ilustrasi yang dicadangkan bagaimana aktiviti air (a_w) menjadi perantara penseimbangan air di antara berbagai keadaan dan fasa.....	21
2	Struktur kimia monomer-monomer yang digunakan.....	50
3	Perbandingan aktiviti hidrolisis lipase yang terjerap pada poli(HEMA-ko-MMA) berlainan nisbah monomer, peratus dan jenis agen rangkai silang.....	53
4	Perbandingan aktiviti pengesteran lipase yang terjerap pada poli(HEMA-ko-MMA) berlainan nisbah monomer, peratus dan jenis agen rangkai silang.....	54
5	Struktur kimia agen rangkai silang yang digunakan.....	58
6	Mekanisma penjerapan alkohol pada poli(metil metakrilat) (PMMA) semasa proses perakaan.....	63
7	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 1:2, dengan agen rangkai silang (a) 1% DVB (b) 2% DVB (c) 5% DVB.....	66
8	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 1:2, dengan agen rangkai silang (a) 1% EGDMA (b) 2% EGDMA (c) 5% EGDMA.....	67
9	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 1:1, dengan agen rangkai silang (a) 1% DVB (b) 2% DVB (c) 5% DVB.....	68
10	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 1:1, dengan agen rangkai silang (a) 1% EGDMA (b) 2% EGDMA (c) 5% EGDMA.....	69



11	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 2:1, dengan agen rangkai silang (a) 1% DVB (b) 2% DVB (c) 5% DVB.....	70
12	Kesan aktiviti air (a_w) ke atas peratus penghasilan ester, lipase <i>Candida cylindracea</i> yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) nisbah 2:1, dengan agen rangkai silang 5% EGDMA.....	71



SENARAI SINGKATAN

HEMA	:	2-Hidroksietil metakrilat
MMA	:	Metil metakrilat
MA	:	Metil akrilat
DVB	:	Divinil benzena
EGDMA	:	Etilena glikol dimetakrilat
PMMA	:	Poli(metil metakrilat)
mg	:	miligram
ml	:	mililiter
%KAK	:	peratus kandungan air keseimbangan
mmol	:	milimol
μ mol	:	mikromol
nm	:	nanometer
μ l	:	mikroliter
uv	:	ultra lembayung
v/v	:	isipadu/isipadu
w/w	:	berat/berat
a_w	:	aktiviti air
W_x	:	berat polimer kering (xerogel)
W_k	:	berat polimer kembung

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti
Pertanian Malaysia untuk memenuhi keperluan Ijazah Master Sains

**KAJIAN KESESUAIAN POLI(2-HIDROKSIEtil METAKRILAT-ko-METIL
METIL METAKRILAT) SEBAGAI PENYOKONG PENYEKATGERAKAN LIPASE**

Oleh

NORHAIZAN BINTI MOHD. ESA

Jun, 1996

Pengerusi : Profesor Abu Bakar Salleh, Ph. D.

Fakulti : Sains dan Pengajian Alam Sekitar

Lipase (Triasilgliserol ester hidrolase, E.C. 3.1.1.3) dari *Candida cylindracea* disekatgerak secara penjerapan pada penyokong polimer. Polimer ini disintesis secara pempolimeran ampai dua monomer, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) dan metil metakrilat (MMA) pada komposisi yang berbeza (1:2, 1:1, 2:1, mol/mol). Etilena glikol dimetakrilat (EGDMA) dan divinil benzena (DVB) pada peratusan yang berbeza (w/w) digunakan sebagai agen rangkai silang.

Kesan kandungan awal air dan saiz zarah-zarah polimer (<180, 180-350, 350-500 μ m) terhadap keberkesanan proses sekatgerak dikaji berdasarkan kepada tindak balas hidrolisis dan pengesteran. Poli(HEMA-ko-MMA) pada saiz 180-350 μ m menunjukkan aktiviti paling tinggi bagi kedua-dua aktiviti hidrolisis dan pengesteran.



Penambahan sedikit etanol pada polimer sebelum dicampur dengan lipase didapati akan meningkatkan aktiviti lipase.

Kesan komposisi monomer, jenis dan peratus agen rangkai silang turut dikaji. Keputusan menunjukkan penjerapan protein meningkat dengan meningkatnya ciri hidrofilik polimer tetapi merendahkan aktiviti hidrolisis manakala sebaliknya bagi aktiviti pengesteran. Aktiviti spesifik tertinggi bagi tindak balas hidrolisis diperolehi oleh lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) dengan nisbah (1:2) dan 5% DVB. Bagi tindak balas pengesteran pula aktiviti tertinggi diperolehi oleh lipase sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) dengan nisbah (2:1) dan 5% EGDMA.

Kesan aktiviti air (a_w) terhadap tindak balas pengesteran turut dikaji. Didapati proses sekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) telah menganjak kedudukan aktiviti air (a_w) optimum lipase *Candida cylindracea* ke arah yang lebih rendah. Walau bagaimanapun tiada perubahan yang ketara bentuk profil %penghasilan ester/ a_w bagi setiap siri polimer.

Lipase yang disekatgerak pada poli(HEMA-ko-MMA) juga menunjukkan aktiviti hidrolisis dan pengesteran yang lebih tinggi berbanding polimer-polimer lain yang diuji melainkan Amberlit XAD-7.



Abstract of thesis submitted to the Senate of Universiti
Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements for the degree
of Master of Science

**STUDIES ON THE SUITABILITY OF POLY(2-HYDROXYETHYL
METHACRYLATE-co-METHYL METHACRYLATE) AS A MATRIX FOR THE
IMMOBILIZATION OF LIPASE**

By

NORHAIZAN BINTI MOHD. ESA

June, 1996

Chairman : Professor Abu Bakar Salleh, Ph. D.

Faculty : Science and Environmental Studies

Lipase (Triacylglycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3) from *Candida cylindracea* was immobilised by adsorption on the surface of polymer supports. Polymers were prepared by suspension polymerization of two monomers 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and methyl methacrylate (MMA) in different compositions (1:2, 1:1, 2:1, mole/mole). Different percentages (w/w) of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and divinyl benzene (DVB) were used as cross-linking agents.

The influence of initial water content and particle size of the polymer (<180, 180-350, 350-500 μ m) on the degree of immobilization was determined by monitoring the hydrolysis and esterification reactions. Poly(HEMA-co-MMA) with 180-350 μ m



particles size gave the highest specific activity for both hydrolysis and esterification. Prewetting the polymer support with small amount of ethanol before coupling with lipase increased the lipase activity.

The effect of the composition of monomers, type and percent of cross-linking agents was investigated on the degree of immobilization. Results showed that protein adsorption increased when hydrophilicity increased and was decreased the hydrolysis activity, whereas it was the reverse for the esterification activity. The highest specific activity for hydrolysis was achieved by immobilised lipase on poly(HEMA-co-MMA) with the ratio (1:2) and 5% DVB. For the esterification reaction, the highest activity was produced by poly(HEMA-co-MMA) with ratio (2:1), and 5% EGDMA.

The effect of water activity (a_w) on esterification reaction was also studied. It was found that the immobilization promoted a shift in the optimum water activity (a_w) of *Candida cylindracea* lipase to a lower value. It was also found that the pattern profile of %conversion/ a_w was similar with all the series of polymer.

Lipase immobilised onto poly(HEMA-co-MMA) gave a higher yield for both hydrolysis and esterification activity compared the other polymers studied except Amberlit XAD-7.



BAB 1

Pengenalan

Enzim adalah pemangkin biologi yang terdiri dari protein atau glikoprotein. Ia dihasilkan dari berbagai-bagai jenis tumbuhan, haiwan dan mikroba dan terlibat dalam banyak tindak balas kimia yang berlaku di dalam hidupan. Penggunaan enzim di dalam industri telah bermula sejak zaman dahulu lagi, contohnya sebagai agen yang terlibat dalam proses fermentasi, walau pun ketika itu sifat-sifat semulajadi dan fungsinya belum difahami dengan mendalam (Kennedy dan Cabral, 1983).

Berjenis-jenis enzim telah dikenal pasti tetapi sebilangan sahaja yang dihasilkan secara besar-besaran dan digunakan dalam industri terutamanya enzim hidrolitik ekstrasel yang mendegradasikan polimer seperti protein, lemak, karbohidrat dan selulosa (Prave *et al.*, 1987).

Peningkatan pengetahuan dalam memahami sifat-sifat semulajadi enzim dan potensi pemangkinannya, disamping penemuan sumber-sumber enzim yang baru dan penggunaan kaedah kejuruteraan genetik dalam meningkatkan penghasilannya menjadikan penggunaannya semakin meluas. Contohnya di dalam industri pembuatan minuman keras, penghasilan makanan, industri tekstil dan perubatan.



Berbeda dari pemangkin kimia, enzim mempunyai kebolehan memungkinkan tindak balas dalam keadaan biasa iaitu di dalam larutan berakueus yang neutral pada suhu dan tekanan normal. Ini dapat menjimatkan kos dan kemusnahan substrat, hasil tindak balas yang sensitif terhadap suhu yang tinggi dapat dielakkan. Ciri-ciri spesifisiti yang tinggi terhadap substrat juga membolehkan hasil-hasil sampingan yang tidak dikehendaki dapat dikurangkan.

Salah satu enzim yang begitu penting di dalam industri ialah lipase. Walau bagaimana pun kepentingan ekonominya agak terhad berbanding dengan enzim utama yang lain seperti protease dan karbohidrase di mana tidak lebih dari 3% daripada jumlah keseluruhan penggunaan enzim di seluruh dunia (Godfrey dan Reichelt, 1983). Penggunaan lipase dalam menghidrolisis lemak adalah sebagai gantian kepada kaedah kimia (Colgate-Emery) yang melibatkan penggunaan tenaga yang tinggi dengan menghasilkan asid lemak yang bermutu rendah dan larutan gliserol yang cair (12% v/v) (Virto *et al.*, 1994).

Penemuan-penemuan baru dalam penggunaan lipase, menjadikan kepentingannya semakin meningkat bukan sahaja di dalam industri makanan bahkan dalam bidang-bidang lain seperti industri pembuatan kertas, tekstil, pengubahsuaian lemak dan minyak sebagai bahan zat makanan dan di dalam proses kimia organik seperti sintesis ester (Bjorkling *et al.*, 1991).

Walaupun enzim memberikan berbagai-bagai kebaikan, penggunaannya di dalam industri adalah terhad kerana kebanyakan



enzim tidak stabil. Ini adalah kerana hampir keseluruhan enzim di dalam keadaan semulajadinya ditempatkan di dalam sel hidup. Di dalam sel hidup, ianya dibahagi-bahagikan lagi kepada sistem-sistem sekatgerak yang lebih kecil di dalam organel-organel intrasel seperti di dalam mitokondria atau sistem membran intrasel. Apabila enzim ini disaring, ia dipisahkan dari fasa pepejal ke dalam larutan iaitu fasa cecair. Dalam keadaan ini enzim tidak berada di dalam keadaan semulajadi dan biasanya mudah dinyahaktif (Falb, 1972). Di samping ketidakstabilan enzim, kos penulenan enzim juga adalah tinggi terutamanya enzim intrasel dan teknik untuk memperolehi kembali enzim dari campuran tindak balas selepas proses selesai adalah sukar dan mahal. Walau pun dewasa ini teknologi kejuruteraan genetik semakin berkembang dalam pembentukan bakteria dengan keupayaan penghasilan enzim yang tinggi, masalah masa yang panjang dan kos yang tinggi menghadkan penggunaannya.

Oleh itu kajian diperingkat awal dilakukan untuk memungkinkan enzim digunakan berulang-kali dan boleh juga digunakan di dalam tindak balas selanjara (Kennedy dan Cabral, 1983). Kedua-dua objektif ini boleh dicapai dengan melakukan proses sekatgerak enzim pada permukaan pejal dan ini telah mendapat perhatian oleh para penyelidik pada awal tahun 1960-an (Buchholz, 1979; Mosbach, 1976; Chibata, 1978).

Melalui proses sekatgerak, masalah ketidakstabilan di dalam larutan ini dapat diatasi kerana ia menyediakan enzim dengan persekitaran yang menyerupai persekitaran semulajadi yang asal dan membolehkan enzim berfungsi dengan lebih berkesan. Di samping itu,

proses sekatgerak enzim kepada penyokong seperti gentian, membran dan mikrokapsul yang disintesis ini juga membolehkan ciri-ciri kelakuan semulajadi enzim intrasel dan enzim yang terikat pada membran yang semulajadi dikaji iaitu berlainan dari aktiviti di dalam larutan bebas (Falb, 1972).

Walau bagaimana pun terdapat tiga masalah utama penggunaan enzim sekatgerak di dalam industri iaitu:

- 1) Kekurangan enzim stabil yang sesuai untuk dilakukan proses sekatgerak.
- 2) Ciri-ciri penyokong tidak sesuai untuk digunakan dalam industri. Zarah-zarah penyokong biasanya lembut, mempunyai bentuk yang tidak teratur dan tidak stabil dalam proses aliran.
- 3) Keadaan yang diperlukan untuk proses sekatgerak pada skala yang besar melibatkan kos yang tinggi dan penggunaan reagen-reagen yang merbahaya.

Oleh itu objektif projek ini adalah:

- 1) Menyediakan penyokong yang mempunyai struktur yang sesuai untuk sekatgerak enzim dari monomer-monomer 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) dan metil metakrilat (MMA) dengan mempelbagaikan:
 - i) Nisbah monomer-monomer
 - ii) Jenis agen rangkai silang

iii) Peratus agen rangkai silang

- 2) Mengkaji kesesuaian hidrogel poli(HEMA-ko-MMA) yang disintesis sebagai penyokong bagi sekatgerak lipase *Candida cylindracea* iaitu melalui kaedah sekatgerak yang mudah dan murah.
- 3) Mengkaji kesan proses sekatgerak pada hidrogel poli(HEMA-ko-MMA) terhadap aktiviti air (a_w) optimum lipase *Candida cylindracea*.

BAB 2

SOROTAN LITERATUR

Sekatgerak enzim

Proses sekatgerak adalah satu proses di mana molekul enzim dilekatkan kepada permukaan yang pejal tanpa menghilangkan aktivitiya. Contohnya secara ikatan kovalen atau penjerapan kepada polimer-polimer yang tidak larut di dalam pelarut organik atau tak organik, dan pemerangkapan di dalam matriks gel atau mikrokapsul yang bersifat separuh telap. Ini termasuklah pelekatan secara kimia atau fizikal kepada berbagai komponen-komponen sel yang tidak larut air seperti membran nukleus, mitokondria dan membran sel (Chibata, 1982).

Kebaikan proses sekatgerak

Dengan melakukan proses sekatgerak, di mana enzim dilekatkan kepada permukaan yang pejal, berbagai kebaikan diperolehi. Interaksi fizikal di antara penyokong dan enzim boleh mengubah ciri-ciri kimia dan fizikal enzim kepada ciri-ciri yang lebih baik seperti meningkatkan aktiviti biologi dan kestabilan enzim.

Proses sekatgerak juga dapat menghalang enzim daripada beragregat di antara satu sama lain yang boleh mengakibatkan taburan enzim menjadi tak homogen terutamanya apabila ianya digunakan di dalam pelarut organik. Ia juga menyebarkan enzim kepada permukaan yang lebih luas iaitu enzim didedahkan kepada kepekatan substrat yang lebih homogen dan pemindahan jisim menjadi lebih mudah. Enzim yang tidak larut ini boleh diperolehi semula dari campuran tindak balas melalui pengemparan atau penurasan untuk digunakan semula (Woodward, 1985). Ini merupakan salah satu faktor utama yang dapat menjimatkan kos. Tambahan pula tindak balas mudah dikawal dan boleh dijalankan berterusan serta dapat menjimatkan masa kerana tidak memerlukan langkah penulenan untuk mengeluarkan enzim dari aliran hasilan (Jiang dan Zhang, 1993).

Hasil tindak balas yang diperolehi mempunyai ketulenan yang tinggi dan dianggap sebagai semulajadi berdasarkan kepada keperluan FDA (Food and Drug Association), Amerika Syarikat dengan nilai ekonomi yang tinggi (Welsh dan William, 1990; Chulalaksananukul *et al.*, 1992). Proses sekatgerak juga didapati tidak mempengaruhi keenantiomilihan (Berglund *et al.*, 1994).

Enzim yang digunakan untuk proses sekatgerak ini tidak perlu ditulenan kerana kajian (Bovara *et al.*, (1993) dan Wehtje *et al.*, (1993)) menunjukkan lipase yang ditulenan terlebih dahulu, berkemungkinan akan ternyahaktif apabila disekatgerak melainkan jika enzim itu dimuatkan dalam kuantiti yang banyak. Ini dapat menjimatkan masa dan tenaga.

Di antara faktor-faktor yang amat mempengaruhi ciri-ciri dan kestabilan enzim yang disekatgerak adalah i) kaedah sekatgerak, ii) ciri-ciri bahan penyokong, terutamanya ciri hidrofilik/hidrofobik, iii) tapak enzim untuk dilakukan proses sekatgerak dan iv) kedudukan antara muka enzim.

Kaedah sekatgerak

Sejak beberapa tahun kebelakangan ini kebanyakan daripada kajian sekatgerak tertumpu kepada kaedah sekatgerak dan penemuan bahan-bahan penyokong yang baru (Jiang dan Zhang, 1993).

Menurut Bickerstaff (1987), kaedah sekatgerak pada dasarnya terbahagi kepada 4 jenis:

1. Penjerapan

Pelekatan enzim kepada penyokong adalah secara ikatan bukan kovalen seperti interaksi ionik, interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Ia adalah kaedah yang paling awal digunakan, murah dan ringkas. Tiada sebarang langkah pengaktifan untuk mengubah kumpulan berfungsi pada penyokong diperlukan. Oleh itu enzim yang disekatgerak hanya mengalami sedikit atau tiada perubahan konformasi dan dapat mengekalkan aktivitinya (Zarborsky, 1973; Kennedy dan Cabral, 1987). Walau bagaimana pun enzim yang terjerap mudah terbebas dari penyokong terutamanya apabila keadaan persekitaran seperti pH, suhu dan kekuatan ionik berubah (Demain dan Soloman, 1986). Contoh penyokong yang telah digunakan

termasuklah diaminoetil (DEAE)-selulosa, karboksimetil (CM)-selulosa, bentonit, alumina dan kaca berliang.

2. Pengikatan kovalen

Kaedah ini melibatkan pembentukan ikatan kovalen di antara enzim dan penyokong. Ikatan biasanya terbentuk di antara kumpulan berfungsi yang hadir di permukaan penyokong dengan kumpulan berfungsi pada salah satu asid amino yang wujud di permukaan enzim. Walau bagaimana pun perlu dipastikan supaya asid amino penting yang diperlukan untuk aktiviti pemangkinan enzim tidak terlibat dalam pembentukan ikatan kovalen kepada penyokong.

Menerusi kaedah ini, enzim biasanya terikat dengan kuat dan stabil dan menghalangnya daripada terbebas ke dalam larutan tindak balas. Walau bagaimana pun aktiviti yang ditunjukkan mungkin lebih rendah kerana enzim didedahkan kepada keadaan dan reagen yang toksik. Tindak balas yang berlaku lebih sukar, kompleks dan mahal (Bernath dan Venkatasubramaniam, 1986).

3. Pemerangkapan dan pengkapsulan

Kaedah ini berbeza dari kaedah-kaedah yang lain. Enzim dihalang pergerakannya melalui struktur kekisi gel dan membran separuh telap. Pemerangkapan dilakukan dengan mencampurkan enzim kepada monomer dan kemudian dirangkai silang dengan polimer untuk membentuk struktur kekisi yang memerangkap enzim. Contohnya poliakrilamida dan kalsium alginat.

Pengkapsulan pula diperolehi dengan menyelubungi enzim di dalam berbagai bentuk membran separuh telap seperti liposom, mikrokapsul dan nilon.

Dalam kedua-dua kaedah ini, adalah perlu dipastikan kedua-dua substrat dan hasilan boleh membaaur melalui liang-liang pada membran kapsul yang terbentuk untuk mengurangkan kerintangan pemindahan jisim. Begitu juga jika biomolekul yang diperangkap adalah sel, membran polimer ini mestilah tidak mengurangkan pembauran molekul-molekul yang diperlukan begitu juga hasilan akhir yang toksik dari metabolisme sel supaya aktiviti fisiologi yang normal dapat dikekalkan (Prave *et al.*, 1987).

Walau bagaimana pun proses sekatgerak juga boleh dilakukan dengan pergabungan beberapa proses seperti penjerapan dengan pemerangkapan atau penjerapan dengan ikatan kovalen.

Faktor-faktor pemilihan penyokong

Dalam usaha mencari kaedah sekatgerak yang sesuai dan berkesan untuk memperolehi hasil yang maksima, ia juga membawa kepada penggunaan berbagai-bagai jenis penyokong. Pemilihan penyokong untuk proses sekatgerak enzim ini amat penting kerana jumlah enzim yang terjerap adalah bergantung kepada luas permukaan, saiz dan taburan liang untuk membebaskan enzim yang dipilih bagi proses sekatgerak. Faktor-faktor lain yang perlu diambil kira termasuklah parameter seperti keseluruhan tindak balas dan keberkesanan enzim

yang telah disekatgerak, terutamanya jika penyokong yang diperlukan adalah banyak seperti yang digunakan di dalam industri. Di samping itu adalah penting untuk memastikan enzim tidak dinyahaktifkan melalui tindak balas dengan asid amino pada tapak aktif (Kennedy dan Cabral, 1987).

Pemilihan penyokong juga terhad kepada kebolehan substrat dan hasil tindak balas untuk bergerak menerusi liang-liang penyokong seperti membran atau enzim yang terperangkap (jaringan polimer atau mikrokapsul) di samping dapat mengurangkan hasil perencatan. Di dalam kes enzim yang terikat seperti penjerapan, penyokong yang mempunyai banyak liang dipilih kerana lebih banyak permukaan untuk penjerapan (Prave *et al.*, 1987).

Begitu juga ciri-ciri lain seperti penggunaan semula, kos yang diperlukan dalam kaedah sekatgerak yang dipilih dan ketoksikan reagen untuk sekatgerak terutamanya yang berkait rapat dengan penghasilan makanan manusia dan haiwan perlu diambil perhatian (Bailey dan Ollis, 1986; Virto *et al.*, 1994).

Penyokong yang digunakan mestilah mempunyai kekuatan mekanikal yang cukup kuat dan tidak terdegradasi oleh mikroorganisma dan di bawah keadaan ujikaji, seperti perubahan kimia dan suhu yang tinggi (Broun *et al.*, 1978). Ia juga mestilah boleh bertindak sebagai bahan tindak balas yang tidak larut di dalam air yang mempunyai kespesifikan yang tinggi dan mudah dipisahkan dari campuran tindak balas. Ciri hidrofilik iaitu kebolehan air untuk meresap di dalam