

PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI FITASE HASIL FERMENTASI *Aspergillus niger* PADA MEDIA CAIR

Purification and Characterization of Phytase from Submerged Fermentation of Aspergillus niger

Miswar¹⁾

1) Staf Fakultas Pertanian dan Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember
Email : mmiswar20@gmail.com

ABSTRACT

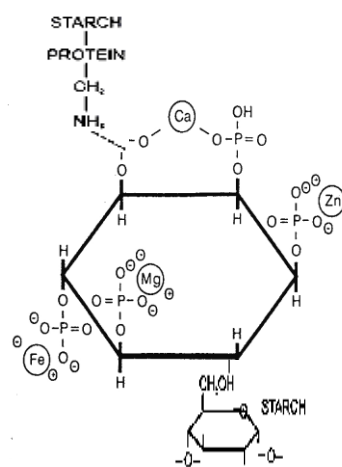
Phytases are enzymes that sequentially remove phosphate groups from myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (phytate), and are the main storage form of phosphate in plants. It has been produced an extracellular phytase from a wild type *Aspergillus niger* in a submerged culture. The phytase was purified in two steps by using ammonium sulphate precipitation (0-50% and 50-80% saturation) and DEAE-Cellulose column chromatography. Under these experimental condition, the phytase could be purified at 30 folds. The enzyme showed a maximum catalytic value at pH 5.0 and optimum temperature at 60°C. Based on a lineweaver-Burk equation, the purified phytase had the Km and Vmax value by 0.42 mM and 15.2 $\mu\text{Pi hour}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$, respectively. The ability of the phytase to hydrolyze phytic acid in maize powder was higher than phytic acid in soybean powder.

Key words : *phytase, phytic acid, Aspergillus niger*

PENDAHULUAN

Asam fitat (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate) merupakan bentuk mineral phosphor (P) yang tersimpan dalam biji, dan dapat mencapai 65%-85% dari total P (Shears, 2001). Senyawa ini dapat juga mengikat beberapa mineral seperti Fe, Ca, Zn, Mg, Mn dan Cu (Lopez *et al.*, 2002) serta protein (Cheryan, 1980) seperti tampak pada **Gambar 1**, dan tahan terhadap panas (Greiner and Konietzny, 2006). Mineral-mineral yang terikat pada asam fitat tidak diserap oleh usus manusia dan ternak non ruminasia (Greiner and Konietzny, 2006; Lott *et al.*, 2000). Tingginya tingkat konsumsi bahan pangan yang berasal dari biji sereal dan legume dapat mengakibatkan terjadinya defisiensi mineral, terutama Fe dan Zn (Stevenson-Paulik *et al.*, 2004). Protein yang terikat pada asam fitat menyebabkan perubahan struktur yang dapat menurunkan kelarutannya, aktivitas enzimatis dan kemampuan enzim proteolitik dalam pencernaan (Cheryan, 1980). Dalam

tubuh, asam fitat dapat menghambat aktivitas enzim yang terlibat dalam pencernaan makanan seperti α -amilase (Knuckles and Betschart, 1987; Desphande and Cheryan, 1984), Lipase (Knuckles, 1988), pepsin, tripsin, dan chymotripsin (Desphande and Damodaran, 1989).



Gambar 1. Struktur asam fitat yang mengikat mineral, protein, dan amilum

Fitase (myo-inositol hexacis-phosphate 3-phosphorylase, EC 3.1.3.8 dan myo-inositol hexakisphosphate 6-phosphorylase, EC 3.1.3.26) merupakan kelompok enzim phosphomono-esterase (Konietzny and Greiner, 2004). Enzim ini mempunyai kemampuan memecah asam fitat dengan melepaskan mineral-mineral dan senyawa organik yang terikat. Penggunaan fitase dalam pangan dan pakan dapat memperbaiki nilai gizi dengan meningkatkan daya cerna protein dan ketersediaan mineral (Sandberg and Andlid, 2002). Selain itu juga fitase digunakan dalam pengolahan makanan untuk menghasilkan pangan fungsional (Konietzny and Greiner, 2003). Dalam pembuatan roti, fitase selain dapat mengurangi kadar asam fitat adonan dan mempersingkat waktu fermentasi juga memperbaiki tekstur roti yang dihasilkan (Haros *et al.*, 2001).

Beberapa mikrobia, tanaman, dan jaringan hewan dapat menghasilkan fitase dengan karakter yang berbeda. Fitase dapat dihasilkan oleh beberapa bakteri seperti *Pseudomonas* spp (Richardson and Hadobas, 1997), *Bacillus* sp (Choi *et al.*, 2001), *Citrobacter braakii* (Kim *et al.*, 2003), dan *Enterobacter* (Yoon *et al.*, 1996). Jamur kelompok *Aspergillus* sp diketahui mampu menghasilkan fitase (Han *et al.*, 1999; Kostrewa *et al.*, 1997). Pada tanaman, fitase dapat dihasilkan dalam biji yang sedang mengalami perkecambahan dan pada akar beberapa tanaman .

Fitase yang dihasilkan oleh mikrobia yang berbeda mempunyai karakter yang berbeda pula. Beberapa karakter yang penting dalam penggunaan fitase dalam industri antara lain aktivitas, pH optimum, suhu optimum dan ketahanan terhadap panas. Pada **Tabel 1** ditampilkan karakter fitase dari beberapa mikrobia.

Tabel 1. Karakteristik fitase yang dihasilkan oleh beberapa mikrobia

Mikrobia	pH opt.	Suhu opt. (°C)	Akt. Spesifik (unit/mg)
<i>A. terreus</i>	5.0–5.5	70	142–196
<i>A. fumigatus</i>	5.0–6.0	60	23–28
<i>A. oryzae</i>	5.5	50	11
<i>P. syringae</i>	5.5	40	769
<i>B. subtilis</i>	6.5–7.5	55–60	9–15
<i>B. amyloliquefaciens</i>	7.0–8.0	70	20

Karakter suhu dan pH optimum serta aktivitas merupakan faktor yang sangat menentukan penggunaan fitase dalam pengolahan makanan (Greiner and Konietzny, 2006). Selain itu penggunaan fitase yang tahan terhadap panas lebih menguntungkan dalam prosesing makanan.

METODA PENELITIAN

Bahan Penelitian

Jamur dan Media Pertumbuhan

Jamur *Aspergillus niger* diperoleh dari Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember. *A. niger* ditumbuhkan pada media cair yang mengandung asam fitat dari jagung. Adapun komposisi media cair terdiri dari (per liter) 28 g amilum, 5 g glukosa, 18 g pepton, 0,5 g KCl, 1,5 g MgSO₄.7H₂O, 1 g KH₂PO₄, CaCl₂ (Papagian *et al.*, 2001). Media cair yang mengandung asam fitat jagung diinokulasi dengan spora, lalu diinkubasi dalam *shaker-incubator* pada suhu 28°C, 175 rpm selama 7 hari.

Tahapan Penelitian

Metoda Analisis

Isolasi dan Purifikasi Fitase.

Media cair yang telah difermentasi dengan *A. niger* disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm, 4°C selama 15 menit, supernatan digunakan sebagai sumber fitase *Aspergillus niger*. Langkah awal purifikasi, fitase ekstrak kasar dipresipitasi menggunakan amonium sulfat pada tingkat saturasi 0-50 dan 50-80%. Protein hasil pengendapan dilarutkan dengan 100 mm bufer sodium asetat pH 5,0, lalu di didialisis selama 24 jam untuk menghilangkan amonium sulfat. Fitase hasil didialisis diukur aktivitas dan kandungan proteinnya, lalu difraksinasi dengan kolom kromatografi DEAE-cellulose. Fraksi-fraksi yang didapatkan diukur aktivitas dan kandungan proteinnya.

Pengukuran Aktivitas Fitase.

Aktivitas enzim fitase ditentukan berdasarkan ion phosphate yang dilepaskan dari substrat selama reaksi hidrolisis sesuai dengan metode Quan *et al.* (2001) dan Wyss *et al.* (1999). Delapan ratus mikroliter larutan bufer asetat (0,2 M ;pH 5,5) yang mengandung 1 mM sodium phytate ditambah dengan 25 µl larutan enzim fitase. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml 10% asam trikloroasetat (TCA). Ion phosphate yang dilepaskan diukur dengan cara mencampur 100 µl larutan hasil hidrolisis dengan 900 µl H₂O dan 1 ml larutan 0,6M H₂SO₄ yang mengandung 2% asam askorbat dan 0,5% ammonium molibdat. Campuran diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang 820 nm. Aktivitas spesifik fitase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dapat melepaskan 1 µg ion phosphate selama satu jam.

Analisis Kadar Protein

Kandungan protein fitase hasil purifikasi

diukur dengan menggunakan reagen CBB G-250 berdasarkan metode Bradford (1976). Protein bovine serum albumine (BSA) digunakan sebagai protein standar.

Uji Karakter Fitase

Karakter fitase hasil purifikasi yang diuji meliputi pH dan suhu reaksi optimum, nilai K_m dan V_{maks} pada pH dan suhu optimum. Untuk mengetahui pH dan suhu optimum dilakukan serangkaian reaksi pada suhu antara 35-75°C (interval 10) dan pH antara 3-7. Untuk mendapatkan nilai K_m dan V_{maks} dilakukan serangkaian reaksi pada pH dan suhu optimum dengan konsentrasi substrat yang berbeda, yaitu antara 1 – 10 mM asam fitat.

Hidrolisis Asam Fitat dalam Bahan Pangan

Kemampuan fitase dalam menghidrolisis asam fitat pada tepung kedelai dan jagung dilakukan reaksi pada pH dan suhu optimum. Tepung jagung atau kedelai steril sebanyak 1 gram suspensikan dengan 4 ml bufer sodium asetat (100 mM, pH 5,0), lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama 5 menit. Setelah 5 menit ditambahkan 0,2 ml larutan enzim fitase hasil purifikasi dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 1 jam. Larutan hasil reaksi disentrifugasi dan 0,2 ml supernatan ditambah dengan 1 ml larutan 0,6M H₂SO₄ yang mengandung 2% asam askorbat dan 0,5% ammonium molibdat. Campuran diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit, kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang 820 nm. Untuk uji in-vitro, aktivitas enzim didefinisikan sejumlah ion fosfat yang dilepaskan dalam reaksi selama satu menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Fitase Hasil Purifikasi

Hasil purifikasi fitase yang dihasilkan oleh *A. Nige* dengan menggunakan presipitasi amonium sulfat dan kolom kromatografi

DEAE-cellulose ditunjukkan pada Tabel 2

Tabel 2. Karakteristik fitase hasil purifikasi dari *Aspergillus niger*

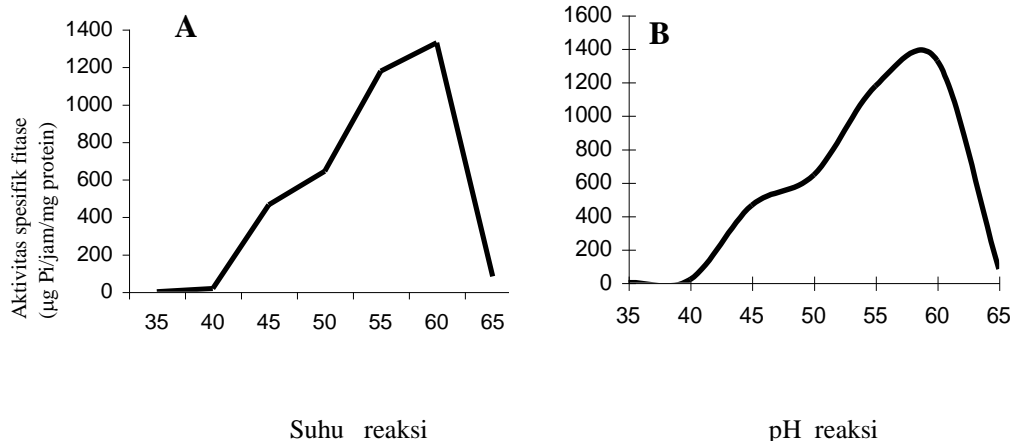
Fraksi fitase	Total protein (mg)	Total aktv. relatif (µg pi/jam)	Aktv. Spesifik (µgPi/jam/mg prot)	Fold
Ekstrak kasar	20,48	184,80	9,02	1,00
Ammo. Sulfat	7,78	1444,42	185,66	20,58
DEAE-cellulose	2,97	1154,88	388,85	43,11

Dalam penelitian ini sebagai langkah awal dalam permurnian, dilakukan presipitasi fitase dengan amonium sulfat. Presipitasi pertama dilakukan pada tingkat saturasi amonium sulfat (0-50)%, kemudian presipitasi kedua pada saturasi (50-80)%. Pada tahapan ini didapat fitase dengan tingkat kemurnian sebesar 20 kali dari fitase ekstrak kasar. Pada proses pemurnian selanjutnya menggunakan kolom kromatografi DEAE-cellulose dipadat fitase dengan tingkat kemurnian 43 kali. Hasil ini lebih baik dibandingkan hasil yang didapat oleh Sariyska *et al.* (2005) yang menggunakan tiga langkah permurnian fitase *A. niger* yaitu ultrafiltrasi, sephadex G-250 dan DEAE Sepharose CL 6B dengan tingkat kemurnian 30 kali. Hal ini

menunjukkan bahwa presipitasi fitase dengan amonium sulfat dapat meningkatkan tingkat kemurniannya. Fitase *A. niger* hasil purifikasi mempunyai aktivitas spesifik sebesar 388,85 (µgPi/jam/mg prot) atau 0,64 unit/ml.

Suhu dan pH Optimum

Suhu dan pH merupakan dua faktor yang sangat menentukan kemampuan enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Penggunaan enzim akan maksimal bila digunakan pada pH dan suhu optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas spesifik fitase dari *A. niger* tertinggi pada suhu 60°C dan pada pH 5,0 seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Suhu dan pH optimum fitase *A. niger* hasil purifikasi

Suhu optimum fitase *A. niger* dalam penelitian ini lebih tinggi

dibandingkan fitase *A. niger* 307 (Sariyska *et al.*, 2005) dan fitase *A. niger*

NRRL 3135 (Ullah and Gibson, 1987) yaitu sekitar 55-58°C. Semakin tinggi suhu optimum fitase akan semakin tahan terhadap pengaruh suhu yang tinggi dan juga memudahkan dalam penyimpanan. Enzim-enzim yang tidak tahan terhadap suhu tinggi, biasanya disimpan pada suhu rendah (dingin) untuk menghindari kerusakan. Seperti halnya suhu, pH reaksi juga sangat menentukan kemampuan katalisis suatu enzim. Derajat keasaman (pH) berpengaruh pada gugus pemberi atau penerima proton pada sisi katalitik fitase yang dapat meningkatkan tingkat ionisasinya. Hasil analisis menunjukkan bahwa pH optimum fitase *A. niger* adalah 5,0 seperti terlihat pada **Gambar 2A**. Menurut Greiner and Konietzny (2006) bahwa fitase yang mempunyai pH optimum antara 3.5-6.0 digolongkan sebagai fitase asam (*acid phytase*), sedangkan alkalin fitase mempunyai pH optimum 7.0-8.0. Pada umumnya fitase yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp merupakan fitase asam, sedangkan yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp merupakan alkalin fitase.

Karakteristik Kinetika Fitase

Kinetika parameter fitase ditentukan pada kondisi pH dan suhu optimum yaitu pada suhu 60°C dan pH 5,0 dengan konsentrasi substrat (asam fitat) antara 0,5 –7,5 mM. Hasil analisis menunjukkan bahwa fitase *A. niger* mempunyai nilai K_m dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,42 mM dan 15,2 $\mu P/jam/mg$ protein. Nilai K_m ini lebih kecil dibandingkan dengan nilai K_m fitase dari *Aspergillus ficuum* sebesar 2,34 mM (Liu, 1997). Hal ini berarti bahwa afinitas fitase dari *A. niger* terhadap asam fitat lebih besar dibandingkan afinitas fitase dari *A. ficuum*. Semakin kecil nilai K_m atau semakin besar afinitas fitase, maka semakin kecil jumlah substrat yang diperlukan untuk mencapai kecepatan maksimum reaksi hidrolisis asam fitat.

Hasil Hidrolisis Asam Fitat Bahan Pangan

Kedelai dan jagung merupakan produk pertanian yang banyak digunakan sebagai bahan pangan maupun pakan. Dalam kedua produk tersebut banyak terkandung asam fitat. Untuk menghindari berkurangnya nilai gizinya, maka kandungan asam fitatnya harus dihilangkan dengan menggunakan fitase. Dalam penelitian ini jumlah fitase yang digunakan sebanyak 0,2 ml yang setara dengan aktivitas fitase 0,128 unit. Hasil analisis menunjukkan bahwa terjadi perbedaan kemampuan hidrolisis fitase terhadap asam fitat dalam tepung dan tepung kedelai. Ion fosfat yang dapat dilepaskan oleh 0,128 unit fitase dari tepung jagung dan kedelai masing-masing sebesar 9,22 mg Pi/jam/kg tepung dan 7,85 mg Pi/jam/kg tepung. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh perbedaan struktur antara biji jagung dengan kedelai.

KESIMPULAN

Aspergillus niger yang difermentasikan pada media cair mampu menghasilkan fitase ekstraseluler. Purifikasi fitase dengan presipitasi amonium sulfat dan kolom kromatografi DEAE-*cellulose* dapat menghasilkan fitase dengan tingkat kemurnian 30 kali dibandingkan fitase ekstrak kasar. Fitase hasil purifikasi aktif secara optimum pada pH 5,0 dan suhu 60°C, dengan K_m dan V_{maks} masing-masing sebesar 0,42 mM dan 15,2 $\mu P/jam/mg$ protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada saudara Novita Cholifah yang telah membantu dalam penelitian ini. Demikian pula diucapkan terima kasih kepada Pusat Penelitian Biologi Molekul, Lembaga Penelitian Universitas Jember yang telah memfasilitasi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford MM (1976). A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem* 72 : 61- 67
- Cheryan M (1980). Phytic acid interactions in food systems, *Crit Rev Food Sci Nutr* 13: 297–355.
- Choi YM, Suh HJ and Kim JM (2001) Purification and properties of extracellular fitase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J Prot Chem* 20: 287-292
- Desphande SS and Damodaran S (1989). Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. *J Food Sci* 54 : 695–699
- Desphande SS and Cheryan M (1984). Effects of phytic acid, divalent cations, and their interactions on alpha-amylase activity. *J Food Sci* 49 : 516–519
- Greiner R and Konietzny U (2006). Phytase for food application. *Food Technol Biotechnol* 44 :125–140
- Han Y, Wilson DB and Lei XG (1999). Expression of an *Aspergillus niger* Fitase Gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 65:1915–1918
- Haros M, Rosell CM and Benedito C (2001). Fungal fitase as a potential breadmaking additive, *Eur Food Res Technol* 213 : 317–322.
- Kim HW, Kim YO, Lee JH, Kim KK and Kim YJ (2003). Isolation and characterization of a fitase with improved properties from *Citrobacter braakii*. *Biotechnol Lett* 25: 1231-1234
- Knuckles BE (1988). Effect of phytate and other *myo*-inositol phosphate esters on lipase activity, *J Food Sci* 53:250–252.
- Knuckles BE and Betschart AA (1987). Effect of phytate and other *myo*-inositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. *J Food Sci* 52 : 719–721.
- Konietzny U and Greiner R (2003). *Phytic Acid: Nutritional Impact*. In Caballero B, Trugo L, and Finglas P (Eds.) (2003). *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, , Elsevier, London, UK.
- Konietzny U and Greiner R (2004). Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazil. J Microbiol* 35:11-18
- Kostrewa D, Gruninger-Leitch F, D’Arcy A, Broger C, Mitchell D and van Loon APGM (1997). Crystal structure of fitase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4:185–190.
- Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, and Révész C (2002). Minerals and phytic acid interactions: Is it a real problem for human nutrition?, *Int J Food Sci Technol* 37: 727–739.
- Papagiani M, Nokes SE and Filer K (2001). Submerged and solid state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effect of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technol Biotechnol* 39:319-526
- Quan CS, Zhang LH, Wang YJ and Ohta Y (2001). *Production of Phytase in A low Phosphate Medium by A Novel Yeast Candida krusei*. *J Biosci Bioeng* 92 : 154-160.

- Richardson AE and Hadobas PA (1997). Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43: 509-516
- Sandberg AS and Andlid T (2002). Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. *Int J Food Sci Technol* 37: 823-834
- Sariyska M, Gargova S, Koleva L and Angelov A (2005). *Aspergillus niger* phytase, purification and characterization. *Biotechnol Eq* 19: 98-106
- Shears SB (2001). Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signalling* 13:151-158.
- Stevenson-Paulik J, Bastidas RJ, Chiou ST, Frye RA and York JD (2004). Generation of phytate-free seeds in *Arabidopsis* through disruption of inositol polyphosphate kinases. *PNAS* 102 : 12612-12617
- Ullah AHJ and Gibson DM (1987). Extracellular phytase (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 : Purification and characterization. *Prepar Biochem* 17: 63-91
- Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A, Remy R, Tessier M, Kronenberger A, Middendorf A, Lehmann M, Schnoebelen L, Röthlisberger U, Kuszniir E, Wahl G, Müller F, Lahm HW, Vogel K and van Loon APGM (1999). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Molecular size, Glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Appl Environm Microbiol* 65: 359-366
- Yoon SJ, Choi YJ, Min HK, Cho KK, Kim YW, Lee SC and Jung YH (1996). Isolation and identification of fitase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of fitase enzyme. *Enzyme Microbial Technol* 18: 449-454