

Kesan Beberapa Parameter Fizikal ke atas Tindak Balas Esterifikasi oleh Lipase Miselium daripada *Rhizopus oryzae*

Abu Bakar Salleh¹, Che Nyonya Abd. Razak¹, Kamaruzaman
Ampon¹, Wan Md Zin Wan Yunus² dan Mahiran Basri²

¹Jabatan Biokimia & Mikrobiologi

²Jabatan Kimia

Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar

Universiti Pertanian Malaysia

43400 UPM Serdang, Selangor Malaysia

Diterima 30 Julai 1993

ABSTRAK

Kajian telah dibuat terhadap beberapa parameter fizikal bagi tindak balas esterifikasi asid oleik dan butanol yang dimagkinkan oleh lipase miselium daripada *Rhizopus oryzae*. Enzim boleh digunakan dalam bentuk serbuk atau kepingan kecil dan tindak balasnya berterusan tanpa memerlukan goncangan. Peningkatan amoun enzim akan menaikkan kadar tindak balas esterifikasi hingga ke 80%. Penukaran maksimum ini tercapai dalam masa 24 jam. Suhu optimum tindak balas ialah 40°C walaupun enzim stabil hingga ke 70°C. Enzim aktif dalam pelarut organik yang mempunyai nilai log P yang besar, dan stabil jika disimpan dalam pelarut heksana.

ABSTRACT

Some physical parameters for the esterification of oleic acid and butanol by mycelial lipase from *Rhizopus oryzae* were examined. The enzyme can be used in the powder or fragment form, and the reaction proceeds without the need for shaking. The rate of esterification increases with the amount of enzyme up to 80% conversion, the maximum conversion achieved in 24 h. The optimum temperature of the reaction is 40°C, but the enzyme is stable up to 70°C. The enzyme is active in organic solvents with high log P values. The enzyme is also stable when stored in hexane.

Kata kunci: esterefikosi, lipase, *Rhizopus oryzae*, parameter fizikal

Pengenalan

Lipase (gliserol ester hidrolase, EC: 3.1.13) ialah sejenis enzim yang terdapat dalam alam semulajadi dan ianya sesuai digunakan untuk tindak balas transformasi dalam industri kimia. Peranan lipase ialah sebagai pemangkin tindak balas hidrolisis trigliserida. Walau bagaimanapun, tindak balas hidrolisis ini boleh berbalik, dan keseimbangan di antara tindak balas ke hadapan dengan tindak balas berbalik dikawal oleh kandungan air campuran tindak balas. Air dihasilkan dalam tindak balas sintesis ester. Jika air ini dapat dikeluarkan daripada campuran tindak balas, keseimbangan tindak balas akan mengarah kepada sintesis ester.

Lipase intrasel daripada *Rhizopus oryzae* sangat aktif (Razak *et al.* 1991) dan dipercayai mempunyai kestabilan yang lebih tinggi daripada enzim ekstrasel. Enzim intrasel terletak dalam sekitaran semulajadi dan masih dilindungi oleh makromolekul seperti lipid dan protein lain, dengan itu membantu dalam menetapkan konformasi enzim. Sementara enzim ekstrasel dirembes keluar dalam sekitar yang cair dengan ini memudahkan tindakan daripada agen-agen denaturasi. Walaupun begitu, kebanyakan kajian esterifikasi dijalankan menggunakan enzim ekstrasel. Ibrahim dan Tan (1991) dan Abu Bakar *et al.* (1992) telah menggunakan lipase ekstrasel daripada *Candida rugosa* dalam suatu tindak balas sintetik. Okumura *et al.* (1979) juga menggunakan enzim ekstrasel daripada *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* dan *Penicillium cyclopium* untuk sintesis ester asid oleik dengan pelbagai alkohol primer. Knox dan Cliffe (1984) melaporkan kegunaan enzim yang terlekat pada miselium kulat dalam sintesis ester. Gancet (1990) pula menggunakan lipase meselium daripada *Rhizopus arrhizus* untuk proses-proses hidrolisis, interesterifikasi, transesterifikasi dan sintesis gliserida.

KAEDAH

Penghasilan Lipase

Rhizopus oryzae (mesofilik) yang dipencilkan dalam makmal ini (Razak *et al.*, 1991) ditumbuhkan dalam PDA (potato dextrose agar) selama 24 jam pada suhu 37°C. Satu keping *R. oryzae* di atas PDA dipindahkan (mengguna penggerudi gabus) ke dalam 100 ml medium yang mengandungi polipepton, 5.0% Na₂N₃, 1%, KH₂PO₄, 0.1% MgSO₄. 7H₂O, minyak zaiton 2.0% dan glukosa, 0.1%; pH medium ialah 6.0.

Selepas 72 jam, miselium dikutip dengan cara penurasan dan dicuci dengan air suling dan aseton sebanyak dua kali. Miselium disimpan dalam peti sejuk sebelum dikeringkan dengan pengering sejuk beku. Miselium kering ini digunting halus-halus (\approx 1 mm panjang) sebelum digunakan.

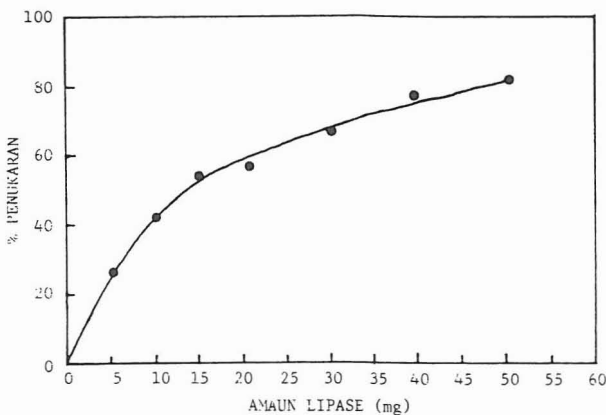
Campuran Tindak Balas dan Penentuan % Esterifikasi

Keaktifan enzim untuk tindak balas esterifikasi 0.8 ml asid oleik dengan 0.25 ml butanol. Berat pemangkin yang digunakan 30 mg (64 unit). Tindak balas dilakukan selama 24 jam pada suhu bilik (27°C) dengan goncangan 150 p.s.m. Tindak balas dihentikan dengan menambah larutan 3.5 ml aseton: etanol (1:1 i/i). Asid oleik yang tidak bertindak balas dengan alkohol dititratkan dengan 0.2 M NaOH. Satu unit aktiviti ditakrifkan sebagai 1 μ mole asid lemak yang digunakan dalam esterifikasi dalam masa satu jam.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

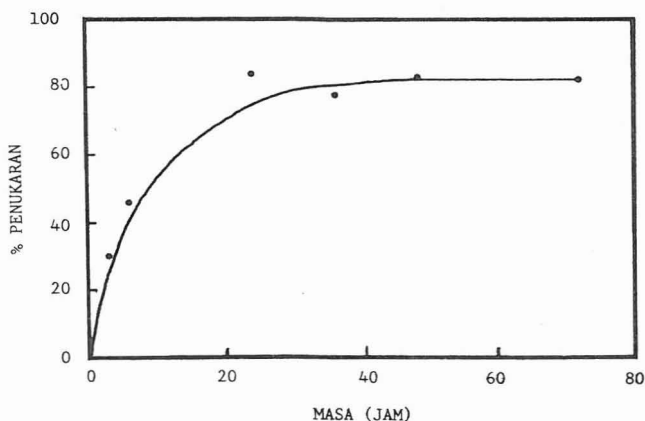
Enzim yang terlekat pada membran tidak dapat diekstrak, tetapi miselium-miselium boleh digunakan secara terus sebagai sumber enzim lipase. Dua bentuk miselium kering telah digunakan iaitu fragemen miselium kering digunting kecil-kecil (1.0 mm), atau ditumbuk menjadi serbuk (100-500 μm). Didapati kedua-dua bentuk enzim tidak menunjukkan perbezaan dari segi keaktifan. Selain dari kesan bentuk, kesan goncangan ke atas tindak balas juga diuji. Kajian menunjukkan tiada perbezaan dapat dilihat ke atas tindak balas yang dilakukan apabila dibandingkan hasil-hasil bagi tindak balas tanpa goncangan atau goncangan hingga ke kadar 200 p.s.m. Pemerhatian ini mencadangkan tiada kesan pemindahan jisim yang mempengaruhi proses tindak balas yang dimungkinkan oleh enzim yang terlekat pada miselium. Serbuk atau fragmen miselium yang mengandungi lipid mudah larut dalam pelarut organik (butanol) dan enzim berfungsi sebagai enzim bebas tanpa sebarang kekangan daripada miselium menyebabkan kesan bauran tidak dapat dilihat apabila jangkamasa tindak balas 24 jam digunakan.

Seperti yang dijangka, pertambahan enzim meningkatkan tindak balas esterifikasi (*Rajah 1*). Amaun 50 mg yang digunakan adalah kuantiti maksimum yang boleh digunakan dalam isipada penindak balas. Amaun miselia yang lebih tinggi menyebabkan campuran tindak balas menjadi pekat dan sebatian dan menjejaskan kadar tindak balas. Keaktifan mula mendatar pada tahap 80% penukaran. Dalam tindak balas berbalik yang berlaku dengan pertambahan produk dalam campuran tindak balas.



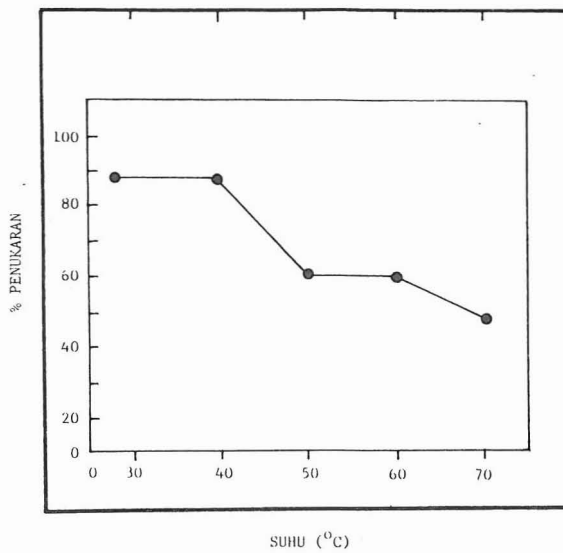
Rajah 1. Kesan kandungan enzim ke atas kadar penghasilan ester, Tindakbalas dilakukan seperti teknik pengasaan enzim dengan menukar amaun lipase yang digunakan.

Aktiviti meningkat secara linear dalam jangkamasa 6 jam, ini diikuti dengan kadar yang perlahan. Penukaran maksimum (anggaran 80%) tercapai dalam masa 24 jam, dan menjadi malar seterusnya (*Rajah 2*). Tahap penukaran maksimum (anggaran 80%) yang dicapai dari peningkatan kuantiti enzim dan masa, disebabkan tindak balas berada di dalam kesimbangan. Dengan kehadiran air, ester yang terhasil daripada esterifikasi akan dihidrolisis untuk membentuk asid lemak dan alkohol kembali (Knox dan Cliffe 1984; Ibrahim *et al.* 1988). Peratus tindak balas boleh ditingkatkan dengan mengurangkan kandungan air yang terhasil di dalam campuran tindak balas. Air boleh dinyah melalui beberapa cara umpamanya menggunakan penapis molekul (Ibrahim dan Tan 1991) atau vakum (Miller *et al.* 1987)

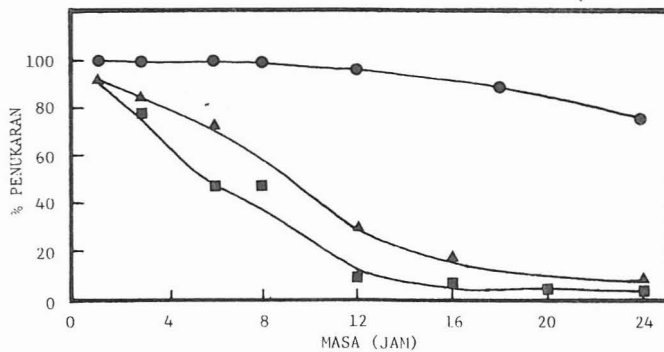


Rajah 2. Kesan jangkamasa tindakbalas ke atas kadar penghasilan ester. Tindakbalas dilakukan seperti teknik pengasaian enzim dengan menukar jangkamasa tindakbalas.

Proses esterifikasi adalah maksimum di sekitar 80% pada suhu 30 - 40°C. Pada suhu 50°C ke atas, keaktifannya adalah lebih rendah berbanding dengan 40°C. Manakala, pada 70°C, kadar penukaran menjadi 50% (*Rajah 3*). Ini mencadangkan pada 50°C ke atas, peratus tindak balas berbalik tinggi menyebabkan lebih banyak ester yang telah dihidrolisis. Kajian kestabilan menunjukkan yang enzim adalah agak stabil walaupun didedahkan pada suhu 70°C. Keaktifannya masih dalam anggaran 80% daripada aktiviti asal selapas 24 jam pada suhu 70°C. Pada suhu 80°C dan 90°C, kestabilan menurun dengan cepat. Dalam masa 1 jam sahaja, aktiviti mula terjejas dan menurun hingga ke paras 50% aktiviti asal dalam jangkamasa 10 jam (80°C) dan 6 jam (90°C) (*Rajah 4*). Kehadiran substrat, asid oleik dapat menstabilkan enzim, kerana substrat dapat melindungi tapak aktif semasa penyimpanan. Mungkin semasa berlaku tindak balas substrat-substrat tidak lagi melekat pada tapak aktif pada jangkamasa yang lama untuk mengawal tapak aktif.



Rajah 3. Kesan suhu terhadap kadar penghasilan ester Tindakbalas dilakukan seperti teknik pengisian enzim dengan mengeringkan campuran tindakbalas pada suhu yang berbeza



Rajah 4. Kestabilan enzim terhadap suhu. Enzim dieram pada suhu 70°C (○), 80°C (△) 90°C (■) pada jangkamasa yang berbeza, Aktiviti residual enzim ditentukan dengan membanding keaktifan enzim selepas pendedahan pada suhu berkenaan dengan keaktifan sebelumnya.

JADUAL 1
Kesan pelarut organik ke atas tindak
balas esterifikasi oleh lipas *R. oryzae*

Pelarut Organik	Nilai Log P*	%Pertukaran
(1) N, N-dimethylformamida	-0.4	9.15
(2) Asetonitril	-0.33	60.21
(3) 1,4-Dioksan	-0.27	68.62
(4) Dietilamina	0.64	0
(5) Piridin	0.17	51.86
(6) Dietileter	0.85	89.50
(7) Trietilamina	1.6	22.03
(8) Benzina	2.0	95.34
(9) Klorofom	2.0	93.48
(10) Toluena	2.5	92.62
(11) 2-Nonanona	2.9	86.72f
5-Nonanona	2.9	87.91
(12) Sikloheksana	3.2	90.90
(13) n-Heksana	3.5	91.66
(14) N-Hektana	4.0	90.89
(15) n-Oktana	4.5	91.95
(16) n-Nonana	5.1	95.60
(17) n-Dekana	5.6	92.12
(18) Undekana	6.1	93.53
(19) Dodekana	6.6	90.77

Keaktifan enzim ditentukan dengan mengukur % penukaran, iaitu % asid di tidak balas ke sebatian ester.

* Daripada Laane *et al.* (1987)

Keaktifan enzim dalam pelarut organik dicatat dalam Jadual 1. Pada umumnya enzim ini aktif dalam kebanyakan pelarut organik yang diuji. Sungguhpun keaktifan enzim terdapat dengan pelarut yang nilai log Pnya kurang daripada sifar, arah aliran lebih menyerlah bagi pelarut yang mempunyai log P yang positif. Seperti kajian masakini, keaktifan bertambah dengan pelarut yang mempunyai nilai log P yang meningkat kecuali dietileter (Log P = 0.85) (Valivety *et al.* 1991; Gorman dan Dordick 1992). Pelarut yang mempunyai log P yang negatif mungkin dapat menunjukkan keaktifan enzim di peringkat awal. Walau bagaimanapun kestabilan dalam pelarut-pelarut ini dijangka rendah disebabkan keupayaan pelarut-pelarut ini menarik air daripada molekul enzim, yang akan menyebabkan kehilangan keaktifan.

Kestabilan enzim dalam pelarut diuji dengan heksana, pada suhu bilik. Pelarut hidrokarbon seperti heksana telah dikenalpasti sebagai pelarut

yang sesuai bagi mendapat kadar tindak balas yang tinggi bagi lipase (Zaks dan Klibanov 1985). Didapati pendedahan enzim kepada heksana walaupun melebihi 100 hari tidak memberi kesan ke atas aktiviti enzim. Kajian kestabilan pada suhu yang lebih tinggi tidak dilakukan kerana terdapat masalah kemerwapan pelarut yang tidak dapat dibendung.

PENGHARGAAN

Projek ini dibiayai oleh Kementerian Sains, Teknologi dan Alam Sekitar Malaysia di bawah program IRPA No. 1-07-05-086.

RUJUKAN

- ABU BAKAR SALLEH, M. BASI, S.M. SAMAH, C.N. RAZAK, K. AMPON dan W.M.Z. YUNUS. 1992. Synthesis of oleic esters by lipase from *Candida rugosa*. Kertaskerja dibentang di *Persidangan Ke-17, Persatuan Biokimia Malaysia* 23-24 September 1992, UKM, Bangi, Selangor.
- GANCET, C. 1990. Catalysis by *Rhizopus arrhizus* mycelial lipase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **613**: 600-604.
- GORMAN, L.A. dan J.S. DORDICK. 1992. Organic solvents strip water of enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 392-297.
- IBRAHIM, C.O., N. NISHIO dan S. NAGAI. 1988. The role of water on the equilibrium of esterification by immobilised lipase packed-bed column reactor. *Biotechnol. Lett.* **10**: 799-804.
- IBRAHIM, C.O. dan H.L. TAN. 1991. Esterification by lipase of *Candida cylindrica*. *Malays. Appl. Biol.* **20**(1): 11-23.
- KNOX, T. dan K.R. CLIFFE. 1984. Synthesis of long chain esters in a loop reactor system using fungal cell bound enzyme. *Process Biochem.* **19**: 188-192.
- LAANE, C., S. BOEREN, K. VOS dan C. VEEGER. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 81-87.
- MILLER, C. A. HELEN, L. POSORSKE dan J. GONZALEZ. 1987. Characteristics of an immobilised lipase for commercial synthesis of esters. Paper presented at the *National American Oil Chemists' Society Meeting*, New Orleans, May 19, 1987.
- OKUMURA, S., M. IWAI dan Y. TSUJISAKA. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. *Biochem. Biophys. Acta* **575**: 156-165.
- RAZAK, N., R.N.Z. ABD. RAHMAN A.B. SALLEH, K. AMPON, W.M.Z. WAN YUNUS dan M. BASRI. Lipase intrasel daripada *Rhizopus oryzae* dan parameter-parameter yang mempengaruhi penghasilannya. *Sains Malaysiana* **20**(3): 87-94.
- VALIVETY, R.H., G. A. JOHNSTON, C.J. SUCKLING dan P.J. HALLING. 1991. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalysed esterification. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1137-1143.
- ZAKS, A. dan A.M. KLIBANOV. 1985. Enzyme-catalysed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 3192-3196.