

SPEKTRALITAS LIPASE DEDAK PADI TERHADAP JENIS SUBSTRAT DAN APLIKASI POTENSIALNYA UNTUK BIOTRANSFORMASI LIPIDA

Jenny Elisabeth dan Donald Siahaan

ABSTRAK

Meskipun proses enzimatis memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan proses kimiawi, namun aplikasi proses enzimatis pada skala industri terkendala oleh harga lipase mikrobia yang relatif mahal. Oleh karena itu, pengembangan sumber lipase yang lebih murah dan memiliki ketersediaan yang tinggi perlu dilakukan, salah satunya adalah dari bahan tumbuhan. Dedak padi diketahui memiliki aktivitas lipase yang cukup tinggi. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui sifat spektralitas lipase dedak padi terhadap jenis substrat pada reaksi hidrolisis dan sintesis (esterifikasi dan transesterifikasi), yakni pada minyak sawit, minyak inti sawit, dan turunannya (asam lemak sawit). Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase dedak padi memiliki aktivitas sedang pada reaksi konversi asam lemak sawit menjadi alkil ester, yaitu pada reaksi esterifikasi asam lemak dengan alkohol. Aktivitas esterifikasi dari lipase dedak padi bergantung pada jenis asam lemak dan alkohol serta kondisi fisik substrat. Lipase dedak padi menunjukkan aktivitas yang cukup tinggi dalam menginkorporasikan asam lemak rantai sedang (medium chain fatty acid / MCFA), yakni asam kaprilat (C8:0) dan asam kaprat (C10:0), pada molekul gliserida olein sawit. Peningkatan rasio substrat dari 0,5:1 hingga 1:1, yakni rasio mol asam lemak dan olein sawit, dapat meningkatkan inkorporasi MCFA. Lipase dedak padi memiliki aktivitas hidrolitik yang lebih rendah terhadap minyak sawit dibandingkan minyak inti sawit, dan juga memiliki aktivitas yang relatif rendah dalam reaksi gliserolisis untuk sintesis monogliserida dari minyak sawit dan inti sawit.

Kata kunci: dedak padi, esterifikasi, hidrolisis, lipase, minyak inti sawit, minyak sawit

PENDAHULUAN

Lipase (*triacylglycerol hydrolase*, E.C. 3.1.1.3) merupakan enzim penting pada industri lemak dan minyak, yakni untuk mengubah bentuk fisik dan kimia minyak dan lemak alami menjadi produk yang bernilai tambah lebih tinggi. Terdapat beberapa keunggulan penggunaan proses enzimatis pada skala industri dibandingkan dengan proses kimiawi, antara lain: (1) memperbaiki metode proses sehingga kualitas produk dapat ditingkatkan, (2) proses dan produk yang dihasilkan bersifat ramah lingkungan dan *biodegradable*, serta (3)

membutuhkan energi dan menghasilkan produk samping yang lebih sedikit (4).

Umumnya lipase bekerja sebagai katalis dalam menghidrolisis ikatan ester dari trigliserida atau ester asam lemak, namun beberapa penelitian juga membuktikan bahwa lipase mampu mengkatalisis reaksi sintesis pada media lipida tanpa air / *non-aqueous* (8). Beberapa tahun terakhir telah banyak dilaporkan tentang penggunaan lipase untuk proses hidrolisis atau sintesis pada minyak/lemak atau ester untuk menjadi produk-produk modifikasi yang bernilai tambah tinggi. Umumnya lipase yang digunakan merupakan lipase mikrobia dan telah banyak jenis lipase ini yang

telah diproduksi secara komersial. Namun, aplikasi reaksi enzimatik pada skala industri terkendala oleh harga lipase mikrobial yang mahal. Hal ini disebabkan oleh produksi lipase mikrobial yang membutuhkan biaya lebih tinggi dibandingkan enzim ekstraseluler lainnya seperti protease dan karbohidrase, karena hasil fermentasinya yang relatif rendah. Dengan demikian perlu upaya untuk memperoleh sumber lipase lain yang harganya lebih murah.

Pemanfaatan bahan tumbuhan sebagai sumber lipase memiliki keunggulan dari sisi harga dan ketersediaannya, dibandingkan dengan lipase mikrobial atau hewani. Terdapat beberapa jenis bahan tumbuhan yang diketahui memiliki aktivitas lipase yang tinggi, antara lain dedak padi, getah pepaya, biji gandum, umbi kentang, serta kecambah biji-bijian. Pada metabolisme biji-bijian, lipase berperan dalam menghidrolisis cadangan minyak atau lemak untuk persediaan energi dan sumber rangka karbon pada pertumbuhan embrio (9). Namun di sisi lain, lipase juga merupakan penyebab utama kerusakan minyak dan lemak yang berasal dari biji-bijian selama penyimpanan.

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa lipase tumbuhan merupakan biokatalis prospektif untuk modifikasi minyak dan lemak. Foglia dan Villeneuve (3) telah membuktikan bahwa lipase getah pepaya, yang umum diketahui memiliki aktivitas protease untuk menghidrolisis protein, dapat digunakan pada sintesis lemak rendah kalori dengan proses transesterifikasi. Lipase dari *rapeseed* juga telah digunakan untuk sintesis minyak kaya asam γ -linolenat dari minyak *evening primrose* (9), serta memperlihatkan aktivitas yang tinggi pada proses reaksi esterifikasi dan interesterifikasi (5). Penelitian yang dilakukan oleh Elisabeth *et al.* (1)

juga menunjukkan bahwa dedak padi dapat digunakan sebagai biokatalis untuk sintesis minyak kaya asam lemak omega-3, tetapi lipase dedak padi memiliki aktivitas yang rendah untuk menghidrolisis minyak ikan (2).

Sebagai sumber lipase, dedak padi tidak mahal karena merupakan hasil samping dari industri penggilingan padi dan banyak ditemukan di Indonesia. Dengan aktivitas lipase yang relatif tinggi serta tanpa proses isolasi dan atau pemurnian, dedak padi dapat diidentikkan sebagai enzim imobil. Dalam bentuk ini, dedak padi akan mudah dipisahkan dari campuran reaksi dan dapat dipergunakan kembali. Di sisi lain, kestabilan lipase terhadap panas juga meningkat karena adanya lapisan dedak.

Hingga saat ini, tidak ada informasi yang dapat diperoleh tentang karakteristik dan sifat spesifisitas lipase dedak padi, terutama pada reaksi sintesis atau modifikasi minyak/lemak yang berlangsung pada kondisi *microaqueous* (hampir tanpa air). Aktivitas lipase dedak padi diduga sangat dipengaruhi oleh jenis lipida dan alkohol yang umum digunakan pada proses biotransformasi minyak/lemak. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui karakteristik dan sifat spesifisitas lipase dedak padi terhadap jenis substrat pada reaksi hidrolisis dan sintesis (esterifikasi dan transesterifikasi), terutama terhadap minyak sawit, minyak inti sawit, dan turunannya. Pemilihan minyak sawit dan minyak inti sawit dilakukan berdasarkan aplikasi potensialnya sebagai bahan baku untuk produk-produk pangan dan oleokimia.

BAHAN DAN METODE

Minyak sawit, minyak inti sawit, olein, dan stearin diperoleh dari PT Pami-na. Perbaungan, Sumatera Utara, sedangkan asam-asam lemak turunan dari minyak sawit dan minyak inti sawit diperoleh dari PT SOCI, Medan. Dedak padi diperoleh dari pabrik penggilingan padi lokal di Sumatera Utara.

Reaksi esterifikasi

Dengan perlakuan terkendali, asam lemak (terdiri atas asam kaprilat, kaprat, laurat, palmitat, stearat, atau oleat) dan alkohol (terdiri atas metanol, etanol, propanol, 1-butanol, atau isopropanol) dengan rasio mol 2:1 dilarutkan dalam heksana, direaksikan dengan menggunakan katalis dedak padi sebanyak 10% (b/b substrat campuran) pada *orbital shaker* dengan kecepatan 300 rpm, suhu 55°C, dan dengan selang waktu tertentu. Fraksi lipida selanjutnya diekstraksi dengan pelarut heksana yang kemudian diuapkan. Jumlah asam lemak bebas (ALB) ditentukan dengan metode Lowry dan Tinsley (6). Tingkat konversi asam lemak menjadi alkil ester dihitung dengan membagi selisih kandungan asam lemak sebelum dan sesudah esterifikasi dengan kandungan asam lemak awal.

Reaksi asidolisis

Minyak olein dan asam lemak pada beberapa tingkat rasio mol serta dedak padi sebanyak 10% (b/b substrat campuran) direaksikan pada *orbital shaker* dengan kecepatan 300 rpm dan suhu 40°C selama 6 jam. Udara pada bejana digantikan dengan gas nitrogen untuk mencegah oksidasi. Reaksi dihentikan dengan menambahkan campuran aseton dan etanol (1:1,

v/v), dedak padi dipisahkan dengan penyaringan, dan kemudian filtrat dititrasi dengan larutan NaOH metanolik 0,5 N untuk menghilangkan fraksi asam lemak pada produk hasil asidolisis.

Reaksi hidrolisis

Minyak dan air de-ion dengan perbandingan 1:2 (b/b), albumin 0,003% (b/b minyak), serta dedak padi sebanyak 10% (b/b substrat campuran) direaksikan pada suhu 50 °C selama 24 jam dengan menggunakan *orbital shaker* pada kecepatan 300 rpm. Sebelum reaksi, udara pada bejana digantikan dengan gas nitrogen. Pada akhir reaksi campuran aseton dan etanol (1:1, v/v) ditambahkan dan dedak padi dipisahkan dengan cara penyaringan.

Reaksi gliserolisis

Campuran gliserol anhidrous dan minyak pada rasio mol 2:1, serta dedak padi sebanyak 10% (b/b substrat campuran) direaksikan pada suhu 40°C selama 24 jam dengan menggunakan *orbital shaker* pada kecepatan 300 rpm. Udara pada bejana digantikan dengan gas nitrogen untuk mencegah oksidasi. Inaktivasi enzim dan pemisahan sisa gliserol dilakukan dengan ekstraksi menggunakan campuran kloroform/metanol (1:1, v/v), dan dedak padi dipisahkan dengan penyaringan.

Analisis

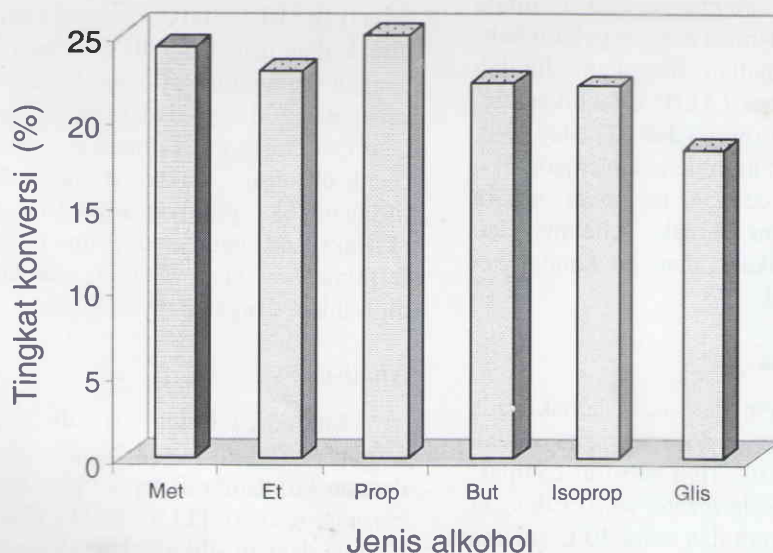
Komposisi lipida (tri-, di-, monogliserida, dan asam lemak bebas) dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (*thin layer chromatography*/TLC) pada plat yang dilapisi dengan silika gel 60 (Kieselgel 60, Merck) dan dielusi dengan pelarut petroleum eter/dietil eter/asam asetat (90:10:1 v/v/v). Spot yang diperoleh dideteksi di

bawah sinar UV setelah penyemprotan dengan larutan 2',7'-diklorofluoresens 0,2 % dalam etanol 96%, kemudian dikerok dan diekstrak dengan pelarut yang sesuai untuk masing-masing fraksi. Komposisi gliserida dihitung berdasarkan berat relatif dari masing-masing ekstrak fraksi. Analisis kandungan asam lemak dilakukan dengan metode kromatografi gas. Sampel dipreparasi dengan proses metilasi menggunakan BF_3 -metanol (14%b/v) dan alat kromatografi gas yang digunakan adalah Perkin Elmer 8420 yang dilengkapi dengan detektor FID dan kolom kapiler DB-225 (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Hidrogen digunakan sebagai gas pembawa dan kandungan asam lemak relatif dihitung berdasarkan persen area dari respon detektor. Jumlah ALB dianalisis dengan metode Lowry dan Tinsley (6).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Reaksi esterifikasi

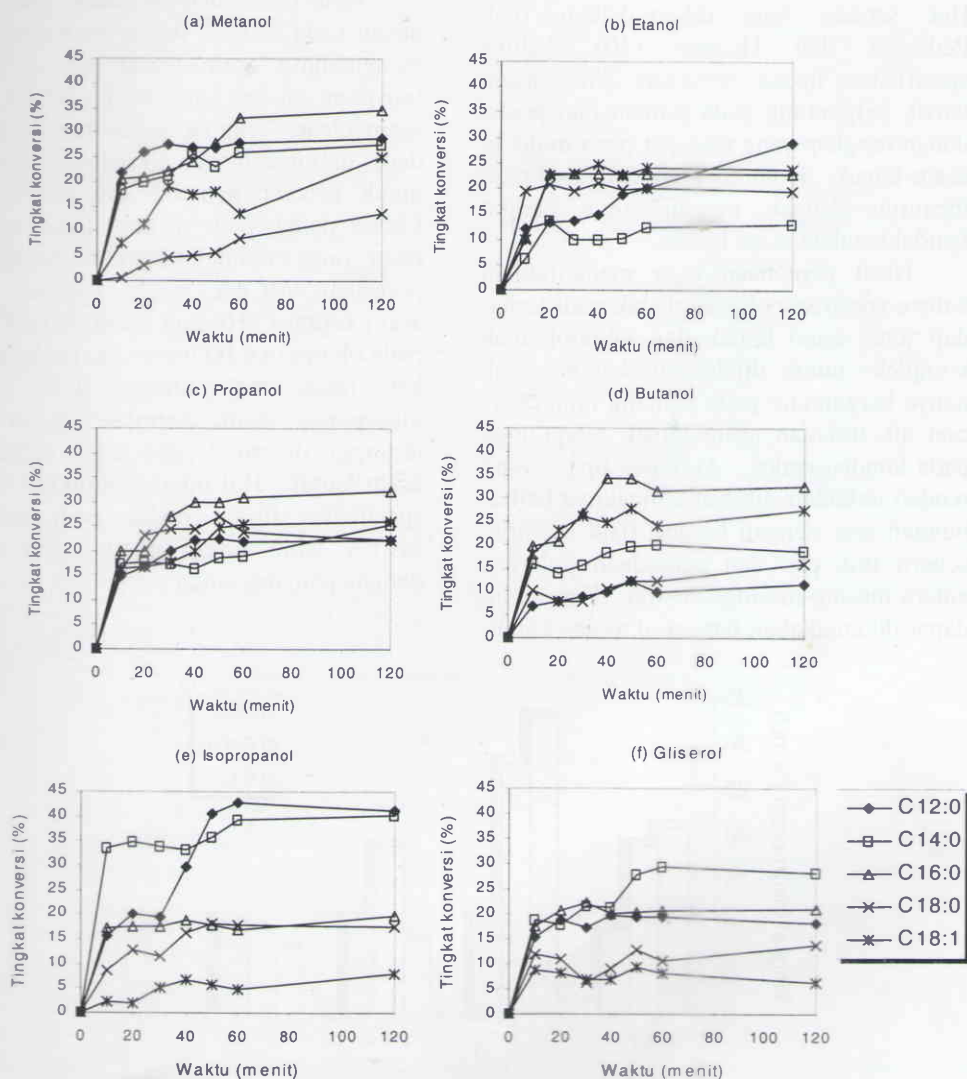
Hasil percobaan menunjukkan bahwa lipase dedak padi memiliki aktivitas untuk mengkonversi asam lemak sawit menjadi produk alkil ester. Pada Gambar 1 diperlihatkan bahwa konversi alkil ester dengan jenis alkohol metanol, etanol, propanol, butanol, dan isopropanol lebih tinggi dibandingkan dengan gliserol. Konversi alkil ester dengan menggunakan alkohol primer dan sekunder berkisar antara 22 – 25%, sedangkan dengan menggunakan gliserol hanya 18%. Hal ini menunjukkan bahwa spesifisitas lipase dedak padi terhadap jenis alkohol relatif tidak berbeda antara alkohol primer dan sekunder, namun lebih rendah terhadap alkohol trihidroksi.



Gambar 1. Pembentukan alkil ester pada reaksi esterifikasi antara asam lemak sawit dan beberapa jenis alkohol dengan menggunakan dedak padi sebagai biokatalis

Jenis asam lemak dan waktu reaksi juga berpengaruh nyata terhadap aktivitas esterifikasi, seperti yang ditampilkan pada Gambar 2. Tingkat esterifikasi asam stearat (C18:0) adalah yang terendah, yang disebabkan oleh titik cairnya yang tinggi dan

bentuknya yang masih padat pada suhu reaksi 55°C. Dalam bentuk yang demikian menyebabkan pencampuran asam lemak dengan alkohol berlangsung tidak sempurna.



Gambar 2. Pengaruh jenis asam lemak dan alkohol pada pembentukan alkil ester selama proses esterifikasi dengan menggunakan dedak padi sebagai biokatalis

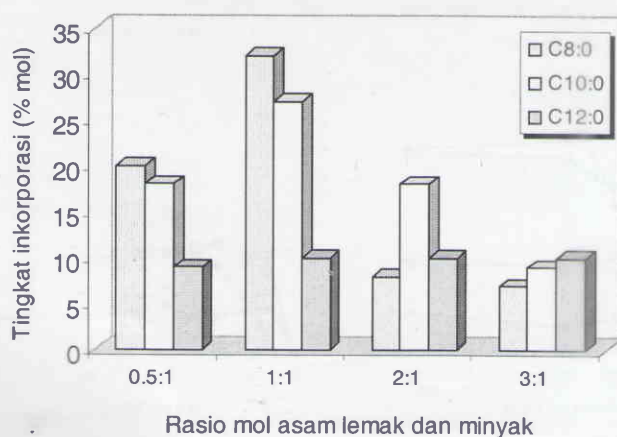
Hasil percobaan juga dapat menjelaskan bahwa lipase dedak padi memiliki spesifisitas yang lebih baik terhadap asam lemak jenuh dibandingkan dengan asam lemak tidak jenuh, terutama pada penggunaan isopropanol dan gliserol. Hal senada juga dikemukakan oleh Pedersen dan Holmer (10), bahwa spesifisitas lipase terhadap jenis asam lemak bergantung pada jumlah dan posisi ikatan rangkap yang terdapat pada molekul asam lemak. Umumnya spesifisitas lipase menurun dengan meningkatnya derajat ketidakjenuhan asam lemak.

Hasil percobaan juga menunjukkan bahwa spesifisitas lipase dedak padi terhadap jenis asam lemak dan alkohol agak kompleks untuk dijelaskan, karena tidak hanya bergantung pada panjang rantai karbon alkohol dan asam lemak tetapi juga pada kondisi reaksi. Aktivitas lipase yang rendah terhadap substrat tampaknya berhubungan erat dengan bentuk fisik substrat, seperti titik cair dan perbedaan polaritas antara masing-masing substrat. Karena itu dapat dikemukakan bahwa aktivitas katali-

tik lipase dedak padi agak sulit diinterpretasikan hanya berdasarkan afinitas atau sifat spesifisitasnya.

Reaksi asidolisis

Pada percobaan ini dedak padi digunakan pada sintesis lipida terstruktur yang mengandung asam lemak rantai sedang (*medium chain fatty acid, MCFA*) dan asam oleat. Bentuk lipida terstruktur ini dapat digunakan sebagai bahan nutrasitikal untuk produk pangan atau farmasitikal. Lipase dedak padi menunjukkan kemampuan yang cukup baik untuk menginkorporasikan MCFA (asam kaprilat C8:0, asam kaprat C:10, dan asam laurat C12:0) pada olein sawit (Gambar 3). Dengan tingkat rasio mol hingga 1:1, tingkat inkorporasi asam kaprilat adalah yang tertinggi, diikuti dengan asam kaprat dan asam laurat. Hal ini menunjukkan bahwa spesifisitas lipase dedak padi terhadap MCFA lebih tinggi untuk asam lemak dengan panjang rantai yang lebih pendek.

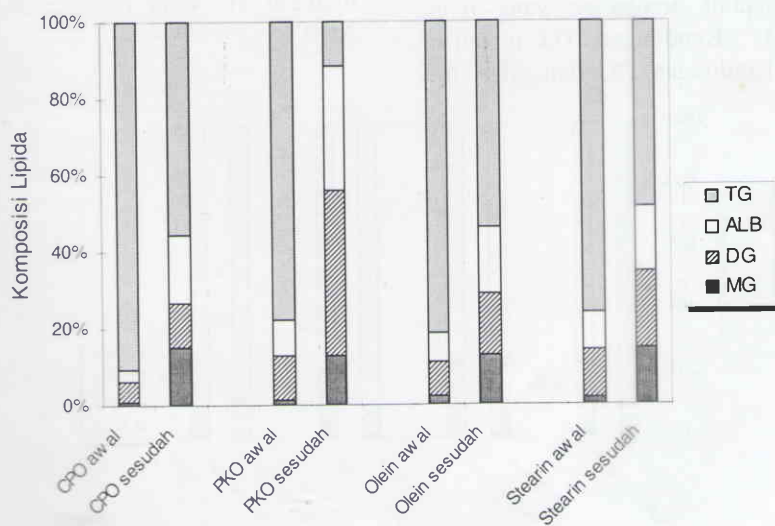


Gambar 3. Inkorporasi asam lemak rantai sedang (MCFA) pada olein sawit dengan beberapa tingkat rasio mol asam lemak dan minyak pada reaksi asidolisis

Peningkatan rasio substrat (rasio mol asam lemak dan minyak atau olein sawit) dari 0,5:1 menjadi 1:1 dapat meningkatkan inkorporasi MCFA (Gambar 3). Dengan menggunakan lipase dedak padi dan tingkat rasio substrat 1:1 maka tingkat inkorporasi C8:0, C10:0, dan C12:0 masing-masing adalah 32, 27, dan 10 %mol. Hal ini menjelaskan bahwa peningkatan jumlah molekul MCFA pada campuran reaksi akan meningkatkan peluang MCFA untuk berada pada interfase saat reaksi asidolisis berlangsung dan untuk dapat mencapai sisi aktif enzim. Sebaliknya, peningkatan rasio substrat lebih besar dari 1:1 mengakibatkan berlebihnya jumlah molekul asam lemak pada campuran reaksi. Hal ini menyebabkan molekul gliserida dari olein sawit memiliki peluang yang lebih rendah untuk berinteraksi dengan molekul enzim dan mengakibatkan molekul MCFA tidak dapat dipindahkan ke molekul gliserida.

Reaksi Hidrolisis

Penggunaan dedak padi sebagai biokatalis pada proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis minyak dan dengan kondisi terkontrol. Komposisi lipida (yakni tri-, di-, monogliserida, dan asam lemak bebas) pada produk hidrolisis ditampilkan pada Gambar 4. Penurunan kandungan trigliserida (TG) pada minyak inti sawit merupakan yang tertinggi, yang diikuti dengan peningkatan kandungan asam lemak bebas (ALB) dan digliserida (DG). Kandungan ALB, monogliserida (MG), DG, dan TG pada produk hidrolisis minyak inti sawit masing-masing adalah 32,7; 12,9; 43,0; dan 11,5% (b/b). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa hidrolisis asam lemak pada minyak inti sawit lebih banyak terjadi pada molekul TG dibandingkan DG.



Gambar 4. Komposisi lipida pada minyak sawit, minyak inti sawit, olein dan stearin sebelum dan sesudah proses hidrolisis dengan menggunakan lipase dedak padi sebagai biokatalis

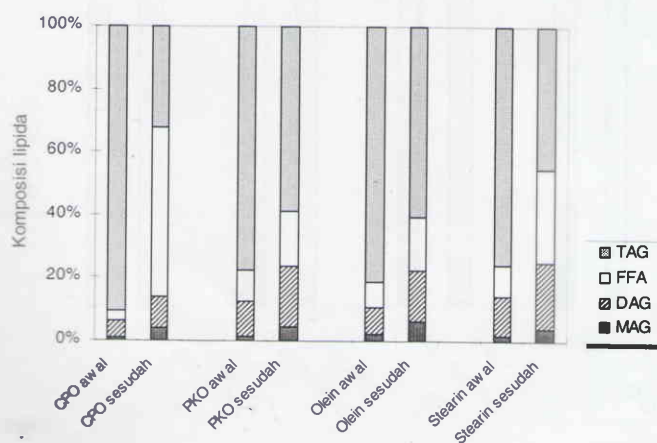
Di sisi lain, kandungan ALB, MG, dan DG pada produk hidrolisis minyak sawit (CPO), olein, dan stearin sawit relatif sama. Dapat dikemukakan bahwa aktivitas hidrolitik lipase dedak padi terhadap minyak sawit dan turunannya lebih rendah dibandingkan minyak inti sawit. Tanaka *et al.* (11) menyatakan bahwa aktivitas hidrolitik lipase *Candida cylindraceae* sangat tergantung pada struktur molekul gliserida secara keseluruhan, bukan hanya bergantung pada jenis asam lemak dan posisi asam lemak pada kerangka molekul gliserol. Sifat ini mungkin juga terdapat pada lipase dedak padi, yang memiliki spesifitas terhadap jenis molekul gliserida secara keseluruhan dan mengakibatkan aktivitas katalitiknya berbeda untuk minyak inti sawit dan minyak sawit.

Reaksi gliserolisis

Setelah proses gliserolisis, komposisi lipida pada minyak sawit dan minyak inti sawit mengalami perubahan yang nyata (Gambar 5). Kandungan TG menurun, sedangkan kandungan DG dan ALB me-

ningkat dengan tingkat yang berbeda pada masing-masing jenis minyak. Kandungan MG pada semua produk gliserolisis relatif rendah, yang mengindikasikan bahwa lipase dedak padi memiliki aktivitas yang rendah untuk sintesis MG dengan reaksi gliserolisis.

Pada proses gliserolisis terjadi reaksi simultan, yakni reaksi hidrolisis molekul TG dan DG menjadi asam lemak, dan reaksi esterifikasi yang memindahkan gugus asam lemak ke molekul gliserol (7). Hasil percobaan menunjukkan bahwa lipase dedak padi menghasilkan produk gliserolisis minyak sawit dengan kandungan DG dan ALB yang lebih tinggi. Hal ini mengindikasikan bahwa proses pemutusan rantai asam lemak dari molekul TG berlangsung dengan baik, namun reaksi pemindahan gugus asam lemak ke molekul gliserol mengalami hambatan. Lebih lanjut juga dapat dikemukakan bahwa pemutusan rantai asam lemak dominan terjadi pada molekul TG yang menghasilkan DG dan ALB.



Gambar 5. Komposisi lipida pada minyak sawit, minyak inti sawit, olein dan stearin sebelum dan sesudah proses gliserolisis dengan menggunakan lipase dedak padi sebagai biokatalis

KESIMPULAN

Lipase dedak padi merupakan biokatalis yang cukup prospektif untuk digunakan pada proses modifikasi minyak dan lemak. Dengan aktivitas katalitik dan spesifisitas tertentu serta harganya yang murah, membuat dedak padi menjadi biokatalis potensial untuk berbagai proses enzimatis yang berhubungan dengan minyak dan lemak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase dedak padi memiliki aktivitas sedang untuk mengkonversi asam lemak menjadi alkil ester dan memiliki kemampuan yang cukup tinggi untuk menginkorporasikan asam lemak rantai sedang (MCFA) pada olein sawit, terutama untuk asam kaprilat (C8:0) dan asam kaprat (C10:0). Aktivitas lipase dedak padi juga tidak hanya bergantung pada jenis molekul substrat, yang berkaitan dengan panjang rantai, derajat ketidakjenuhan, dan posisi asam lemak pada kerangka gliserol, namun juga sangat dipengaruhi oleh bentuk fisik substrat. Spesifisitas lipase dedak padi juga dipengaruhi oleh suhu reaksi dan polaritas substrat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan pada Indonesian Toray Science Foundation (ITSF) yang telah membiayai penelitian ini, serta kepada Sdr. Henry Nainggolan, Sdri. Melpha Dorthia dan Sdr. Hiras Sirait atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

1. ELISABETH, J., A. JATMIKA, and K. SINAGA. 1999. Synthesis of n-3 PUFA-rich palm oil by lipase-catalyzed acidolysis. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 7(1) : 43-56.
2. ELISABETH, J. 2000. Studies of the specificity of lipases toward EPA and DHA: Its implication on synthesis of n-3 PUFA-rich glyceride. Paper presented at Evaluation and Monitoring Seminar of The Young Academic Program, URGE Project. Jakarta, September 2000.
3. FOGLIA, T.A. and P. VILLENEUVE. 1997. *Carica papaya* latex lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(11): 1447-1449.
4. GANDHI, N.N. 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(6): 621-634.
5. JACHMANIAN, I. and K.D. MUKHERJEE. 1996. Esterification and interesterification reactions catalyzed by acetone powder from germinating rapeseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(11): 1527-1532.
6. LOWRY, R.R. and T.J. TINSLEY. 1975. Rapid colorimetric determination of fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53:470-472.
7. MACRAE, A.R. 1983. Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(2):243-246.
8. MUKHERJEE, K.D. 1990. Enzymatic modification of fat and other lipids. *Biocatalyst* 3:277-282.
9. MUKHERJEE, K.D. 1994. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog. Lipid Res.* 33(1/2):165-174.
10. PEDERSEN, S.B. and G. HOLMER. 1995. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72(2): 239-243.
11. TANAKA, Y., J. HIRANO, T. FUNADA and R. HASHIZUME. 1993. Triglyceride specificity of *Candida cylindracea* lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70(10): 1031-1034.

Substrate specificity of rice bran lipase and its potential applications in lipid biotransformation

Jenny Elisabeth and Donald Siahaan

Abstract

Although enzymatic processes have several advantages compare to chemical processes, the industrial scale development of enzymatic processes is very slowly growth due to high investment and operating cost associated with the microbial lipases used. Therefore, other type of lipases, such as plant lipases, shall be explored in order to provide lower cost and more available lipases. Rice bran is known as an abundant source of lipase. The objective of this research is to examine the specificities of rice bran lipase toward substrate in hydrolysis and synthesis reactions (esterification and transesterification), particularly for palm oil, palm kernel oil, and its derivatives. The result showed that the rice bran lipase had a moderate activity to convert the palm fatty acid into alkyl ester by esterification reaction with alcohol. The esterification activity depends on the kinds of fatty acid and alcohol, and also the physical state of the substrate. The rice bran lipase showed a good capability to incorporate the MCFA, particularly caprylic acid (C8:0) and capric acid (C10:0) into the glyceride molecule of palm olein. Increasing the substrate ratio from 0.5:1 up to 1:1, that was molar ratio of fatty acid and palm olein, could increase the MCFA incorporation. The rice bran had a poorer hydrolytic activity toward palm oil than palm kernel oil, and it had low activity to synthesize monoglyceride from palm and palm kernel oil by glycerolysis reaction.

Key words: rice bran, esterification, hydrolysis, lipase, palm kernel oil, palm oil

Introduction

Lipase (triacylglycerol hydrolase, E.C. 3.1.1.3) considers as the most important biocatalyst in the oils and fats industry for transformation of natural fats and oils into some value-added products. In comparison to chemical-catalyzing process, lipase provides some advantages such as: (a) improving processing methods for higher quality; (b) offering environmentally friendly and biodegradable products; and (c) consuming less energy and generating less waste (4).

Generally, lipase is used as catalyst for ester bonds of triglycerides or acyl esters hydrolysis. However, several studies have reported that lipases also catalyze organic reactions in non-aqueous media

(8). In recent years, numerous reports have described the uses of lipases for hydrolysis or synthesis of peculiar modified oils, fats, or esters. Extracellular microbial lipases are particularly used for the processes and more than one dozen commercial lipases have been produced by the industry. However, the development of industrial scale enzymatic reactions is slowly growth that associated with the high price of commercial microbial lipases. Microbial lipases give more expensive operation cost due to low fermentation yield, in comparison to other extra cellular enzymes, such as proteases and carbohydrases.

Compared with microbial or animal lipases, plant lipases have some advantages due to their lower cost and more available. There are some plant organs

containing high activity lipases such as rice bran, *Carica papaya* latex (CPL), oat seed, potato tuber, and germinating oil seeds. In oil seeds and cereals, highly activity lipases are found to catalyze the hydrolysis of reserve triacylglycerols in providing energy and carbon skeleton for embryonic growth (9). However, the lipase is also the main cause of oil deterioration in the seeds and cereals during storage.

Several investigations concluded that plant lipases were prospective biocatalysts for oil and fat modifications. Foglia and Villeneuve (3) demonstrated that CPL, known for its proteolytic activity, was useful for the lipase-catalyzed synthesis of low-calorie structured triglycerides. Lipase from rapeseed was used for enrichment of γ -linolenic acid (GLA) of evening primrose oil (9), and showed a significantly higher activity for esterification and interesterification reactions (5). Elisabeth *et al.* (1) reported that rice bran lipase might be used as biocatalyst to synthesize omega-3 polyunsaturated fatty acid-rich oils, but the rice bran lipase had a poor ability to hydrolyze fish oil.

As source of lipase, rice bran is inexpensive, since it is a by-product of rice mill and found abundantly in Indonesia. Furthermore, without separation, isolation and purification from rice bran, rice bran lipase may be considered as an immobilized lipase. In this form, rice bran may be easily removed from the reaction system and can be recycled. On the other hand, the thermal stability of the lipase may be enhanced by the rice bran layer.

So far, no study has been reported on the characteristics and specificities of rice bran lipase, particularly on synthesis or modification of fats and oils in micro aqueous condition. It is supposed that rice bran lipase activity depends on the kinds

of lipids and alcohols that are usually used in biotransformation of fats and oils. Hence, the objective of the research was to examine the characteristics and specificities of rice bran lipase toward substrate in hydrolysis and synthesis reactions (esterification and transesterification), particularly for palm oil, palm kernel oil, and its derivatives.

Materials and Method

Palm oil, palm kernel oil, palm olein, and palm stearin were provided by PT Pamina, Perbaungan - North Sumatera, and fatty acids derived from palm or palm kernel oil were provided by PT SOCI, Medan. Rice bran was obtained from a local rice mill in North Sumatera.

Esterification reaction

In control experiments, fatty acid (caprylic acid, capric acid, lauric acid, palmitic acid, stearic acid, and oleic acid) and alcohol (methanol, ethanol, propanol, 1-butanol, and isopropanol) with molar ratio of 2:1, dissolved in n-hexane, were reacted in the presence of 10% (w/w) of rice bran in an orbital shaker at 300 rpm, 55°C for various periods. Lipids were extracted from the reaction products with hexane and then evaporated. Free fatty acid (FFA) content was determined by Lowry and Tinsley method (6). The extent of conversion to alkyl ester was calculated by dividing the difference of fatty acid content before and after esterification with the initial content of fatty acid.

Acidolysis reaction

Palm olein, fatty acid, and 10% (w/w) of rice bran were mixed and incubated in

an orbital shaker at 300 rpm, 40°C for 6 hours. Air in the flask was replaced by nitrogen gas to prevent oxidation. The reaction was stopped by addition of acetone/ethanol mixture (1:1, v/v), the rice bran lipase was filtered, and then the mixture was titrated to shift the pH to alkaline with 0.5 N NaOH methanolic solution to remove the free fatty acids in the product.

Hydrolysis reaction

Oil, de-ioned water at a weight ratio of oil/water 1:2, and 0.003% albumine were mixed with 10% (w/w) of rice bran at 50°C and stirred at 300 rpm for 24 hours. Air in the flask was replaced by nitrogen gas. Acetone/ethanol mixture (1:1, v/v) was added to stop the reaction and then the rice bran was filtered.

Glycerolysis reaction

A mixture of glycerol anhydrous and oil at the molar ratio 2:1, and 10% (w/w) rice bran were mixed and incubated in an orbital shaker at 300 rpm, 40°C for 24 hours. Air in the flask was replaced by nitrogen gas to avoid oxidation. Inactivation of enzyme and removal of the excess glycerol was achieved by extraction of the reaction mixture into chloroform/methanol (1:1,v/v), and the rice bran was filtered.

Analysis

The lipid composition (tri-, di-, monoglyceride, and FFA) was examined by thin layer chromatography (TLC, Kieselgel 60, Merck). TLC plates were developed with petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (90:10:1, v/v/v) as eluent, visualized by spraying 2,7-dichloro-fluorescein (0.2% in 96% ethanol). The

bands were scrapped off and extracted with the appropriate solvent. The glyceride composition was calculated as weight percent of each extracted fraction of the total lipid weight. The fatty acid composition was analyzed with gas chromatography (GC) by methylated with 14% BF₃ in methanol. A Perkin Elmer 8420 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and DB-225 fused silica capillary column (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA) was used. Hydrogen was used as the carrier gas and the relative content of a fatty acid was expressed as weight percent of the total amount of fatty acids by the area percent of the detector response. The free fatty acid content was analyzed by Lowry and Tinsley method (6).

Results and Discussion

Esterification reaction

The results showed that the rice bran lipase had an enzymatic activity for converting palm fatty acid to alkyl ester. Figure 1 shows that alkyl ester conversion with methanol, ethanol, propanol, butanol, and isopropanol were higher compared to glycerol. Conversion to alkyl ester using primary and secondary alcohol was 22-25%, and using glycerol was 18%. It means that the alcohol specificity of rice bran lipase was not significantly different between primary and secondary alcohol, but it was lower for trihydroxy alcohol.

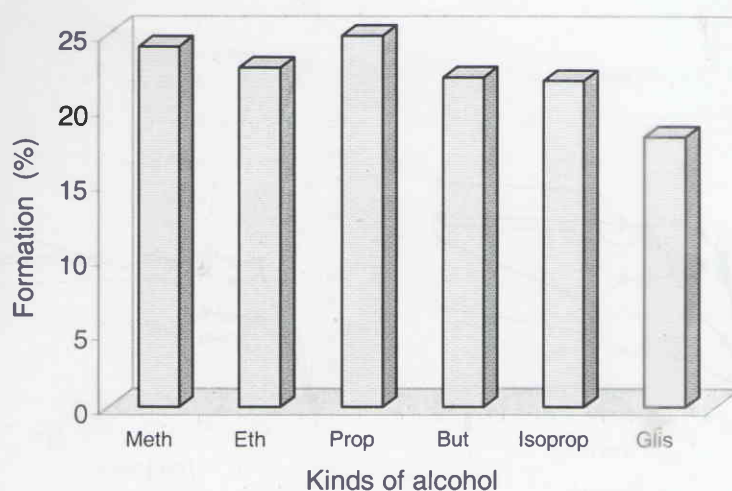
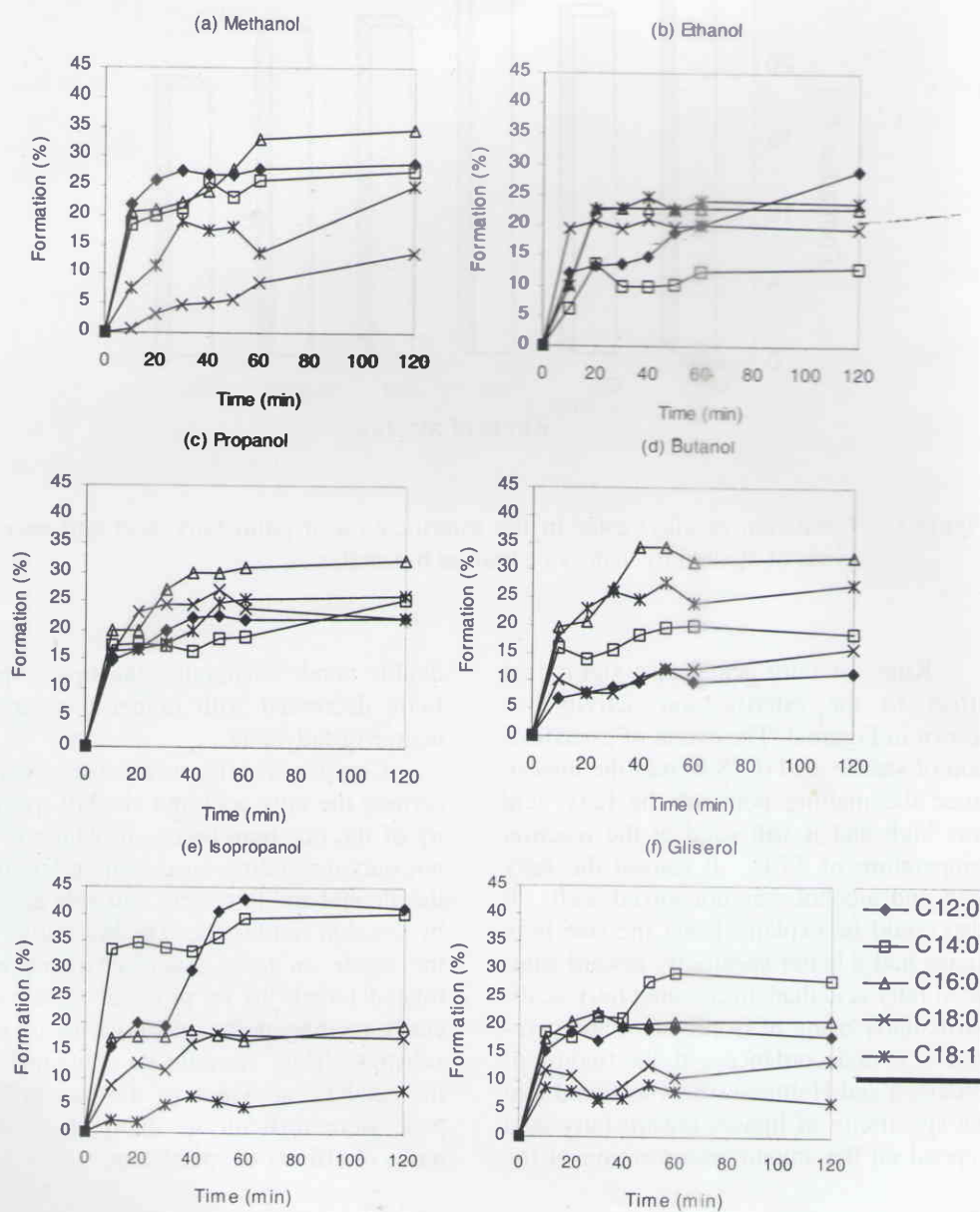


Figure 1. Formation of alkyl ester in the esterification of palm fatty acid and several kinds of alcohol by using rice bran as biocatalyst.

Kinds of fatty acid had a significant effect to the esterification activity, as shown in Figure 2. The extent of esterification of stearic acid (C18:0) was the lowest, since the melting point of the fatty acid was high and it still solid at the reaction temperature of 55°C. It caused the fatty acid and alcohol was not mixed well. It also could be explained that the rice bran lipase had a better specificity toward saturated fatty acid than unsaturated fatty acids, particularly using of isopropanol and glycerol. It is in accordance with the finding of Pedersen and Holmer (10), who found that the specificity of lipases toward fatty acid depend on the amount and position of the

double bond. Generally, the lipase specificity decreased with higher unsaturation degree of fatty acid.

Complex results were observed concerning the fatty acid and alcohol specificity of the rice bran lipase, in which it was not only depending on the chain length of the alcohol and fatty acid, but also affected by reaction conditions. The low activity of the lipase on long chain substrates were related largely to its physical state, especially melting point and polarity of each substrate. Thus, it could be explained that the catalytic activities of the rice bran lipase were difficult to interpret in strict terms of affinity or specificity.



Gambar 2. Formation of alkyl ester during esterification of several kinds of fatty acid and several kinds of alcohol by using rice bran as biocatalyst.

Acidolysis reaction

In this study, rice bran lipase was used to synthesize structured lipids containing medium chain fatty acid (MCFA) and oleic acid, which could be used as nutraceuticals for food or pharmaceuticals. The rice bran lipase showed a good capability to incorporate MCFA (caprylic acid C8:0; capric acid C10:0; and lauric acid C12:0) into the palm olein (Figure 3). With molar ratio of fatty acid and oil up to 1:1, the incorporation of caprylic acid was the highest, followed by capric and lauric acid. It means that the specificity of rice bran lipase was better toward the shorter chain length of MCFA.

Increasing the substrate ratio from 0.5:1 up to 1:1, which was ratio of fatty acid and palm olein, would increase the MCFA incorporation (Figure 3). By using

the rice bran lipase and substrate ratio of 1:1, the incorporation of C8:0, C10:0, and C12:0 were 32, 27, and 10 %mole, respectively. This could be explained that increasing amount of the MCFA molecules enhanced the opportunity of MCFA to adsorb into the interfacial phase, where the acidolysis reaction was occurred, and to achieve active site of the enzyme. On the contrary, increasing the substrate ratio more than 1:1 led to excessive content of fatty acids in the reaction mixture. It caused the glyceride molecule of palm olein had low opportunity to interact with the enzyme molecule and made the MCFA could not be transferred into the glyceride molecule.

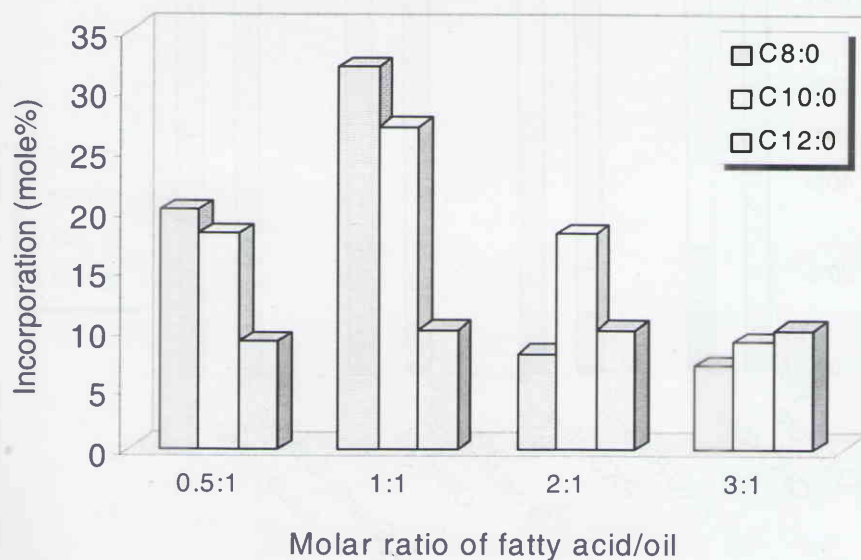


Figure 3. Incorporation of MCFA into palm olein with several molar ratios of fatty acid to oil in acidolysis reaction

Hydrolysis reaction

Hydrolysis of various kinds of oil was performed under the standard conditions with the rice bran as biocatalyst. The lipid composition of mono-, di-, triglyceride (MAG, DAG, TAG), and FFA of the hydrolysis product was shown in Figure 4. Decreasing of TAG content in palm kernel oil (PKO) was the highest, in accordance with increasing of FFA and DAG content. The FFA, MAG, DAG, and TAG content of the hydrolysis product of PKO were 32.7, 12.9, 43.0, and 11.5 % (w/w), respectively. The result suggested that hydrolysis of acyl chain in PKO was dominant on TAG molecules than that on DAG.

On other hand, the FFA, MAG, and DAG contents of the hydrolysed product of crude palm oil (CPO), palm olein, and palm stearin were relatively similar. Therefore, it can be explained that the hydrolytic activity of the rice bran lipase toward palm oil and its derivatives were lower than PKO. Tanaka et al. (11) stated that the hydrolytic activity of *Candida cylindracea* lipase depends not only on the chain length and position of fatty acid at the glycerol backbone, but also on the whole glyceride structure. It was supposed that the rice bran lipase had specificity toward the whole glyceride structure and made its catalytic activity different between PKO and palm oil.

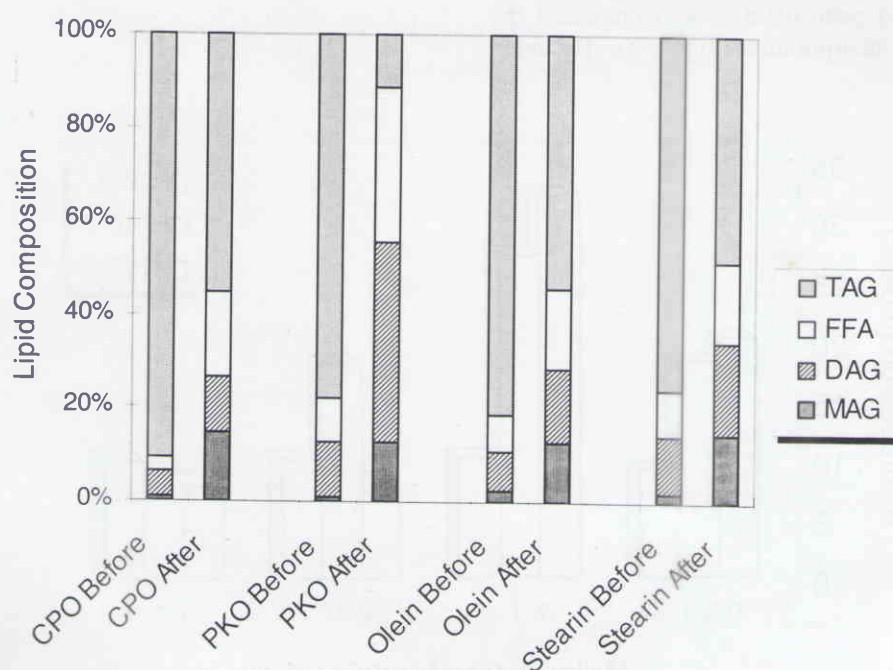


Figure 4. Composition of lipids in original CPO, PKO, palm olein, and stearin and their hydrolysis products by using rice bran as biocatalyst.

Glycerolysis reaction

After glycerolysis, the lipid composition of palm oil and PKO was significantly changed (Figure 5). The TAG content decreased, while the DAG and FFA content increased with different extent for each kind of oil. The MAG content of all glycerolized products were low, indicating that rice bran lipase had low activity to synthesize MAG by glycerolysis reaction.

There is a simultaneous reaction in the glycerolysis process, i.e. hydrolysis of TAG and DAG molecules to produce acyl-chain and esterification reaction for transferring the acyl-chain into glycerol molecules (7). The result shows that rice bran lipase gave high DAG and FFA content by using the CPO as oil substrate. High content of DAG and FFA means that the splitting of acyl chain from the TAG molecule could occur, but transferred of the acyl chain into the glycerol molecules was inhibited. The result of this research also suggested that hydrolysis of acyl-chain was

dominant on TAG and produced DAG and fatty acid molecules.

Conclusions

The rice bran lipase should be viewed as a prospective biocatalyst for oil and fat modifications. Its interesting catalytic activity and specificity, as well as its relatively inexpensive price, make rice bran a potential biocatalyst for various enzymatic processes involving oils and fats. The results of this research show that the rice bran lipase had a moderate activity to convert palm fatty acids into alkyl ester and good capability to incorporate MCFA into palm olein, particularly caprylic acid (C8:0) and capric acid (C10:0). The activity of the lipase did not only depend on the kinds of substrate, which in accordance with the chain length, degree of unsaturation, and fatty acid position at the glycerol backbone, but also due to its physical state. It could be suggested that the specificity of the rice bran lipase was temperature- and polarity-dependent.

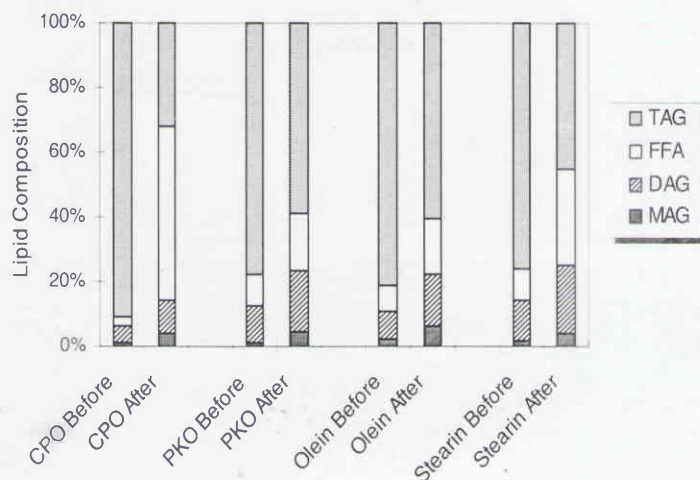


Figure 5. Composition of lipids in original CPO, PKO, palm olein, and stearin and their glycerolysis products by using rice bran as biocatalyst

Acknowledgement

The authors would like to express grateful thanks to The ITSF (Indonesia Toray Science Foundation) for financial supporting of this research, and also to Mr Henry Nainggolan, Ms. Melpha Dorthia, and Mr. Hiras Sirait for their technical assistance during laboratory work.

References

1. ELISABETH, J., A. JATMIKA, and K. SINAGA. 1999. Synthesis of n-3 PUFA-rich palm oil by lipase-catalyzed acidolysis. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 7(1) : 43-56.
2. ELISABETH, J. 2000. Studies of the specificity of lipases toward EPA and DHA: Its implication on synthesis of n-3 PUFA-rich glyceride. Paper presented at Evaluation and Monitoring Seminar of The Young Academic Program, URGE Project. Jakarta, September 2000.
3. FOGLIA, T.A. and P. VILLENEUVE. 1997. *Carica papaya* latex lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(11): 1447-1449.
4. GANDHI, N.N. 1997. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(6): 621-634.
5. JACHMANIAN, I. and K.D. MUKHERJEE. 1996. Esterification and interesterification reactions catalyzed by acetone powder from germinating rapeseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(11): 1527-1532.
6. LOWRY, R.R. and T.J. TINSLEY. 1975. Rapid colorimetric determination of fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53:470-472.
7. MACRAE, A.R. 1983. Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(2):243-246.
8. MUKHERJEE, K.D. 1990. Enzymatic modification of fat and other lipids. *Biocatalyst* 3:277-282.
9. MUKHERJEE, K.D. 1994. Plant lipases and their application in lipid biotransformations. *Prog. Lipid Res.* 33(1/2):165-174.
10. PEDERSEN, S.B. and G. HOLMER. 1995. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72(2): 239-243.
11. TANAKA, Y., J. HIRANO, T. FUNADA and R. HASHIZUME. 1993. Triglyceride specificity of *Candida cylindracea* lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70(10): 1031-1034.

ooOoo