

**PENGHASILAN DAN PENCIRIAN EKSPOLISAKARIDA DARIPADA *Bacillus licheniformis* S20A.**

**ANIDA BINTI MAT ISA**

**Tesis ini dikemukakan  
sebagai memenuhi syarat penganugerahan  
ijazah Sarjana Kejuruteraan (Polimer)**

**Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Sumber Asli  
Universiti Teknologi Malaysia**

**MAC, 2004**

Buat suami tercinta serta ayah ibu yang dikasihi

## PENGHARGAAN

Penulis ingin merakamkan penghargaan tak terhingga kepada penyelia, Prof Madya Dr. Wan Aizan Wan Abdul Rahman dan Dr. Rosli Md. Illias yang tidak jemu-jemu memberi bimbingan dan sokongan sepanjang tempoh penyelidikan ini. Jutaan terima kasih diucapkan kepada Dr. Farediah daripada Fakulti Sains yang sudi memberi tunjuk ajar dalam menyelesaikan masalah berkaitan analisis RMN.

Penghargaan juga ditujukan kepada juruteknik makmal kejuruteraan bioproses dan makmal kejuruteraan polimer terutamanya Pn Siti Zalita dan Cik Zainab dan juga juruteknik-juruteknik lain serta rakan –rakan di makmal kejuruteraan bioproses yang telah banyak membantu menjayakan penyelidikan ini. Semoga hasil penyelidikan ini dapat memberi manfaat kepada semua.

## ABSTRAK

Mikroorganisma yang hidup dalam keadaan persekitaran yang sesuai akan menghasilkan bahan sampingan. Eksopolisakarida, EPS merupakan salah satu bahan sampingan hasil aktiviti pertumbuhan bakteria. Banyak EPS daripada bakteria telah dikaji dan digunakan secara meluas. Kajian ini melibatkan pengkulturan bakteria yang diperolehi daripada telaga minyak tempatan dalam medium pengkulturan yang dapat menghasilkan biopolimer diikuti oleh proses pencirian. Bacteria *Bacillus licheniformis* S20A yang dipencilkan daripada lapangan minyak tempatan didapati menghasilkan EPS S20A secara optimum apabila dikulturkan di dalam medium sukrosa pada suhu 45°C, dengan kelajuan penggoncang 200 rpm selama 22 jam. Penggunaan sumber karbon dan nitrogen yang berbeza dalam kajian pertumbuhan bakteria didapati menghasilkan EPS yang mempunyai kumpulan berfungsi yang sama tetapi penghasilan EPS yang optimum dipengaruhi oleh faktor nutrient. Pertumbuhan bakteria pula berlaku mengikut fasa tertentu iaitu fasa lag, fasa log, fasa pegun dan diakhiri dengan fasa kematian. Ujian pencirian yang dilakukan bertujuan untuk mengenalpasti kumpulan berfungsi dan jenis monomer yang membina biopolimer EPS tersebut serta mengkaji sifat-sifatnya. Penentuan struktur dan jenis EPS dianalisis menggunakan kaedah FTIR dan <sup>1</sup>H RMN. Pencirian terhadap sifat terma dilakukan dengan penggunaan teknik DSC dan TGA. Keterlarutan EPS di dalam pelarut organik dan inorganik turut dilakukan. Kaedah viskometri dan GPC digunakan untuk mengukur berat molekul purata serta jenis taburannya. Sifat reologi EPS terhadap faktor kepekatan dan suhu turut diuji. Keputusan FTIR mendapati EPS S20A mempunyai kumpulan berfungsi C=OH dan ujian <sup>1</sup>H RMN pula menunjukkan EPS S20A mempunyai satu anomerik iaitu α-D mannososa. EPS S20A adalah sejenis polimannosa dan mempunyai berat molekul purata-kelikatannya di antara  $1.7 \times 10^5$  sehingga  $1.54 \times 10^6$  g/mol. Berat molekul purata-kelikatannya didapati meningkat tetapi jumlah hasil yang diperolehi semakin menurun apabila *Bacillus licheniformis* S20A dikulturkan melebihi 22 jam. Kaedah GPC menunjukkan EPS S20A mempunyai indeks kepolisebaran 1.06. EPS S20A ini melebur pada suhu  $T_{m \text{ onset}}$  124.5 °C, mula terurai pada suhu 200.0 °C, dan menunjukkan sifat higroskopik. EPS S20A juga menunjukkan sifat pseudoplastik apabila digunakan dalam kepekatan melebihi 4%.

## ABSTRACT

In suitable surrounding environment, living microorganisms are able to produce side products. Exopolysaccharide, EPS is one of the side products in bacterial growth activities. Many EPS from bacteria has been studied and used widely. Among those are xanthan, alginate and curdlan. This study is purposely to culture bacteria isolated from local oil field in a medium that can produce biopolymer prior to characterization process. When cultured in sucrose medium at 45°C, shaker speed at 200 rpm for 22 hours *Bacillus licheniformis* S20A is able to produce optimum EPS. Different carbon and nitrogen sources used in bacterial growth study were found to produce EPS with same functional group. Bacterial was grown following the typical growth curve consist of lag phase, log phase, stationary phase and death phase. Characterization carried out to identify the functional group and monomer that build up the EPS. Structure and EPS type were analyzed using FTIR and <sup>1</sup>H NMR. Thermal analysis was carried out using DSC and TGA technique. Solubility test has been done in organic and inorganic solvents. Molecular weight and distribution was measured using viscometry and GPC method. EPS rheology upon concentration and temperature was also studied. Result in FTIR spectrum indicate the functional group of EPS S20A is C=OH. Only one anomeric refers to α-D mannose was detected in <sup>1</sup>H NMR spectrum. EPS S20A is a polymannose with molecular weight viscosity-average around 1.7 x 10<sup>5</sup> to 1.54 x 10<sup>6</sup> g/mol. The molecular weight viscosity-average was found increased when *Bacillus licheniformis* S20A is cultured more than 22 hours, but the amount of EPS S20A produced is decreased. GPC method indicate EPS S20A have a polydispersity index of 1.06. EPS S20A is a hygroscopic polymer tend to melt at T<sub>m onset</sub> 124.5°C and degraded at 200.0°C. EPS S20A shows pseudoplastik behavior when used in concentration higher than 4%.

## KANDUNGAN

<b>BAB</b>	<b>PERKARA</b>	<b>MUKA SURAT</b>
	TAJUK	i
	PENGAKUAN	ii
	DEDIKASI	iii
	PENGHARGAAN	iv
	ABSTRAK	v
	ABSTRACT	vi
	KANDUNGAN	vii
	SENARAI JADUAL	xi
	SENARAI GAMBARAJAH	xiii
	SENARAI SIMBOL DAN RINGKASAN PERKATAAN	xvi
	SENARAI LAMPIRAN	xviii
<b>BAB I</b>	<b>Pengenalan</b>	<b>1</b>
	1.1 Pengenalan	1
	1.2 Latar belakang Masalah	2
	1.3 Objektif Penyelidikan	5
	1.3 Skop Penyelidikan	6
<b>BAB II</b>	<b>KAJIAN LITERATUR</b>	<b>7</b>
	2.1 Pengenalan	7
	2.2 Jenis-jenis EPS	10
	2.3 Sintesis EPS	13
	2.4 Faktor yang Mempengaruhi Sintesis EPS	17

2.4.1	Nutrien	17
2.4.2	Keadaan Persekitaran	19
2.5	Aplikasi EPS didalam Industri dan Perubatan	22
2.5.1	Perubatan	22
2.5.2	Industri Petroleum dan Minyak	25
2.5.3	Industri Makanan	27
2.5.4	Rawatan Air Sisa	28
2.6	EPS Terubahsuai	30
2.7	Proses Memperolehi EPS	32
2.8	Pencirian EPS	34
2.8.1	Berat Molekul Polimer	34
2.8.1.1	GPC	35
2.8.1.2	Kaedah Viskometri	36
2.8.2	Penentuan Kumpulan Berfungsi Polimer	38
2.8.2.1	Spektroskopi Infra merah	38
2.8.2.2	Resonan Magnet Nukleus	40
2.8.3	Analisis Terma	41
2.8.4	<i>Bacillus licheniformis</i>	43
<b>BAB III</b>	<b>METODOLOGI PENYELIDIKAN</b>	<b>46</b>
3.0	Pengenalan	46
3.1	Bahan	46
3.1.1	<i>Bacillus licheniformis</i> S20A	46
3.1.2	Agar Nutrien	46
3.1.3	Medium Pengayaan	47
3.1.4	Bahan untuk Penentuan Berat Molekul Biopolimer	50
3.1.5	Sumber Karbon	51
3.1.6	Sumber Nitrogen	52
3.1.7	Bahan Kimia yang Lain	52
3.1.8	Bahan Pelarut	53
3.2	Penghasilan Biopolimer	53
3.2.1	Penyediaan Kultur <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	53
3.2.2	Kajian Pertumbuhan Bakteria	55

3.2.3	Penyediaan Biopolimer Kering	56
3.2.4	Penulenan Biopolimer	56
3.2.5	Kesan Kepelbagaian Sumber Karbon dan Nitrogen Terhadap Pengeluaran Biopolimer	58
3.2.6	Pengukuran Kandungan Protein di dalam Polimer Kering	58
3.3	Ujian Pencirian Biopolimer	59
3.3.1	Tindakbalas dengan Larutan Sodium Karbonat	59
3.3.2	Penentuan Kumpulan Berfungsi Biopolimer	59
3.3.3	Penentuan Berat Molekul Polimer	60
3.3.3.1	Kaedah Viskometri	60
3.3.3.2	Kaedah GPC	61
3.3.4	Ujian Terhadap Pelarut	62
3.3.5	Analisis Termal	63
3.3.5.1	Kalorimeter Pengimbasan Kebezaan (DSC)	63
3.3.5.2	Analisis Termogravimetrik (TGA)	63
3.3.6	Ujian Reologi	63
3.3.7	Penentuan Struktur Biopolimer	64
<b>BAB IV</b>	<b>KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>	67
4.1	Pertumbuhan Bakteria dan Penghasilan Polimer	67
4.1.2	Kesan Penggunaan Sumber Karbon dan Nitrogen Terhadap Pertumbuhan Sel <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	70
4.1.2.1	Sumber Karbon	70
4.1.2.2	Sumber Nitrogen	72
4.1.3	Kesan Sumber Karbon dan Nitrogen Terhadap Penghasilan Eksopolimer	74
4.1.3.1	Sumber Karbon	74
4.1.3.2	Sumber Nitrogen	76
4.1.4	Kandungan Protein di dalam Eksopolimer S20A	79

4.2	Pencirian Eksopolimer S20A	81
4.2.1	Identifikasi Awalan Eksopolimer	81
4.2.2	Analisis FTIR	83
4.2.3	Berat molekul EPS	87
4.2.3.1	Kaedah Viskometri (Berdasarkan Tempoh Masa Pengeraman <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> S20A Yang Sama)	87
4.2.3.2	Kaedah Viskometri (Berdasarkan Tempoh Masa Pengeraman <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> S20A Yang Berbeza)	95
4.2.3.3	Berat molekul EPS Berdasarkan Kaedah Kromatografi Telapan Gel (GPC)	99
4.2.4	Ujian Terhadap Pelarut	105
4.2.5	Analisis Terma	107
4.2.5.1	Kalorimeter Pengimbasan Kebezaan, DSC	107
4.2.5.2	Analisis Permeteren Graviti Haba, TGA	110
4.2.6	Reologi EPS	112
4.2.6.1	Kesan Kepekatan EPS	112
4.2.6.2	Kesan Suhu	114
4.3	Penentuan Struktur EPS S20A, Spektrum $^1\text{H}$ RMN	116
<b>BAB V</b>	<b>KESIMPULAN DAN PERBINCANGAN</b>	126
5.1	Kesimpulan	126
5.2	Cadangan	128
	<b>RUJUKAN</b>	130
	<b>LAMPIRAN</b>	148
	LAMPIRAN A-B	148-158

**SENARAI JADUAL**

<b>NO JADUAL</b>	<b>TAJUK</b>	<b>MUKA SURAT</b>
2.1	Perbezaan kedudukan dan struktur bagi PHB, EPS dan PGA	9
2.2	Perbezaan struktur EPS monosakarida dan heteropolisakarida	11
2.3	Perkembangan status EPS mengikut tahun	12
2.4	Jenis EPS yang terhasil berdasarkan substrat	16
2.5	Unsur makronutrien dan kepentingannya terhadap fisiologi sel	18
2.6	Kaedah yang digunakan bagi menentukan berat molekul polimer.	37
3.1	Komposisi bahan larutan mineral surih.	54
3.2	Hubungan antara jumlah puncak dalam spekturm RMN dengan atom hidrogen yang bersebelahan dengan puncak tersebut.	66
4.1	Sumber karbon dan nitrogen yang diperlukan oleh <i>Bacillus licheniformis</i> berdasarkan produk yang ingin dihasilkan.	80
4.2	Ringkasan puncak EPS S20A yang dicerap melalui FTIR.	84
4.3	Ringkasan spektrum FTIR yang direkodkan bagi setiap sampel	87

karbon dan nitrogen tertentu

4.4	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S1	89
4.5	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S2	90
4.6	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S3	91
4.7	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S4	92
4.8	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S5	93
4.9	Data kaedah viskometri bagi EPS S20A sampel S6	94
4.10	Kelikatan intrinsik dan berat molekul purata kelikatan bagi setiap sampel	95
4.11	Kelikatan intrinsik dan berat molekul purata kelikatan mengikut tempoh pengeraman <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	97
4.12	Berat molekul bagi setiap isipadu eluen EPS S20A	103
4.13	Kaedah pengiraan berat molekul purata nombor dan purata berat EPS S20A	105
4.14	Sifat keterlarutan EPS S20A terhadap pelarut yang diuji	106
4.15	Ringkasan nilai anjakan kimia bagi sampel EPS S20A	117
4.16	Nilai anjakan kimia bagi glukosa dan manosa (Rathbone, 1985)	117

## SENARAI GAMBARAJAH

NO. GAMBARAJAH	TAJUK	MUKA SURAT
2.1	Sintesis EPS yang berlaku diluar sel	14
2.2	Empat jenis penghasilan EPS yang berlaku dalam sitoplasma	16
2.3	Mekanisma penghasilan EPS di dalam sel	17
2.4	Antara pengubahsuaian yang boleh dilakukan terhadap EPS	31
3.1	Kaedah mencoret bakteria di atas permukaan agar	54
3.2	Carta alir metodologi ujikaji EPS daripada <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	57
4.1	Lengkung pertumbuhan dan kelikatan kaldu <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	69
4.2	Kesan penggunaan sumber karbon yang berbeza terhadap pertumbuhan <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	71
4.3	Kesan sumber nitrogen terhadap pertumbuhan <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	73
4.4	Kesan sumber karbon terhadap penghasilan eksopolimer	75

4.5	Kesan sumber nitrogen terhadap penghasilan eksopolimer	78
4.6	Graf lengkung piawai kandungan protein yang terdapat dalam BSA	81
4.7	Perbandingan di antara spektrum FTIR bagi sampel EPS S20A (A) dengan EPS dari <i>Lessonia trabeculata</i>	86
4.8	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S1	89
4.9	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S2	90
4.10	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S3	91
4.11	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S4	92
4.12	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S5	93
4.13	Plot Huggins bagi EPS S20A sampel S6	94
4.14	Berat molekul EPS S20A mengikut tempoh pengeraman <i>Bacillus licheniformis</i> S20A	98
4.15	Kromatografi pemisahan dekstran piawai menggunakan larutan 0.25M NaOH sebagai eluen	101
4.16	Lengkung tentukan bagi berat molekul melawan isipadu eluen yang dibina berdasarkan kromatografi dekstran piawai	102
4.17	Kromatogram sampel EPS S20A menggunakan kaedah GPC	103
4.18	Taburan berat molekul EPS S20A selepas tempoh pengeraman selama 22 jam	104
4.19	Termogram DSC bagi sampel EPS S20A	109

4.20	Termogram TGA bagi sampel EPS S20A	112
4.21	Kesan kepekatan EPS S20A terhadap kelikatan ketara	114
4.22	Kesan suhu terhadap kelikatan polimer	115
4.23	Spektrum RMN bagi EPS S20A	118
4.24	Spektrum medan tengah $^1\text{H}$ RMN bagi sampel EPS S20A)	120
4.25	Medan tengah bagi EPS yang diperolehi daripada <i>Burkholderia cepacia</i> (Linker, <i>et.al.</i> , 2001)	121
4.26	Medan rendah EPS S20A	122
4.27	Perbandingan spektrum FTIR antara EPS S20A dan $\alpha$ -D mannos	124
4.28	Struktur Haworth dan Fischer bagi $\alpha$ -D mannos	125

## SENARAI SIMBOL DAN RINGKASAN PERKATAAN

BSA	-	Bovine serum albumin
c	-	Halaju cahaya Hukum Hooke
c	-	kepekatan
Ca <sup>2+</sup>	-	Ion kalsium
CCl <sub>4</sub>	-	Tetraklorometana
CMC	-	Karboksimetil selulos
cPs	-	Centipoise
Cu <sup>2+</sup>	-	Ion kuprum
DMSO	-	Dimetil sulfoksida
DP	-	Darjah pempolimeran
DSC	-	Differential scanning calorimetry / kalorimeter pengimbasan perbezaan
EPS	-	Eksopolisakarida
Fe <sup>2+</sup>	-	Ion ferum
FTIR	-	Inframerah transformasi Fourier
GPC	-	Gel permeation chromatography / kromatografi telapan gel
GRAS	-	<i>generally recognized as safe</i>
HCl	-	Asid hidroklorik
IR	-	Inframerah
k	-	pemalar dyne/cm
K	-	Pemalar empirikal persamaan Mark-Houwink Sakurada
K <sup>+</sup>	-	Ion kalium
KBr	-	Kalium bromida
Mg <sup>2+</sup>	-	Ion magnesium
M <sub>n</sub>	-	Berat molekul purata -nombor
Mn <sup>2+</sup>	-	Ion mangan
MnSO <sub>4</sub>	-	Manganis sulfat
M <sub>0</sub>	-	Berat molekul monomer
Mo <sup>2+</sup>	-	Ion molibdenum
M <sub>v</sub>	-	Berat molekul purata -kelikatan
M <sub>w</sub>	-	Berat molekul purata -berat
Na <sup>+</sup>	-	Ion natrium

NaCl	-	Natrium klorida
OH	-	Kumpulan hidroksil
PGA	-	Poli $\gamma$ glutamik asid
PHB	-	Polihidroksibutilrat
PHBV	-	Poli- $\beta$ -hidrovalerate
RMN	-	Resonans magnet nuklear
Subsp.	-	Subspesis
T	-	suhu mutlak
$T_g$	-	suhu peralihan kaca
TGA	-	Thermogravimetric analysis / analisis termogravimetrik
THF	-	Tetrahidrofuran
$T_m$	-	Takat peleburan
TMA	-	Analisis terma mekanik
$Zn^{2+}$	-	Ion zink
$\mu$	-	Jisim atom
$\alpha$	-	Pemalar empirical persamaan Mark-Houwink Sakurada
$\Delta G$	-	perubahan tenaga bebas Gibbs
$\Delta G_m$	-	Tenaga bebas Gibbs ketika peleburan
$\Delta H$	-	Perubahan entalpi
$\eta_{re}$	-	Kelikatan relatif
$\eta_{red}$	-	Kelikatan terturun
$\Delta S$	-	perubahan entropi
$\eta_{sp}$	-	Kelikatan tentu
$[\eta]$	-	Kelikatan intrinsik
$\nu$	-	Frekuensi, $cm^{-1}$

**SENARAI LAMPIRAN**

<b>LAMPIRAN</b>	<b>TAJUK</b>	<b>MUKA SURAT</b>
A	Spektrum FTIR bagi sumber karbon dan nitrogen yang digunakan	148
B	Data viskometri dan plot Huggins bagi EPS S20A yang terhasil dari tempoh pengeraman yang berbeza.	155

## BAB I

### PENGENALAN

#### 1.1 Pendahuluan

Secara amnya, polimer dapat dikategorikan kepada polimer sintetik dan polimer asli. Polimer sintetik seperti plastik merupakan polimer yang dihasilkan oleh manusia menggunakan bahan mentah petrokimia. Polimer asli pula wujud secara semulajadi di dunia ini dan mempunyai kegunaan yang meluas seperti juga polimer sintetik. Walaupun begitu, polimer asli memerlukan kos pengeluaran yang tinggi berbanding plastik sintetik yang mudah dihasilkan dengan kualiti yang seragam dan stabil.

Permintaan terhadap plastik bagi kegunaan domestik dan industri semakin meningkat setiap hari. Dianggarkan pada tahun 2000, penggunaan plastik di China ialah sebanyak 16 milion tan, menjadikan China negara kelima tertinggi penggunaan plastik selepas Amerika Syarikat, Jepun, Jerman dan Korea Selatan (Ren, 2003). Hampir semua polimer sintetik terutamanya plastik bersifat rintang terhadap air sesuai dengan tujuan penggunaannya. Plastik mempunyai sifat fizikal yang lebih baik terutamanya kekuatan dan kerintangannya terhadap mikroorganisma yang hidup dalam air.

Mikroorganisma merupakan penyebab utama kerosakan komoditi. Plastik telah diformulasikan untuk rintang terhadap kemerosotan kualiti agar boleh digunakan untuk jangkamasa yang panjang. Pelbagai bahan telah digunakan untuk menjadikan plastik lengai terhadap serangan mikrobial. Formulasi penghasilan

plastik telah menjadikan ia tidak mempunyai kumpulan hujung yang dapat memulakan proses oksidasi oleh enzim mikrobial. Sifat hidrofobik plastik menyebabkan ia tidak menyediakan persekitaran yang sesuai untuk serangan mikrobial yang memerlukan proses penyerapan air, pembengkakan dan pH yang sesuai. Oleh itu, biarpun plastik mempunyai ikatan kimia yang sama dengan sebatian organik yang mudah biodegradasi, plastik tidak dapat diuraikan secara biologi.

Pertambahan kepadatan penduduk dunia bermakna semakin banyak plastik yang dihasilkan dan semakin banyak juga sampah yang perlu dilupuskan. Kesedaran terhadap kepentingan memelihara alam sekitar serta peningkatan kos pengurusan bahan buangan telah menimbulkan minat masyarakat terhadap plastik boleh yang diuraikan secara semulajadi bagi mengatasi masalah ini.

## **1.2 Latar belakang Masalah**

Plastik sintetik sebenarnya memberi banyak manfaat kepada manusia. Daripada bahan plastik yang paling ringkas seperti plastik pembungkusan sehinggalah kepada kegunaan lain seperti perabot. Malah kos penghasilan dan keberkesanan plastik seperti dalam bidang pembungkusan adalah lebih baik berbanding bahan pembungkusan yang lain. Menggantikan plastik dengan kertas akan menyebabkan banyak hutan dimusnahkan. Jumlah tenaga yang diperlukan juga akan bertambah. Scott dan Gilead (1995) melaporkan jumlah tenaga yang diperlukan untuk menghasilkan beg kertas adalah dua kali ganda lebih tinggi daripada yang digunakan dalam penghasilan beg polietilena.

Bagaimanapun, plastik turut menyumbang kearah pencemaran alam. Berjuta-juta tan plastik perlu dilupuskan setiap tahun di seluruh dunia. Sifat fizik-kimia plastik yang lebih ringan daripada air menyebabkan ia terapung di atas permukaan air. Angin dan ombak boleh membawa plastik ini ke merata tempat bagi tempoh masa yang lama. Plastik juga tidak boleh dihancurkan dan mendap di dasar lautan.

Plastik yang rintang terhadap penguraian secara biologi ini dapat dilihat walaupun setelah beberapa tahun ditanam di dalam tanah. Hidupan laut seperti mamalia, ikan dan juga burung turut menjadi mangsa pembuangan plastik. Di sektor pertanian pula, plastik yang ditanam akan mengganggu pertumbuhan akar dan turut merosakkan mesin menuai dan peralatan pertanian yang lain.

Plastik biodegradasi boleh dibahagikan kepada tiga bahagian utama iaitu degradasi melalui oksidasi cahaya, kopolimer plastik dan selulosa atau kanji dan bahan terbitan dari mikrobial yang mempunyai kadar degradasi yang tinggi. Bahan polimer yang dihasilkan secara semulajadi adalah lebih mudah diuraikan. Bahan polimer ini juga lebih dikenali sebagai biopolimer. Antara bahan biopolimer yang telah dibangunkan untuk memenuhi sifat-sifat tertentu dalam pelbagai industri ialah polihidroksialkanoat, polilaktid, poliester alifatik, polisakarida dan kopolimer daripada polimer-polimer tersebut. (Lee, 1996).

Kayu, kapas, kulit dan bulu bebiri juga merupakan sumber semulajadi yang boleh menggantikan polimer sintetik. Bagaimanapun, kesemua sumber ini memerlukan ruang dan masa yang lama sebelum hasilnya boleh diperolehi. Lebih 80 milion ekar tanah diperlukan untuk menanam pokok sekiranya ia digunakan bagi menggantikan pengeluaran plastik di Amerika Syarikat yang menghampiri 40 bilion paun setahun.

Biopolimer turut dihasilkan oleh bakteria dan prokariot. Gam xanthan adalah antara biopolimer daripada bakteria yang telah digunakan dengan meluas di dalam industri pembuatan makanan dan juga dalam menggalakan perolehan minyak. Polimer daripada bakteria mempunyai banyak kelebihan berbanding sumber semulajadi lain untuk dijadikan alternatif kepada polimer sintetik. Mikroorganisma mempunyai tempoh pertumbuhan yang lebih singkat berbanding benda hidup yang lain. Pertumbuhan mikroorganisma juga stabil kerana tidak bergantung kepada perubahan iklim dan juga serangan penyakit.

Selain daripada dimajukan untuk menggantikan plastik sintetik, biopolimer juga digunakan dalam industri makanan, farmasi, petroleum dan banyak lagi. Ketika ini permintaan terhadap biopolimer ini lebih tertumpu kepada polisakarida daripada tumbuhan dan rumpai laut. Masalah kekurangan bekalan mentah, kualiti produk yang tidak tetap dan peningkatan kos menyebabkan biopolimer daripada mikroorganisma lebih diminati berbanding polimer daripada tumbuhan untuk diusahakan.

Mikroorganisma yang berkeupayaan menghasilkan biopolimer juga boleh digunakan secara langsung tanpa proses fermentasi. Contohnya, bakteria penghasil biopolimer disuntik terus ke dalam telaga minyak untuk menggalakkan perolehan minyak. Bakteria ini akan menghasilkan palam yang akan menyekat saluran aliran yang tidak dikehendaki. Keadaan ini akan menyebabkan aliran air yang disuntik akan melalui saluran mengandungi minyak yang dikehendaki untuk menolak minyak keluar daripada telaga. Kaedah kedua ialah dengan mengeramkan bakteria tersebut di dalam medium penghasilan biopolimer. Seterusnya biopolimer tersebut akan disuntik masuk kedalam telaga minyak untuk digunakan bagi tujuan yang sama.

ZENECA Bio Product, United Kingdom telah mengeluarkan polihidroksialkanoat yang pertama daripada mikroorganisma dengan menggunakan nama komersil Biopol<sup>TM</sup>. Wella iaitu sebuah syarikat penjagaan rambut German telah menggunakan plastik BIOPOL untuk membotolkan syampu rambut mereka yang dinamakan SANARA. Bekas pengisi makanan dan pisau cukur pakai buang turut diperbuat BIOPOL telah dijual di Jepun. Polimer ini terbina daripada kopolimer 3-asid hidroksibutirik (3HB) dan 3- asid hidroksivalerik (3HV). Kopolimer ini boleh diuraikan secara biologi dan juga melalui aktiviti enzim oleh kebanyakan bakteria, kulat dan alga (Hammond dan Liggat, 1995). Masa penguraian adalah bergantung kepada bentuk material tersebut. Penguraian boleh berlaku dalam tempoh minggu hinggalah ke tahun.

Dianggarkan permintaan untuk polimer terbiodegradasikan akan mencapai 1.4 milion tan pada tahun 2000 (Lee, 1996). Bagaimanapun, satu daripada masalah yang dihadapi oleh pembangunan biopolimer ini adalah harganya yang lebih mahal

berbanding plastik daripada petro-kimia. Harga pasaran bagi BIOPOL ialah \$16/kg (Lee, 1996). Harga ini adalah 16 kali ganda lebih mahal berbanding dengan polipropilena yang berharga kurang dari \$1/kg. Faktor harga menyebabkan BIOPOL sukar digunakan sebagai bahan mentah pukal bagi menghasilkan sesuatu produk.

Oleh itu, usaha perlu dijalankan untuk mencari alternatif kepada biopolimer yang sedia ada. Dalam kajian ini sejenis bakteria S20A telah dipencilkan dari telaga minyak tempatan dan ujian menunjukkan ia ialah *Bacillus licheniformis* (Ooi, 2000) dan dikenali sebagai *Bacillus licheniformis* S20A. Apabila dikulturkan di dalam medium yang sesuai didapati mikroorganisma ini mengeluarkan mukus. Mukus ini telah menyebabkan pertambahan kelikatan medium pertumbuhan yang digunakan. Mukus ini dipercayai sebagai eksopolimer iaitu polimer yang dirembeskan diluar sel mikroorganisma. Polimer yang terhasil ini dikaji dari segi cirinya untuk menentukan kepentingan dan keupayaan polimer tersebut menggantikan polimer sintetik dan biopolimer yang sedia ada. Polimer yang dihasilkan oleh *Bacillus licheniformis* S20A mungkin boleh menjadi satu sumber tempatan yang baru untuk dibangunkan. Di Malaysia, antara pusat pengajian tinggi yang terlibat dengan penyelidikan terhadap biopolimer ialah Universiti Putra Malaysia (UPM) yang sedang menjalankan kajian terhadap penghasilan asid sitrik daripada *Aspergillus niger* (Suryani, 2003) dan rawatan logam berat menggunakan polimer semulajadi (Abdullah *et.al.*, 2003).

### 1.3 Objektif Penyelidikan

Penyelidikan ini boleh dibahagikan kepada beberapa objektif seperti:

- 1) Pengkulturan bakteria yang diperolehi daripada telaga minyak tempatan. dengan menggunakan medium yang dijangkakan sesuai untuk bakteria hidup dan menghasilkan biopolimer.
- 2) Mengenalpasti jenis dan struktur kimia biopolimer yang diperolehi.

- 3) Menciri dan mengkaji berat molekul, kesan tindakan haba serta sifat kimia biopolimer yang diperolehi.

## 1.4 Skop Penyelidikan

Bagi mencapai objektif tersebut, penyelidikan ini telah dibahagikan kepada beberapa skop iaitu:

1. Proses pengkulturan yang melibatkan kajian terhadap
  - a) pertumbuhan *Bacillus licheniformis* S20A dan
  - b) kesan sumber karbon dan nitrogen terhadap pertumbuhan dan penghasilan polimer.
2. Penganalisaan terhadap jenis dan struktur biopolimer melalui teknik
  - a) spektroskopi inframerah transformasi Fourier (FTIR) bagi mengenalpasti kumpulan berfungsi pada biopolimer.
  - b) resonans magnet nuklear (RMN) untuk mengklasifikasi jenis dan struktur biopolimer.
3. Pencirian polimer yang melibatkan
  - a) penentuan sifat terma biopolimer melalui teknik kalorimeter pengimbasan perbezaan dan teknik termogravimetrik
  - b) kajian tentang kelikatan dan berat molekul biopolimer melalui teknik viskosimetri dan kromatografi telapan gel.
  - c) sifat kimia biopolimer.

dikenal pasti samada ia jenis polimer rantai lurus atau bercabang. EPS S20A juga boleh dikaji dari segi fungsi atau aplikasinya. Sesetengah EPS tidak berfungsi apabila wujud dalam bentuk yang asal. Oleh itu fungsi EPS S20A boleh dikaji samada dalam keadaan asalnya mahupun dicampurkan dengan bahan kimia yang lain seperti dalam proses pensulfonan atau sililasi. Penambahan bahan kimia atau polimer lain ke dalam EPS S20A boleh dilakukan bergantung kepada fungsi akhir yang diinginkan bagi polimer ini. Kajian ke atas sifat mekanikal polimannya EPS S20A juga boleh dilakukan memandangkan polimer ini mempunyai beberapa ciri yang baik seperti berat molekul yang tinggi.

## RUJUKAN

- Abdullah, A.G.L., Sachrul, T.G., dan Razak, A.A.H.A (2003) "Heavy Metal Removal by Natural Polymer" <http://www.eng.upm.edu.my/webkka/index.html>  
Universiti Putra Malaysia
- Alami, Y., Achouak, W., Marol, C. dan Heulin, T. (2000). "Rhizosphere Soil Aggregation And Plant Growth Promotion Of Sunflowers By An Exopolysaccharide-Producing Rhizobium sp<sup>1</sup> Strain Isolated From Sunflower Roots." *Applied and Environmental Microbiology*. **66**. 3393-3398.
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F. dan Heulin, T. (1998). "Colonization of Wheat Roots By An Exopolysaccharide-Producing Pantoea Agglomerans Strain And Its Effect On Rhizosphere Soil Aggregation." *Applied and Environmental Microbiology*. **64**. 3740-3747.
- Apostolopoulos, V., Sandrin, M.S., dan McKenzie, I.F. (1999). "Carbohydrate/peptide Mimics: Effect On MUC1 Cancer Immunotherapy." *J.Mol.Med*. **77**. 427-436.
- Apostolopoulos, V., McKenzie, I.F. dan Pietersz, G.A. (1996). "Breast Cancer Immunotherapy: Current Status And Future Prospects." *Immunology and Cell Biology*. **74.5**.457-464.
- Appendini, P. dan Hotchkiss, J.H. (2002). "Review of Antimicrobial Food Packaging." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2002. Article in press.

- Ashtaputre, A.A dan Shah, A.K. (1995). "Studies on a Viscous, Gel-Forming Exopolysaccharide From *Sphingomonas paucimobilis* GS1." *Applied and Environmental Microbiology*. **61**. 1159-1162.
- Baig, S dan Ahmad, H.S. (1995). "Effects Of Agitator Configuration And Rotational Speed On The Production Of Extracellular Polysaccharide By *Xanthomonas cucurbitae* PCSIR B-52." *J. of Fermentation and Bioengineering*. **79**. 572-578.
- Banat, I.M., Makkar, R.S. dan Cameotra S.S. (2000). "Potential Commercial Applications Of Microbial Surfactants." *Appl Microbiol Biotechnol*. **53**. 495-508.
- Barth, H.G. (1986). "Characterization Of Water-Soluble Polymers Using Size-Exclusion Chromatography" dlm Glass, J.E. "Water Soluble Polymers; Beauty With Performance". Washington DC. American Chemical Society. 31-53.
- BeMiller, J.N. dan Whistler, R.L. (1996). "Carbohydrates." dlm. Fennema O.R. "Food Chemistry, 3<sup>rd</sup> edition." New York. Dekker. 129-136.
- Billmeyer Jr., F.W. (1962). "Textbook Of Polymer Science". United States Of America. John Wiley & Sons.
- Borde, B., Bizot, H., Vigier, G., dan Buléon, A. (2002). "Calorimetric Analysis Of The Structural Relaxation In Partially Hydrated Amorphous Polysaccharides.II. Phenomenological Study Of Physical Ageing." *Carbohydrate Polymers*. **48**.111-123.
- Bot, A., Smorenburg, H.E., Vreeker, R., Pâques, M. dan Clark, A.H. (2001). "Melting Behaviour Of Schizophyllan Extracellular Polysaccharide Gels In The

Temperature Range Between 5°C And 20 °C.” *Carbohydrate Polymers*. **45**. 363-372.

Boyle, C.D dan Reade A.E. (1983). “Characterization of Two Extracellular Polysaccharides From Marine Bacteria.” *Applied and environmental microbiology*. **46**. 392-399.

Bradford, M.M. (1976). “A Rapid And Sensitive Method For The Quatitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry*. **72**. 248-254.

Brown, M.E. (1988). “Introduction To Thermal Analysis; Techniques And Applications.” London. Chapman and Hall.

Bulla Jr., L.A dan Hoch J.A. (1985). “Biology Of The Bacilli” dlm. Demain, A.L. dan Solomon, N.A. “Biology of Industrial Microorganisms”. California. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. 57-76.

Cadmus, M.C., Knutson, C.A., Lagoda, A.A., Pittsley, J.E. dan Burton, K. A. (1978). “Synthetic Media For Production Of Quality Xanthan Gum In 20 Liter Fermentors.” *Biotechnology and Bioengineering*. **20**. 1003-1014.

Çalic, P., Çalik, G. dan Özdamar, T.H. (1998). “ Oxygen Transfer Effects In Serine Alkaline Protease Fermentation By *Bacillus Licheniformis*: Use Of Citric Acid As The Carbon Source.” *Enzyme & Microbial Technology*. **123**. 451-461.

Campbell, D dan White, J.R. (1989). “Polymer Characterization; Physical Techniques”. London. Chapman and Hall.

Cerning, J. (1990). “Exocellular Polysaccharides Produced By Lactic Acid Bacteria.” *FEMS Microbiol. Rev.* **87**. 113-130.

- Chandia, N.P., Matsuhira, B. dan Vásquez, A.E. (2001). "Alginic Acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization By Formic Acid Hydrolysis And FTIR Spectroscopy." *Carbohydrate Polymers*. **46**.81-87.
- Chandra, R. dan Rustgi, R. (1998). "Biodegradable Polymer" *Prog. Polym. Sci.* **23**. 1273-1335.
- Chua, H., Hu, W.F dan Ho, L.Y (1997). "Recovery Of Biodegradable Polymers From Food-Processing Wastewater Activated Sludge System." *Journal Of The Institution Of Engineers, Singapore*. **37**. 2-13.
- Clementi, F., Mancini, M., dan Moresi, M. (1998) "Rheology Of Alginate From *Azotobacter Vinelandii* In Aqueous Dispersions." *Journal of Food Engineering*. **36**. 51-62.
- Corsaro, M.M., Evidente, A., Lanzetta, R., Lavermicocca, P dan Molinaro, A. (2001) "Structural Determination Of The Phytotoxic Mannan Exopolysaccharide From *Pseudomonas syringae* pv. *Ciccaronei*." *Carbohydrate Research*. **330**. 271-277.
- Cottrel, I.W (1980) "Industrial Potential Of Fungal And Bacterial Polysaccharides." dlm. Sandford, P.A. dan Matsuda, K. "Fungal Polysaccharides." Washington D.C. American Chemical Society. 251-270.
- Crescenzi, V. (1995) "Microbial Polysaccharides Of Applied Interest: Ongoing Research Activities In Europe." *Biotechnology Progress*. **11**.3. 251-259
- Crescenzi, V dan Dentini, M. (1996) "Microbes In Polymer Chemistry" dlm. Ottenbrite, R.M., Huang, S.J dan Park, K. "Hydrogels And Biodegradable Polymers For Bioapplications". Washington DC. American Chemical Society. 221-232.

- Crescenzi, V., Alagni, M.D., Dentini, M. dan Mattei, B. (1996). "Aqueous Solution Properties Of Bacterial Poly- $\gamma$ -D-Glutamate" dlm. Ottenbrite, R.M., Huang, S.J dan Park, K. "Hydrogels And Biodegradable Polymers For Bioapplications." Washington DC. American Chemical Society. 233-242.
- Cromwick, A-M., Birrer, G.A. dan Gross R.A (1996). "Effects Of Ph And Aeration On  $\gamma$ -Poly(Glutamic Acid) Formation By *Bacillus licheniformis* In Controlled Batch Fermentor Cultures." *Biotechnology And Bioengineering*. **50**. 222-227.
- Cromwick, A-M. dan Gross R.A (1995). "Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A Physiology And  $\gamma$ -Poly(Glutamic Acid) Formation." *Int. J. Biol. Macromol.* **17**,5. 259-267.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kotz, J., Philipp, B., Seidel, Ch. dan Stscherbina, D. (1994) "Polyelectrolytes; Formation, Characterization And Application". Cincinnati. Hanser/Gardner Publications Inc.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. dan Smith, F. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry*. **28**.350-356.
- Faber, E.J., van den Haak, M.J., Kamerling, J.P. dan Vliegenthart, J.F.G. (2001). "Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3." *Carbohydrate Research*. **331**.173-182.
- Fariña, J.J., Siñeriz, F., Molina, O.E. dan Perotti, N.I (2001). "Isolation and Physicochemical Characterization Of Soluble Scleroglucan From *Sclerotium rolfsii*. Rheological Properties, Molecular Weight And Conformational Characteristics." *Carbohydrate Polymers*.**44**. 41-50.

- Farfés, J., Caminal, G. dan López-Santín, J. (1997). "Influence Of Phosphate On Rhamnose-Containing Exopolysaccharide Rheology And Production By *Klebsiella I-714*." *Appl. Microbiol Biotechnol.* **48**. 522 – 527.
- Firon, N., Ashkenazi, S., Mirelman, D., Ofek, I. Dan Sharon, N. (1987). "Aromatic Alpha-Glycosides Of Mannose Are Powerful Inhibitors Of The Adherence Of Type 1 Fimbriated *Escherichia Coli* To Yeast And Intestinal Epithelial Cells." *Infect. Immun.* **55**:472-476.
- Garcia-Garibay, M. dan Marshall, V.M.E. (1991) "Polymer Production By *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*." *J. Appl. Bacteriol.* **79**. 103-107.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. dan Gomez, E. (2000). " Xanthan Gum: Production, Recovery, And Properties." *Biotechnology Advances.* **18**. 549-579.
- Gartshore, J., Lim, Y.C. dan Cooper, D.G (2000). "Quantitative Analysis Of Biosurfactant Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy." *Biotechnology Letters.* **22**, 169-172.
- Geel-Schutten, G.H.V., Faber, E.J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M.R., Brink, B.T., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. dan Dijkhuizen, L. (1999). "Biochemical And Structural Characterization Of The Glucan And Fructan Exopolysaccharides Synthesized By The *Lactobacillus reuteri* Wild- Type Strain And By Mutant Strain." *Applied and Environmental Microbiology.* **65**.7.3008-3014.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. dan Sand, W. (1998). "Importance Of Extracellular Polymeric Substances From *Thiobacillus ferrooxidans* For Bioleaching. " *Applied and Environmental Microbiology.* **64**. 2743-2747.

- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derenne, S., Sinninghe Damsté, J.S. dan De Leeuw J.W. (1999). "Distribution of Aliphatic, Nonhydrolyzable Biopolymers In Marine Microalgae." *Organic Geochemistry*. **30**.147-159
- Geresh, S., Dawadi, R.P. dan Arad, S.M. (2000) "Chemical Modification of Biopolymers: Quaternization of the Extracellular Polysaccharide of the Red Microalga *Porphyridium* sp." *Carbohydrate Polymers*. **63**. 75-80.
- Gibbs, P.A. dan Seviour, R.J. (1996). "Does The Agitation Rate And/Or Oxygen Saturation Influence Exopolysaccharide Production By *Aureobasidium pullulans* In Batch Culture?" *Appl Microbiol Biotechnol*. **46**. 503-510.
- Gilewski, T., Adluri, S., Ragupthi, G., Zhang, S., Yao, T-J., Panageas, K., Moynahan, M., Houghton, A., Norton, L., dan Livingston, P.O.(2000). "Vaccination Of High Risk Breast Cancer Patients With Mucin-1(MUC1) Keyhole Limpet Hemomycinconjugate Plus QS-21." *Clinical Cancer Research*. **6**. 1693-1701.
- Grobben, G.J., van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M.R., Sikkema, J dan de Bont, J.A.M (1997). " Analysis Of The Exopolysaccharides Produced By *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 Grown In Continuous Culture On Glucose And Fructose." *Appl. Microbiol Biotechnol*. **48**, 516-52.1
- Guezennec, J., Pignet, P., Lijour, Y., Gentric, E., Ratiskol, J. dan Collic-Jouault, S. (1998). "Sulfation and Depolymerization Of A Bacterial Exopolysaccharide of Hydrothermal Origin." *Carbohydrate Polymers*. **37**. 19-24.
- Guillet, J (1995). "Plastics And The Environment" dlm. Scott G. dan Gilead, D. "Degradable Polymers." London. Chapman and Hall. 216-246.

- Ha, Y.M., Park, Y-H. dan Kim, Y.J. (2002). "A Taxonomic Study of *Bacillus* sp. Isolated from Korean Salt-Fermented Anchovy." *Molecular Biology Today*. 3.1.25-29.
- Hasirci, V., Lewandrowski, K., Gresser, J.D., Wise, D.L. dan Trantolo, D.J. (2001) "Versatility of Biodegradable Biopolymers: Degradability and in Vivo Application." *Journal of Biotechnology*. 86. 135-150.
- Hatakeyama, T dan Quinn, F.X (1999). "Thermal Analysis; Fundamentals and Applications To Polymer Science". England. John Wiley and Sons..
- Itagaki, Y. (2002). "Yeast Mannan In Combination With High Concentration Of  $Ca^{2+}$  Enhances Production Of Tissue Plasminogenactivator By Human Diploid Fibroblasts Stimulated With Proteose Peptone." *Biotechnology Letters*. 24.103-107.
- Jeanes, A (1973). "Extracellular Microbial Polysaccharides: New Hydrocolloids Having Both Fundamental And Practical Import" dlm. Bikales, N.M. "Water-Soluble Polymers". New York. Plenum Press. 227-242.
- Kang, H-A., Shin, M.S.dan Yang, J-W. (2002) "Preparation and Characterization Of Hydrophobically Modified Alginate." *Polymer Bulletin*. 42.429-435.
- Kanke, M., Katayama, H., Nakamura, M. (1995). "Application Of Curdlan To Controlled Drug Delivery. In Vitro And In Vivo Release Studies Of Theophylline –Containing Curdlan Tablets." *Biol.Pharm. Bull*. 18. 1104-1108.
- Kim, B.S., Jung, I.D., Kim, J.S., Lee, J., Lee, I.Y dan Lee K.B. (2000). "Curdlan Gels As Protein Drug Delivery Vehicles." *Biotechnology Letters*. 22. 1127-1130.
- Kim, D-S., Thomas, S dan Fogler, H.S (2000). "Effect Of Ph And Trace Minerals On

Long Term Starvation Of *Leuconostoc Mesenteroides*.” *Applied and Environmental Microbiology*. 66. 976-981.

Kim, J-H., Kim, M-R., Lee, J-H., Lee, J-W. dan Kim, S-K. (2000). “Production Of High Molecular Weight Pullulan By *Aureobasidium pullulans* Using Glucosamine.” *Biotechnology Letters*. 22. 987-990.

Kimmel, S.A., Roberts, R.F dan Ziegler, G.R. (1998). “Optimization Of Exopolysaccharide Production By *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* RR Grown In A Semidefined Medium.” *Applied and environmental microbiology*. 64. 659-664.

Kong, Y. dan Hay, J.N. (2002). “The Measurement Of The Crystallinity Of Polymers By DSC.” *Polymer*. 43. 3873-3878.

Kumagai, H., MacNaughtan, W., Farhat, I.A., dan Mitchell, J.R. (2002). “The Influence Of Carrageenan On Molecular Mobility In Low Moisture Amorphous Sugars.” *Carbohydrate Polymers*. 48. 341-349.

Lee, I.Y., Seo, W.T, Kim, G.J Ahn, S.G.,Kwon, G.S dan Park Y.H. (1997). “Optimization Of Fermentation Conditions For Production Of Exopolysaccharide By *Bacillus polymyxa*.” *Bioprocess engineering*. 16. 71-75.

Lee, J.W., Yeomans, W.G., Allen, A.L., Deng, F., Gross, R.A dan Kaplan, D.L. (1999). “Biosynthesis Of Novel Exopolymers By *Aureobasidium pullulans*.” *Applied and Environmental Microbiology*. 65. 5265-5271.

Lemoine, J., Chirat, F., Wieruszski, J., Strecker, G., Favre, N. dan Neeser, J. (1997). “Structural Characterization Of The Exocellular Polysaccharides Produced By *Streptococcus thermophilus* Sfi39 and Sfi12.” *Applied and Environmental Microbiology*. 63. 3512-3518.

- Lester, J.N., Sterritt, R.M., Rudd, T. dan Brown, M.J. (1984). "Assesment Of The Role Of Bacterial Extracellular Polymers In Controlling Metal Removal In Biological Waste Water Treatment." dalam Grainger, J. M. dan Lynch, J. M. "Microbiological Methods For Environmental Biotechnology." 197-215.
- Levander, F., Svensson, M. dan Rådström, P. (2002).. "Enhanced Exopolysaccharide Production by Metabolic Engineering of *Streptococcus thermophilu*." *Applied And Environmental Microbiology*. **68**. 2. 784–790.
- Linker, A., Evans, L.R. dan Impallomeni, G. (2001). "The Structure of a Polysaccharide From Infectious Strains of *Burkholderia cepacia*." *Carbohydrate Research*. **335**. 45 -54.
- Lloret, J., Wulff, B.B.H., Rubio, J.M, Downie, J.A., Bonilla, I. dan Rivilla, R. (1998). "Exopolysaccharide II Production Is Regulated By Salt In The Halotolerant Strain *Rhizobium meliloti* EFB1." *Applied and Environmental Microbiology*. **64**. 1024-1028.
- Looijesteijn, P.J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T. dan Hugenholtz, J. (2001). "Physiological Function Of Exopolysaccharides Produced By *Lactococcus Lactis*." *International Journal Of Food Microbiology*. **64**. 71-80.
- Louch, H.A., dan Miller, K.J. (2001). "Synthesis of a Low Molecular Weight Form Of Exopolysaccharide By *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110." *Applied and Environmental Microbiology*. **67.2**. 1011-1014.
- Luengo, J.M., Garcý'a, B.n., Sandoval,A., Naharro, G.n. dan Olivera, E.R. (2003) "Bioplastics from microorganisms". *Current Opinion in Microbiology*. **6**:251–260

- Mah, T.C. dan O'Toole, G.A. (2001). "Mechanisms of Biofilm Resistance To Antimicrobial Agents." *Trends in Microbiology*. **9.1**. 34-39.
- Magraritis, A., Zajic, J.E. dan Gerson, D.F (1979). "Production of Surface-Active Properties of Microbial Surfactants." *Biotech. & Bioeng.*, **21**, 1151
- Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A. dan Nicolaus, B. (1996). "Chemical Composition Of Two Exopolysaccharides From *Bacillus thermoantarcticus*." *Applied and Environmental Microbiology*. **62**. 3265-3269
- Mänttari, M., Puro, L., Nuortila-Jokinen, J. dan Nyström, M. (2000). "Fouling Effects Of Polysaccharides And Humic Acid In Nanofiltration." *Journal of membrane science*. **165**.1-17.
- Marshall, V.M., Dunn, H., Elvin, M., McLay, N., Gu, Y. dan Laws, A.P. (2001). "Structural Characterisation Of The Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* EU20." *Carbohydrate Research*. 331. 413-422.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., Gambacorta, A. dan Nicolaus, B. (2002). "A Halophilic Thermotolerant *Bacillus* Isolated From A Marine Hot Spring Able To Produce A New Exopolysaccharide." *Biotechnology Letters*. **24**. 515-519.
- McCormick, C.L. (1991). "Structural Design Of Water Soluble Copolymers." dlm. Shalaby, S.W., McCormick, C.L. dan Butler, G.B. "Water Soluble Polymers; Synthesis, Solution Properties, And Applications." Washington D.C. American Chemical Society. 2-24
- Mercê, A.L.R., Landaluze, J.S., Mangrich, A.S., Szpoganicz, B. dan Sierakowski, M.R. (2001). "Complexes of Arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$  ." *Bioresource Technology*. **76**. 29-37.

- Mobley, D.P.(1994). "Plastics from microbes : microbial synthesis of polymers and polymer precursors." Cincinnati : Hanser/Gardner Pubn.,
- Molyneux, P. (1983). "Water Soluble Synthetic Polymers: Properties And Behavior." Volume II, Boca Raton, CRC Press, Inc.
- Moreno, J., Vargas, M.A., Madiedo, J.M., Munoz, J., Rivas, J. dan Guerrero, M.G. (2000). "Chemical And Rheological Properties Of An Extracellular Polysaccharide Produced By The *Cyanobacterium anabaena* sp. ATCC 33047." *Biotechnology And Bioengineering*. **67**. 283-290.
- Nayak, B.R., Biswal, D.R., Karmakar, N.C. dan Singh, R.P. (2002) "Grafted hydroxypropyl guar gum : development, characterization and application as flocculating agent." *Bull. Mater.Sci*. **25**.6. 537-540
- Norberg, A,B dan Enfors, S. (1982). "Production Of Extracellular Polysaccharide By *Zoogloea ramigera*." *Applied And Environmental Microbiology*. **44**. 1231-1237.
- Ooi, S.W. (2000). "Isolation And Characterization Of Indigenous Microorganisms in Malaysian Oil Fields." Unjiversiti Teknologi Malaysia. Tesis Sarjana.
- Pavlova, K dan Grigorova, D. (1999). "Production And Properties Of Exopolysaccharide By *Rhodoturula acheniorum* MC." *Food Research International*. **32**. 473-477.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M-J., Cerning, J. dan Desmazeaud, M. (2000). "Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium." *Applied and Environmental Microbiology*. **66**. 3427-3431.

- Quintero, E.J dan Weiner, R.M. (1995). "Evidence For The Adhesive Function Of The Exopolysaccharide Of *Hyphomonas* Strain MHS-3 In Its Attachment To Surfaces." *Applied And Environmental Microbiology*. **61**. 1897-1903.
- Rath, J., Messner, R., Kosma, P., Altmann, F., März, L. Dan Kubicek, C.P. (1995). "The  $\alpha$ -D-Mannan Core Of A Complex Cell-Wall Heteroglycan Of *Trichoderma reesei* is Responsible For  $\beta$ -Glucosidase Activation." *Arch Microbiol*. **164**. 414-419.
- Ren, X. (2003) " Biodegradable plastics: a solution or a challenge?" *Journal of Cleaner Production*. **11**. 27-40.
- Rosen, S.L. (1993) "Fundamental Principles of Polymeric Materials.2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Rutot, D., Duquesne, E., Ydens, I., Degée, P., dan Dubois, P. (2001). "Aliphatic Polyester-Based Biodegradable Materials: New Amphiphilic Graft Copolymers." *Polymer Degradation and Stability*. **73**. 561-566.
- Sabra, W., Zeng, A.-P. dan Deckwer, W.-D. (2001). "Bacterial Alginate: Physiology, Product Quality And Process Aspects." *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **56**. 315-325.
- Salehizadeh, H., Vossoughi, M. dan Alemzadeh, I. (2000). "Some Investigations On Bioflocculant Producing Bacteria." *Biochemical Engineering Journal*. **5**. 39-44.
- Scamparini, A., Mariuzzo, D., Fujihara, H., Jacobusi, R., dan Vendruscolo, C. (1997). "Structural Studies of CV-70 Polysaccharide" *International Journal of Biological Macromolecules*. **21**. 115-121.

- Schweiger-Hufnagel, U., Ono, T., Izumi, K., Hufnagel, P., Morita, N., Kaga, H., Morita, M., Hoshino, T., Yumoto, I., Matsumoto, N., Yoshida, M., Sawada, M.T. dan Okuyama, H. (2000). "Identification Of The Extracellular Polysaccharide Produced By The Snow Mold Fungus *Microdochium nivale*." *Biotechnology Letters*. **22**. 186-187.
- Seymour, F. (1977). "Nuclear Magnetic Resonance And Mass Spectroscopy Of Polysaccharides" dlm. Sandford, P.A dan Laskin, A. "Extracellular Microbial Polysaccharides". . Washington DC. American Chemical Society. 114-127.
- Shah, V., Ray, A, Garg, N. dan Madamwar, D.(2000). "Characterization Of The Extracellular Polysaccharide Produced By A Marine Cyanobacterium, *Cyanothece sp.* ATCC 51142, And Its Exploitation Toward Metal Removal From Solutions." *Current Microbiology*. **40**. 274-278.
- Shafee, E.E. (2001). "The Influence Of Semicrystalline Morphology On The Dielectric Relaxation Properties Of Poly (3-Hydroxybutyrate)." *European Polymer Journal*. **37**. 1677-1684.
- Shuler, M.L dan Kargi, F. (1992) " Bioprocess Engineering; Basic Concepts." New Jersey. Prentice Hall P.T.R
- Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Song, C.H. dan Yun, J.W. (2001). "Effect Of Substrate Concentration On Broth Rheology And Fungal Morphology During Exo-Biopolymer Production By *Paecilomyces Japonica* In A Batch Reactor." *Enzyme and Microbial Technology*. **29**. 392-399.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipubul, S., Navarini, L., Bosco, M dan Cescutti, P. (1999). "Exopolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacteria Strains From Traditional Thai Fermented Foods: Isolation, Identification And Exopolysaccharide Characterization." *International Journal Of Food Microbiology*. **51**. 105-111.

- Smith, J.H dan Pace, G.W (1982) "Recovery Of Microbial Polysaccharides." *J.Chem. Technol Biotechnol.* **32**. 119-129.
- Song, D.K dan Sung, Y.K. (1995). "Synthesis And Characterization Of Biodegradable Poly (1,4-butanediol succinate)." *Journal of Applied Polymer Science.* **56**. 1381-1395.
- Souw, P dan Demain, A.L. (1979). "Nutritional Studies On Xanthan Production By *Xhantomonas campestris* NRRL B1459." *Applied and environmental microbiology.* **37**. 1186-1192.
- Staaf, M., Yang, Z., Huttunen, E., dan Wildmalm, G. (2000). "Structural Elucidation Of The Viscous Exopolysaccharide Produced By *Lactobacillus helveticus* Lb161." *Carbohydrate Research.* **326**.113-119.
- Stahl, P.D. dan Ezekowitz, R.A.B.(1998). "The Mannose Receptor Is A Pattern Recognition Receptor Involved In Host Defence." *Current Opinion in Immunology.* **10**. 50-55.
- Suryani, Ismail, N. dan Mohamed, S.N. (2003) "Effect of Nitrogen Concentration on Citric Acid Production by *Aspergillus niger*." <http://www.eng.upm.edu.my/webkka/index.html>. Universiti Putra Malaysia.
- Sutherland, I.W. (2001). "Biofilm Exopolysaccharides: A Strong And Sticky Framework" *Microbiology.* **147**. 3-9.
- Sutherland, I.W. (1999). "Polysaccharases For Microbial Exopolysaccharides" *Carbohydrate Polymers.* **38**. 319-328.
- Sutherland, I.W. (1994). "Structure-Function Relationships In Microbial

Exopolysaccharides” *Biotech, Adv.* **12.** 393-448.

Sutherland, I.W. (1986). “Industrially Useful Microbial Polysaccharides.”  
*Microbiological Sciences.* **3.** 5-9.

Takeda, M., Ishigami, M., Shimada, A., Matsuoka, H. dan Nakamura, I. (1994).  
“Separation and Preliminary Characterization Of Acidic Polysaccharides  
Produced By *Enterobacter* sp.” *J. Ferment.Bioeng.* **78.** 140-144 .

Van den Berg, D.J.C., Robijin, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M.L., Vreeker,  
Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Ledebor, A.M. dan Verrips, C.T. (1995).  
“Production Of A Novel Extracellular Polysaccharide By *Lactobacillus sake* 0-1  
And Characterization Of The Polysaccharide.” *Applied and Environmental  
Microbiology.* **61.** 2840-2844.

Van de Velde, K. dan Kiekens, P. (2002). “Biopolymers : Overview Of Several  
Properties And Consequences On Their Applications.” *Polymer Testing.* **21.**  
433 – 442.

Vanhaverbeke, C., Heyraud, A., Achouak, A. dan Heulin, T. (2001). “Structural  
Analysis Of The Exopolysaccharide From *Burkholderiacaribensis* Strain  
MWAP71” *Carbohydrate Research.* **334.** 127-133.

van Poolen, H.K. and Associates, Inc. (1981). “Fundamentals of Enhanced Oil  
Recovery.” Oklahoma. Penwell Books.

Vuyst, L.D dan Degeest, B. (1999). “Heteropolysaccharides From Lactic Acid  
Bacteria.” *FEMS Microbiol. Rev.* **23.**153-177.

Wang, Y. dan McNeil, B. (1995) “pH effects on exopolysaccharide and oxalic acid  
production in cultures of *Sclerotium gluconicum*.” *Enzyme and Microbial*

*technology*. 17. 124-130

- Wang, W., Wang, W., Zhang, X. dan Wang, D. (2002). "Adsorption of p-Chlorophenol By Biofilm Components." *Water Research*. 36. 551-560.
- Weiner, R.M (1997). "Biopolymers From Marine Prokaryotes." *Trends In Biotechnology*. 15. 390-394.
- Whistler, R.L., (1973). "New Developments In Water-Soluble Polysaccharides" dlm. Bikales, N.M. "Water-Soluble Polymers". New York. Plenum Press. 179-186
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D. dan Caldwell D.E. (1995). "Bioaccumulation Of The Herbicide Diclofop In Extracellular Polymers And Its Utilization By A Biofilm Community During Starvation." *Applied and Environmental Microbiology*. 61. 152-158.
- Xie, J.Z., Chang, H-L. dan Kilbane II, J.J. (1996) "Removal And Recovery Of Metal Ions From Wastewater Using Biosorbents And Chemically Modified Biosorbents." *Bioresource Technology*. 57. 127-136.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V. dan Fredrickson, H.L. (1995). "Characterization Of A New Lipopeptide Surfactant Produced By Thermotolerant And Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50." *Applied and Environmental Microbiology* . 61.5.1706-1713.
- Yang, Z., Huttunen, E., Staaf, M., Widmalm, G. dan Tenhu, H. (1999). "Separation, Purification, And Characterisation Of Extracellular Polysaccharide Produced By Slime-Forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Strains." *International Dairy Journal*. 9. 631-638.

Yokoi, H., Natsuda, O., Hirose, J., Hayashi, S. dan Takasaki, Y. (1995).

“Characteristics Of A Biopolymer Flocculant Produced By *Bacillus* sp. PY-90.”

*Journal of Fermentation And Bioengineering.* 79. 378-380.