

## PREPARASI MONO- DAN DIGLISERIDA DARI MINYAK SAWIT DENGAN GLISEROLISIS ENZIMATIK

Jenny Elisabeth<sup>1,2)</sup>, Angga Jatmika<sup>1)</sup>, E. Nainggolan<sup>2)</sup>, dan D.M. Malau<sup>2)</sup>

### ABSTRAK

Reaksi gliserolisis enzimatis dilakukan pada minyak sawit merah (MSM), olein, stearin dan minyak inti sawit (MIS) dengan menggunakan beberapa jenis enzim lipase sebagai biokatalisator. Diantara lipase Lipozyme-IM, Novozym-435, Pseudomonas sp., dan dedak padi, maka lipase Pseudomonas sp. menghasilkan produk dengan kandungan monogliserida (MG) dan digliserida (DG) tertinggi pada MSM, olein dan stearin serta lipase Lipozyme-IM pada MIS. Kandungan DG dalam produk minyak sawit hasil gliserolisis berkisar 40-55%, sedangkan kandungan MG masih relatif rendah yakni sekitar 10%. Peningkatan waktu reaksi hingga 72 jam tidak meningkatkan kandungan MG dan DG dalam produk MSM hasil gliserolisis serta kandungan MG dan DG telah mencapai maksimum pada waktu reaksi 24 jam. Peningkatan rasio mol gliserol dan minyak di atas 2:1 juga tidak meningkatkan kandungan MG dan DG dalam produk minyak sawit hasil gliserolisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase yang digunakan memiliki spesifisitas yang lebih rendah terhadap molekul DG dibandingkan trigliserida (TG), sehingga hidrolisis molekul DG menjadi MG relatif sukar terjadi. Dengan gliserolisis enzimatis ini, kandungan karoten dalam substrat MSM dapat dipertahankan lebih dari 90%.

Kata kunci : minyak sawit, monogliserida, digliserida, lipase, gliserolisis, proses enzimatik

### PENDAHULUAN

Campuran monogliserida/monoasilgliserol (MG) dan digliserida/diasilgliserol (DG) merupakan bahan pengemulsi yang penting dalam industri pangan, kosmetika, dan farmasi. Biasanya secara industrial bahan pengemulsi MG dan DG ini diproduksi secara kimiawi antara minyak dan lemak alami dengan gliserol (gliserolisis) pada suhu tinggi (240-260°C) menggunakan katalis anorganik seperti natrium-, kalium- atau kalsium hidroksida. Umumnya produk MG dan DG yang dihasilkan memiliki komposisi MG 35-60%, DG 35-60%, TG (trigliserida/ triasilgliserol) 1-20%, ALB

(asam lemak bebas) dan garam alkalinnya 1-10%, serta glise-rol 1-10% (9,13).

Teknik fisikokimiawi konvensional memiliki beberapa kelemahan yang berhubungan dengan penggunaan suhu reaksi yang tinggi. Teknik ini membutuhkan energi yang tinggi, adanya pembentukan produk-produk samping yang tidak dikehendaki yang disebabkan oleh reaksi peroksidasi dan polimerisasi dan bersifat toksik bagi kesehatan manusia. Oleh karena itu proses-proses enzimatik telah dikembangkan untuk menghasilkan MG dan DG dari minyak alami dengan menggunakan lipase sebagai biokatalisator. Penggunaan reaksi enzimatik pada lemak dan minyak memiliki beberapa keuntungan yaitu (i) sifat spesi-

<sup>1</sup>Pusat Penelitian Kelapa Sawit

<sup>2</sup>Fakultas Pertanian Unika St. Thomas Medan

fisitas lipase yang tinggi, (ii) kondisi proses yang ringan dengan penggunaan suhu dan tekanan yang relatif rendah, (iii) biaya pengelolaan limbah yang relatif lebih murah, dan (iv) produk yang dihasilkan lebih "aman" dibandingkan dengan proses kimia konvensional.

Lipase komersial umumnya merupakan lipase mikrobial yang diperoleh dari beberapa jenis mikroorganisme seperti *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, dan lain-lain. Preparasi lipase mikrobial ini biasanya membutuhkan teknik produksi, ekstraksi, dan isolasi yang relatif rumit sehingga harganya relatif mahal. Dedak padi juga diketahui memiliki aktifitas lipase yang tinggi, yang ditunjukkan dengan kecepatan pembentukan ALB yang tinggi pada minyak dedak padi (*rice bran oil*) hingga kadar ALB nya dapat mencapai 40-50%. Di samping memiliki aktifitas hidrolitik, lipase dedak padi juga memiliki aktifitas esterifikasi yang telah dibuktikan oleh Ozgul dan Turkay (11) dengan esterifikasi *in situ* antara minyak dedak padi dengan metanol dan etanol menghasilkan metil- dan etil ester.

Minyak sawit memiliki komposisi asam lemak yang unik dibandingkan dengan minyak nabati lainnya. Minyak sawit mengandung asam lemak tak jenuh tunggal, yakni C18:1, yang tinggi dan diketahui memiliki efek pencegahan terhadap penyakit kardiovaskuler (3). Minyak sawit juga memiliki kelebihan lain yakni mengandung karotenoid, yang merupakan provitamin A, serta vitamin E yang tinggi. Dengan demikian minyak sawit memiliki sifat antioksidan yang dapat meningkatkan stabilitas oksidatifnya baik selama penyimpanan maupun proses pengolahan (2,14).

Jenis minyak lainnya yakni minyak inti sawit (MIS) mengandung asam laurat (C12:0) yang tinggi. Asam laurat memiliki

kandungan energi yang lebih rendah, yakni 8,3 kkal/g, dibandingkan dengan asam-asam lemak rantai panjang yang memiliki kandungan energi sebesar 9,0 kkal/g. Selain itu asam-asam lemak rantai sedang (C8 - C12) juga dapat menurunkan kolesterol darah dan bersifat antitumor (1,5,6).

Dengan perbedaan sifat spesifitas pase dan karakteristik dari masing-masing jenis minyak alami maka dapat dihasilkan produk-produk MG dan DG yang berbeda pula. Lipase yang memiliki spesifitas *sn1,3-* dan substrat minyak sawit mentah (MSM) atau olein minyak sawit dapat menghasilkan produk MG dan DG yang kaya asam lemak tak jenuh tunggal serta karotenoid dan vitamin E. Dengan reaksi enzimatik yang menggunakan suhu proses yang relatif rendah maka karotenoid dan vitamin E dalam minyak sawit tidak akan mengalami kerusakan. Di sisi lain dengan substrat MIS dan pemilihan lipase yang tepat dapat dihasilkan produk MG dan DG yang kaya asam laurat.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari teknik sintesis MG dan DG dengan gliserolisis enzimatik. Substrat yang digunakan pada penelitian ini adalah MSM, olein, stearin, dan MIS, sedangkan biokatalisator yang digunakan adalah lipase mikrobial dan dedak padi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah MSM, olein, stearin dan MIS. Enzim yang digunakan adalah lipase imobil dari *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) dan *Candida antartica* (Novozym-435) dari Novo Nordisk Bioindustrial Ltd. (Denmark), lipase *Pseudomonas sp.* dari Sigma Chem. Co. (USA) dan dedak

padi varietas Ramos yang diperoleh dari sebuah penggilingan padi di Pancur Batu Sumatera Utara.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Oleo Pangan-Pusat Penelitian Kelapa Sawit dan Laboratorium Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Unika St. Thomas Medan.

### Reaksi gliserolisis enzimatik

Minyak dan gliserol dicampur dengan rasio mol 1:2, serta ditambahkan lipase imobil 5% (b/b) atau 0,5 mg lipase *Pseudomonas sp.* atau dedak padi 10% (b/b) dari campuran substrat. Campuran tersebut diinkubasi dengan orbital shaker pada kecepatan pengadukan 300 rpm, suhu 40°C, dan waktu reaksi minimum 48 jam. Udara dalam bejana reaktor digantikan dengan gas N<sub>2</sub>. Pemisahan enzim imobil dan dedak padi dari campuran reaksi dilakukan dengan penyaringan dan residu gliserol dihilangkan dengan penambahan air. Fraksi lipida diekstraksi dengan campuran kloroform dan metanol (1:1, v/v). Semua reaksi dilakukan dengan 2 kali ulangan dan analisis dilakukan secara duplo.

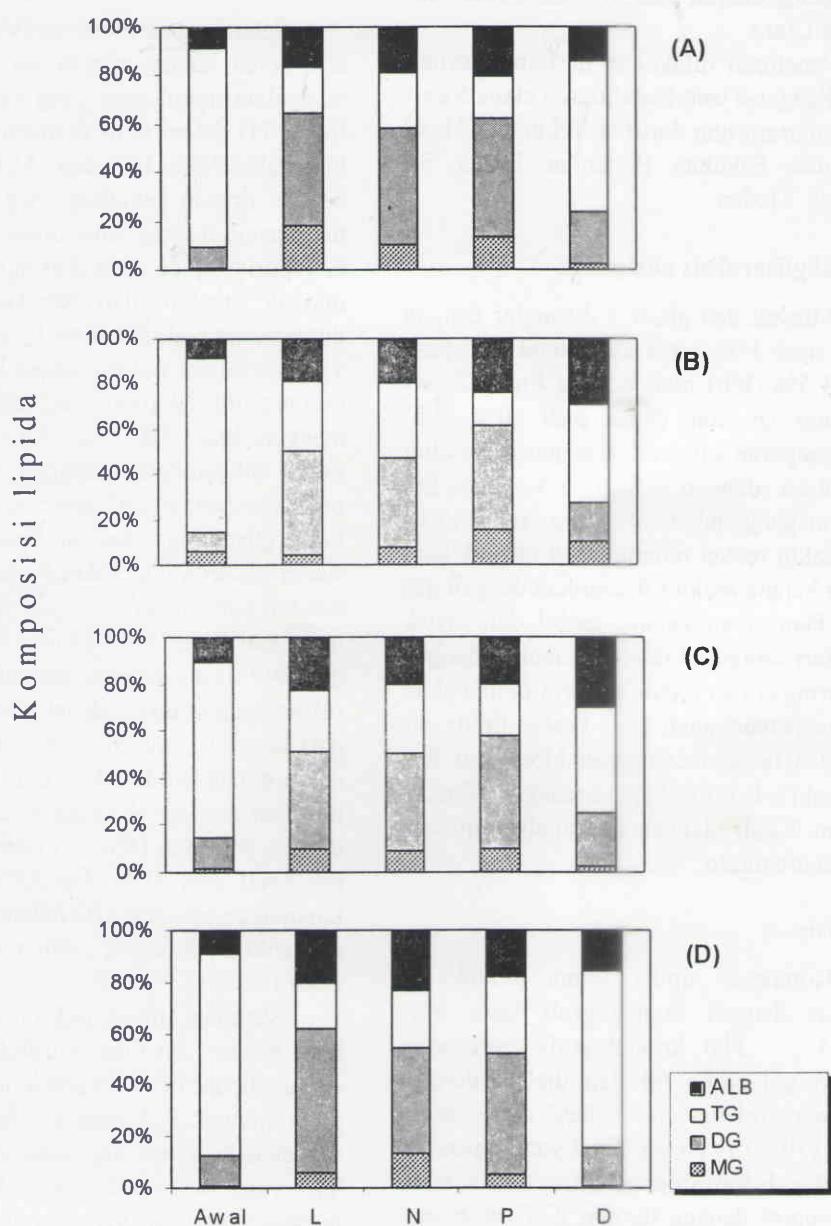
### Analisis

Komposisi lipida dalam produk dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (TLC). Plat kromatografi dipreparasi dengan gel silika 60 dan dielusi dengan pclarut petroleum eter : dietil eter : asam asetat (70:30:1, v/v/v). Spot yang diperoleh dideteksi di bawah sinar ultraviolet setelah disemprot dengan larutan 2',7'-dichlorofluorescein 0,2% dalam etanol. Kandungan karoten dalam sampel yang menggunakan substrat MSM dianalisis dengan spektrofotometri berdasarkan metode PORIM (12).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah gliserolisis enzimatik, komposisi lipida dalam minyak sawit dan MIS mengalami perubahan yang nyata. Jumlah fraksi TG dalam minyak menurun dan jumlah fraksi MG, DG dan ALB meningkat dengan tingkat kenaikan yang berbeda untuk masing-masing jenis lipase dan minyak. Komposisi lipida pada masing-masing jenis minyak sebelum dan sesudah gliserolisis ditampilkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa lipase-lipase mikroba memiliki aktifitas yang lebih baik untuk menghasilkan MG dan DG yang lebih tinggi dibandingkan dengan lipase dedak padi. Kandungan DG dalam produk minyak hasil gliserolisis dengan lipase mikroba sudah cukup tinggi yakni berkisar 40-55%, namun kandungan MG maksimum hanya mencapai 18%. Di sisi lain kandungan MG dan DG dalam produk minyak hasil gliserolisis dengan lipase dedak padi masih jauh dari kisaran komposisi yang umumnya terdapat dalam produk MG dan DG yang dihasilkan dengan gliserolisis kimiawi. Kandungan MG dan DGnya masing-masing lebih kecil dari 10% dan 30%, sedangkan kandungan MG dan DG dalam produk hasil gliserolisis kimiawi umumnya berkisar antara 35-60%.

Skrining lipase mikroba menunjukkan bahwa aktifitas gliserolisis masing-masing lipase berbeda untuk masing-masing jenis minyak. Lipase *Pseudomonas sp.* menghasilkan produk dengan kandungan TG yang terendah atau MG dan DG tertinggi untuk MSM, olein dan stearin, diikuti oleh lipase Lipozyme-IM dan Novozym-435. Hasil ini sesuai dengan studi Mc Neill *et al.* (9) yang menunjukkan bahwa



Gambar 1. Komposisi lipida pada (A) MSM, (B) Olein, (C) Stearin dan (D) MIS sebelum dan sesudah gliserolisis dengan beberapa jenis lipase : (L) Lipozyme-IM, (N) Novozym-435, (P) *Pseudomonas sp.*, dan (D) dedak padi.

lipase *Pseudomonas fluorescens* menghasilkan produk gliserolisis dengan kandungan MG yang lebih tinggi dibandingkan lipase *Mucor miehei* dan *Candida* dari beberapa jenis minyak dan lemak.

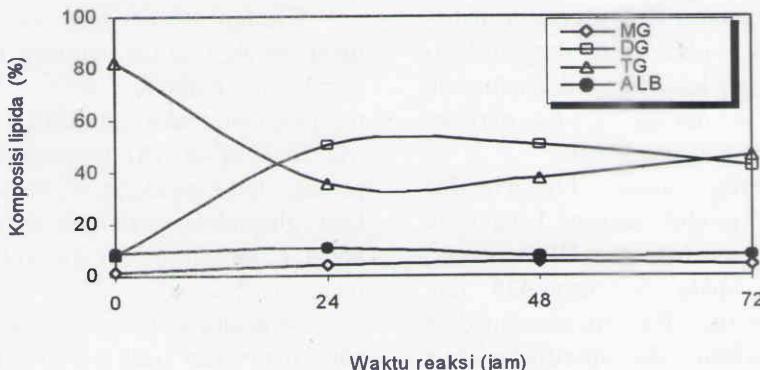
Pada MIS, lipase Lipozyme-IM menghasilkan produk dengan kandungan TG terendah atau MG dan DG tertinggi, diikuti oleh lipase Novozym-435 dan *Pseudomonas sp.* Hal ini menunjukkan adanya perbedaan sifat spesifitas dari masing-masing jenis lipase. Lipase *Pseudomonas sp.* memiliki spesifitas yang lebih tinggi pada asam-asam lemak yang berantai lebih panjang karena asam lemak yang dominan dalam minyak sawit adalah asam lemak C16:0 dan C18:1, sedangkan dalam MIS adalah asam lemak yang berantai sedang (C12:0). Di sisi lain lipase Lipozyme-IM memiliki spesifitas terhadap jenis asam lemak dengan kisaran panjang rantai atom C yang lebih luas, karena aktifitas gliserolitiknya terhadap MIS maupun MSM hampir sama.

Pada gliserolisis enzimatik terjadi reaksi simultan antara reaksi hidrolisis untuk pemotongan rantai asil dari TG dan DG serta reaksi esterifikasi untuk pemindahan rantai asil tersebut pada molekul gliserol (7). Kandungan ALB dalam produk minyak sawit hasil gliserolisis yang tinggi, yakni sekitar 20%, menunjukkan bahwa reaksi pemotongan rantai asil dari TG minyak sawit berjalan dengan baik. Fenomena ini juga didukung oleh adanya penurunan kandungan TG yang cukup besar, meskipun reaksi pemindahan rantai asil ke molekul gliserol belum mencapai maksimum. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya kandungan air yang cukup tinggi dalam campuran reaksi, di mana kadar air dalam gliserol yang digunakan mencapai 13%.

Kandungan air yang melebihi kebutuhan untuk aktifitas optimum lipase dapat mendorong reaksi ke arah hidrolisis dan menghambat reaksi esterifikasi (4). Studi Mc Neill *et al.* (8) menunjukkan adanya peningkatan kandungan ALB dalam produk hasil gliserolisis enzimatik dengan peningkatan kadar air dalam gliserol dari 0.6% hingga 12.5%.

Di antara ketiga jenis lipase mikroba yang digunakan pada penelitian ini, lipase Lipozyme-IM dipilih sebagai enzim yang terbaik untuk digunakan dalam percobaan-percobaan berikutnya. Meskipun lipase *Pseudomonas sp.* memberikan keragaan yang terbaik pada minyak sawit hasil gliserolisis, namun harganya yang relatif mahal serta bentuk enzimnya yang mobil menyebabkan penggunaannya tidak terlalu ekonomis dibandingkan lipase Lipozyme-IM. Lipase Lipozyme-IM komersial terdapat dalam bentuk immobil, sehingga dapat digunakan berulang kali serta lebih mudah dipisahkan dari campuran reaksi.

Hasil penelitian ini juga memberi gambaran bahwa proses pemotongan rantai asil lebih dominan terjadi pada molekul TG minyak sawit dibandingkan DG. Pada Gambar 2 terlihat bahwa peningkatan waktu reaksi hingga 72 jam tidak menyebabkan penurunan kandungan DG untuk pembentukan MG, tetapi terjadi peningkatan kandungan TG. Kandungan ALB juga terlihat sedikit menurun dan kandungan MG relatif tetap. Dengan demikian terdapat kemungkinan bahwa setelah waktu reaksi 24 jam maka reaksi esterifikasi yang terjadi pada molekul gliserida parsial, terutama DG, lebih besar dibandingkan dengan molekul gliserol. Fenomena ini juga menggambarkan bahwa enzim lipase selain memiliki spesifitas terhadap jenis dan posisi asam



Gambar 2. Perubahan komposisi gliserida pada MSM pada gliserolisis dengan lipase Lipozyme-IM pada suhu inkubasi 40°C dan kecepatan pengadukan 300 rpm

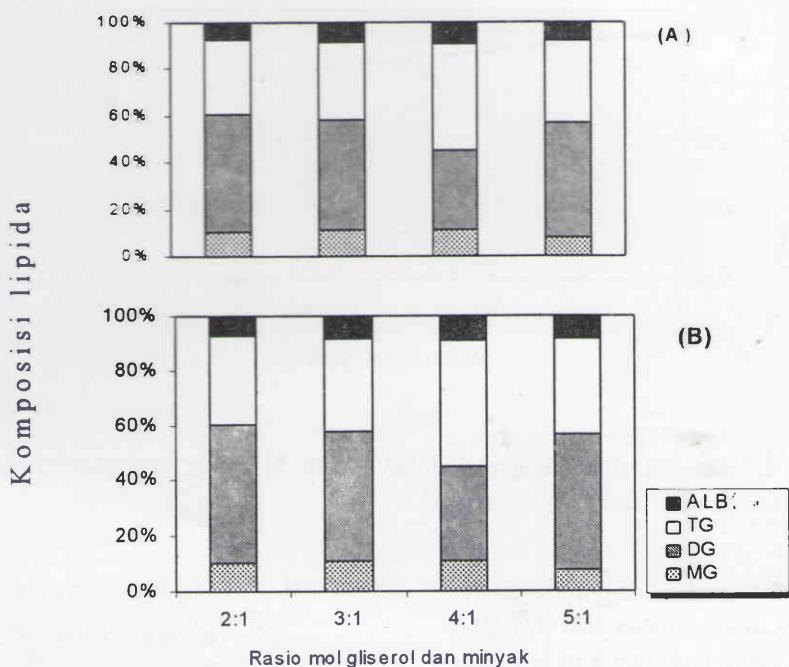
lemak, juga memiliki spesifisitas terhadap jenis molekul gliserida. Studi Tanaka *et al.* (15) juga membuktikan bahwa kemampuan hidrolitik dari lipase *C. cylindraceae* tergantung pada struktur spesifik molekul TG, yang kemudian disebutnya dengan spesifisitas trigliserida.

Peningkatan rasio mol gliserol dan minyak lebih dari 2:1 tidak mempengaruhi komposisi lipida dalam produk hasil gliserolisis. Pengaruh penggunaan beberapa tingkat rasio minyak sawit dan gliserol terhadap komposisi gliserida MSM dan MIS disajikan pada Gambar 3.

Dengan meningkatkan jumlah gliserol dalam campuran reaksi diharapkan peluang molekul-molekul gliserol untuk berpartisi ke molekul enzim semakin besar pula, namun hal tersebut tidak ditemui pada percobaan ini. Beberapa studi tentang gliserolisis enzimatik pada beberapa minyak alami mampu menghasilkan produk dengan kandungan MG yang relatif tinggi, yakni >70% (8, 9, 10, 13). Namun penelitian ini belum menunjukkan hal yang sama, karena

peningkatan kandungan gliserida parsial yang relatif tinggi hanya terjadi pada fraksi DG.

Perbedaan di atas dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Selain kandungan air dalam campuran reaksi, suhu reaksi dan sistem pengadukan yang kurang sempurna juga berpengaruh terhadap aktifitas lipase dalam reaksi gliserolisis ini. Mc Neill *et al.* (8) mengemukakan bahwa reaksi gliserolisis dengan penggunaan 2 tahap suhu reaksi, yaitu suhu 50°C selama 20 jam pertama dan diikuti dengan suhu 40°C untuk reaksi 30 jam berikutnya, menghasilkan produk dengan kandungan MG yang lebih tinggi dari lemak sapi. Sistem pengadukan akan mempengaruhi tingkat peluang kontak antara molekul-molekul gliserida dan gliserol dengan enzim. Studi-studi terdahulu banyak yang menggunakan sistem pengadukan menggunakan pengaduk magnetik dengan kecepatan 800 rpm, sedangkan penelitian ini menggunakan pengaduk orbital dengan kecepatan pengadukan yang lebih rendah (300 rpm). Dengan demikian ketiga faktor di atas



Gambar 3. Pengaruh rasio mol gliserol dan minyak terhadap komposisi lipida dalam produk minyak sawit hasil gliserolisis dengan lipase Lipozyme-IM : (A) MSM dan (B) MIS

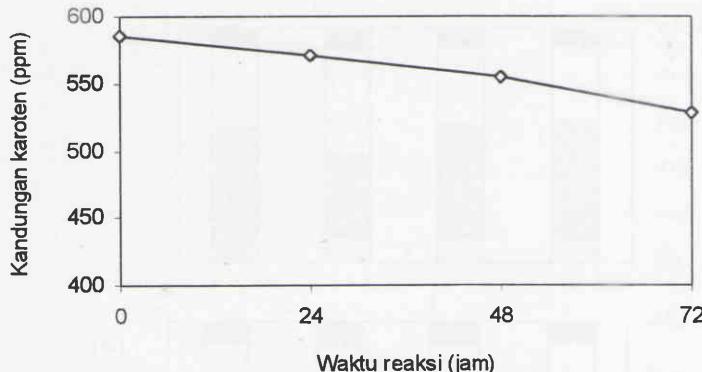
merupakan faktor penting yang perlu diteliti pada tahap penelitian selanjutnya.

Gliserolisis enzimatis dengan substrat MSM dapat mempertahankan kandungan karoten yang terdapat didalamnya (Gambar 4). Meskipun kandungan karoten menurun seiring dengan peningkatan waktu reaksi, namun hingga waktu reaksi 72 jam retensi karoten dalam produk MSM hasil gliserolisis masih sekitar 90% dibandingkan dengan kandungan awalnya. Reduksi oksigen pada bejana reaktor dengan menggantikan udara dengan gas nitrogen serta penggunaan suhu reaksi yang relatif rendah dapat menghambat kerusakan oksidatif dari karoten yang terdapat dalam MSM. Jika

kandungan MG dalam produk hasil gliserolisis dapat ditingkatkan maka proses ini cukup menjanjikan untuk digunakan dalam produksi bahan pengemulsi dari minyak sawit dan minyak inti sawit.

## KESIMPULAN

Lipase *Pseudomonas sp.* merupakan biokatalisator dengan aktifitas gliserolisis tertinggi untuk MSM, olein, dan stearin serta lipase Lipozyme-IM untuk MIS. Produk minyak sawit hasil gliserolisis yang dihasilkan mengandung fraksi MG dan DG masing-masing berkisar 10 % dan 40-55%.



Gambar 4. Perubahan kandungan karoten dalam MSM selama gliserolisis dengan enzim Lipozyme-IM

Peningkatan waktu reaksi hingga 72 jam tidak meningkatkan kandungan MG dan DG, yang telah mencapai maksimum pada waktu reaksi 24 jam. Peningkatan rasio mol gliserol dan minyak di atas 2:1 juga tidak meningkatkan kandungan MG dan DG dalam produk minyak sawit hasil gliserolisis. Namun hingga waktu reaksi 72 jam, proses ini dapat mempertahankan kandungan karoten dalam substrat MSM yang digunakan dengan tingkat retensi >90%.

Untuk tahap penelitian berikutnya perlu dilakukan optimasi terhadap faktor kandungan air, suhu dan sistem pengadukan campuran reaksi sehingga kandungan MG dalam produk hasil gliserolisis dapat ditingkatkan.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. AKOH, C.C. and K.H. HUANG. 1995. Enzymatic synthesis of structure lipids : Transesterification of triolein and caprylic acid. *J. Food Lipids* 2:219-230.
2. CHOO, Y.M. 1997. Carotenoids from palm oil in Nutritional Components of Palm Oil. Paper of Malaysian Palm Oil at 88 th AOCS Annual Meeting, Seattle, Washington.
3. FOMUSO L.B. and C.C. AKOH. 1997. Enzymatic modification of triolein: Incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(3): 269-272.
4. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA, and M.S. AUGUSTO. 1994. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(6): 579-582.
5. LAW, K. and T. THIAGARAJAN. 1990. Palm Oil - Edible oil of tomorrow in ERICKSON, D.R. (ed). *Edible Fats and Oils Proceeding-Basic Principles and Modern Practices*. Works Conference Proceedings. Am. Oils Chem. Soc., Champaign, Illinois-USA.
6. LEE K.T. and C.C. AKOH. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(5): 611-615.
7. MACRAE, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(2): 243-246.
8. MC NEILL G.P., S. SHIMIZU and T. YAMANE. 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of mono-

- glyceride J. Am. Oil Chem. Soc. 67(11): 779-783.
9. MC NEILL G.P., S SHIMIZU and T. YAMANE. 1991. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 68(1): 1-5.
10. MC NEILL G.P. and T. YAMANE. 1991. Further improvement in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 68(1): 6-10.
11. OZGUL, S and S. TURKAY. 1993. *In situ* esterification of rice bran oil with methanol and ethanol. J. Am. Oil Chem. Soc. 70(2): 1285-1287.
12. PORIM. 1995. PORIM Test Method. PORIM, Malaysia.
13. ROSU R., Y. UOZAKI, Y. IWASAKI and T. YAMANE. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 74(4): 445-450.
14. SUNDARAM, K. and N. CHANDRASEKHARAN. 1997. Minor components in edible oils and fats : Their Nutritional Implications in Nutritional Components of Palm Oil. Paper of Malaysian Palm Oil at 88 th AOCS Annual Meeting, Seattle, Washington.
15. 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.

### Preparation of mono- and diglyceride from palm oil by enzymatic glycerolysis

Jenny Elisabeth<sup>1,2)</sup>, Angga Jatmika, E. Nainggolan<sup>2)</sup>, and D.M. Malau<sup>2)</sup>

#### Abstract

Enzymatic glycerolysis was used in crude palm oil (CPO), olein, stearin and palm kernel oil (PKO) with several lipases as biocatalyst. Screening of the Lipozyme-IM, Novozym-435, Pseudomonas sp. and rice bran lipases showed that lipase of Pseudomonas sp. resulted the highest monoglyceride (MG) and diglyceride (DG) content for CPO, olein and stearin, and Lipozyme-IM for the PKO. The DG content of the glycerolytic products was range in 40-55%, whereas the MG content was relatively low, approximately 10%. Increasing of time reaction until 72 hours could not improve the yield of MG and DG, which were maximum at 24 hours reaction time. Increasing of molar ratio of glycerol and oil above 2:1 also could not improve the MG and DG content. This study showed that the lipases had lower specificity of DG than TG molecule, so the glycerolysis of DG molecule was hardly happened. Using this method, the carotene content of CPO could be retained greater than 90%.

Key words: palm oil, monoglyceride, diglyceride, lipase, glycerolysis, enzymatic process

#### Introduction

Mono- and diglycerides (MG and DG) are an important group of emulsifying agents widely used in the food, cosmetic, and pharmaceutical industry. Normally they were produced commercially by the reaction

of natural fats and oils with glycerol (glycerolysis) at high temperature (240 - 250°C) using an organic catalysts such as sodium-, potassium- or calcium hydroxide. Usually the MG and DG products contain 35-60% MG, 35-50% DG, 1-20% triglycerides (TG), 1-10% free fatty acids and their alkali metal salts, and 1-10% glycerol (9,13).

<sup>1</sup>Indonesian Oil Palm Research Institute

<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Catholic University of St. Thomas, Medan

The conventional physicochemical glycerolysis method has several disadvantages due to high temperature. It needs high energy consumption and also forms dark-coloured by-products and undesirable flavor caused by peroxidation and polymerization. All the by-products could be toxic for human health. Therefore, synthesis of MG and DG from natural oil with enzymatic process which use lipase as biocatalyst has received a lot of attention during this last decade. The enzymatic reaction of fats and oils presents the following advantages : (i) specificity of the lipase; (ii) mild process condition with low pressure and temperature; (iii) low waste treatment cost; and (iv) give more safety product than conventional physicochemical process.

The commercial lipases commonly are produced from microorganism, such as *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.*, *Candida sp.*, *Pseudomonas sp.*, etc. Preparation of the microbial lipases need more difficult technique of production, extraction and isolation, so the price is relatively expensive. Rice bran, which is obtained as a by-product in the milling of brown rice kernel to yield the familiar white rice, contains lipase too. Rice bran lipase is known as the principal cause of oil deterioration in the bran during storage, because of increasing the free fatty acid in the rice bran oil. Besides the hydrolytic activity, rice bran lipase also has the esterification activity, as described by Ozgul and Turkay (11). They used *in situ* esterification of rice bran oil with methanol and ethanol to produce methyl- and ethyl ester.

Palm oil has unique composition of fatty acid among the natural oil. It contains high monounsaturated fatty acid (C18:1) that is known has an anticoronary heart

disease effect. On the other hand, palm contains high carotenoid, a provitamin A, and also high vitamin E. With these two components, palm oil has antioxidant activity and may increase its oxidative stability on storage and processing (2, 14).

Palm kernel oil (PKO) contains high lauric acid. With this medium chain of Carbon, lauric acid has lower energy content, 8.3 kcal/gram, than long chain fatty acid that has 9.0 kcal/gram. In addition, medium chain fatty acid help to reduce the plasma cholesterol and lessen the incidence of tumor (1, 5, 6).

With the different specificity of lipase and the characteristic of palm and palm kernel oil, MG and DG could be produced with different characteristic too. By using *sn* 1,3- lipase and crude palm oil (CPO) or palm olein as substrate, an oleic acid-rich MG and DG and also rich in carotenoid and vitamin E could be synthesized. This could be expected because enzymatic process use relatively low temperature, so the carotenoid and vitamin E in the palm oil could be retained. By using the PKO, a lauric acid-rich MG and DG could be expected.

The aim of this research was to study about the technical synthesis of MG and DG with enzymatic glycerolysis. Several types of lipase from microorganism and rice bran were used as biocatalyst, and CPO, olein, stearin, or PKO as an initial substrate

## Materials and Methods

### Materials

This research used crude palm oil (CPO), olein, stearin, and palm kernel oil (PKO) as substrate. Immobilized lipase of *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) and

*Candida antartica* (Novozym-435) were obtained from Novo Nordisk Bioindustry Ltd., Denmark; lipase of *Pseudomonas sp.* was obtained from Sigma Chem. Co., USA, and rice bran was obtained from a local rice mill in Pancur Batu, North Sumatera.

This research was done in Oleofood Laboratory-Indonesian Oil Palm Research Institute and Laboratory of Agricultural Technology, Faculty of Agriculture, Catholic Univ. of St. Thomas Medan.

### Enzymatic glycerolysis

A mixture of glycerol 87%, oil and lipase was prepared in a 25 ml erlenmeyer flask. The mole ratio of glycerol and oil was approximately 2:1 and the lipase was used at 5% (w/w) for the immobilized lipase (Lipozyme-IM and Novozym-435), 0.5 mg for *Pseudomonas sp.* lipase and 10% (w/w) for the rice bran. An orbital shaker was used at 300 rpm and the mixture was incubated at 40°C for at least 48 hours. Air in the flask was replaced by N<sub>2</sub> gas. Inactivation of the enzyme and removal of the excess glycerol was achieved by extraction of the reaction mixture into kchloroform/methanol (1:1, v/v) and the immobilized lipase or rice bran was filtered. All reaction were in duplicate.

### Analysis

Analysis of the product mixture was carried out by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60 using petroleum ether, diethyl ether and acetic acid (70:30:1, v/v/v) as developing solvent. The bands were visualized under ultraviolet radiation after spraying the plate with 2'-7'-dichlorofluorescein in ethanol and scrapped off. The carotene content of samples, which

used CPO as substrate, was analyzed using spectrophotometer following the PORIM method (12).

### Result and Discussion

After glycerolysis, the lipid composition of palm oil and PKO was significantly changed. The TG content decreased and MG, DG and free fatty acid (FFA) content increased with different extent for each lipase and oil. The lipid composition for each palm oil and PKO before and after the glycerolysis reaction was shown in Figure 1. It showed that generally the microbial lipase had higher activity for synthesizing MG and DG than rice bran lipase. By using the microbial lipase, the DG yield of the glycerolysis product was in the range of 40% to 55%, whereas the maximum MG content was only 18%. On the other hand, MG and DG yield with rice bran lipase were less than 10% and 30%, respectively. Commonly the physicochemical glycerolysis could produce 35-60% MG and DG yield.

Screening of microbial lipases had showed that the glycerolytic activity of each lipase was different for each kind of oil. The lipase of *Pseudomonas sp* gave a product with the lower TG content or the highest MG and DG content for CPO, olein and stearin, followed by Lipozyme-IM and Novozym-435. Mc Neill *et al.* (9) also showed same result, that *Pseudomonas fluorescens* lipase gave a higher MG and DG yield than lipase of *Mucor miehei* and *C. antartica* from several oils and fats.

From PKO, the Lipozyme-IM gave higher MG and DG yield, followed by Novozym-435 and *Pseudomonas sp.* This result indicated the different specificity of

each lipase. Lipase of *Pseudomonas sp.* had higher specificity to the longer chain of fatty acids, since the fatty acids of C16:0 and C18:1 were dominant in palm oil. In another hand, the Lipozyme-IM had specificity with broader range of chain length of fatty acids, since it had same activity between palm oil and PKO.

There is a simultaneously reaction in the glycerol process, i.e. hydrolysis in TG and DG molecules to produce acyl chain and esterification reaction for transferring the acyl-chain into glycerol molecules (7). With high content of FFA, about 20%, it means that the splitting of acyl chain from the TG molecule could occur, but transferred of the acyl chain into glycerol molecule is not maximum. This result could be caused by a high water content in the reaction mixture, whereas the water content in the glycerol was almost 13%. Water content that higher than the need of optimum lipase activity could let the reaction to the hydrolysis and inhibit the esterification reaction. It is in accordance with Mc Neill et al. (9) that the FFA content of the glycerolytic product increased with the increasing of water content in glycerol from 0.6% to 12.5%.

Among the microbial lipases, the Lipozyme-IM was chosen as biocatalyst for the next experiments. Although the *Pseudomonas sp.* lipase was the best for giving high MG and DG yield, but the relatively expensive price and the mobile form of the lipase made it not economically feasible than Lipozyme-IM. By using Lipozyme-IM, the enzyme could be recovered easily from the reaction mixture and recycled for repeating use of the enzyme.

The result of this research also suggests that hydrolysis of acyl chain domi-

nantly on TG molecules than DG. Figure 2 shows that increasing of reaction time to 72 hours do not decrease the DG content for MG formation but increase the TG content. The FFA content slightly decreased and the MG content was stable. Therefore, it can be explained that esterification of partially glyceride molecules was greater than glycerol molecules after 24 hours reaction time. It also indicated that the lipase has specificity of glyceride molecule, not only fatty acid and positional specificity. It is in accordance with the report of Tanaka et al. (15), who suggested that the hydrolytic activity of *Candida cylindracea* lipase depends on the the whole TG molecule structure and called triglyceride specificity.

Increasing the molar ratio of glycerol and oil more than 2:1 did not influence the lipid composition of the glycerolytic products. The influence of the molar ratio of glycerol and oil in the glycerolysis of CPO and PKO was shown in Figure 3. It was expected that increasing the glycerol amount in the reaction mixture could increase the opportunity of the glycerol molecules to interact with enzyme molecules, but it was not found it in this research. Several studies about the enzymatic glycerolysis of several natural oils and fats had given a high yield of MG, i.e. greater than 70% (8, 9, 10, 13), but not for this study that high increasing of partially glycerides only happened on DG fraction.

There are many factors that influence the lipase activity in the glycerolysis. Besides the water content in the reaction mixture, temperature and mixing system can also influence the lipase activity. According to Mc Neill et al. (8), glycerolysis reaction with two step of temperature, 50°C for the first 20 hours and followed with 40°C

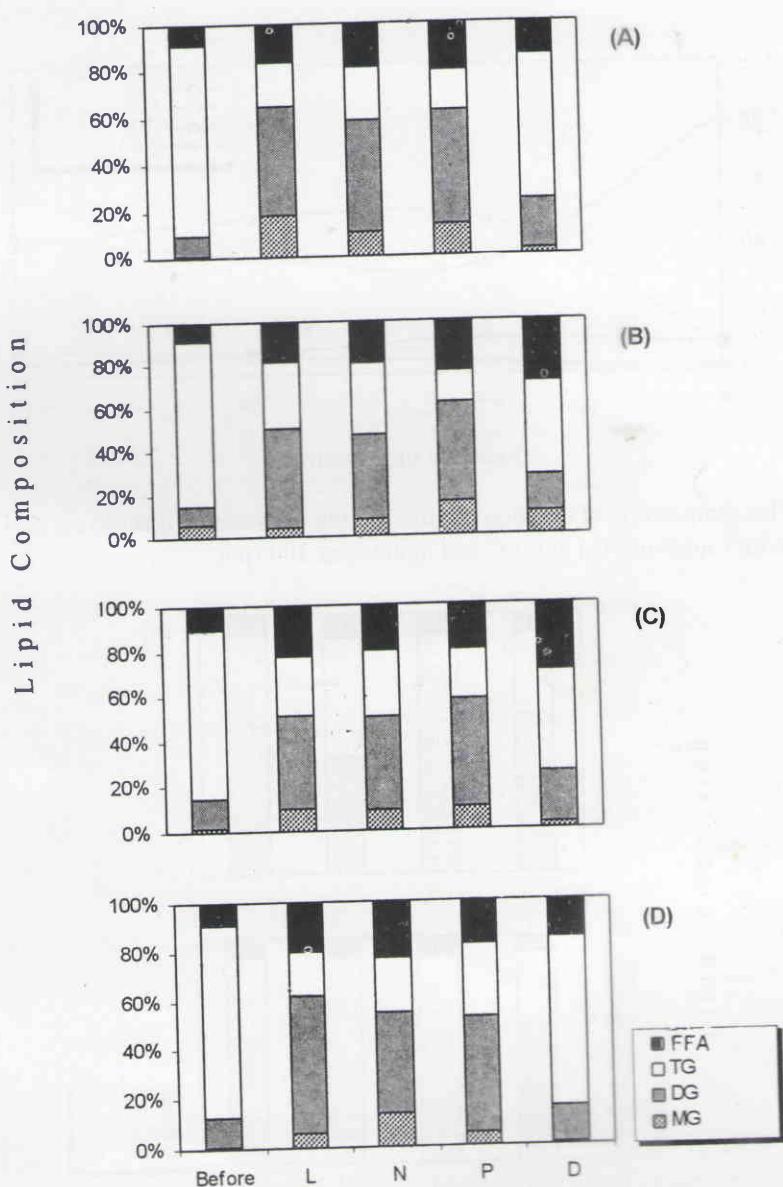


Figure 1. The lipid composition of (A) CPO, (B) Olein, (C) Stearin and (D) PKO before and after glycerolysis with several lipases: (L) Lipozyme-IM, (N) Novozym-435, (P) *Pseudomonas sp.* And rice bran

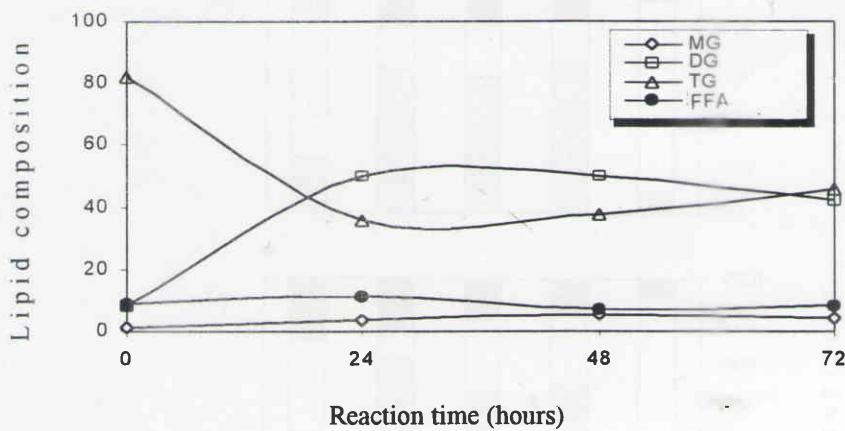


Figure 2. The composition of reaction mixture during enzymatic glycerolysis of CPO with Lipozyme-IM at 40°C and agitated at 300 rpm

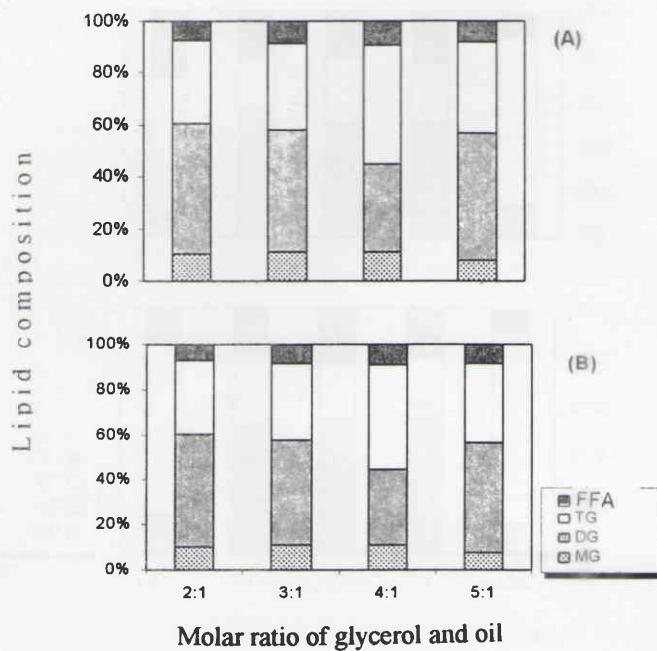


Figure 3. Influence of the molar ratio of glycerol and oil on lipid composition of glycerolytic products with Lipozyme-IM as biocatalyst : (A) CPO and (B) PKO

for next 30 hours, could improve the MG yield. On the other hand, the mixing system could influence the probability of interaction between glycerides, glycerol, and enzyme molecules. In the previous studies, the mixing system used magnetic-stirrer and agitated at 800 rpm, while in this study orbital shaker with lower agitation (300 rpm) was used. Therefore, the above three factors are important for determined in the next studies.

Enzymatic glycerolysis could maintain the carotene content of CPO, as shown in

Figure 4. Eventhough the carotene content slightly decreased as the reaction time increase, but it retained about 90% in the glycerolytic product after 72 hours reaction time. Reducing of O<sub>2</sub> in the reactor by replacing air with N<sub>2</sub> gas and using low temperature could inhibit deterioration of the carotene. If the yield of MG could be improved, thus this method was feasible for producing emulsifier from palm oil and PKO.

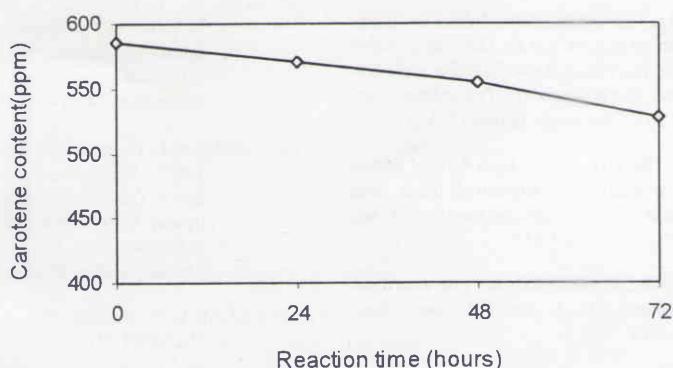


Figure 4. The carotene content of CPO during glycerolysis with Lipozyme-IM as biocatalyst

### Conclusion and Suggestion

Lipase of *Pseudomonas sp.* was the best biocatalyst for preparing MG and DG from CPO, olein and stearin with enzymatic glycerolysis, but for PKO was Lipozyme-IM. The MG and DG contents of the glycerolytic products were approximately 10% and 40-55%, respectively. Increasing of the reaction time until 72 hours and the molar ratio of glycerol oil above 2:1 could not improve the MG and DG contents. But this method could

retain the carotene content of CPO with the extent of retention greater than 90%.

For the next study, it is important to study about some factors as water content, temperature and mixing system of the reaction mixture for improvement in the yield of MG.

### References

- AKOH, C.C. and K.H. HUANG. 1995. Enzymatic synthesis of structure lipids : Transesterification

- of triolein and caprylic acid. *J. Food Lipids* 2:219-230.
2. CHOO, Y.M. 1997. Carotenoids from palm oil in Nutritional Components of Palm Oil. Paper of Malaysian Palm Oil at 88 th AOCS Annual Meeting, Seattle, Washington.
3. FOMUSO L.B. and C.C. AKOH. 1997. Enzymatic modification of triolein: Incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced-calorie structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(3): 269-272.
4. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA, and M.S. AUGUSTO. 1994. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(6): 579-582.
5. LAW, K. and T. THIAGARAJAN. 1990. Palm Oil - Edible oil of tomorrow in ERICKSON, D.R. (ed.). *Edible Fats and Oils Proceeding-Basic Principles and Modern Practises. Works Conference Proceedings*. Am. Oils Chem. Soc., Champaign, Illinois-USA.
6. LEE K.T. and C.C. AKOH. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(5): 611-615.
7. MACRAE, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60(2): 243-246.
8. MC NEILL G.P., S. SHIMIZU and T. YAMANE. 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67(11): 779-783.
9. MC NEILL G.P., S. SHIMIZU and T. YAMANE. 1991. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(1): 1-5.
10. MC NEILL G.P. and T. YAMANE. 1991. Further improvement in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(1): 6-10.
11. OZGUL, S and S. TURKAY. 1993. *In situ* esterification of rice bran oil with methanol and ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70(2): 1285-1287.
12. PORIM. 1995. PORIM Test Method. PORIM, Malaysia.
13. ROSU R., Y. UOZAKI, Y. IWASAKI and T. YAMANE. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74(4): 445-450.
14. SUNDARAM, K. and N. CHANDRASEKHARAN. 1997. Minor components in edible oils and fats : Their Nutritional Implications in Nutritional Components of Palm Oil. Paper of Malaysian Palm Oil at 88 th AOCS Annual Meeting, Seattle, Washington.
15. 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