

PEMURNIAN DAN SIFAT-SIFAT FRUKTOSA ESTER ASAM LEMAK SAWIT YANG DISINTESIS SECARA ENZIMATIS

Tjahjono Herawan, Rakmi Abdul-Rahman¹ dan Othman Omar²

ABSTRAK

Etil asetat telah digunakan sebagai pelarut dalam pemurnian fruktosa ester asam lemak sawit secara khromatografi elusi. Dengan menggunakan pelarut ini hampir seluruh fruktosa ester yang disintesis secara enzimatis seperti fruktosa palmitat, fruktosa oleat dan fruktosa stearat dapat diisolasi, sementara dengan menggunakan pelarut khloroform hanya fruktosa palmitat dan fruktosa stearat saja yang dapat diisolasi. Hasil analisis sifat-sifat fisika kimia menunjukkan bahwa fruktosa ester ini mempunyai titik leleh antara 49 - 52,3 °C dan hydrophile lipophile balance yang termasuk ke dalam rentang untuk penggunaan kosmetik, deterjen dan makanan. Surfaktan ini juga dapat menurunkan tegangan permukaan air dari 72 dyne/cm kepada 38,3 dyne/cm.

Kata kunci : fruktosa ester, asam lemak sawit

PENDAHULUAN

Gula ester atau karbohidrat ester yang digunakan untuk makanan dan kosmetik (*food grade*) haruslah bebas dari bahan beracun dan pelarut organik, asam lemak bebas, gula yang tidak bereaksi dan sabun serta harus tidak berbau, tidak berasa dan bentuknya menarik. Masalah ekonomis dalam penghilangan sabun, pelarut dan warna yang tidak diinginkan dari produk merupakan penghalang utama di dalam produksi, isolasi dan peningkatan penggunaan produk sebagai emulsifier atau pengganti lemak dalam makanan. Oleh karena itu, beberapa penelitian diarahkan kepada pemurnian produk gula

ester mentah yang meliputi proses-proses netralisasi, *bleaching* untuk menurunkan warna, pencucian, distilasi untuk menghilangkan asam lemak bebas dan pelarut, penyulingan, penghilangan bau dan khromatografi (1).

Keuntungan dari pembuatan gula ester, dalam hal ini fruktosa ester, menggunakan proses enzimatis adalah sedikitnya pengotor yang ada dalam produk mentah, seperti pelarut, gula yang tidak bereaksi, asam lemak dan biokatalis. Pelarut sangat mudah dipisahkan secara penguapan pada tekanan rendah. *Lipozyme* sebagai biokatalis, karena bentuknya yang granula atau terimobilisasi, dapat dipisahkan dari produk mentah secara filtrasi.

Masalah yang timbul dalam pemurnian fruktosa ester mentah hasil sintesis secara proses enzimatis adalah pemisahan kelebihan asam lemak di dalam produk. Karena alasan ini, Khaled *et al.* (6) telah melakukan suatu kajian mengenai

1) Profesor Madya di Jabatan Kejuruteraan Kimia & Proses, Fakulti Kejuruteraan, Universiti Kebangsaan Malaysia

2) Profesor di Jabatan Biokimia, Fakulti Sains Hayat, Universiti Kebangsaan Malaysia

pemurnian gula ester. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa dialisis melalui membran latek memungkinkan untuk mendapatkan gula ester dengan kemurnian lebih dari 98%. Meskipun mereka telah berhasil, namun metode ini masih mahal untuk diterapkan dalam skala besar. Metode lain yang dapat digunakan untuk memurnikan fruktosa ester adalah khromatografi elusi.

Khromatografi elusi telah berkembang dari awal penggunaannya yang terbatas pada laboratorium kimia sebagai metode pemisahan. Tetapi pada saat ini metode ini banyak mempengaruhi beberapa bidang penggunaan seperti kedokteran, farmasi, teknologi kimia, ilmu pangan dan sebagainya. Metode ini juga telah digunakan oleh Jasper *et al.* (5) dalam pemisahan sukrosa ester asam lemak menggunakan khromatografi cair kinerja tinggi, tetapi mereka hanya menggunakan metode ini untuk analisis kuantitatif saja. Ducret *et al.* (3) juga menggunakan khromatografi elusi untuk pemurnian gula ester, tetapi mereka menggunakan khloroform sebagai pelarut utama atau fasa geraknya. Karena khloroform bersifat racun, dalam penelitian ini khloroform diganti dengan etil asetat yang mempunyai sifat lebih aman untuk kesehatan dan tidak bersifat racun.

Tulisan ini membahas metode pemurnian fruktosa ester mentah menggunakan khromatografi kolom sederhana. Dalam penelitian ini digunakan fasa gerak yang berbeda namun mempunyai parameter kepolaran yang hampir sama, yang diharapkan dapat diterapkan dalam skala yang lebih besar. Sifat fisika-kimia dari fruktosa ester yang disintesis dari fruktosa dan asam lemak sawit distilat se-

cara proses enzimatis menggunakan *Lipozyme IM* sebagai biokatalis juga dilaporkan pada tulisan ini.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fruktosa dari Merck, asam lemak sawit distilat (tanpa pemurnian), *Lipozyme IM* (lipase *Mucor miehei* terimobilisasi, dengan keaktifan 6 BAUN/gram) dan kolom khromatografi (50 x 2,5 id cm) dengan Kieselgel 60 sebagai fasa diam. Seluruh pelarut organik yang digunakan sebagai fasa gerak adalah bermutu sesuai untuk keperluan analitik.

Metode

Penyediaan

Sebanyak 1,44 gram (setara dengan 8 mmol) fruktosa dicampur dengan 22,64 gram (sekitar 80 mmol) asam lemak sawit, 10% (w/w substrat) *Lipozyme IM* dan 100 ml tert-butil alkohol (2-metil-2-propanol). Penelitian dilakukan dalam labu 250 ml dan diguncang dengan inkubator pengguncang mekanis (pada 250 rpm) pada 55 °C selama 24 jam. Pada akhir reaksi, enzim dipisahkan dengan filtrasi dan pelarut diuapkan.

Pemurnian

Dalam penelitian ini digunakan dua jenis pelarut utama, yaitu khloroform dan etil asetat. Penggunaan dua jenis pelarut ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap produk yang diperoleh.

Contoh fruktosa ester mentah dilarut-

kan dalam khloroform atau etil asetat (bergantung kepada fasa gerak yang digunakan) dan diletakkan pada bagian atas kolom khromatografi yang mengandung Kieselgel 60. Kemudian kolom dielusi dengan khloroform atau etil asetat pada laju alir 0,1 ml/mnt (gravitasi) hingga warna kuning hilang (untuk menghilangkan asam lemak bebas) dan selanjutnya dielusi dengan campuran khloroform (atau etil asetat)/metanol/air = 64/10/1 v/v/v dengan laju alir yang sama untuk mengisolasi fruktosa ester. Pada tahap akhir pelarut diuapkan pada tekanan rendah untuk mendapatkan produk. Produk dikristalisasi dengan menambahkan aseton hangat (40 °C) dan dibiarkan selama semalam dalam lemari pendingin. Kedua produk hasil proses pemurnian yang menggunakan pelarut berbeda ini dianalisis.

Analisis

Analisis kualitatif produk dilakukan dengan Gilson HPLC. Pemisahan dilakukan pada kolom Supelcosil LC 18, 5 µm (250 x 4,6 mm) pada laju alir 0,7 ml/mnt dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Fasa gerak mengandung metanol:asam asetat (99,7%:0,3% v/v).

Spektrum infra merah dicatat dalam FT-IR spektrofotometer model FTS 165, menggunakan lapisan film surfaktan dalam KBr. Tegangan permukaan diukur dalam air suling pada suhu ruang 28 °C menggunakan Fisher Surface Tensiometer Model 21.

Titik leleh dari surfaktan diamati dengan alat Electrothermal. Sementara nilai *hydrophile lipophile balance* (HLB)

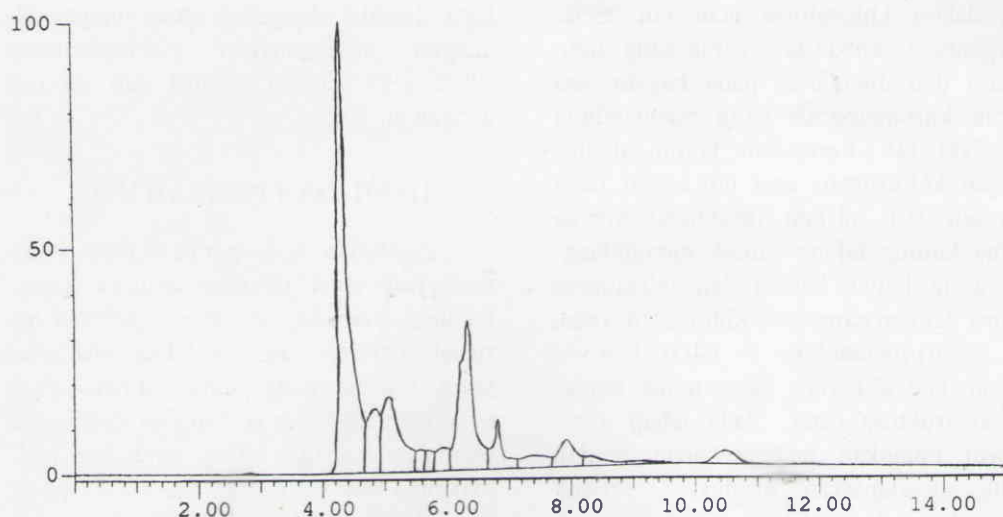
juga dianalisis dengan metode Gupta (4) dengan menggunakan piridin/benzena (95/5 v/v) sebagai pelarut dan dititrasi dengan air suling.

HASIL DAN PEMBAHASAN

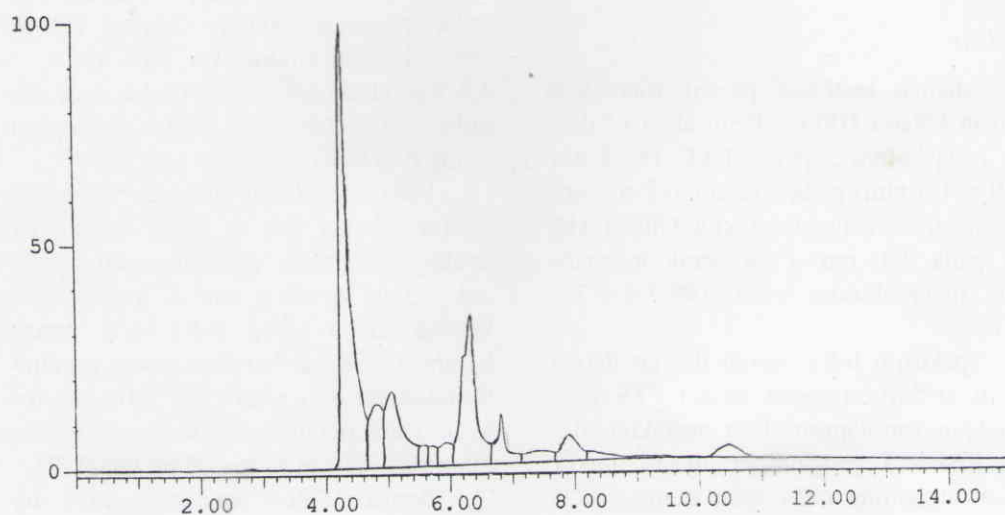
Pemilihan fasa gerak dalam khromatografi elusi dibatasi dengan keperlunya, yaitu cairan yang digunakan haruslah cairan yang memiliki viskositas yang rendah pada suhu kamar. Pada penelitian ini, karena fruktosa ester akan digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan dan kosmetik, maka fasa gerak yang digunakan haruslah pelarut yang tidak toksik. Karena khloroform bersifat toksik, pada penelitian ini khloroform yang biasa digunakan sebagai fasa gerak diganti dengan etil asetat. Etil asetat lebih aman bagi kesehatan dibandingkan dengan khloroform. Etil asetat dipilih karena memiliki parameter kepolaran yang hampir sama dengan khloroform (etil asetat = 4,4 dan khloroform = 4,1) dan juga memiliki viskositas yang rendah pada suhu ruang (0,43 cP).

Pada penelitian ini elusi gradien dipilih sebagai metode elusi karena banyaknya kelebihan asam lemak dalam produk. Elusi gradien adalah suatu kasus khusus dalam tahap elusi yang berciri komposisi pelarut berubah secara kontinu. Keuntungan dari teknik ini terutama terletak pada peningkatan sensitivitas yang dihasilkan dari pita yang lebih tajam (7).

Analisis HPLC dari fraksi yang diekstraksi dengan pelarut pertama nampak pada Gambar 1a dan 1b. Gambar ini menunjukkan bahwa seluruh fraksi hanya mengandung asam lemak (dibandingkan dengan bahan baku asam lemak sawit).



Gambar 1a. Hasil analisis HPLC untuk Fraksi 1 (larut dalam khloroform), pemisahan dalam kolom Supelcosil LC 18, 5 μ m (250 x 4,6 id mm) pada laju alir 0,7 ml/mnt dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Fasa gerak mengandung metanol : asam asetat (97,7 : 0,3 v/v)

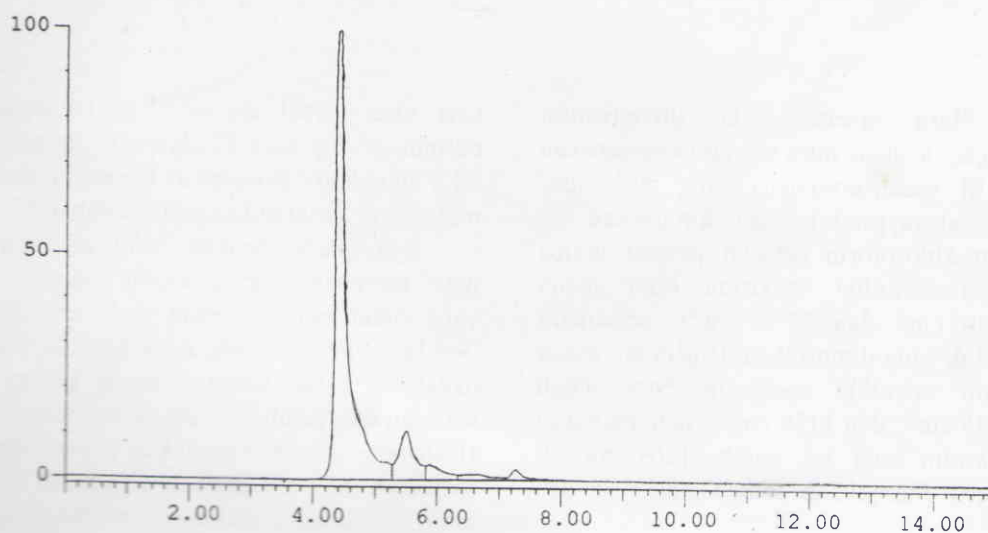


Gambar 1b. Hasil analisis HPLC untuk Fraksi 1 (larut dalam etil asetat), pemisahan dalam kolom Supelcosil LC 18, 5 μ m (250 x 4,6 id mm) pada laju alir 0,7 ml/mnt dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Fasa gerak mengandung metanol : asam asetat (97,7 : 0,3 v/v)

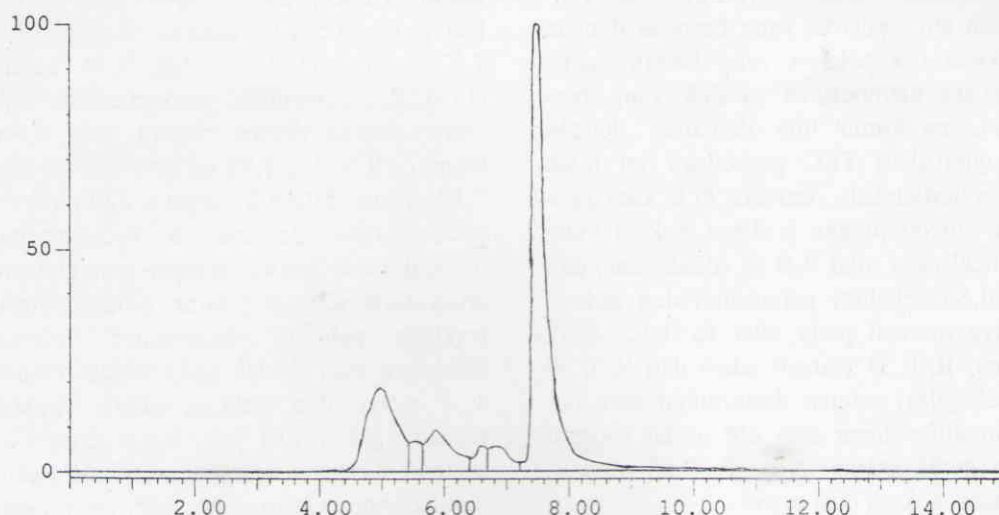
Metode khromatografi elusi menggunakan jenis pelarut yang berbeda dengan parameter kepolaran yang hampir sama ternyata memberikan produk yang berbeda, meskipun bila dianalisis dengan menggunakan TLC perbedaan ini tidak dapat terdeteksi. Analisis TLC dari produk menunjukkan terdapat noktah yang muncul pada nilai R_f 0,53 (tidak jelas) dan R_f 0,89 sebelum pemurnian dan noktah hanya muncul pada nilai R_f 0,32 (tidak jelas), R_f 0,53 (sangat jelas) dan R_f 0,89 (tidak jelas) setelah dimurnikan baik dengan khloroform atau etil asetat sebagai fasa gerak utama. Nilai R_f 0,53 menunjukkan noktah dari ester.

Analisis HPLC menunjukkan bahwa produk yang dimurnikan dengan mengu-

nakan khloroform sebagai fasa gerak hanya memberikan puncak utama pada 4,37 menit (80,77%) dan 5,44 menit (11,02%), sementara menggunakan etil asetat puncak utama muncul pada 4,96 menit (20,66%), 5,85 menit (9,08%) dan 7,52 menit (59,49%) seperti ditunjukkan pada Gambar 2a dan 2b. Gambar ini menunjukkan bahwa dengan penggunaan khloroform sebagai pelarut, diduga hanya fruktosa palmitat (bercampur dengan kelebihan asam lemak pada waktu retensi 4,37 menit) dan fruktosa stearat (waktu retensi 5,44 menit) yang dapat diisolasi, sementara dengan menggunakan etil asetat diduga hampir seluruh fruktosa ester yang tersintesis dapat diisolasi.



Gambar 2a. Hasil analisis HPLC untuk Fraksi 2 (larut dalam khloroform/metanol/air), pemisahan dalam kolom Supelcosil LC 18, 5 μ m (250 x 4,6 id mm) pada laju alir 0,7 ml/menit dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Fasa gerak mengandung metanol : asam asetat (97,7 : 0,3 v/v)



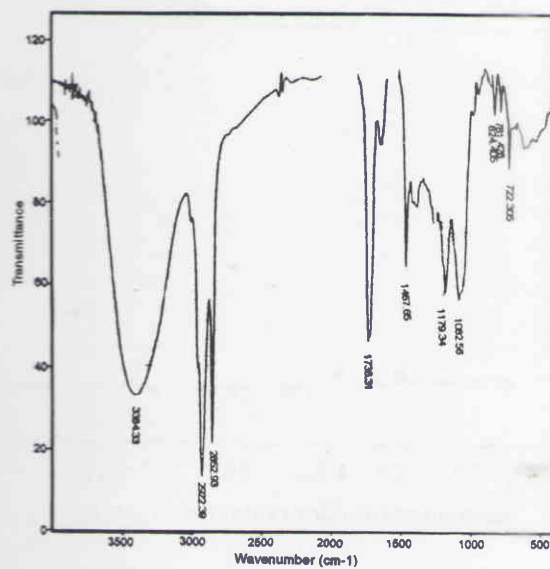
Gambar 2b. Hasil analisis HPLC untuk Fraksi 2 (larut dalam etil asetat/metanol/air), pemisahan dalam kolom Supelcosil LC 18, 5 μ m (250 x 4,6 id mm) pada laju alir 0,7 ml/mnt dan dideteksi dengan detektor Gilson 116 UV pada 280 nm. Fasa gerak mengandung metanol : asam asetat (97,7 : 0,3 v/v)

Hasil tersebut diatas dikonfirmasi dengan analisis infra merah menggunakan FT-IR spektrofotometri yang menunjukkan bahwa produk yang dimurnikan dengan khloroform sebagai pelarut utama hanya memiliki spektrum ester jenuh (1736 cm^{-1} dan 1179 cm^{-1}), sementara produk yang dimurnikan dengan etil asetat selain memiliki spektrum ester jenuh (1735 cm^{-1} dan 1179 cm^{-1}) juga memiliki spektrum ester tak jenuh (1269 cm^{-1}), seperti ditunjukkan pada Gambar 3a dan 3b.

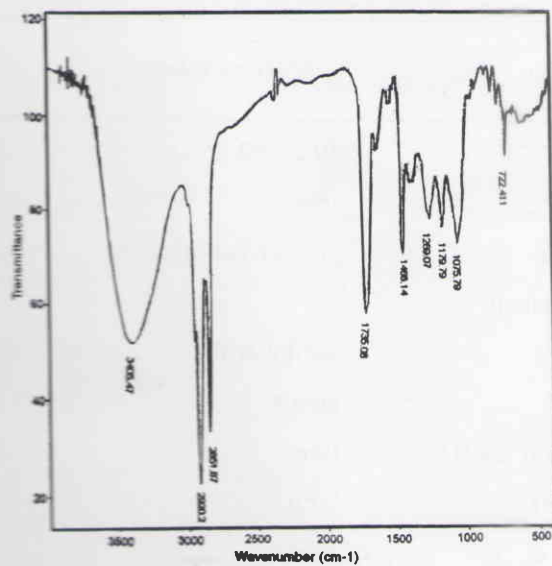
Salah satu karakteristik surfaktan yang paling penting adalah kemampuannya untuk menurunkan tegangan antarmuka dan tegangan permukaan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fruk-

tosa ester dapat menurunkan tegangan permukaan air dari 72 dyne/cm menjadi 38,3 dyne/cm. Penurunan tegangan permukaan air ditunjukkan pada Gambar 4.

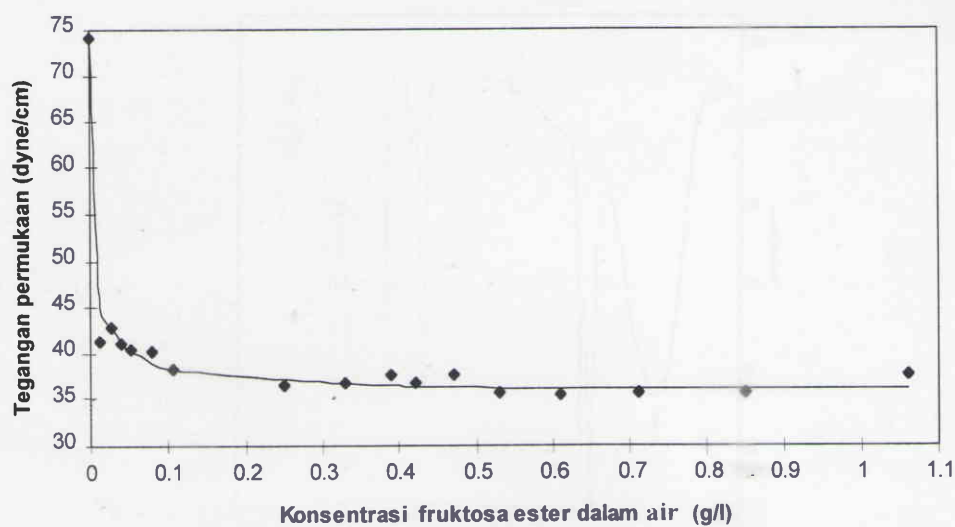
Hydrophile-lipophile balance (HLB) juga merupakan karakteristik surfaktan yang cukup penting. Pada skala tertinggi (9 -18) surfaktan adalah hidrofilik dan dapat bertindak sebagai bahan pelarut, deterjen dan emulsifier air dalam minyak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan yang disintesis dari fruktosa dan asam lemak sawit distilat ini memiliki nilai HLB 16+. Nilai ini menunjukkan bahwa surfaktan ini dapat digunakan sebagai bahan kosmetik, deterjen dan emulsifier minyak dalam air. Sifat fisika-kimia yang lain dicantumkan pada Tabel 1.



Gambar 3a. Spektrum infra merah dari fruktosa ester yang dimurnikan dengan pelarut khloroform



Gambar 3b. Spektrum infra merah dari fruktosa ester yang dimurnikan dengan pelarut etil asetat



Gambar 4. Penurunan tegangan permukaan air akibat pemberian fruktosa ester

Tabel 1. Sifat fisika-kimia dari surfaktan

No	Uraian	Fruktosa ester ^{a)}	Span 60 ^{b)}
1	Titik leleh (°C)	49,2 - 52,3	54,2 - 55,3
2	HLB ^{c)}	16+	5,0
3	Bentuk fisik	<i>powder</i> putih-kuning	<i>powder</i> putih
4	Kelarutan dalam:		
	- Air 28 °C	sedikit larut	tidak larut
	- Air 60 °C	emulsi	tidak ada data
	- Khloroform 28 °C	larut	larut
	- Aseton 60 °C	larut	larut
	- Metanol 60 °C	larut	sedikit larut

a) Dibuat dari fruktosa dan asam lemak sawit distilat dengan proses enzimatis

b) Sorbitan monostearat komersial dengan HLB 4,7, disintesis secara proses kimia

c) *Hydrophile-lipophile balance*, dianalisis dengan metode Gupta (4)

KESIMPULAN

Etil asetat dapat digunakan sebagai pelarut untuk memurnikan fruktosa ester asam lemak sawit. Hampir seluruh fruktosa ester hasil sintesis seperti fruktosa palmitat, fruktosa oleat dan fruktosa stearat dapat diisolasi dengan pelarut ini. Fruktosa ester memiliki titik leleh 49 - 52,3 °C dan HLB 16+ yang menunjukkan bahwa surfaktan ini dapat digunakan sebagai bahan kosmetik, deterjen dan emulsifier air dalam minyak. Surfaktan ini juga dapat menurunkan tegangan permukaan air dari 72 dyne/cm menjadi 38,3 dyne/cm.

DAFTAR PUSTAKA

1. AKOH, C.C. (ed). 1994. Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes. Marcel Dekker, Inc., New York, 269 p.
2. ATTWOOD, D. and A.T FLORENCE. 1983. Surfactant system. Their Chemistry, Pharmacology and Biology. Champman and Hall. New York. 794 p.
3. DUCRET, A., A. GIROUX, M. TRANI, and R. LORTIE. 1996. Enzymatic preparation of biosurfactant from sugar or sugar alcohol and fatty acids in organic media under reduced pressure. *Biotech. and Bioeng.* 48(3): 214-221.
4. GUPTA, R.K. K. JAMES and F.J SMITH. 1983. Sucrose esters and sucrose ester/glyceride blends as emulsifier. *JAOCS* 60(4): 862 - 869.
5. JASPER, M.E.A.P., F.F. LEEUWEN, H.J.W NIEUWENHUIS, and G.M VIANEN. 1987. High performance liquid chromatographic separation of sucrose fatty acid ester. *JAOCS* 64(7): 1021 - 1025.
6. KHALED, N., D. MONTET, M. PINA, and J. GRAILLE. 1991. Fructose oleate synthesis in a fixed bed reactor. *Biotechnology Letters* 13(3): 162 - 172.
7. RAVINDRANATH, B. 1989. Principles and Practice of Chromatography. John Wiley & Son, New York, 502 p.

Purification and properties of enzymatic synthesis of fructose esters of palm fatty acid

Tjahjono Herawan, Rakmi Abdul-Rahman¹ and Othman Omar²

Abstract

Ethyl acetate has been used as a solvent in the purification of fructose ester of palm fatty acid by elution column chromatography. Almost all fructose esters synthesized by enzymatic process, such as fructose palmitate, fructose oleate, and fructose stearate could be isolated. Using chloroform as solvent, only fructose palmitate and fructose stearate could be isolated. Analysis of physicochemical properties shows that this surfactant has a melting point of 49 - 52.3 °C and hydrophile-lipophile balance which covers the range suitable for used in cosmetics, detergent, and foods. This surfactant could also reduce surface tension of water from 72 dyne/cm to 38 dyne/cm.

Key words : fructose ester, palm fatty acid

¹ Associate Professor at Dept. of Chemical and Process Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Kebangsaan Malaysia

² Professor at Dept. of Biochemistry, Faculty of Life Science, Universiti Kebangsaan Malaysia

Introduction

Sugar esters or carbohydrate esters which can be used in food and cosmetics (food grade) must be free from toxic and organic solvents, free fatty acids, unreacted sugar, and soap, and must be odorless, tasteless, and visually attractive. The problem of economically removing unwanted soaps, solvent, and color from products is major deterrent in the production, isolation, and increased use of the products as emulsifiers or fat substitutes in food. Therefore, some research effort has been directed towards the purification of crude sugar esters product which may involve neutralization, bleaching to reduce coloring materials, washing, distillation to remove free fatty acids and solvent, refining, deodorization and chromatographic process (1).

The advantage of the preparation of sugar ester, in this case fructose ester, using enzymatic process is only slight impurities are present in the crude product, such as solvent, unreacted sugar, unreacted fatty acids, and biocatalyst. The solvent is easily separated by evaporation under vacuum. Lipozyme as a biocatalyst, because of its granule or immobilized form, can be separated from crude product by filtration.

The problem in the purification of crude fructose ester synthesized by enzymatic process is separation of excess fatty acid in the product. With this in mind, Khaled *et al.* (6) carried out a study of sugar esters purification. Their result showed that dialysis through a latex membrane made it possible to obtain a sugar ester more than 98% pure. However, this

method is still expensive to be applied in large scale.

Another method that can be used for purifying crude fructose ester is by elution chromatography. The elution chromatographic process has become a long way from its early confine of chemical laboratory as a separation method. But at present its considerable impact on several user disciplines, such as medicine, pharmacy, chemical technology, food science, and many more. This method has been used by Jasper *et al.* (5) on the separation of sucrose fatty acid esters using high performance liquid chromatography, but they just used this method for quantitative analytical only. Ducret *et al.* also used elution chromatographic for purification of their sugar ester, but they used chloroform as the main eluent or mobile phase (3). Because of its toxicity, in this experiment chloroform has been changed to ethyl acetate which is safer to health and non-toxic.

This paper reports the method of purification of crude fructose esters using simple or traditional column liquid chromatography. In this work different types of mobile phase with similar polarity parameter were used, which might be applied in larger production scale. The study about physicochemical properties of fructose ester derived from fructose and palm fatty acid distillate by enzymatic process using *Lipozyme IM* as biocatalyst, are also reported.

Materials and Methods

Materials

Materials used in this experiment are fructose from Merck, palm fatty acid distillate (PFAD, without purification), *Lipozyme IM* (immobilised of *Mucor miehei* lipase, activity 6 BAUN/gram) and column chromatography (50 x 2.5 id cm) with Kieselgel 60 as fixed phase. All organic solvents used as mobile phase/eluent are of analytical grade.

Methods

Preparation

A 1.44 g (equal with 8 mmol) of fructose was mixed with 22.64 g (about 80 mmol) of PFAD, 10% (w/w substrate) of *Lipozyme IM*, and 100 ml tert-butyl alcohol (2-methyl-2propanol). The experiment was carried out in 250 ml flask and shaken by mechanical orbital shaker incubator (at 250 rpm) at 55 °C for 24 hours. At the end of reaction, enzyme was removed by filtration and the solvent was evaporated.

Purification

In this work two types of main solvent were used, namely chloroform and ethyl acetate. The use of these solvent is aimed to investigate the influence of different types of mobile phase to product.

Sample crude fructose esters were dissolved in chloroform or ethyl-acetate (depending on the mobile phase used), and deposited at the top of column chromatography containing Kieselgel 60. The column was then eluted with chloroform (or ethyl acetate) at a flow rate of 0.1

ml/min (gravity) until the yellow color disappeared to remove free fatty acid, and then eluted with mixture of chloroform (or ethyl-acetate)/methanol/water = 64/10/1 v/v/v at the same flow rate to isolate fructose ester. Finally the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain the product. The crude product was crystallized by adding warm acetone (40 °C) and left it overnight in refrigerator.

Analysis

Qualitative analysis of product was carried out by Gilson HPLC. Separation was achieved on Supelcosil C18, 5 µm column (250 x 4.6 mm) at flow rate of 0.7 ml/min and detected by Gilson 116 UV detector at 280 nm. The mobile phase consisted of methanol: acetic acid (99.7% : 0.3 %v/v).

Infra red spectra was recorded on FT-IR spectrophotometer model FTS 165, using film test surfactant between potassium bromide plates. Surface tension was measured in distilled water at room temperature of 28 °C with Fisher Surface Tensiomat Model 21.

Melting point of surfactant was observed on Electrothermal. While, hydrophile-lipophile balance (HLB) was also analyzed by Gupta's method, using pyridine/benzene (95/5 v/v) as solvent and titrated by distilled water (4).

Results and Discussion

The choice of the mobile phase in elution chromatography is limited by the condition that it should be a liquid of reasonably low viscosity at the ambient temperature. In this experiment, because of fructose ester will be used as food and

cosmetics additive, the mobile phase used must be nontoxic solvent. Because of its toxicity, chloroform which is usually used as mobile phase, was replaced with ethyl acetate. Ethyl acetate is safer for health than chloroform. Ethyl acetate was chosen because it has almost same polarity parameter with chloroform (ethyl acetate = 4.4 and chloroform = 4.1) and also has a low viscosity at the ambient temperature (0.43 cP).

In this experiment gradient elution was chosen as elution method because of excessive fatty acid found in the product. Gradient elution is a special case of step-wise elution where the solvent composition is changed continuously. The advantage of this techniques lies mainly in the increased sensitivity resulting from the sharper bands (7).

HPLC analysis of the fraction was eluted with first solvent is shown in Figure 1a and 1b. This figure shows that all fraction contained only fatty acid (compared to palm fatty acid raw material).

The elution chromatography method uses different types of solvent with the almost similar polarity parameter. It produces different products, eventhough when analyzed by thin layer chromatography (TLC) its dissimilarity could not be detected. The analysis produce spots at R_f value of 0.53 (not clear) and R_f 0.89 before purification, and spot only appear at R_f value of 0.32 (not clear), R_f 0.53 (very clear) and R_f 0.89 (not clear) after purification. The R_f value of 0.53 indicates that it is a spot of ester.

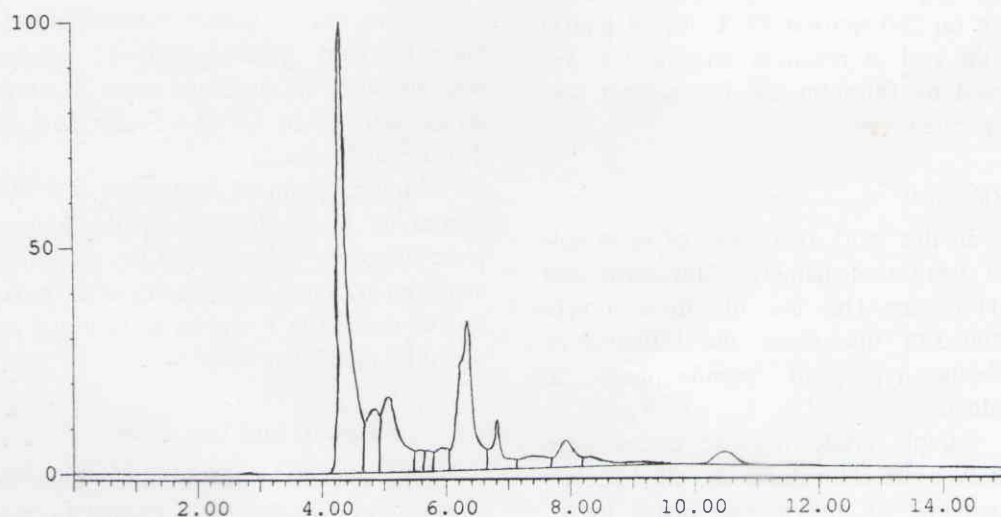


Figure 1a. Analysis HPLC of fraction 1 (dissolve in chloroform), separation on Supelcosil LC18, 5 μ m column (250 x 4.6 id mm) at flow rate 0.7 ml/min and detected by Gilson 116 UV detector at 280 nm. The mobile phase consisted of methanol : acetic acid (99.7:0.3 v/v)

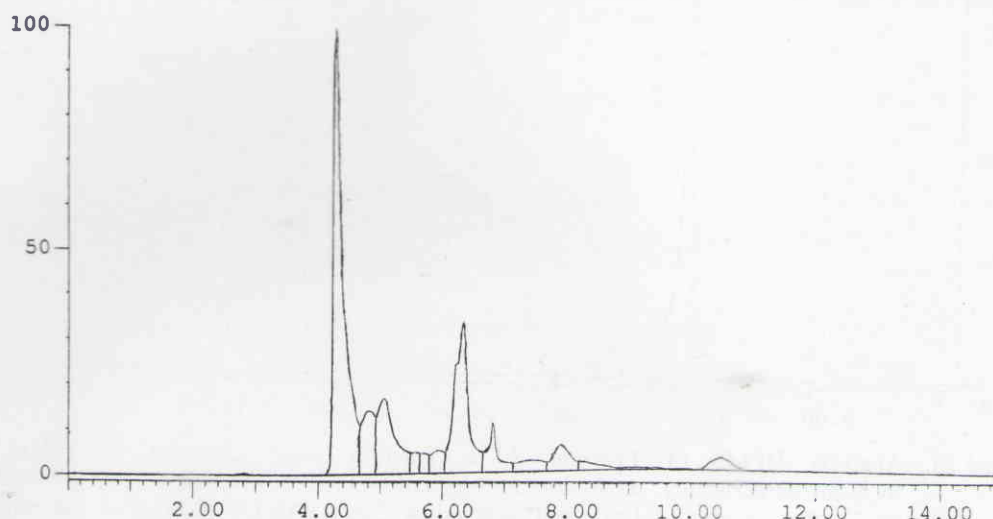


Figure 1b. Analysis HPLC of fraction 1 (dissolve in ethyl acetate), separation on Supelcosil LC18, 5 μ m column (250 x 4.6 id mm) at flow rate 0.7 ml/min and detected by Gilson 116 UV detector at 280 nm. The mobile phase consisted of methanol : acetic acid (99.7:0.3 v/v)

Analysis by HPLC shows that product purified using chloroform as mobile phase only produced main peaks at 4.37 minute (80.77%) and 5.44 minute (11.02%), while using ethyl acetate the main peak appeared at 4.96 minute (20.66%), 5.85 minute (9.08%) and 7.52 minute (59.49%) as shown in Figure 2a and 2b. These figures show that by using chloroform as solvent, only fructose palmitate (mixed with excessive fatty acid at retention time 4.7 minute) and fructose stearate (retention time 5.44 minute) could be isolated, while using ethyl acetate all of fructose esters synthesized could be isolated.

This result, confirmed by FT-IR in-

frared spectrophotometry analysis, showed that product purified with chloroform as main solvent only had a saturated ester spectrum (1736 cm^{-1} and 1179 cm^{-1}), while product purified with ethyl acetate also had a unsaturated ester spectrum (1735 cm^{-1} , 1269 cm^{-1} and 1179 cm^{-1}), as shown in Figures 3a and 3b.

One of the most important characteristic of surfactant is its ability to reduce interfacial and surface tensions. Our experiment shows that fructose ester could reduce surface tension of water from 72 dyne/cm to 38.3 dyne/cm. The reduction of water surface tension is shown in Figure 4.

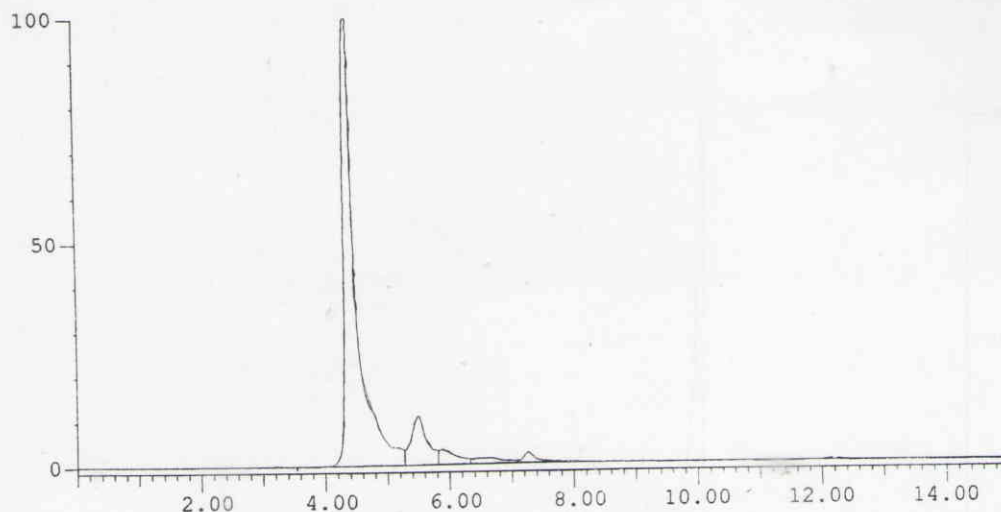


Figure 2a. Analysis HPLC of Fraction 2 or fructose ester (dissolve in chloroform/methanol/water), separation on Supelcosil LC18, 5 μ m column (250 x 4.6 id mm) at flow rate 0.7 ml/min and detected by Gilson 116 UV detector at 280 nm. The mobile phase consisted of methanol : acetic acid (99.7:0.3 v/v)

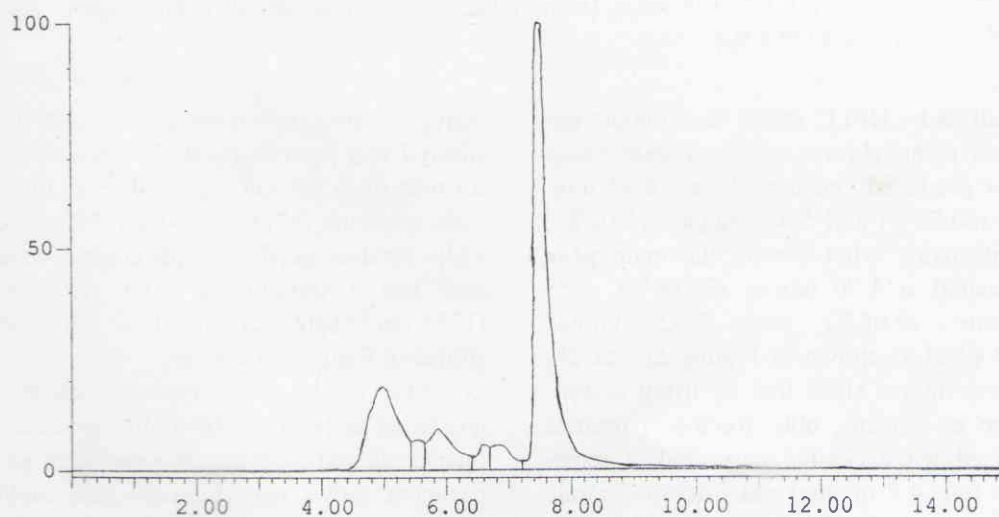


Figure 2b. Analysis HPLC of Fraction 2 or fructose ester (dissolve in ethyl acetate/methanol/water), separation on Supelcosil LC18, 5 μ m column (250 x 4.6 id mm) at flow rate 0.7 ml/min and detected by Gilson 116 UV detector at 280 nm. The mobile phase consisted of methanol : acetic acid (99.7:0.3 v/v)

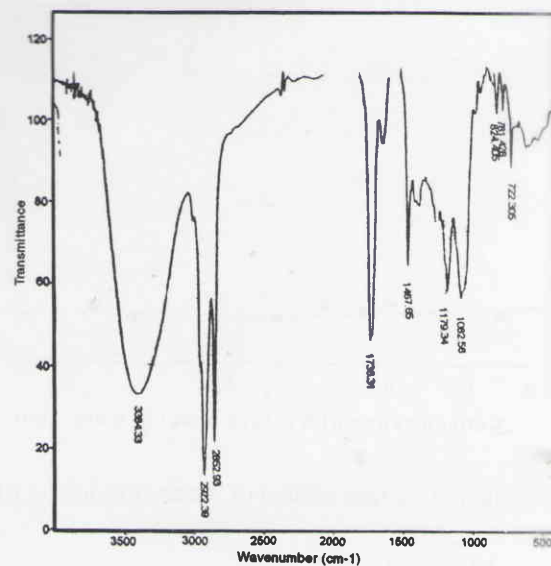


Figure 3a. Infra Red spectrum of fructose ester purified by chloroform as solvent

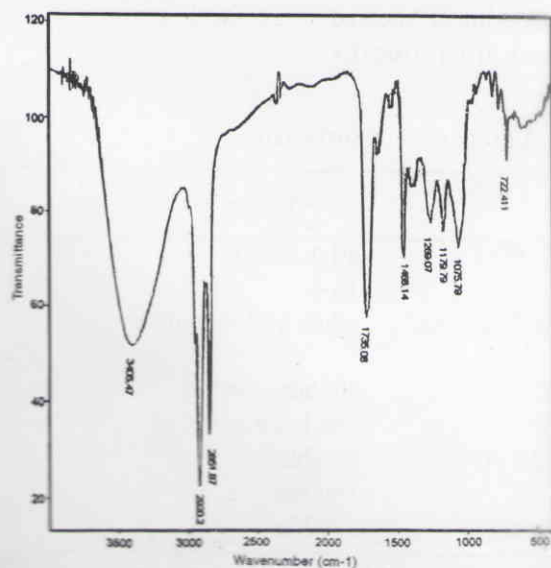


Figure 3b. Infra Red spectrum of fructose ester purified by ethyl acetate as solvent

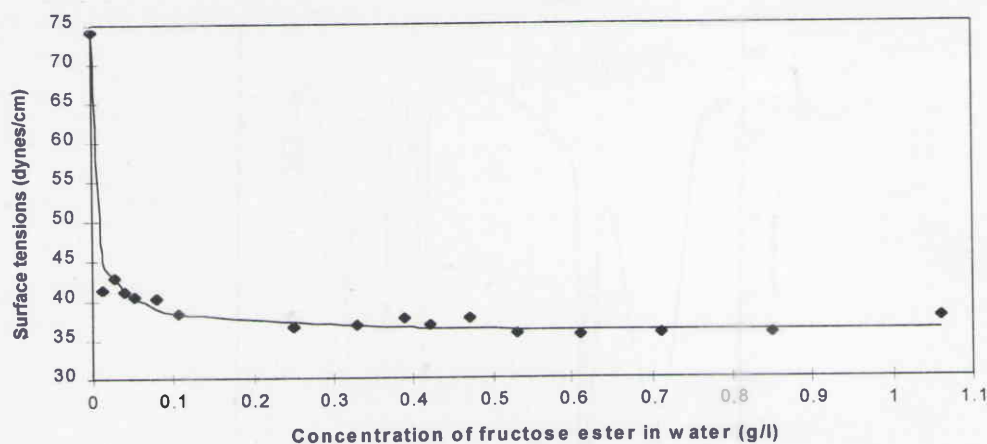


Figure 4. Reduction of surface tension of water afforded by fructose ester

Hydrophile-lipophile balance (HLB) is also an important characteristic of surfactant. At the highest scale (9-18) the surfactant are hydrophilic and acting as detergent and water in oil (w/o) emulsifier (2). The current experiment showed that biosurfactant derived from fructose

and palm fatty acid distillate had an HLB of 16+. This value indicates that surfactant can be used as cosmetics material, detergent and o/w emulsifier. Other physicochemical properties are shown in Table 1.

Table 1. Physicochemical properties of surfactant

No		Fructose ester ^{a)}	Span 60 ^{b)}
1	Melting point (°C)	49.2 - 52.3	54.2 - 55.3
2	HLB ^{c)}	16+	5.0
3	Physical form	white-yellow powder	white powder
4	Solubility in:		
	- Water 28 °C	slightly soluble	not soluble
	- Water 60 °C	emulsion	not available
	-Chloroform 28 °C	soluble	soluble
	-Acetone 60 °C	soluble	soluble
	-Methanol 60 °C	soluble	slightly soluble

^{a)} Derived from fructose and palm fatty acid distillate by enzymatic process

^{b)} Commercial sorbitan monostearate with HLB value of 4.7, synthesized by chemical process

^{c)} Hydrophile-lipophile balance, analyzed by Gupta method (4)

Conclusions

Ethyl acetate can be used as solvent for purification of fructose ester of palm fatty acid. Almost all fructose ester synthesized such as fructose palmitate, fructose oleate and fructose palmitate can be isolated with this solvent. The fructose esters have a melting point of 49 - 52.3 °C and HLB of 16+ which indicates that they can be used as solubilizing agent, detergent and w/o emulsifier. This surfactant can also reduce water surface tension from 72 dyne/cm to 38.3 dyne/cm.

References

1. AKOH, C.C. (ed). 1994. Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes. Marcel Dekker, Inc., New York, 269 p.
2. ATTWOOD, D. and A.T FLORENCE. 1983. Surfactant system. Their Chemistry, Pharmacology and Biology. Champman and Hall. New York. 794 p.
3. DUCRET, A., A. GIROUX, M. TRANI, and R. LORTIE. 1996. Enzymatic preparation of biosurfactant from sugar or sugar alcohol and fatty acids in organic media under reduced pressure. Biotech. and Bioeng. 48(3): 214-221.
4. GUPTA, R.K, K. JAMES and F.J SMITH. 1983. Sucrose esters and sucrose ester/glyceride blends as emulsifier. JAOCS 60(4): 862 - 869.
5. JASPER, M.E.A.P., F.F. LEEUWEN, H.J.W NIEUWENHUIS, and G.M VIANEN. 1987. High performance liquid chromatographic separation of sucrose fatty acid ester. JAOCS 64(7): 1021 - 1025.
6. KHALED, N., D. MONTET, M. PINA, and J. GRAILLE. 1991. Fructose oleate synthesis in a fixed bed reactor, Biotechnology Letters 13(3): 162 - 172.
7. RAVINDRANATH, B. 1989. Principles and Practice of Chromatography. John Wiley & Son, New York, 502 p.

ooOoo