

## **Kekhususan Substrat Lipase Miselium *Rhizopus oryzae***

**Abu Bakar Salleh, Wan Md. Zin Wan Yunus, Mahiran Basri,  
Kamaruzaman Ampon dan Che Nyonya Abd. Razak**

*Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar  
Universiti Pertanian Malaysia  
43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia*

Received 24 August 1994

### **ABSTRAK**

Kekhususan substrat lipase miselium dari *Rhizopus oryzae* bagi tindak balas pengesteran telah dikaji. Kajian menunjukkan hasil tindak balas tinggi apabila asid berantai panjang (C12-C18) ditindakkan dengan alkohol primer (C3-C7) dan beberapa diol primer. Kehadiran ikatan dubel di dalam rantai asid tidak memberi kesan yang besar ke atas tindak balas tetapi aktiviti pengesteran yang ditunjukkan apabila alkohol-alkohol sekunder, tertier atau aromatik digunakan adalah rendah.

### **ABSTRACT**

The substrate specificity of a mycelial lipase from *Rhizopus oryzae* for the esterification reaction was investigated. Studies showed that the enzyme exhibited high activity when long-chain fatty acids (C12-C18) were reacted with primary alcohols (C3-C7) as well as primary diols. The presence of double bonds did not affect reactions significantly, but esterification activity for secondary, tertiary or aromatic alcohols was low.

**Kata kunci: lipase, miselium, *Rhizopus oryzae*, kekhususan substrat**

### **PENGENALAN**

Penggunaan biokatalis dalam pemprosesan kimia kini menarik perhatian ramai terutama dari segi kekhususan tindak balas dan keprihatinan terhadap persekitaran. Antara biokatalis yang giat dikaji ialah lipase yang mempunyai potensi kegunaan yang tinggi dalam industri oleokimia. Pencirian sumber lipase baru yang dapat mengetengahkan keunggulan biokatalis sebagai pemangkin menjadi salah satu fokus penyelidikan.

Walaupun peranan semulajadi lipase adalah memangkin tindak balas hidrolisis trigliserida, kebolehan untuk menjadi mangkin bagi tindak balas pengesteran nampaknya lebih menarik kepada ahli-ahli sains dan teknologi. Ester-ester asid lemak mustahak untuk pelbagai kegunaan

industri. Contohnya isopropil miristat, palmitat dan stearat digunakan sebagai salah satu komponen untuk pelbagai minyak kosmetik (Meffert 1984). Ester-ester rantai panjang atau lilin telah diguna secara meluas sebagai pelincir, pemplastik dan bau-bauan (Knox dan Cliffe 1984).

Sintesis ester bermangkinkan lipase telah dilaporkan oleh Knox dan Cliffe (1984) di mana mereka menggunakan lipase *Rhizopus arrhizus* sebagai mangkin. Miller *et al.* (1988) pula melaporkan penggunaan lipase dari *Mucor meihei* manakala Ibrahim dan Tan (1991) pula melihat kesesuaian lipase dari *Candida rugosa*. Kajian ke atas lipase dari *Candida* telah juga dibuat oleh Salleh *et al.* (1992).

*R. oryzae* merupakan fungus mesofilik yang telah dikenal pasti dari makmal kami. Keadaan-keadaan kultur untuk menghasilkan lipase dari organisme ini telah dilaporkan oleh Razak *et al.* (1991). Kajian sekarang berfokus kepada pencirian lipase ini memangkinkan beberapa tindak balas hidrolitik dan sintetik. Kajian ke atas beberapa parameter fizikal yang mempengaruhi tindak balas sintetik bermangkinkan enzim ini telahpun dilaporkan (Salleh *et al.* 1995). Laporan ini merupakan sambungan kepada laporan di atas dan menumpukan kepada hasil kajian ke atas kekhususan substrat tindak balas sintesis lipase *R. oryzae* ini.

## BAHAN DAN KAEDAH

### *Penghasilan Lipase Miselium*

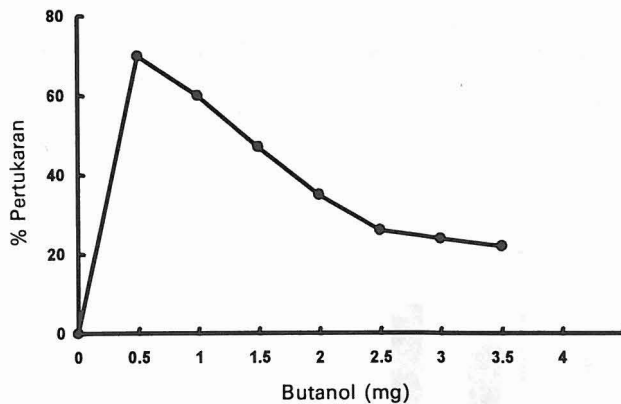
*R. oryzae* (mesofilik) ditumbuhkan di atas agar kentang dekstroza (potato dextrose agar, PDA) selama 24 jam pada suhu 30°C. Sekeping *R. oryzae* pada PDA dipindahkan (dengan menggunakan penebuk gabus) ke dalam satu kelalang yang mengandungi 100 ml medium yang disediakan dari bahan-bahan (dalam % i/b) berikut: polipepton, 5%; NaNO<sub>3</sub>, 0.1%, MgSO<sub>4</sub>, 0.05%; minyak zaiton, 2.0%; dan glukosa, 0.1%. pH medium adalah 6.0. Selepas 72 j, miselium dipungut dengan penurasan. Miselium dicuci dengan air dan aseton sebanyak dua kali dan dikering dengan udara. Miselium kering digunting halus-halus (lebih kurang 1 mm) sebelum digunakan.

### *Asai Enzim (Pengesteran)*

Aktiviti enzim ditentukan dengan tindak balas pengesteran asid lemak dan alkohol pada nisbah yang dipilih. Bagi setiap tindak balas 30 mg enzim miselium digunakan. Tindak balas dilakukan selama 24 j pada suhu bilik (27°C) dengan kadar pergoncangan 150 pusingan/minit. Pemberhentian tindak balas dibuat dengan menambah 3.5 ml larutan etanol-aseton (nisbah isipadu 1:1) dan amaun asid lemak yang tidak bertindak balas ditentukan dengan titratan asid-bes dengan menggunakan larutan 0.2M NaOH. Purata dari sekurang-kurang dua bacaan yang diperolehi dari dua eksperimen dilaporkan.

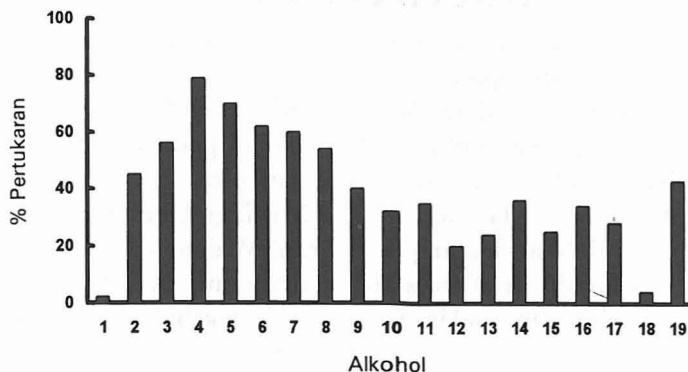
## KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Kadar pengesteran asid oleik dengan butanol pada pelbagai nisbah mol dengan menggunakan lipase intrasel miselium dari *R. oryzae* sebagai mangkin ditunjukkan di dalam *Rajah 1*. Kadar pertukaran yang paling baik diperolehi apabila nisbah mol asid dan alkohol pada 1:1. Nisbah ini sama dengan nisbah optimum untuk sintesis etil oleat dengan menggunakan lipase dari *Mucor meihei* (Gatfield 1984). Meningkatkan amaun alkohol dari nisbah ini merendahkan kadar pertukaran. Walau bagaimanapun kajian seterusnya menunjukkan di bawah keadaan ini, peratus pertukaran di sekitar 80% boleh dicapai sekiranya masa tindak balas dilanjutkan.



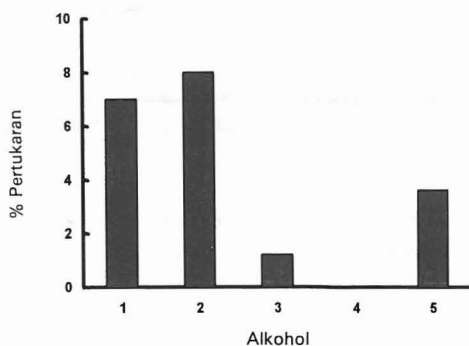
*Rajah 1. Kesan peningkatan nisbah alkohol dalam tindak balas pengesteran dengan asid oleik. Asid oleik (0.8 ml = 2.5 mmole) ditindak balas dengan amaun butanol yang berbeza. Selama 24 j pada suhu 27°C dengan 30 mg lipase miselium.*

Selaras dengan keputusan yang diperolehi di atas, kajian-kajian selanjutnya dibuat dengan menggunakan nisbah asid lemak:alkohol 1:1. *Rajah 2* menunjukkan kekhususan enzim terhadap alkohol primer. Sungguhpun peratus pertukaran yang paling tinggi diperolehi apabila *n*-butanol digunakan tetapi peratus pertukaran bagi tindak balas dengan propanol, *n*-pentanol, *n*-heksanol dan *n*-heptanol juga tinggi. Peratus pertukaran menurun dengan pertambahan panjang dan kerencaman rantai alkohol. Kadar pertukaran bagi tindak balas dengan alkohol sekunder juga rendah (*Rajah 3*). Ada kemungkinan wujudnya stereo pilihan untuk *S*(+)-2-oktanol tetapi kadar pertukarannya nampaknya juga tidak memuaskan. *Rajah 4* menunjukkan hasil-hasil pertukaran bagi tindak balas dengan alkohol tertier. Seperti pada alkohol sekunder kekhususan bagi alkohol tertier juga rendah. Sedikit aktiviti dikesan untuk pinakol dan mentol tetapi kesan stereo pilihan untuk mentol tidak ditunjukkan.



Rajah 2: Kekhususan lipase miselium pada alkohol primer.

Kepekatan alkohol yang sama (molar) digunakan untuk bertindak balas dengan asid oleik (2.56 mmol). Alkohol yang diguna ialah 1. Metanol 2. Etanol 3. 1-Propanol 4. 1-butanol 5. Heptanol 6. 1-Oktanol 7. 1-Dekanol 8. 1-Undekanol 9. 1-Dodekanol 10. Geraniol 11. Sitranellol 12. Farnesol 13. Fitol 14. Benzilalkohol 15. Siklooktanol 16. Sikloheksiletanol 17. 1-Metoksi-2- Propanol 18. 1-tert-Butoksi-2-Propanol dan 19. 3-Kloro Propanol.

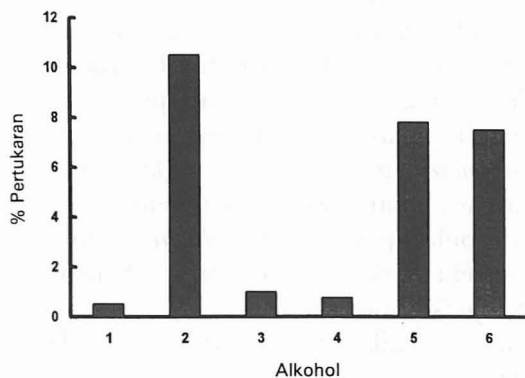


Rajah 3: Kekhususan lipase miselium kepada alkohol sekunder.

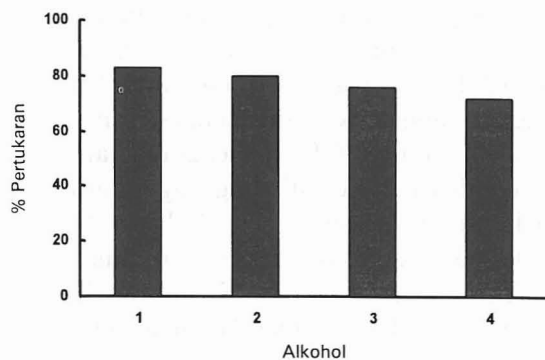
Kepekatan alkohol yang sama (molar) digunakan untuk bertindak balas dengan asid oleik (2.56 mmol). Alkohol yang digunakan ialah 1. 2-Propanol 2. 2-Heksanol 3. S(+)-2-Oktanol 4. R(-)-2-Oktanol dan 5. 2,3-Butanol.

Enzim ini juga menunjukkan kekhususan yang tinggi pada diol primer (Rajah 5) di mana peratus pertukarannya setanding dengan mono alkohol yang berkenaan. Walau bagaimanapun tidak ada aktiviti yang dikesan apabila fenol dan katekol digunakan. Gatfield (1984) melaporkan kekhususan terhadap alkohol primer lipase dari *M. meihei* adalah lebih baik dari alkohol sekunder. Laporan ini menyatakan peratus pengesteran untuk *n*-butanol adalah 90% manakala untuk alkohol sekunder hanya di sekitar 65% sahaja. Beliau juga melaporkan apabila geraniol, satu terpena alkohol, digunakan dalam tindak balas, pertukaran-pertukaran di sekitar 80% telah

Kekhususan Substrat Lipase Miselium *Rhizopus oryzae*



Rajah 4: Kekhususan lipase miselium kepada alkohol tertiar. Kepekatan alkohol yang sama (molar) digunakan untuk bertindak balas dengan asid oleik (2.56 mmol). Diol yang digunakan ialah 1. *t*-Butanol 2. Pinakol 3. Linalool 4. Terpineol 5. (+)-Menthol dan 6. (-)-Menthol.



Rajah 5: Kekhususan lipase miselium kepada diol primer. Kepekatan diol yang sama (molar) digunakan untuk bertindak balas dengan asid oleik (2.56 mmol). Diol yang digunakan ialah 1. 1,4-Butandiol 2. 1,5-Pentandiol, 3. 1,8-Oktandiol dan 4. 1,6-Heksandiol.

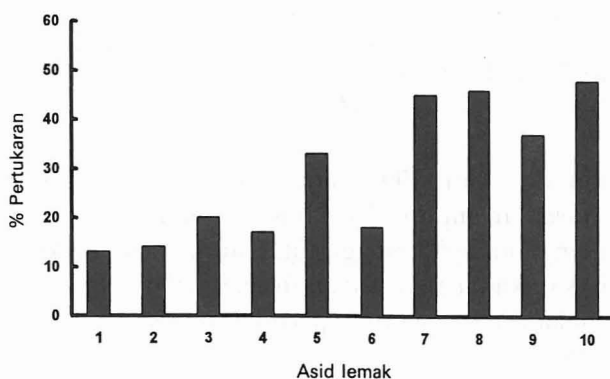
dicatat. Ibrahim dan Tan (1991) dan Salleh *et al.* (1992) pula melaporkan lipase dari *C. rugosa* mempunyai kekhususan yang tinggi terhadap alkohol primer yang mengandungi 3 hingga tujuh atom karbon. Nishio *et al.* (1988) pula menunjukkan kadar pertukaran di sekitar 90% boleh dicapai apabila butanol digunakan dan peratus pertukaran bagi geraniol dan benzil alkohol juga tinggi.

Kadar tindak balas pengesteran ini bergantung kepada senang atau susahnya nukleofil (sebatian hidroksil) bertindak balas dengan perantaraan asil-enzim (Miller *et al.* 1988). Hasil kajian di atas menunjukkan tapak aktif boleh menerima sebilangan besar substrat dengan alkohol primer me-

rupakan substrat yang paling baik. Keputusan kajian ini juga menca- dangkan bahawa tukar gantian pada  $\alpha$ -karbon alkohol tidak memberi halangan yang besar kepada substrat untuk bertindak balas.

Linko dan Yu (1992) telah mengkaji penggunaan beberapa lipase mikrob untuk pengesteran asid oleik. Kajian mereka menunjukkan bahawa lipase dari *Achromobacter* sp. boleh memangkinkan tindak balas dengan alkohol rantai panjang tetapi peratus pembentukan ester rendah. Dalam sintesis butil oleate pula lipase dari *C. cylindracea* dua kali lebih aktif dari enzim yang diperolehi dari *Achromobacter* sp. Sementara itu kadar per- tukaran yang ditunjukkan oleh lipase dari *R. oryzae* menandingi nilai-nilai yang ditunjukkan yang dilaporkan untuk lipase dari *C. cylindracea*, *C. lipolytica*, *Chromabacterium vicosum*, *Pencillum cyclopium* dan *R. arrhizus*. Se- balikinya Nishio *et al.* (1988) pula melaporkan sintesis oleat oleh lipase *Pseudomonas fragii* tidak dipengaruhi oleh panjang rantai alkohol.

Keputusan kajian kekhususan asid ditunjukkan di dalam *Rajah 6*. Secara umumnya dapat disimpulkan bahawa lipase ini memangkinkan tindak balas dengan lebih baik sekiranya rantai asid bertambah panjang. Berdasarkan kepada pola yang ditunjukkan, lipase dijangka dapat me- mangkin tindak balas menggunakan asid yang mengandungi bilangan karbon lebih dari 18. Kolisis *et al.* (1990) menunjukkan lipase dari *R. delemar* merupakan mangkin yang baik untuk pengesteran rantai panjang seperti asid lauric atau oleik. Gancet (1990) menggunakan *R. arrhizus* dan men- dapati lipase ini memberikan aktiviti yang tinggi untuk asid-asid lemak C8- C18. Manakala lipase *H. lanuginosa* pula didapati sesuai untuk memang- kinkan tindak balas bagi asid-asid yang mengandungi bilangan karbon dari 12 sehingga 18 (Ibrahim *et al.* 1988). Kehadiran ikatan dubel di dalam molekul asid nampaknya tidak memberi kesan kepada kekhususan enzim ini.



*Rajah 6: Kekhususan lipase miselium kepada asid lemak.*

*Kepekatan yang sama (molar) asid lemak ditindak balas dengan butanol. Asid lemak yang digunakan ialah 1. Asetik 2. Butrik. 3. Velerik 4. Kaproik 5. Kaprilik 6. Kaprik 7. Laurik 8. Miristik 9. Palmitik dan 10. Oleik.*

## PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai oleh Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar Malaysia (IRPA No. 1-07-05-086).

## RUJUKAN

- GANCET, C. 1990. Catalysis by *Rhizopus arrhizus* mycelial lipase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**: 600-604.
- GATFIELD, L.L. 1984. The enzymatic synthesis of esters in non- aqueous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **434**: 569-572.
- IBRAHIM, C.O. and H.L. TAN. 1991. Esterification by lipase of *Candida cylindracea* with fatty acid distillates (FAD) as acyl donor. *Mal. Appl. Biol.* **20(1)**: 11-24.
- IBRAHIM, C.O., H. SEEKI, N. NISHIO and S. NAGAI. 1988. Hydrolysis of triglycerides by immobilised lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agr. Biol. Chem.* **52**: 99-105.
- KNOX, T. and K.R. CLIFFE. 1984. Synthesis of long-chain esters in a loop reactor system using a fungal cell bound enzyme. *Proc. Biochem.* **19**: 188-192.
- KOLISIS, F.N., T.P. VALIS and A. XENAKIS. 1990. Lipase-catalysed esterification of fatty acids in non-ionic microemulsions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**: 674-680.
- LINKO, Y. and H. YU. 1992. Enzymatic synthesis of oleic acid esters by various lipases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **672**: 492-496.
- MEFFERT, A. 1984. Technical uses of fatty acid esters. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **61(2)**: 255-258.
- MILLER, C., H. AUSTIN, L. POSORSKE and C.J. GONAZLEZ. 1988. Characteristics of an immobilised lipase for commercial synthesis of esters. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **65(6)**: 927-931.
- NISHIO, T., T. CHIKANO and M. KAMUMURA. 1988. Ester synthesis by lipase from *Pseudomonas fragii*, 22-39b. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1205-1208.
- RAZAK, N., R.N. ABD. RAHMAN, A.B. SALLEH, K. AMPON, W.M.Z. YUNUS and M. BASRI. 1991. Lipase intrasel daripada *Rhizopus oryzae* dan parameter-parameter yang mempengaruhi penghasilannya. *Sains Malaysiana* **20(3)**: 87-94.
- SALLEH, A.B., M. BASRI, S.M. ABU SAMAH, C.N.A. RAZAK, K. AMPON and W.M.Z.W. YUNUS. 1992. Synthesis of oleic esters by lipase from *Candida rugosa*. *Proc. Mal. Biochem. Soc. Conf.* **17**: 21-24.
- SALLEH, A.B., C.N.A. RAZAK, K. AMPON, W.M.Z. WAN YUNUS and M. BASRI. 1995. Tindak balas esterifikasi oleh lipase intrasel daripada *Rhizopus oryzae*: Kajian ke atas beberapa parameter fizikal. *Pertanika J. Sci. Technol.* **3**: 233-239.