

## Optimasi dan Karakterisasi *Carboxymethyl Cellulase*(CMCase) Khamir *Trichosporon Sporotrichoides* (Van Oorschot) Van Oorschot & De Hoog UICC Y-286 dari Taman Nasional Gunung Halimun

Wibowo Mangunwardoyo, Aprilismulan, Ariyanti Oetari

Departemen Biologi FMIPA-UI, Depok 16424  
w\_mangunwardoyo@hotmail.com

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian terhadap khamir *Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286 yang menunjukkan aktivitas CMCase tertinggi pada pengujian menggunakan metode Teather dan Wood. Kurva produksi CMCase menghasilkan enzim optimum pada jam ke 12 setelah inokulasi. Penggunaan carboxymethyl cellulose sebagai sumber karbon, enzim CMCase dihasilkan optimum pada konsentrasi 0,2 dan 0,4%. Sumber nitrogen berupa ammonium sulfat enzim dihasilkan optimum pada 0,3% dan sumber fosfat berupa kalium dihidrogen fosfat 0,1% memberikan hasil enzim optimum. Optimum pH dan suhu aktivitas CMCase adalah 3,5 dan 45°C dan pH 7 pada 37°C.

### Abstract

Yeast *Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286 has the highest CMCase activity after being screened using Teather & Wood method. The optimum yield of CMCase was reached at 12 hours after cultivation. The production of CMCase was optimum at 0.2 % and 0.4 % (w/v) concentration using carboxymethyl cellulose as carbon source. The optimum production of CMCase at 0.3 % (w/v) concentration using ammonium sulfate as a nitrogen source, and at 0.1 % (w/v) concentration using kalium dihydrogen phosphate as a phosphorus source. The optimum pH and temperature for CMCase activity were 3.5 at 45°C; and pH 7.0 at 37°C.

**Key words :** Ammonium sulfate; CMC; CMCase; kalium dihydrogen phosphate; *Trichosporon sporotrichoides*.

## 1.PENDAHULUAN

Enzim selulase terdiri dari 3 komponen: (i)  $\beta$ -1,4-endoglukanase atau *carboxymethyl cellulase* (CMCase) (EC 3.2.1.4), (ii)  $\beta$ -1,4-eksoglukanase atau *cellulohydrolase* (EC 3.2.1.91), dan (iii)  $\beta$ -1,4-glukosidase (EC 3.2.1.21) (1, 2, 3). Enzim selulase memotong ikatan 1,4-D-glikosida pada molekul selulosa (4) untuk menghasilkan monomer glukosa.

*Carboxymethyl cellulase* (CMCase) atau enzim endoglukanase (5), mempunyai afinitas tinggi terhadap derivat selulosa yang larut dan dapat memotong ikatan selulosik internalnya secara acak (6,7).

Enzim CMCase dapat diproduksi oleh fungi dan bakteri. Spesies-spesies dari genus *Aspergillus* memproduksi enzim CMCase (3). *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens* dan *Rhodotorula minuta* adalah khamir penghasil CMCase (8).

Kemampuan sel untuk memproduksi selulase sangat dipengaruhi oleh ketersediaan karbon dan nitrogen di lingkungan (9).

Aktivitas selulase dalam menghidrolisis selulosa dipengaruhi beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut di antaranya pH dan suhu (9). Aktivitas enzim menunjukkan aktivitas maksimum pada pH dan suhu optimum.

Karakterisasi protein dilakukan untuk mengetahui karakter suatu protein dan untuk membedakan protein satu dengan protein lainnya (10). Karakterisasi suatu protein dapat dilihat dari aktivitas protein pada pH dan suhu yang berbeda (11).

Penelitian bertujuan mengetahui konsentrasi optimum CMC sebagai sumber karbon,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat untuk memproduksi CMCase, serta karakterisasi CMCase *Trichosporon sporotrichoides* (van Oorschot) van Oorschot & de Hoog UICC Y-286 dari TNGH pada variasi pH dan suhu.

## 2. METODE PENELITIAN

### Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini adalah *Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286 dari tanah TNGH.

### Medium

Medium yang digunakan untuk pertumbuhan adalah Yeast Extract Malt Extract Agar (YMA), untuk pemeliharaan adalah Potato Dextrose Agar (PDA), dan untuk optimasi produksi CMCase adalah Yeast Nitrogen Base (YNB) dengan variasi konsentrasi CMC sebagai sumber karbon,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen, dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat.

### Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian antara lain: akuades, alkohol 70% (v/v), CMC, bahan kimia glukosa dan bahan-bahan kimia dari Merck, yaitu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidrat,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat,  $\text{NaHCO}_3$ , KNa tartrat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat,  $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### CARA KERJA

#### Pembuatan medium

Pembuatan medium PDA, YMA dan YNB berdasarkan (12).

#### Pembuatan kurva pertumbuhan

Khamir *T. sporotrichoides* UICC Y-286 diinkubasi dalam medium YMA miring pada suhu ruang selama 48 jam. Suspensi sel dibuat dengan menambahkan 5 ml akuades steril ke dalam tabung dan dikering menggunakan ose pada jam ke 48. Sebanyak 2 ml suspensi sel ( $0,2-0,3 \times 10^8$  sel/ml) diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 20 ml medium YNB dan CMC 0,2% (b/v). Labu tersebut kemudian dimasukkan ke dalam shaker inkubator pada suhu ruang dengan kecepatan putar 110 rpm selama 28 jam.

Sampel diambil pada jam ke 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 dan 28, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Aktivitas enzim dilakukan dengan metode (13).

#### Pembuatan larutan pelepas Nelson

Pembuatan larutan Nelson A, larutan Nelson B dan larutan Nelson C (Larutan arsenomolibdat) berdasarkan (13).

#### Pengukuran aktivitas CMCase

Pengukuran aktivitas CMCase berdasarkan (15). Sebanyak 0,5 ml larutan enzim dan 0,5 ml CMC (0,1%) dalam bufer fosfat (50 mM, pH 5,0) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Gula yang dihasilkan diukur dengan metode (13). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan 1 µmol glukosa per menit dalam kondisi pengujian (5).

#### Pengukuran konsentrasi glukosa

Pengukuran konsentrasi glukosa dilakukan dengan metode (13) pada panjang gelombang 575 nm.

## OPTIMASI PRODUKSI ENZIM

### Pengaruh variasi konsentrasi CMC, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Dua ml suspensi sel ( $0,2-0,3 \times 10^8$  sel / ml) diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer 100 ml yang berisi 20 ml medium fermentasi dengan berbagai konsentrasi substrat CMC 0,05%, 0,10%, 0,20%, 0,30%, 0,40% dan 0,50% (b/v), berbagai konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,20%, 0,30%, 0,40%, 0,50%, 0,60%, 0,70%, dan 0,80% (b/v) dan berbagai konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,025 %, 0,05%, 0,10%, 0,20%, 0,30%, 0,40% dan 0,50% (b/v). Labu tersebut kemudian dimasukkan dalam shaker inkubator pada suhu ruang dengan kecepatan putar 110 rpm selama 24 jam. Pada jam ke 24 hasil fermentasi disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan digunakan untuk penentuan aktivitas enzim.

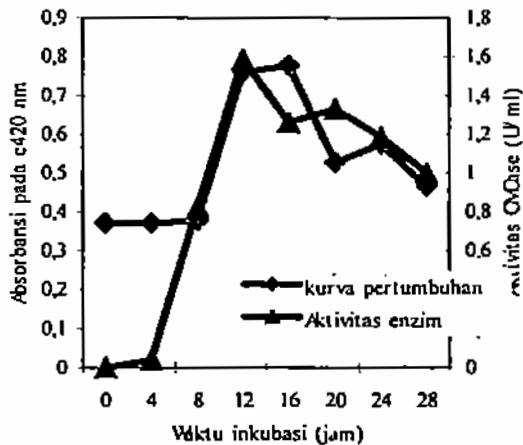
### Karakterisasi enzim pada variasi pH dan suhu

Karakterisasi enzim berdasarkan (15). Penentuan pH optimum dilakukan dengan mereaksikan enzim dengan substrat CMC selama 30 menit pada tingkat pH berbeda-beda (pH 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, dan 8,0). Penentuan suhu optimum suatu enzim dilakukan dengan menginkubasi enzim bersama substrat CMC selama 30 menit pada variasi suhu 30, 35, 37, 45, 50, 60 dan 70 °C. Aktivitas enzim kemudian dianalisis.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kurva pertumbuhan *Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286

Kurva pertumbuhan *T. sporotrichoides* UICC Y-286 diperoleh melalui *batch fermentation* selama 28 jam.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan aktivitas CMCase dari *T. sporotrichoides* UICC Y-286.

Kurva pertumbuhan *T. sporotrichoides* UICC Y-286 menunjukkan bahwa pada fase logaritmik akhir (jam ke 12), jumlah sel dan aktivitas enzim mencapai jumlah maksimum. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa jam ke 12 merupakan waktu yang tepat bagi enzim CMCase dihasilkan paling tinggi. Chen *dkk.* (2004) melaporkan aktivitas CMCase dari *S. fredii* RO (CCRC 15769) paling tinggi pada jam ke 40 setelah inokulasi dalam medium yang mengandung CMC. Pada saat tersebut merupakan fase eksponensial akhir.

*Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286 menghasilkan CMCase dan sel dalam waktu yang bersamaan, yang ditunjukkan dengan dua garis paralel (*growth associated*) pada kurva pertumbuhan. Hasil studi pustaka menyatakan bahwa fase pertumbuhan (*trophophase*) dan fase pembentukan produk (*idiophase*) berjalan secara paralel (16).

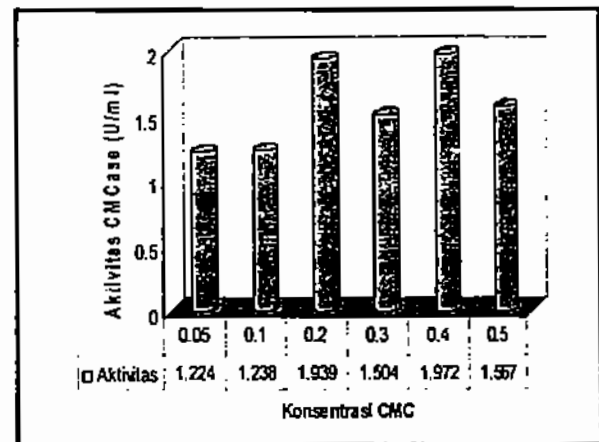
## OPTIMASI PRODUKSI ENZIM CMCase

### CMC sebagai sumber karbon

*Trichosporon sporotrichoides* UICC Y-286 pada konsentrasi 0,05% dan 0,10% memiliki aktivitas CMCase yang hampir sama (1,224 dan 1,238 U/ml). Pada konsentrasi 0,20% aktivitas enzim meningkat sebesar 1,939 U/ml, kemudian terjadi penurunan aktivitas pada konsentrasi 0,30% (1,504 U/ml). Peningkatan aktivitas enzim terjadi kembali pada konsentrasi 0,40% (b/v) sebesar 1,972 U/ml. Pada akhir fermentasi, aktivitas enzim menurun pada konsentrasi 0,50% (1,567 U/ml) (Gambar 2). Prasertsan (17) melaporkan bahwa isolat fungi F11

menghasilkan enzim CMCase paling tinggi pada konsentrasi CMC 0,10 % (b/v).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa produksi CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 berlangsung pada dua puncak pada dua konsentrasi substrat (0,2 dan 0,4%). Pada puncak pertama, produksi CMCase tinggi yang mengakibatkan glukosa hasil hidrolisis CMC oleh CMCase dalam medium bertambah. Glukosa yang dihasilkan digunakan secara langsung oleh sel khamir untuk metabolisme, sehingga menghambat produksi CMCase. Laporan (1, 6 dan 7) menyatakan CMCase adalah enzim yang dapat mendegradasi CMC menjadi selooligosakarida dan glukosa. Menurut Fadel (18), apabila produk hasil hidrolisis yaitu glukosa dalam konsentrasi tinggi, glukosa yang dihasilkan akan dimetabolisme lebih dahulu sehingga produksi CMCase akan dihambat. Laporan (7 dan 19) menyatakan bahwa glukosa dapat menghambat sintesis selulase melalui mekanisme represi katabolit. Gancedo (20) melaporkan bahwa khamir pada umumnya tumbuh baik pada berbagai macam sumber karbon, tetapi glukosa dan fruktosa merupakan sumber karbon yang paling disukai karena merupakan sumber karbon sederhana. Keberadaan sumber karbon tersebut menyebabkan produksi enzim yang mendegradasi sumber karbon kompleks menjadi rendah bahkan tidak dihasilkan sama sekali.



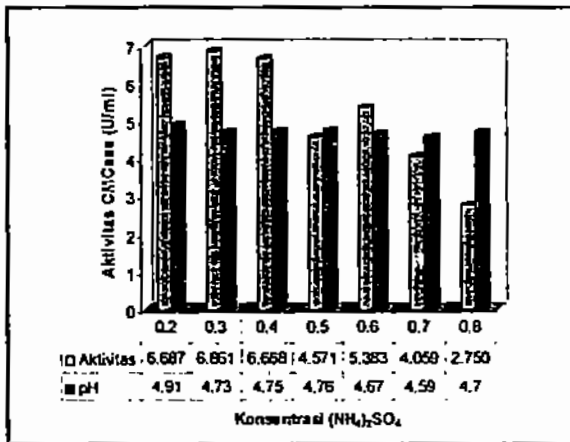
Gambar.2. Penentuan konsentrasi substrat CMC sebagai sumber karbon pada *T. sporotrichoides* UICC Y-286.

### (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebagai sumber nitrogen

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> merupakan sumber nitrogen yang paling disukai oleh mikroorganisme sebagai sumber nitrogen karena amonium merupakan sumber nitrogen

sederhana yang dapat dengan mudah menyerap ke dalam sel untuk sintesis asam amino (21).

Hasil pengujian terhadap sumber nitrogen ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) menunjukkan bahwa aktivitas CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 paling tinggi dicapai pada konsentrasi 0,30 % (b/v) aktivitas enzim CMCase sebesar 6,861 U/ml. Namun demikian pada konsentrasi 0,2 dan 0,4 % (b/v) mempunyai aktivitas CMCase yang hampir sama dengan konsentrasi 0,3 % (b/v) sebesar 6,687 dan 6,668 U/ml (Gambar 3).



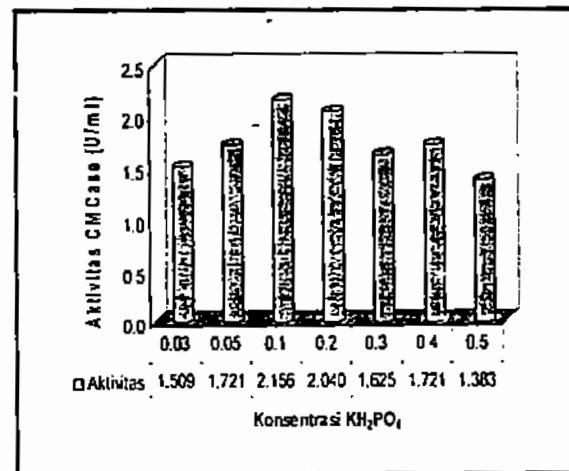
Gambar 3. Penentuan konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen pada *T. sporotrichoides* UICC Y-286.

Penambahan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 % (b/v) menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas CMCase sebesar 21,5 %, FPase sebesar 21,3 %, dan  $\beta$ -glukosidase sebesar 20 % pada *Aspergillus niger* F-119 (18). Produksi selulase sangat tergantung pada sumber dan konsentrasi nitrogen yang terdapat dalam medium. Amonium merupakan sumber nitrogen anorganik yang baik untuk sintesis selulase. Penggunaan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dalam produksi enzim selulase pada *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Chaetomium cellulolyticum*, *Myrothecium sp.*, *Penicillium funiculosum* dan *Trichoderma reesei* (18, 19).

Selama proses fermentasi menunjukkan sedikit penurunan pH akhir medium: dibandingkan pH awal medium (pH 5.0) (Gambar 3). Hal tersebut disebabkan oleh  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sebagai sumber nitrogen yang digunakan dalam medium fermentasi. pH dalam fermentasi mengalami penurunan akibat dihasilkannya  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ketika ion amonium dari  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  diasimilasi oleh mikroorganisme (21).

#### $\text{KH}_2\text{PO}_4$ sebagai sumber fosfat

Hasil pengujian terhadap sumber fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) menunjukkan bahwa aktivitas CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 paling tinggi dicapai pada konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,10 % (b/v) sebesar 2,156 U/ml (Gambar 4). *Fusarium coeruleum* menggunakan fosfat anorganik dalam bentuk  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pada konsentrasi 0,2051 %. *Aspergillus niger* menggunakan sumber fosfat anorganik dalam bentuk  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pada konsentrasi 0,002 % atau lebih kecil akan mengalami pertumbuhan yang rendah, sedangkan apabila konsentrasi dinaikkan secara bertahap sampai 0,089 % maka pertumbuhan fungi menjadi meningkat (22).



Gambar 4. Penentuan konsentrasi optimum  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat pada *T. sporotrichoides* UICC-286.

Fosfat organik digunakan kapang pada umumnya dalam bentuk kalium fosfat seperti kalium ortofosfat ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), kalium metafosfat ( $\text{KPO}_3$ ), kalium pirofosfat ( $\text{K}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), kalium monohidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), dan kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Di antara sumber fosfat tersebut,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sering digunakan karena selain penggunaan ion-ion fosfat dan kalium, kedua sumber fosfat ini dapat berperan juga sebagai bufer yang dapat mengatur perubahan pH dalam medium (22).

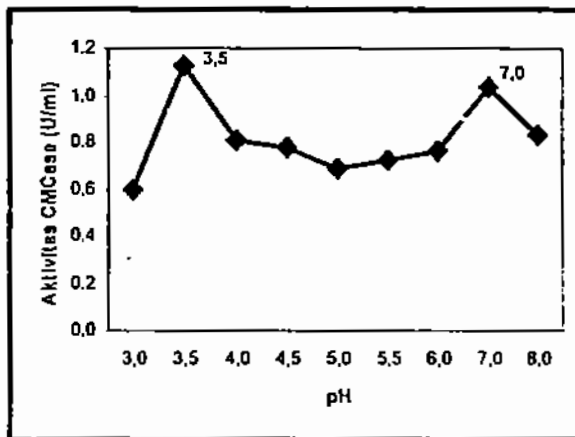
Enzim selulase dihasilkan oleh khamir bersifat ekstraselular, setelah disintesis oleh sel kemudian dikeluarkan ke lingkungannya (23). Penambahan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dalam medium dapat berperan sebagai sumber fosfat dan sebagai sistem bufer yang akan menjaga kondisi pH lingkungan, sehingga enzim yang berupa protein dikeluarkan oleh sel khamir tidak

mengalami denaturasi karena perubahan pH (18, 22, 24).

## KARAKTERISASI ENZIM CMCase

### Penentuan pH Optimum

Gambar 5 menunjukkan bahwa aktivitas CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 memperlihatkan dua aktivitas pH optimum yaitu pada 3,5 dan 7,0 sebesar 1,127 U/ml dan 1,035 U/ml. CMCase pada *A. niger* Z10 menunjukkan dua aktivitas pH optimum pada 4,5 dan 7,5 (15). Kapang *Cephalosporium* sp.RYM-202 memproduksi CMCase dengan pH optimum 8,0 untuk C-I dan pH 7,5-9,5 untuk C-II. (25).



Gambar 5. Penentuan pH optimum enzim CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286.

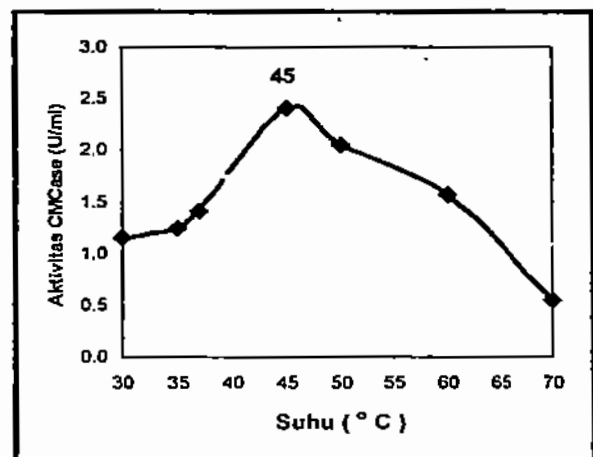
Setiap jenis enzim memiliki kisaran pH optimum yaitu kisaran pH dimana enzim menunjukkan aktivitas maksimum dengan stabilitas tinggi dan akan mengalami denaturasi pada pH yang lebih rendah atau lebih tinggi (18). Enzim pada umumnya bersifat amfofilik artinya enzim dapat bersifat sebagai asam maupun basa. Hal ini disebabkan oleh adanya sisi aktif yang dapat memberikan gugus fungsional residu asam amino spesifik yang merupakan pemberi dan penerima proton (24).

Terdapatnya dua aktivitas pH optimum yaitu 3,5 dan 7,0, hal tersebut kemungkinan enzim CMCase yang dipunyai oleh *T. sporotrichoides* UICC Y-286 bersifat isoenzim atau subunit berbeda pada protein enzim yang sama. Griffin (21) menyatakan bahwa isoenzim dihasilkan oleh mikroorganisme yang memproduksi lebih dari satu jenis enzim dengan aktivitas enzimatik sama. Adanya perbedaan tersebut diduga disebabkan perbedaan kandungan polisakarida pada enzim. Namun sebagian peneliti menduga

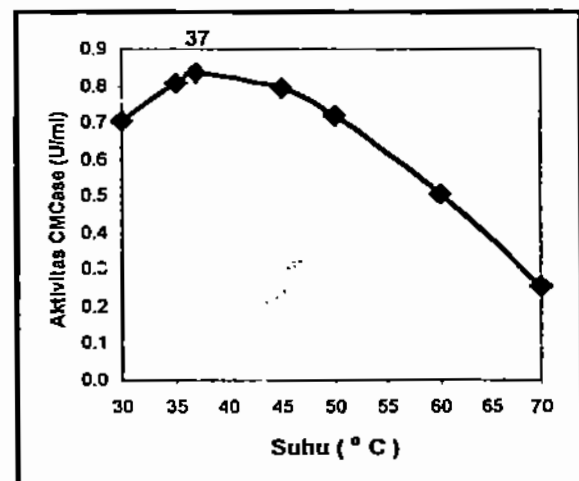
isoenzim-isoenzim tersebut merupakan hasil kerja enzim proteolitik. Proses pematangan yang memerlukan waktu lama sehingga terjadi autolisis oleh karena adanya enzim proteolitik ekstraselular (23).

### Penentuan Suhu Optimum

Pengujian suhu optimum CMCase pada *T. sporotrichoides* UICC Y-286 pada pH optimum 3,5 menunjukkan suhu optimum pada 45° C (Gambar 6) dan pada pH optimum 7,0 menunjukkan suhu optimum 37° C (Gambar 7).



Gambar 6. Penentuan suhu optimum enzim CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 pada pH 3,5.



Gambar 7. Penentuan suhu optimum enzim CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 pada pH 7,0.

*A. niger* mempunyai suhu optimum 55° C untuk aktivitas l'Pase dan CMCase, pada *T. viride* dan *Streptomyces sp* menunjukkan suhu optimum 55° C untuk pengujian aktivitas CMCase (18). Bakteri *S. fredii* menghasilkan aktivitas CMCase pada suhu optimum 35° C pada pH 7,0. (26) *A. niger* Z10 menghasilkan aktivitas CMCase pada suhu optimum 40° C (27)

Aktivitas enzim akan meningkat dengan bertambahnya suhu sampai konfigurasi tiga dimensi molekul enzim tersebut rusak akibat terjadinya denaturasi. Suhartono (1989) menyatakan fenomena ini disebabkan oleh peningkatan energi kinetik molekul-molekul enzim sebelum mencapai suhu optimum yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat sehingga memperbesar peluang keduanya untuk bertemu dan bereaksi. Sebaliknya setelah melewati suhu optimum konformasi enzim mengalami perubahan sehingga menjadi tidak aktif dan tidak dapat berfungsi sebagaimana mestinya. Pada suhu tinggi substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga mengalami kesulitan untuk memasuki sisi aktif dari enzim (27).

#### 4. KESIMPULAN

CMCase diproduksi oleh *T. sporotrichoides* UICC Y-286 paling tinggi pada jam ke 12, yaitu pada fase eksponensial akhir. Produksi enzim CMCase optimum terhadap substrat CMC 0,20 % (b/v) sebesar 1,939 U/ml dan 0,40 % (b/v) sebesar 1,972 U/ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,30 % (b/v) sebesar 6, 861 U/ml; dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,10 % (b/v) sebesar 2,156 U/ml. Karakterisasi CMCase *T. sporotrichoides* UICC Y-286 menunjukkan aktivitas optimum pada dua titik pH dan suhu yaitu pH 3,5 pada suhu 45° C, dan pH 7,0 pada suhu 37° C.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari Proyek NAGAO Natural Environment Foundation atas nama Wellyzar Syamsuridzal Ph.D.

#### DAFTAR ACUAN

- (1) Saha, B.C & R.J. Bothast. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel  $\beta$ -glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology* 62(9): 3165 – 3170. 1996.
- (2) Krishna, C. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology* 69: 231 – 239. 1999.
- (3) Onsoni, H., M.R. Zamani, M. Motallebi & N. Zarghami. 2005. Identification of over producer strain of endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *Aspergillus Species*: Characterization of crude carboxymethyl cellulase. *African Journal of Biotechnology* 4(1): 26 – 30. 2005.
- (4) Han, S.J., Y.J. Yoo, & H.S. Kang.. Characterization of bifunctional cellulase and its structural gene. *The Journal of Biological Chemistry* 270(43): 26012 – 26019. 1995.
- (5) Murai, T., M. Ueda, T. Kawaguchi, M. Arai & A. Tanaka. Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing  $\beta$ -glucosidase and carboxymethyl-cellulase from *Aspergillus aculeatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4857 – 4861. 1998.
- (6) Kim, C. Characterization and substrate specificity of an endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase I (avicelase I) from an extracellular multienzyme complex of *Bacillus circulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(3): 959 – 965. 1995.
- (7) Ilmen, M., A. Saloheimo, M. Onnela & M.E. Penttila. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(4): 1298 – 1306. 1997.
- (8) Sudiana, I.M. & M. Rahmansyah. *Species and functional diversity of soil microflora at Gunung Halimun National Park*. BCP JICA: viii + 69. 2002.
- (9) Kashem, M.A., M.A. Manchur, M.S. Rahman & M.N. Anwar. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of reducing sugars, extra-cellular protein and cellulolytic enzymes by two cellulolytic bacterial isolates. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(10): 1660 – 1663. 2004.
- (10) Okeke, B.C. & A. Paterson. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces sp.*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 483 – 487. 1992.
- (11) Yarrow, D. Methods for the Isolation, maintenance and Identification of Yeast dalam: Kurtzman, C.E. and J.W. Fell (eds). *The Yeasts. A taxonomical Study* North\_Holland. Tubi., Co. London: 7-105. 1998.

- (12) Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153 (1): 375 – 380. 1944.
- (13) Coral, G., B. Arikani, M.N. Ünalı & H. Govenmez. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulose of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. *Turkey Journal of Biological* 26: 209 – 213.
- (14) Crueger W & A. Crueger.. *Biotechnology: A text book of industrial microbiology*. Science Tech, Inc. Madison: x + 308. 1982.
- (15) Prasertsan, P., A. H-kittikul & B. Chitmanee. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 614 – 617. 1992.
- (16) Fadel, M. Production physiology of cellulases and  $\beta$ -glucosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid state fermentation conditions. *Online Journal of Biological Sciences* 1(5): 401 – 411. 2000.
- (17) Rajoka, M.I.. Influence of various fermentation variables on exo-glucanase production in *Cellulomonas flavigena*. *Electronic Journal of Biotechnology* 7(3): 1 – 15. 2004.
- (18) Gancedo, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2): 334 – 361.
- (19) Griffin, D.H. *Fungal Physiology*. A Wiley-Interscience Publication. New York: xii + 383. 1981.
- (20) Beaulieu, M., Y. Beaulieu, J. Mélinard, S. Pandian & J. Goulet. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* 61(1): 165 – 169. 1995.
- (21) Bilgrami, K.S. & R.N. Verma.. *Physiology of fungi*. 2<sup>nd</sup> rev.ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi: x + 507. 1998.
- (22) Enari, T.M. 1983. Microbial cellulases. *Dalam: Willian & Forgady (eds.). Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers, London & New York. 1983.
- (23) Suhartono, M. T. *Enzim dan bioteknologi*. Departemen P & K dan Dirjen PAU Bioteknologi IPB: vi + 322. 1989.
- (24) Kang, M.K. & Y.H. Rhee. 1995. Carboxymethyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Biotechnology letters (Historical Archive)* 17(5): 507 – 512.
- (25) Chen, P.J., T.C. Wei, Y.T. Chang & L.P. Lin. Purification and characterization of carboxymethyl cellulose from *Sinorhizobium fredii*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 111 – 118. 2005.
- (26) Cappucino, J.G. & N. Sherman. . *Microbiology: A laboratory manual*. Fourth ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California: xvii + 477. 1966.