

CHARACTERIZATION OF IMMOBILIZED LIPASE IN ALUMINOSILICATE FOR LACTOSYL PALMITATE SYNTHESIS

Karakterisasi Lipase yang Diimobilisasi dalam Aluminosilikat untuk Sintesis Laktosil Palmitat

Anna Roosdiana*, Tutik Setianingsih, Diah Mardiana, and Suratmo

Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Brawijaya University, Malang, 65145

Received January 30, 2009; Accepted June 30, 2009

ABSTRACT

Whey lactose can be esterified enzymatically by using immobilized lipase. The lipase can be isolated from *Rhizopus oryzae*, purified and immobilized in mesoporous aluminosilica. The use of immobilized lipase has advantages, there are longer shelf life and repeatable use. It is necessary to characterize the immobilized lipase and ester product. The aim of the research was to characterize immobilized lipase, including determination lipase adsorption type in mesoporous aluminosilicate, immobilized lipase stability during storage time, efficiency of repetitive use of immobilized lipase. The result showed that lipase adsorption in mesoporous aluminosilicate was physical adsorption type through hydrogen bond and electrostatic interaction. Immobilized lipase stability was relatively constant at storage temperature 5 °C for 25 days resulting in 98.16% of initial activity. The repetitive use of immobilized lipase showed efficient until 5 uses within activity of 50.22%. The IR spectra of lactosyl palmitate from both whey and pure lactose result showed bands at wavelength number of 3462 cm^{-1} (OH bond), 1739 cm^{-1} and 1747 (C=O ester bond) 1295 cm^{-1} dan 1242 cm^{-1} (C-O ester bond). In addition, the HLB value for lactosyl palmitate (whey) 4.708 and lactosyl palmitate (pure lactose) 4.715, therefore both lactosyl palmitate is appropriate as emulgator in W/O.

Keywords: immobilized lipase, aluminosilica, lactose, whey, lactosyl palmitate

PENDAHULUAN

Limbah susu (whey) masih banyak mengandung laktosa 4,8% [1] yang sampai saat ini belum dimanfaatkan secara optimal. Karena itu untuk meningkatkan pemanfaatan limbah susu dapat dilakukan pembuatan ester laktosa dengan menggunakan biokatalis enzim lipase. Keuntungan pembuatan ester laktosa secara enzimatik adalah tidak menghasilkan reaksi samping dan ester laktosa yang dihasilkan kemungkinan dapat digunakan untuk keperluan industri maupun rumah tangga, antara lain sebagai biosurfaktan

Lipase dapat diproduksi dari berbagai jenis mikroorganisma secara ekstraseluler, tetapi lipase yang termasuk esterifikasi banyak dihasilkan oleh kapang antara lain, *Mucor miehei* dan *Rhizopus oryzae*. Pada media pertumbuhan yang sama, lipase yang dihasilkan oleh *Rhizopus oryzae* lebih banyak dibandingkan dengan *Mucor miehe* [2]. Di bidang industri, penggunaan enzim untuk katalisis reaksi memiliki keterbatasan, karena memerlukan biaya yang mahal pada penggunaan enzim bebas, sehingga penggunaan enzim imobil merupakan alternatif untuk menekan biaya. Novozym 435 merupakan lipase imobil yang masih aktif pada penyimpanan beberapa minggu dan dapat digunakan secara berulang [3].

Pada umumnya lipase mempunyai massa molekul relatif berkisar 33 - 65 kDa yang setara dengan ukuran molekul 48Å [4]. Lipase hasil isolasi dari *Rhizopus oryzae* telah menunjukkan aktivitas esterifikasi untuk katalisis reaksi esterifikasi laktosa dengan asam palmitat. Lipase hasil isolasi dari *Rhizopus oryzae* perlu dimurnikan untuk mendapatkan aktivitas spesifik yang lebih tinggi. Lipase hasil pemurnian dapat diimobilkan dalam aluminosilikat mesopori menghasilkan kapasitas adsorpsi 123mg/g dengan aktivitas 147,81 U[5]. Untuk penggunaan lipase imobil lebih lanjut, maka lipase imobil perlu dilakukan karakterisasi antara lain jenis adsorpsi lipase dalam aluminosilikat, kestabilan lipase imobil selama penyimpanan, efisiensi aktivitas lipase, dilengkapi dengan identifikasi laktosil palmitat yang dihasilkan.

Ester laktosa termasuk dalam ester gula. Sintesis ester gula ini dipengaruhi oleh perbandingan mol antara gula dan asam lemak bebas, pelarut organik, temperatur dan aktivitas air. Semakin kecil aktivitas air semakin tinggi konversi ester gula [6]. Ester laktosa yang dihasilkan secara enzimatik baik dari bahan dasar laktosa murni atau laktosa whey perlu dilakukan karakterisasi fisikokimia. Salah satu karakter biosurfaktan yang penting adalah kemampuan untuk mereduksi tegangan permukaan antar muka dari air dan minyak. Pada umumnya parameter untuk

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-34575835
Email address : aroos@brawijaya.ac.id

mengukur aktivitas surfaktan adalah cmc. Karakter lain yang sering digunakan adalah nilai HLB (*Hydrophilic-lipophilic balance*). Nilai HLB lebih kecil dari 6, lebih larut dalam fasa minyak dan surfaktan berfungsi sebagai emulsifier yang mempunyai nilai HLB lebih besar dari 9-18 berfungsi untuk emulsifier O/W [7].

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang diperlukan adalah PDA (*Potato Dextrose Agar*), glukosa, pepton, ekstrak khamir, laktosa, whey (komposisi air 3,5%, protein kasar 11,7%, laktosa 70%, lipida 0,5% dan Abu 10,80%), asam palmitat, asam sitrat, asam asetat glasial, t-butanol, etanol, metanol, kloroform, KH_2PO_4 , NaCl, MgSO_4 , aluminium sulfat, natrium silikat, setiltrimetil amonium bromida (CTAB), tetrametil amonium hidroksida, mesitilen span 60, span 80.

Alat

Seperangkat alat gelas, tanur, *autoclave*, sentrifuse dingin, surface area meter, *Melting point apparatus*, spektrofotometer Inframerah, Spektrofotometer UV-Visible, Inkubator.

Prosedur Kerja

Preparasi lipase imobil

Produksi enzim lipase dilakukan dengan menumbuhkan *Rhizopus oryzae* dalam 250 mL media pertumbuhan, pH 6, selama 96 jam pada temperatur kamar dan kecepatan pengocokan 100 rpm. Media hasil fermentasi ditambah 25 mL larutan bufer sitrat pH 5 sebanyak 10%, disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm dan temperatur 4 °C. Supernatan merupakan ekstrak kasar lipase, selanjutnya ekstrak kasar lipase dimurnikan dengan pengendapan amonium sulfat dengan kejenuhan 20 - 60%. Ekstrak kasar lipase sebanyak 200 mL diberi 22,6 g amonium sulfat, diaduk hingga larut, selanjutnya disentrifugasi pada 5000 rpm, temperatur 4 °C selama 30 menit. Supernatan yang didapat ditambahkan 52,4 g ammonium sulfat, diaduk hingga larut, selanjutnya disentrifugasi pada 5000 rpm, temperatur 4 °C selama 30 menit. Endapan yang terbentuk merupakan lipase hasil pengendapan oleh amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20 - 60%. Endapan lipase ditambah 10 mL larutan buffer sistrat fosfat 0,2M pH 5 dan dimasukkan dalam kantong selopan, kemudian direndam dalam 100 mL larutan buffer sitrat fosfat 0,07 M, pH 5 dalam 250 mL gelas beaker sambil diaduk menggunakan stirrer pada temperatur 4 °C. Dialisis dilakukan selama 24 jam,

kemudian larutan buffer diganti dengan buffer perendam yang baru sampai semua garam terpisah. Lipase hasil pemurnian diimobilkan pada aluminosilikat mesopori dengan cara menambahkan 50 mL suspensi lipase 3467 ppm ke dalam 1 g aluminosilikat dengan waktu reaksi 3 jam, kecepatan pengocokan 100 rpm. Kemudian lipase imobil disaring pada kertas Whatman No 1, dan dikeringkan di dalam desikator pada temperatur kamar.

Penentuan jenis adsorpsi lipase pada aluminosilikat mesopori

Lipase imobil diuji jenis adsorpsinya dengan melakukan desorpsi, yaitu 0,1 g lipase imobil dalam aluminosilikat mesopori dimasukkan ke dalam 5 mL akuades, 5 mL etanol, 5 mL HCL 0,1N, 5 mL bufer sitrat pH 5, masing-masing dikocok pada 100 rpm selama 3 jam. Kadar lipase dalam supernatan ditentukan melalui penentuan kadar protein secara spektrofotometri menggunakan metode Biuret. Semua percobaan dilakukan 3 kali ulangan.

Uji pengaruh kondisi penyimpanan lipase yang diimobilisasi dalam aluminosilikat mesopori

Enzim imobil dalam aluminosilikat diuji kestabilan pada variasi waktu penyimpanan (0, 5, 10, 15, 20, 25) hari, temperatur (5, 25, 30) °C terhadap aktivitas dalam mengkatalisis reaksi esterifikasi laktosa dan asam palmitat. Semua percobaan dilakukan 3 kali ulangan. Aktivitas lipase diukur berdasarkan kadar asam palmitat sebelum dan sesudah reaksi menggunakan titrasi alkalimetri persatuan waktu per jumlah enzim [8], laktosa 0,036 g direaksikan dengan 0,256 g asam palmitat, 0,1 g enzim imobil, 5 mL t-butanol di dalam erlenmeyer selama 24 jam pada temperatur 50 °C. Setelah itu ditambahkan 3 tetes indikator fenolftalein 1%, selanjutnya dititrasi dengan larutan KOH alkoholis 0,1653 M hingga terbentuk warna merah muda. Blanko yaitu campuran sebelum inkubasi, dititrasi dengan larutan KOH. Satu unit aktivitas lipase imobil adalah banyaknya asam palmitat (μg) yang bereaksi dengan laktosa dalam satu menit hasil katalisis oleh 1 g lipase imobil.

Uji efisiensi pemakaian lipase imobil

Laktosa 0,036 g (0,0514 g whey) direaksikan dengan 0,256 g asam palmitat dengan perbandingan mol 1:10, 0,1 g lipase imobil, 10 mL t-butanol diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 24 jam, kemudian lipase imobil disaring dan dicuci dengan t-butanol, lipase imobil hasil saringan dipakai kembali untuk membuat ester laktosa sampai 7 kali pemakaian ulang. Semua pekerjaan dilakukan 3 kali ulangan. Setiap pemakaian lipase imobil, diukur aktivitasnya.

Lipase imobil dikatakan masih efektif apabila efisiensi aktivitas di atas 50%.

Identifikasi dan karakterisasi fisikokimia laktosil Palmitat

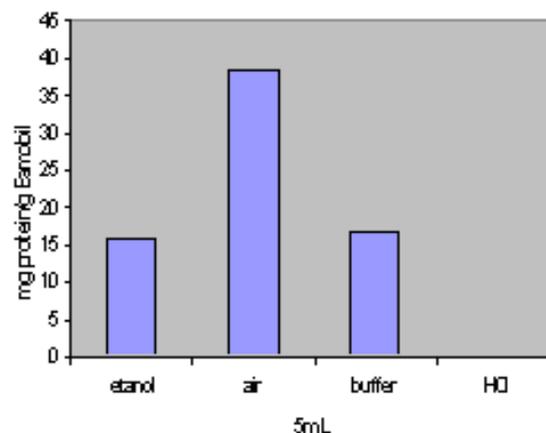
Laktosa 3,6 g dan asam palmitat 15,36 dalam 100 mL t- butanol direaksikan dengan 1 g lipase diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 24 jam. Pada akhir reaksi, enzim dipisahkan dengan cara filtrasi dan pelarutnya dievaporasi. Asam palmitat yang tidak bereaksi dan produk dilarutkan dalam kloroform kemudian disaring untuk memisahkan laktosa yang tidak bereaksi. Filtrat diidentifikasi menggunakan metode Khaled [9], yaitu dengan cara kromatografi lapis tipis dengan adsorben Kieselgel 60 dan eluen kloroform/metanol/asam asetat/air (80:10:8:2 v/v). Pemurnian ester laktosa dilakukan dengan kromatografi cair dengan Metode Ducret [9] menggunakan eluen kloroform/metanol/asam asetat/air (64:10:8:2 v/v). Eluat diuapkan menggunakan evaporator. Padatan yang terbentuk dilarutkan di dalam aseton untuk rekristalisasi. Kristal laktosil palmitat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan spektrofotometer IR sedangkan penentuan nilai HLB laktosil palmitat ditentukan menggunakan metode Gupta, menggunakan piridin/benzena (95:5 v/v) sebagai pelarut dan dititrasi dengan akuades[10].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Jenis Adsorpsi Lipase pada Aluminosilikat Mesopori

Lipase mempunyai titik isoelektrik pada pH 6,8, karena itu lipase diisolasi pada kondisi pH buffer 5, supaya lipase dalam keadaan larut dan bermuatan positif. Lipase dalam supernatan dimurnikan dengan cara pengendapan, menggunakan amonium sulfat dengan persen kejenuhan 20 - 60%. Lipase dari hasil fraksi pengendapan didialisis dan hasilnya diimobilisasi dalam aluminosilikat. Pada umumnya lipase mempunyai massa molekul relatif 33 - 65 kDa dan ukuran lipase setara dengan 48Å [4], sehingga lipase murni dapat diimobilisasi dalam aluminosilikat mesopori, kapasitas adsorpsi aluminosilikat mesopori terhadap lipase adalah 123 mg lipase/g lipase imobil [5].

Aluminosilikat mempunyai pori dengan gugus fungsi OH dan pada kondisi ini bermuatan negatif sehingga lipase dimungkinkan diadsorpsi oleh aluminosilikat mesopori dengan interaksi elektrostatik. Selain itu adanya interaksi mungkin disebabkan oleh ikatan hidrogen, hidrogen atau oksigen dari silanol atau situs asam Bronsted dengan oksigen atau hidrogen pada gugus karboksilat dengan hidrogen dari amina lipase dan juga adanya interaksi lain yaitu Van der

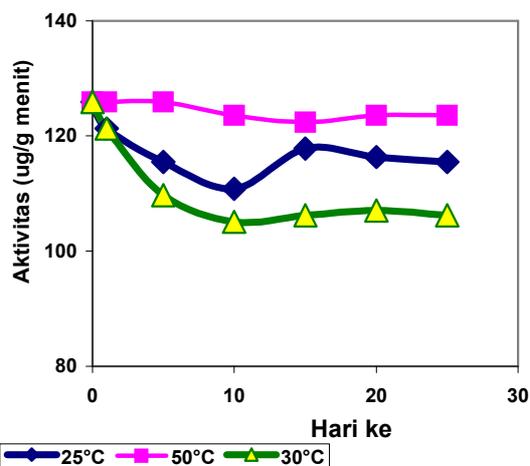


Gambar 1. Desorpsi lipase imobil terhadap HCl, buffer pH5, etanol dan air

Waals. Untuk memastikan jenis ikatan tersebut maka lipase imobil didesorpsi terhadap HCl, buffer pH5, etanol dan air. Hasil desorpsi lipase imobil ditampilkan pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil desorpsi, tampak bahwa penggunaan air maupun etanol menyebabkan terjadi pemutusan ikatan hidrogen antara lipase dan aluminosilikat, sehingga protein lipase tersolvasi dan dilepaskan ke dalam fasa ruah. Namun, ikatan hidrogen yang terbentuk antara air-protein lipase dibandingkan dengan etanol-protein lipase lebih kuat sehingga menyebabkan jumlah protein yang dilepaskan saat dilakukan desorpsi menggunakan air menjadi lebih tinggi, berturut-turut 38,61 mg dan 15 mg untuk 1 g lipase imobil. Hal yang sama juga dapat terjadi untuk desorpsi menggunakan larutan buffer pH 5. Pada pH 5 enzim lipase cenderung bermuatan positif dan terikat secara elektrostatik dengan muatan negatif pada aluminosilikat. Tetapi, antaraksi elektrostatik ini dapat diganggu karena adanya proses kesetimbangan antara lipase pada permukaan aluminosilikat dengan fasa ruah, sehingga menimbulkan beda potensial kimia antara keduanya dan menyebabkan sebagian lipase dapat berdifusi ke dalam fasa ruah.

Berbeda dengan desorpsi dalam larutan HCl, muatan positif lipase di dalam HCl akan bertambah sehingga antaraksi elektrostatik antara lipase dan permukaan aluminosilikat akan semakin kuat dan tidak ada protein lipase yang terlepas. Selain itu, HCl di dalam larutan berada sebagai H⁺ dan Cl⁻. Ukuran H⁺ yang kecil berpotensi lebih mudah masuk ke dalam rongga pori dan berikatan dengan gugus COO⁻ enzim membentuk COOH dan berikatan dengan O pada Si-O-Al membentuk situs asam Bronsted. Serangan H⁺ tersebut berakibat hilangnya muatan negatif pada Al dan putusya antaraksi elektrostatik antara enzim dan aluminosilikat. Namun keadaan tersebut tidak menye-



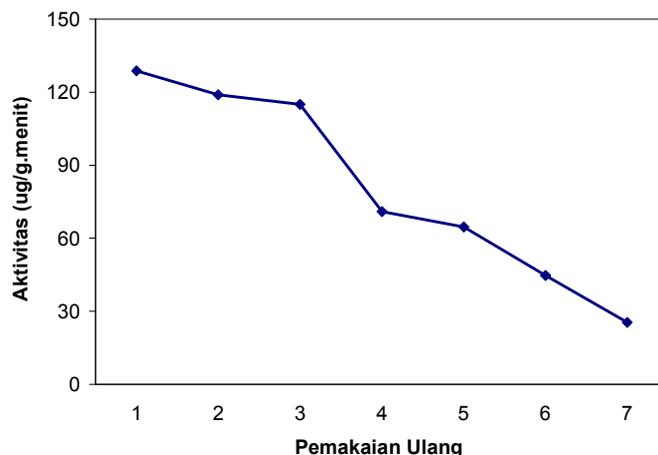
Gambar 2. Kestabilan lipase imobil dalam aluminosilikat mesopori terhadap waktu dan temperatur penyimpanan

babkan desorpsi karena berganti menjadi interaksi yang lain, yaitu ikatan hidrogen dan gaya Van der Waals. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa jenis adsorpsi lipase pada aluminosilikat termasuk jenis adsorpsi fisika, melalui ikatan hidrogen dan gaya elektrostatik.

Uji pengaruh kondisi penyimpanan lipase imobil

Lipase merupakan senyawa protein yang kestabilannya dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, seperti pH, suhu, media penyimpanan. Lipase yang diisolasi dari *Candida antarctica* dan diimmobilisasi dalam resin akrilat (Novozym 435), pada penyimpanan dalam media isopropil alkohol pada temperatur 50 °C aktivitas menurun menjadi 70% dari aktivitas semula. Penyimpanan lipase imobil dalam media aseton selama 18 hari pada temperatur 40 °C aktivitas menurun menjadi 50% dari semula [3]. Karena itu, pada penelitian dilakukan uji pengaruh waktu dan temperatur penyimpanan terhadap aktivitas lipase imobil dan hasilnya ditampilkan pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2, Kestabilan lipase imobil pada temperatur 30 °C selama 10 hari mengalami penurunan aktivitas sampai 16,51%, setelah itu penyimpanan sampai 25 hari menunjukkan aktivitas yang konstan, hal ini dikarenakan lipase merupakan senyawa protein yang memungkinkan mengalami degradasi secara partial pada temperatur 30 °C, dan akan mengubah struktur tiga dimensi protein. Sebagai akibatnya, konformasi lipase menjadi kurang cocok terhadap substrat. Penurunan aktivitas sebesar 11,93% juga dijumpai pada penyimpanan selama 10 hari pada 25 °C, akan tetapi pada penyimpanan 15 hari aktivitas lipase naik dan turun kembali pada hari ke 20 hari kemudian relatif konstan pada hari ke 25. Terjadinya kenaikan



Gambar 3. Efisiensi Pemakaian ulang lipase imobil

aktivitas, kemungkinan disebabkan oleh sebagian ikatan yang terputus mengakibatkan terbentuknya bagian yang membentuk sisi aktif baru, tetapi pemutusan ikatan lebih lanjut kemungkinan membentuk konformasi yang tidak sesuai dengan sisi aktif dan menjadi tidak cocok dengan substrat.

Penyimpanan lipase imobil pada temperatur 5 °C selama 25 hari menunjukkan kecenderungan stabil, hal ini membuktikan bahwa lipase imobil tidak dipengaruhi oleh temperatur yang rendah. Karena itu penyimpanan lipase imobil dalam jangka panjang sebaiknya dilakukan dalam keadaan kering pada temperatur 5 °C.

Uji Efisiensi Pemakaian Lipase Imobil

Penggunaan enzim dalam keadaan bebas tidak dapat dipakai secara berulang, karena enzim sulit untuk dipisahkan dari campuran reaksi. Berbeda dengan enzim bebas, penggunaan lipase imobil mempunyai keuntungan yaitu dapat digunakan secara berulang. Pada penelitian ini lipase imobil dilakukan penggunaan enzim sampai 7 kali pemakaian dan diuji aktivitasnya. Hasil uji efisiensi ditampilkan pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3 pemakaian ulang lipase yang diimmobilisasi dalam aluminosilikat mesopori sampai 5 kali ulangan masih menunjukkan efisiensi aktivitas sebesar 50,22% dari aktivitas semula. Bila dibandingkan dengan Novozym 435, efisiensi penggunaan ulang lipase imobil dalam aluminosilikat mesopori menunjukkan hasil yang lebih baik, karena Novozym 435 hanya dapat dipakai sebanyak 3 kali ulangan dengan aktivitas 59% dari semula [3].

Penurunan aktivitas pada penggunaan ulang terjadi karena saat reaksi esterifikasi selama 24 jam, temperatur 50 °C dalam media tersier butanol, kemungkinan lipase sudah ada yang terlepas. Hal ini sesuai dengan lipase yang diimmobilisasi dalam

aluminosilikat mesopori mengalami desorpsi sebanyak 15,83 mg lipase tiap 1 gram lipase imobil atau jumlah lipase yang didesorpsi sebanyak 12,67%. Disamping itu, penyimpanan lipase pada 50 °C selama 24 jam akan mengakibatkan terjadinya inaktivasi lipase, sehingga untuk pemakaian ulang dua kali atau lebih aktivitas lipase akan menurun.

Identifikasi dan karakterisasi fisikokimia laktosil Palmitat

Reaksi esterifikasi gula oleh asam lemak terjadi melalui mekanisme *pingpong*, yaitu lipase akan bereaksi dengan asam lemak membentuk asil lipase dan air, kemudian asil lipase bereaksi dengan gula membentuk ester dan lipase akan dilepas kembali. Konsentrasi gula, asam lemak, air dan media pelarut organik akan mempengaruhi jumlah produk ester [11]. Lipase memiliki 3 asam amino yang berfungsi sebagai sisi aktif yaitu asam aspartat, histidin dan serin (Asp-His-Ser) yang letaknya berdekatan dan berperan dalam reaksi esterifikasi [12], karenanya mekanisme reaksi esterifikasi laktosa oleh asam palmitat akan berlangsung melalui tahap asilasi dan deasilasi.

Hasil esterifikasi laktosa oleh asam palmitat pada rasio mol laktosa : asam palmitat 1:6 menghasilkan persentase konversi 68,93%. Laktosil palmitat yang dihasilkan perlu diidentifikasi untuk memastikan terbentuknya ester laktosil palmitat. Spektra IR untuk ester dari laktosa murni dan laktosa whey menunjukkan pita serapan 3462 cm^{-1} (OH), 1739 cm^{-1} dan 1747 cm^{-1} (ikatan C=O ester), 1295 cm^{-1} dan 1245 cm^{-1} (ikatan C-O ester). Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua gugus hidroksil pada laktosa teresterifikasi terbukti dengan masih ada pita serapan OH.

Karakter laktosil palmitat yang perlu diketahui adalah nilai HLB, nilai HLB di bawah 6 dapat digunakan sebagai emulgator pada sistem W/O dan HLB lebih besar dari 9 dapat digunakan sebagai emulgator pada sistem O/W [7]. Nilai HLB pada laktosil palmitat dari laktosa whey dan laktosa murni menunjukkan berturut-turut 4,708 dan 4,715, dengan demikian laktosil palmitat dapat digunakan sebagai emulgator pada sistem air dalam minyak.

KESIMPULAN

Jenis adsorpsi lipase hasil isolasi dari isolasi dari *Rhizopus oryzae* pada aluminosilikat mesopori merupakan jenis adsorpsi fisika melalui ikatan hidrogen dan antaraksi elektrostatis. Kestabilan lipase yang diimobilisasi dalam aluminosilikat mesopori menunjukkan aktivitas relatif konstan selama waktu penyimpanan 25 hari pada temperatur 5 °C, sedangkan pada temperatur penyimpanan 25 - 30 °C selama 25

hari aktivitas menunjukkan penurunan sebesar 16,51%. Pemakaian ulang lipase imobil masih menunjukkan efisien pada penggunaan 5 kali ulangan dengan aktivitas 50,22% dari aktivitas semula. Ester laktosil palmitat telah berhasil disintesis secara enzimatik dibuktikan dari spektra IR dan laktosil palmitat dapat digunakan sebagai emulgator pada sistem air dalam minyak

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami sampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, DIKTI atas kepercayaan dan pemberian Dana PHB XIV Tahun anggaran 2006-2007.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ranken, M.D and Kill, R.C, 1993, Food Industries Manual, 23rd Edition, Blackie Academic & Professional, 126-128.
2. Roosdiana, Setianingsih, Mardiana, and Suratmo, 2006, International Conference on Mathematics and Natural Sciences, Bandung, Indonesia.
3. Sekeroglu, G., Fadiloglu, S., and Ibanoglu, E., 2004, *J. Sci. Food. Agric.*, 82, 1516-1522.
4. Vakhlu, J. and Kour, A., 2006, *Electron. J. Biotechnol.*, 9, 1, 1-7.
5. Roosdiana, Setianingsih, Mardiana, and Suratmo, 2006, Pembuatan Ester laktosa dari Limbah Susu (Whey) menggunakan Lipase Yang diimobilisasi dalam aluminosilikat, Laporan PHB, Universitas Brawijaya.
6. Gulati, R., Arya, P., Malhotra, B., Prasad, A.K., Saxena, R.K., Kumar, J., Watterson, A.C., and Parmar, V.S., 2003, *Arkivoc.*, 159-170.
7. Lin, S.C., 1996, *J. Chem. Biotech.*, 66, 109-120
8. Fadiloglu, S. and Soylennez, 1998, *Turkish J. Eng. Env. Sci.*, 241-247.
9. Ducret, A., Giroux, A., Trani, M., and Lortie, 1996, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 73, 1, 109-133.
10. Gupta, R.K., James, K., and Smith F.J., 1983, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 60, 4, 862-869.
11. Flores, V.F. and Halling, P.J., 2002, *Biotechnol. Bioeng.*, 78, 797-801.
12. Wong, D.W., 1995, *Food Enzyme*, Chapman and Hall, New York.