

# Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi

Niken Candra Bestari<sup>1)</sup>, Suharjono<sup>2)</sup>

<sup>1),2)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

Email : <sup>1)</sup> [ncbestari@gmail.com](mailto:ncbestari@gmail.com) & <sup>2)</sup> [calistus@ub.ac.id](mailto:calistus@ub.ac.id)

## ABSTRAK

Banyaknya industri pengolahan ikan di Muncar, Banyuwangi, menghasilkan limbah cair yang mengandung minyak ikan. Bakteri lipolitik yang hidup dalam limbah cair tersebut dapat menghidrolisis lipid menjadi asam lemak dan gliserol dengan memproduksi lipase. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat bakteri lipolitik yang unggul dari limbah cair pabrik ikan. Isolasi bakteri menggunakan media mineral sederhana, uji kualitatif enzim berdasarkan diameter zona bening menggunakan substrat minyak zaitun 5 % ditambah metil merah 0,01 %. Data diameter zona bening pada hari ke-7 inkubasi dianalisis menggunakan One-Way ANOVA dengan taraf signifikansi 95%. Aktivitas lipase dari 4 isolat dengan diameter zona bening tertinggi diuji secara kuantitatif dengan metode titrimetri menggunakan NaOH 0,03 N. Diameter zona bening isolat 1me, 3ma, 3mb, dan 3mc secara berurutan adalah 4,08±0,21 mm; 3,94±0,03 mm; 3,99±3,15 mm; dan 4,02±0,15 mm. Aktivitas lipase optimum isolat 1me, 3ma, 3mb, dan 3mc secara berurutan sebesar 3,52 U/ml (jam ke-24); 3,98 U/ml (jam ke-30); 3,74 U/ml (jam ke-34), dan 4,05 U/ml (jam ke-34).

Kata kunci : aktivitas lipase, bakteri, diameter zona bening, titrimetri.

## ABSTRACT

The fish processing industry in Muncar, Banyuwangi, produced wastewater containing fish oil. Lipolytic bacteria that live in the wastewater could hydrolyze lipids into fatty acids and glycerol by way of produced lipase. This study was aimed to obtain excellent lipolytic bacterial isolates from fish mill wastewater. Isolation of bacteria using a simple mineral media, enzyme qualitative test based clear zone diameter using olive oil 5% as substrate plus 0,01% methyl red. Data of diameter clear zone on the 7th day of incubation were analyzed using One-Way ANOVA with a significance level of 95%. Lipase activity of 4 isolates with the highest diameter clear zone were tested quantitatively by titrimetric method using 0.03 N NaOH. Diameter clear zone of isolates 1me, 3ma, 3mb, and 3mc respectively was 4,08±0.21 mm; 3,94±0.03 mm; 3,99±3.15 mm; and 4.02±0.15 mm. Optimum lipase activity of isolates 1me, 3ma, 3mb, and 3mc respectively was 3,52 U/ml (24 hours); 3,98 U/ml (20 hours); 3,74 U/ml (34 hours); and 4,05 U/ml (34 hours).

Key words: bacteria, diameter clear zone, lipase activity titrimetric.

## PENDAHULUAN

Kabupaten Banyuwangi memiliki potensi kelautan yang tinggi, salah satunya di Kecamatan Muncar yang menjadi sentral pengolahan ikan. Terdapat setidaknya 67 industri pengolahan ikan skala besar dan menengah, dengan total kapasitas produksinya 1.209 ton perhari, sedangkan kapasitas produksi dari 40 industri pengolahan ikan skala kecil/rumah tangga, rata-rata produksi perharinya adalah 203,4 ton [15]. Limbah yang dibuang oleh pabrik hasil samping pengolahan ikan terdiri dari, nitrat (NO<sub>3</sub>), fosfat (PO<sub>4</sub>), sulfida (H<sub>2</sub>S), ammonia (NH<sub>3</sub>-N), klorin bebas [14] dan yang paling banyak adalah senyawa lipid dari minyak ikan [15]. Lingkungan yang telah lama tercemar serta kolam pengolahan limbah dimungkinkan terdapat bakteri

pendegradasi lipid tersebut yang alamiah, bersaing maupun membentuk konsorsium dengan mikroba lainnya [1].

Aktivitas mikroba dalam mendegradasi lipid dalam limbah cair pabrik ikan terkait dengan kemampuan mikroba tersebut dalam menghasilkan enzim lipase disebut dengan lipolitik. Lipase (Triasilgliserol lipase) adalah soluble enzyme menghidrolisis triasilgliserol untuk membebaskan asam lemak bebas dan gliserol.

Lipase memiliki pengaplikasian yang besar di bidang bioteknologi. Lipase bakteri dipakai secara ekstensif pada industri pengolahan makanan dan susu untuk menghidrolisis lemak susu, pematangan keju, peningkatan rasa sintetik, dan proses lipolisis dalam pembuatan keju dan krim [3]. Lipase juga dipakai dalam

industri deterjen sebagai bahan aditif pada bubuk pembersih [5], dalam industri tekstil untuk meningkatkan kemampuan absorpsi produk [16], dalam sintesis senyawa atau polimer biodegradable [12] dan reaksi diferensiasi transesterifikasi [6]. Enzim ini digunakan sebagai katalis untuk memproduksi produk-produk kosmetik [3], pada industri kertas, sintesis biodiesel [13], industri pengolahan kulit sintesis, dan industri farmasi [8].

Lipase telah diisolasi dan dimurnikan dari kapang, khamir, bakteri, tumbuhan, dan hewan [10], dari sumber isolasi tersebut, lipase yang berasal dari bakteri lebih bernilai secara ekonomis dan lebih stabil [18]. Mikroba penghasil lipase dapat ditemukan pada habitat yang mendukung seperti limbah industri, pabrik pengolahan minyak, dan tanah yang terkontaminasi minyak [9], seperti lingkungan daerah pembuangan limbah cair pabrik ikan di Muncar. Oleh karena itu, pengujian aktivitas lipase bakteri yang berasal dari limbah cair tersebut perlu dilakukan untuk mengetahui sejauh mana potensi lipolitiknya agar mendapatkan isolat unggul yang dapat diaplikasikan dalam remediasi maupun dalam bidang bioteknologi.

## METODE PENELITIAN

### **Sampling, isolasi, dan karakterisasi.**

Sampel diambil di PT Multi Agro, PT Maya Muncar, dan PT Sari Laut. Sampel limbah cair diisolasi menggunakan serial dilusi  $10^{-1} - 10^{-7}$ . Komposisi media isolasi (g/l)  $\text{NaNO}_3$  7 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g; KCl 0,1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{CaCl}_2$  0,025 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,025 g; dan ekstrak khamir 1 g. Media tersebut ditambah dengan komponen *trace element* (g/l)  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,26 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,06 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,50 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,70 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,50 g; sebanyak 0,5 ml untuk setiap liter media (0,05 %) dan minyak zaitun steril sebanyak 10 %. Bakteri diinkubasi suhu  $37^\circ \text{C}$  selama 24-48 jam. Setelahnya, koloni bakteri dikarakterisasi berdasarkan ciri optik. Isolat bakteri dimurnikan pada media miring berisi Trypticase Soy Agar (TSA) dengan tambahan Tween-80.

## METODE PENELITIAN

### **Sampling, isolasi, dan karakterisasi.**

Sampel diambil di PT Multi Agro, PT Maya Muncar, dan PT Sari Laut. Sampel limbah cair diisolasi menggunakan serial dilusi  $10^{-1} - 10^{-7}$ . Komposisi media isolasi (g/l)  $\text{NaNO}_3$  7 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g; KCl 0,1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{CaCl}_2$  0,025 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,025 g; dan ekstrak khamir 1 g. Media tersebut ditambah dengan komponen *trace element* (g/l)  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0,26 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,06 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,50 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,70 g; dan  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,50 g; sebanyak 0,5 ml untuk setiap liter media (0,05 %) dan minyak zaitun steril sebanyak 10 %. Bakteri diinkubasi suhu  $37^\circ \text{C}$  selama 24-48 jam. Setelahnya, koloni bakteri dikarakterisasi berdasarkan ciri optik. Isolat bakteri dimurnikan pada media miring berisi Trypticase Soy Agar (TSA) dengan tambahan Tween-80.

**Uji kualitatif zona bening.** Bakteri hasil pemurnian diambil 1 ose dan dibiakkan selama 24 jam di 5 ml media cair dengan komposisi NaCl 1 %, ekstrak khamir 1 %, pepton 2 %, Tween-80 1 %, dan minyak zaitun steril 2 %. Kertas cakram berdiameter  $\pm 5$  mm dicelupkan ke media cair selama 10-15 menit kemudian di letakkan media padat cawan petri dengan komposisi (perliter) pepton 10 g, NaCl 5 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1 g, Agar 20 g, Tween-80 2,5 %, dan minyak zaitun steril 5 %. Media ditambah dengan metil merah 0,01 %. Cawan diinkubasi selama 7 x 24 jam dan pada hari ke-7 dihitung diameter zona beningnya dengan cara membagi diameter melintang total zona bening dengan diameter koloni bakteri.

**Uji kuantitatif aktivitas lipase.** Media yang digunakan sama dengan media cair uji kualitatif. Uji aktivitas lipase ini dilakukan bersama dengan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri. Setiap *sampling*, 4 ml kultur diambil dan disentrifugasi 8000 rpm, 10 menit, suhu  $4^\circ \text{C}$ . Supernatan disaring dan didapatkan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim 1 ml ditambah 1 ml minyak zaitun steril, dan 2 ml buffer fosfat pH 7 kemudian diinkubasi suhu  $40^\circ \text{C}$ , 90 menit. Setelah diinkubasi, ditambah larutan aseton : etanol (1:1) 5 ml dan diberi 2 tetes indikator phenolphthalein (pp) kemudian dititrasi dengan NaOH 0,03 N hingga mulai berubah warna menjadi merah muda pucat. Aktivitas lipase dapat dihitung dengan cara sebagai berikut (1) [17].

Aktivitas lipase (U/ml) =  $\frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{(VE \times 90)} \dots (1)$ .

Keterangan :

A = Volume (ml) NaOH untuk titrasi sampel.

B = Volume (ml) NaOH untuk titrasi blanko.

1000 = Konversi ke mmol ke  $\mu\text{mol}$ .

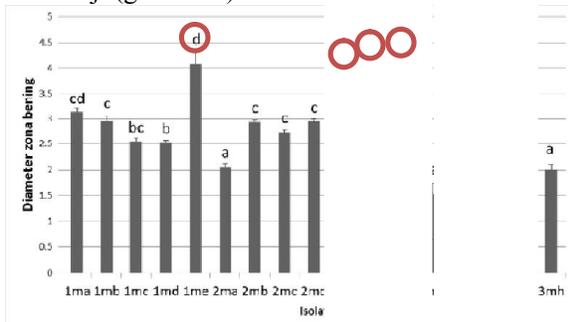
90 = Waktu inkubasi.

VE = Volume total campuran ekstrak kasar.

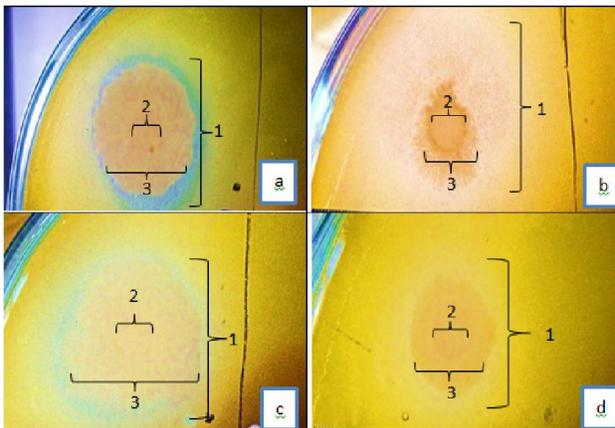
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Uji kualitatif lipolitik.** Ditemukan 17 isolat bakteri dari hasil isolasi dan diuji berdasarkan diameter zona bening. Pengamatan selama 7 hari inibertujuan untuk mengetahui perubahan aktivitas masing-masing isolat. Isolat yang memiliki diameter zona bening yang tinggi pada hari pertama belum tentu memiliki diameter

zona bening yang tinggi pula pada hari terakhir. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengukuran diameter zona bening selama 7 hari berturut-turut. Dari 17 isolat, ditemukan 4 isolat bakteri yang berdiameter zona bening dengan perbedaan signifikan tertinggi ( $p < 0,05$ ) (gambar 1). Isolat dengan diameter tertinggi yaitu 1me, 3ma, 2mb, dan 3mc dengan diameter zona bening berturut-turut sebesar  $4,08 \pm 0,21$  mm;  $3,94 \pm 0,03$  mm;  $3,99 \pm 3,15$  mm; dan  $3mc$   $4,02 \pm 0,15$  mm. Bakteri penghasil lipase yang baik dapat dilihat dari kekuatan pembentukan zona bening dan diameter zona bening yang dihasilkan pada media uji (gambar 2).



Gambar 1. Uji kualitatif diameter zona bening masing-masing isolat pada hari ketujuh



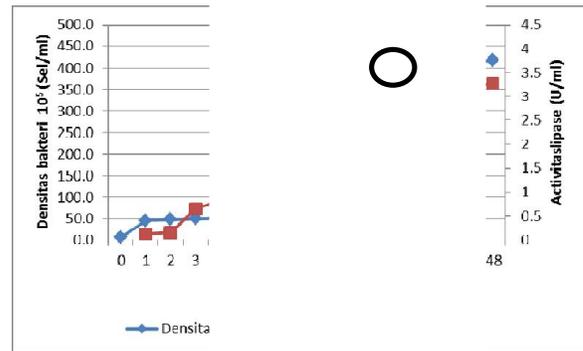
Gambar 2. Zona bening aktivitas bakteri lipolitik pada hari ketujuh.

(a) 1me, (b) 3ma, (c) 3mb, dan (d) 3mc

Keterangan :

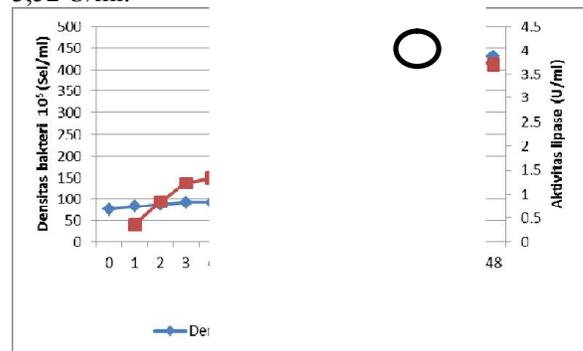
(1) Zona bening, (2), Kertas cakram, (3) Lebar koloni bakteri

**Uji kuantitatif aktivitas lipase.** Ekstrak kasar lipase diproduksi secara ekstraselular dan diukur dengan metode titrimetri. Ekstrak kasar diperoleh dari hasil pemisahan sel bakteri dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^\circ\text{C}$  untuk menghindari denaturasi protein [11].



Gambar 3. Kurva pertumbuhan dan aktivitas lipase isolat 1me

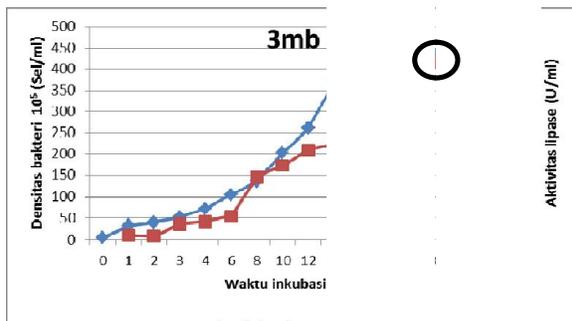
Aktivitas lipase diukur seiring dengan pertumbuhan sel bakteri yang bertujuan untuk mengetahui hubungan aktivitas lipolitik saat fase-fase tertentu pada pertumbuhan bakteri dan memiliki satuan Unit per ml (U/ml). Satu unit lipase (U) didefinisikan sebagai jumlah kebutuhan lipase per menit untuk membebaskan  $1 \mu\text{mol}$  asam lemak dari minyak zaitun sebagai substrat (Shu dkk., 2009). Isolat 1me dan memiliki konstanta rerata laju pertumbuhan sebesar 0,28 generasi/jam serta waktu generasi logaritmik selama 3,7 jam (Gambar 3). Sementara itu, aktivitas lipasenya mulai meningkat pada jam ke-3 sampai mencapai tingkat optimum pada jam ke-24 dengan densitas bakteri sebanyak  $4,08 \times 10^7$  sel/ml dengan nilai aktivitas lipase sebesar 3,52 U/ml.



Gambar 4. Kurva pertumbuhan dan aktivitas lipase isolat 3ma

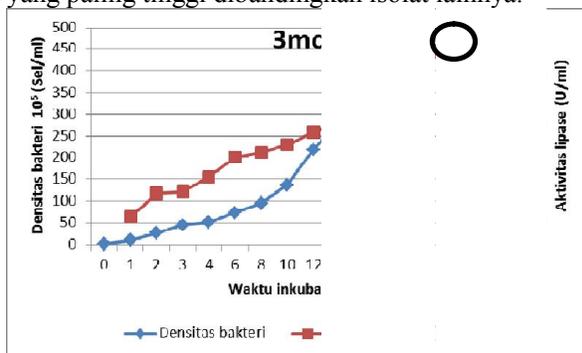
Isolat 3ma memiliki konstanta rerata laju pertumbuhan sebesar 0,07 generasi/jam dengan waktu generasi logaritmik selama 13,3 jam (Gambar 4). Isolat 3ma memiliki aktivitas lipase optimum pada jam ke-30 inkubasi dengan densitas bakteri sebanyak  $4,25 \times 10^7$  sel/ml dan nilai aktivitas lipase sebesar 3,98 U/ml.

Isolat 3mb memiliki rerata laju pertumbuhan sebesar 0,19 generasi/jam dan waktu generasi logaritmik selama 5,4 jam (Gambar 5). Aktivitas lipase pada isolat 3mb mengalami kenaikan setelah jam ke-6 setelahnya terus meningkat dan mengalami nilai optimum pada jam ke-34 dengan inkubasi densitas bakteri sebanyak  $4,34 \times 10^7$  sel/ml dan nilai aktivitas lipase sebesar 3,74 U/ml.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan dan aktivitas lipase isolat 3mb

Isolat 3mc memiliki rerata laju pertumbuhan sebesar 0,26 generasi/jam serta waktu generasi logaritmik selama 4 jam (Gambar 9). Aktivitas lipase isolat 3mc juga mengalami kenaikan seiring dengan fase pertumbuhan bakteri. Sama dengan isolat 3mb, aktivitas lipase optimum isolat 3mc juga terjadi pada waktu inkubasi jam ke-34 dengan densitas bakteri sebanyak  $4,73 \times 10^7$  sel/ml dan aktivitas lipase sebesar 4,05 U/ml. Isolat 3mc menunjukkan aktivitas lipase optimum yang paling tinggi dibandingkan isolat lainnya.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan dan aktivitas lipase isolat 3mc

Aktivitas lipase tertinggi pada isolat 1me, 3ma, dan 3mc terjadi pada waktu berbeda, namun masih dalam kisaran fase akhir eksponensial atau logaritmik, kecuali isolat 3mb yang memiliki aktivitas tertinggi pada fase stasioner awal (Gambar 5). Jika melihat kurva fase pertumbuhan dan kurva aktivitas lipase, dapat dikatakan bahwa isolat bakteri menunjukkan aktivitas lipase dengan mengikuti pola pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, aktivitas lipase pada masing-masing isolat diduga sebagai bagian dari aktivitas metabolit primer isolat bakteri. Hal ini didukung oleh pernyataan Koch dkk. (2003), bahwa aktivitas metabolit primer berjalan seiring fase pertumbuhan mikroba, mengalami kenaikan optimal pada akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner, dan dapat mengalami penurunan seiring aktivitas mikroba yang menurun dan berkurangnya nutrisi sebagai substrat.

Haba dkk., (2000) mendapatkan bakteri *Staphylococcus aureus* CECT 9 yang ditumbuhkan dalam media mengandung substrat minyak zaitun bekas pakai sebanyak 2 % memiliki aktivitas lipase paling tinggi sebesar 0,7 U/ml setelah 72 jam inkubasi. Haba dkk. (2009) juga menguji aktivitas lipase menggunakan substrat minyak bunga matahari bekas pakai sebanyak 2 % pada *Staphylococcus aureus* CECT 9 menghasilkan aktivitas sebesar 2,4 U/ml setelah inkubasi selama 144 jam. Contoh substrat lain adalah [2] minyak hati ikan cod dan minyak castor masing-masing 2,5 % pada bakteri bakteri *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 menghasilkan aktivitas lipase optimum sebesar 14,8 U/ml dan 13,7 U/ml setelah 48 jam inkubasi pada suhu 30° C.

Aktivitas lipase sangat dipengaruhi oleh jenis mikroba, substrat, konsentrasi, suhu, serta waktu inkubasi yang berhubungan dengan fase pertumbuhan mikroba. Oleh karena itu, besarnya aktivitas lipase pada penelitian ini tidak bisa dijadikan tolak ukur tetap karena aktivitas lipase pada masing-masing isolat dapat berbeda-beda pada setiap fase dan pada setiap waktu inkubasi. Konsentrasi dan jenis substrat juga berpengaruh pada besarnya aktivitas lipase. Oleh itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai optimasi aktivitas lipase dari berbagai parameter tersebut.

## KESIMPULAN

Dari total 17 isolat, terdapat 4 isolat yang memiliki diameter zona bening tertinggi, yaitu isolat 1me ( $4,08 \pm 0,21$  mm), 3ma ( $3,94 \pm 0,03$  mm) 3mb ( $3,99 \pm 3,15$  mm), dan 3mc ( $4,02 \pm 0,15$  mm). Isolat 3mc dinyatakan sebagai isolat terunggul dengan menghasilkan aktivitas lipase optimum tertinggi sebesar 4,05 U/ml pada jam ke-34 inkubasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih pada pihak berwenang PT Multi Agro, PT Maya Muncar, dan PT Sari Laut. Kami mengucapkan terima kasih atas bantuan dari rekan-rekan Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya atas segala masukan dan bantuannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Cooper, P.F., D.A. Hobson & Susan Jones. 1990. Sewage treatment by reed bed system. *J. IWEM* 3:11-14.
- [2] Esakkiraj, P., M. Rajkumarbharathi, A. Palavesam, G.Immanuel. 2009. Lipase production by *Staphylococcus epidermidis* CMST-Pi 1 isolated from the gut of shrimp

- Penaeus indicus*. *J. Ann Microbiol.*; 60:37–42.
- [3] Eugene, W.S. 1974. Industrial application of microbial lipases : a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*;51(2): 12-16.
- [4] Falch, A. & E. Falch. 1991. Industrial Enzymes Developments In Production And Application. *J. Biotechnol Adv.*;9: 643-658.
- [5] Fuji, T., T. Tataru and M. Minagawa, 1986. Studies on *Propionibacterium acnes* lipase in seborrheic application of lipolytic enzyme in detergent dermatitis and other skin diseases and unsei-in. *J. Am. Oil Chem. Soc.*; 63: 796-799.
- [6] Habu, E., O. Bresco, C. Ferrer, A. Marques, M. Busquets, A. Manresa. 2000. Isolation of lipase secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *J. Enzyme Microbial. Techno.*;26:40-44.
- [7] Hasan, F., A. S. Aamer, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *J. Enzyme Microbial. Tech.*; 39;2: 235-251.
- [8] Higaki, S., M. Morohashi, 2003. Studies on *Propionibacterium acnes* lipase in seborrheic application of lipolytic enzyme in detergent dermatitis and other skin diseases and Unsei-in. industries. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63: 796-799.
- [9] Jaeger, K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. 1994. *Bacterial lipases*. *FEMS Microbiol. Rev.* 15 (1994)29–63.
- [10] Joseph, B., P. Ramteke, G. Thomas. 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *J. Biotechnol. Ad.*; 26:457–470.
- [11] Kurnia, D.R.D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai biokatalis pada proses gliserolisis untuk menghasilkan monoasilgliserol*. Tesis Program Pascasarjana Jurusan Teknik Kimia Universitas Diponegoro. Semarang.
- [12] Linko, Y.Y., M. Lamsa, X. Wu, E. Uosukainen. 1998. Detection and determination of products by lipase biocatalyse. *J. Biotechnol.*; 66(1): 41-50.
- [13] Nouredini, H., X. Gao & R.S. Philkana. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *J. Bioresour.* 269:5771-5779.
- [14] Rizqon, M. 2013. *Pengaruh Pencemaran Limbah Cair Industri Pengolahan Ikan Terhadap Kualitas Air Tanah di Kecamatan Muncar Kabupaten Banyuwangi*. Skripsi Sarjana Pendidikan. Program Pendidikan Geografi UM. Malang.
- [15] Setiyono & Satmoko Yudo. 2008. *Dampak pencemaran lingkungan akibat limbah industri pengolahan ikan di Muncar (studi kasus kawasan industri pengolahan ikan di Muncar, Banyuwangi)*. *JAI* (4),1: 23-27..
- [16] Sharma, R., Y. Christi and U.C. Banerjee. 2001. Production, purification, characterization and production application of lipases. *J. Biotech. Ad.*;19:627-662.
- [17] Shu, Zhengyu, Lin R., Jiang H., Zhang Y., Wang M., Huang J. 2009. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *J. Bioscience Bioengineering* (107) 6; 658-661.
- [18] Snellman, E.A., E.R. Sullivan and R.R. Colwell, 2002. Purification and properties of the extracellular immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for lipase, LipA, of acinetobacter sp. RAG-1. *J. Bioresour* 269: 5771-5779.
- [19] Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *J. Biotechnol. Progr*; 15: 147-157.