

SINTESIS MINYAK SAWIT MERAH KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3 DENGAN METODE ASIDOLISIS ENZIMATIK

Jenny Elisabeth, Angga Jatmika, dan Krismawati Sinaga

ABSTRAK

Pada penelitian ini dilakukan asidolisis antara konsentrat asam lemak omega-3 (n-3) dari minyak ikan tuna dan minyak sawit merah (MSM) dengan lipase Lipozyme-IM dan dedak padi sebagai biokatalisator. Produk MSM kaya asam lemak n-3 yang dihasilkan diharapkan dapat digunakan sebagai bahan nutrisi makanan atau farmasi, yang selain kaya asam lemak n-3 juga dapat digunakan sebagai sumber provitamin A dan vitamin E. Inkorporasi asam lemak n-3 diikuti dengan penurunan konsentrasi asam lemak jenuh dan monoenat dari MSM, terutama C16:0 dan C18:1. Peningkatan rasio substrat, yakni rasio konsentrat asam lemak n-3 dan MSM, dapat meningkatkan inkorporasi asam lemak n-3, tetapi rasio optimum adalah 2:1 (b/b) karena penggunaan rasio substrat yang tinggi berdampak pada peningkatan biaya produksi. Pada produk MSM termodifikasi dengan lipase dedak padi terkandung EPA (eicosapentaenoic acid; C20:5) dan DHA (docosahexaenoic acid; C22:6) masing-masing 7,2% dan 37,9 %, sedangkan dengan Lipozyme-IM 6,2 % dan 36,1 %. Dengan proses asidolisis enzimatis, kandungan β -karoten dalam MSM dapat dipertahankan lebih dari 65 %, sedangkan kandungan vitamin E dapat mencapai lebih dari 1000 ppm karena tokoferol minyak ikan juga terekstraksi di dalam produk.

Kata kunci : minyak sawit, asam lemak omega-3, asidolisis, lipase

PENDAHULUAN

Minyak ikan yang kaya akan asam lemak omega-3 (n-3), yakni EPA (eicosapentaenoic acid; C20:5) dan DHA (docosahexaenoic acid; C22:6), diketahui dapat mencegah penyakit jantung serta memiliki sifat antitumor dan anti-inflamasi (16). DHA juga dikategorikan sebagai nutrisi esensial pada pertumbuhan awal manusia, karena dibutuhkan untuk tumbuh kembang otak dan retina (10). Meskipun memiliki banyak keunggulan, tidak semua orang senang mengonsumsi minyak ikan. Bau amis merupakan masalah utama dalam penggunaannya sebagai bahan nutrisi atau formulasi produk pangan. Salah satu upaya untuk mengatasi masalah ini adalah dengan menginkorporasikan asam lemak n-3 dari

minyak ikan pada minyak nabati yang biasa dikonsumsi manusia.

Beberapa penelitian tentang sintesis minyak nabati kaya asam lemak n-3 dengan proses enzimatis telah dilaporkan, yang umumnya menggunakan lipase sebagai katalisator. Dengan kondisi reaksi yang ringan, yakni suhu dan tekanan rendah, kerusakan oksidatif asam lemak n-3 dapat dikurangi. Sridhar dan Lakshminarayana (17) menggunakan reaksi interesterifikasi antara minyak kacang tanah dan konsentrat metil ester asam lemak n-3 menggunakan lipase Lipozyme dari *Rhizomucor miehei* sebagai katalisator. Huang dan Akoh (8), Huang *et al.* (9) dan Akoh *et al.* (1) juga telah melaporkan tentang inkorporasi asam lemak n-3 pada minyak nabati, yakni minyak kanola, minyak kacang tanah, minyak kedelai, minyak biji melon, dan

minyak *evening primrose* menggunakan lipase IM60 dari *R. miehei* ataupun SP435 dari *Candida antarctica*.

Jenis lipase yang telah digunakan untuk sintesis minyak nabati kaya asam lemak n-3 ini umumnya merupakan lipase mikrobial, yang harganya relatif mahal karena membutuhkan proses produksi, ekstraksi, dan isolasi yang relatif rumit. Hal ini merupakan kendala dalam aplikasi reaksi enzimatis pada skala industri. Oleh karena itu upaya untuk memperoleh sumber lipase yang murah sangat dibutuhkan. Salah satu bahan alami yang diketahui memiliki aktifitas lipase adalah dedak padi. Lipase ini merupakan faktor utama yang menyebabkan minyak dedak padi (*rice bran oil*) memiliki kandungan asam lemak bebas yang tinggi, mencapai 40-50 % (15). Di samping memiliki aktifitas hidrolitik, Ozgul dan Turkay (11) telah membuktikan bahwa lipase dedak padi juga memiliki aktifitas esterifikasi yang tinggi.

Minyak sawit merah (MSM) merupakan minyak kaya karoten yang diproduksi dari minyak sawit mentah dengan proses pemurnian khusus dan dapat digunakan sebagai minyak pangan. Selain karotenoid, MSM juga mengandung vitamin E yang relatif tinggi. Kandungan karotenoid dan vitamin E pada MSM masing-masing berkisar antara 500-700 ppm dan 600-1000 ppm (4). MSM juga kaya akan asam oleat (C18:1) yang diketahui dapat menurunkan kandungan kolesterol dalam serum darah dan meningkatkan stabilitas oksidatif minyak (2).

Pada penelitian ini dilakukan modifikasi MSM dengan menginkorporasikan asam lemak n-3, terutama EPA dan DHA, dari minyak ikan tuna. Inkorporasi dilakukan dengan reaksi asidolisis menggunakan Lipozyme-IM dan dedak padi sebagai bio-

katalisator, sesuai dengan hasil seleksi yang telah dilakukan pada Penelitian sebelumnya (6). Penggunaan MSM sebagai pembawa (*carrier*) asam lemak n-3 dapat memberikan beberapa nilai tambah, yakni (i) dapat dihasilkan suatu produk minyak yang tidak hanya kaya akan asam lemak n-3, tetapi juga kaya akan vitamin A dan E, (ii) kandungan karoten dan vitamin E pada MSM dapat merupakan *barrier* alami dalam mencegah kerusakan oksidatif produk maupun pada saat proses produksi dilakukan.

Adapun tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh waktu reaksi dan rasio substrat, yakni konsentrat asam lemak n-3 dan MSM, terhadap tingkat inkorporasi asam lemak n-3. Disamping itu juga dilakukan pengamatan pengaruh asidolisis terhadap kandungan karoten dan vitamin E pada MSM yang digunakan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

MSM diperoleh dari PT Kilang Vecolina Bakrie, Jakarta. Minyak ikan tuna yang merupakan *tuna pre-cook oil* diperoleh dari PT Aneka Tuna, Gempol, Jawa Timur. Dari minyak ikan tuna dilakukan isolasi asam lemak n-3 dengan metode kristalisasi urea (5). Enzim yang digunakan adalah lipase imobil *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) dari Novo Nordisk Bioindustrial Ltd. (Denmark), sedangkan dedak padi varietas Merah Munte diperoleh dari sebuah penggilingan padi di Pancur Batu. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Oleo Pangan Pusat Penelitian Kelapa Sawit pada bulan Juni hingga September 1998.

Reaksi asidolisis enzimatik

Reaksi asidolisis dilakukan antara konsentrat asam lemak n-3 dan MSM pada berbagai tingkat rasio dengan Lipozyme-IM (sebanyak 5 % b/b) atau dedak padi (sebanyak 10 % b/b) sebagai biokatalisator. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam, sambil diaduk pada *orbital shaker* dengan kecepatan 300 rpm. Udara dalam bejana digantikan dengan gas N₂ untuk mencegah oksidasi. Semua reaksi dilakukan dengan 2 ulangan dan analisis dilakukan secara duplo. Reaksi dihentikan dengan penambahan campuran pelarut aseton/etanol (1:1, v/v), lalu lipase imobil atau dedak padi dipisahkan dengan penyaringan. Proses ekstraksi fraksi lipida dilakukan dengan penambahan heksana, metanol dan air dengan volume yang sama. Campuran ini kemudian dititrasi dengan NaOH metanolik 0,5 N untuk menghilangkan asam lemak bebas yang terdapat pada produk. Campuran dipisahkan menjadi 2 fase melalui sentrifusi. Lapisan atas diambil dan diuapkan pelarutnya.

Analisis

Analisis kandungan asam lemak dilakukan setelah proses metilasi sampel dengan BF₃-metanol (14 %b/v), menggunakan alat kromatografi gas Perkin Elmer 8420 yang dilengkapi dengan detektor FID dan kolom kapiler DB-225 (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA). Suhu injektor dan detektor sebesar 260 °C, sedangkan suhu oven 220 °C dan tekanan gas Hidrogen sebagai gas pembawa sebesar 15 psig. Kadar relatif metil ester asam lemak dihitung dengan menggunakan C17:0 sebagai standar internal.

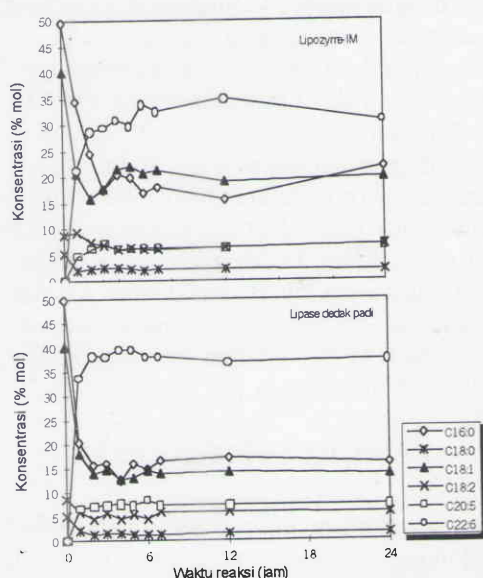
Analisis kandungan gliserida dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis pada plat yang dilapisi dengan silika gel 60. Plat dikembangkan dengan pelarut petroleum eter/dietil eter/asam asetat (90:10:1 v/v/v), serta visualisasi spot dilakukan dengan penyemprotan 2',7'-diklorofluoresens 0,2 % (b/v) dalam etanol. Kandungan trigliserida (TG) dihitung berdasarkan berat relatif fraksi TG dengan mono-, digliserida dan asam lemak. Kandungan karoten dianalisis dengan menggunakan metode PORIM (14) dan vitamin E menggunakan metode Funter-Meyer (3).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan asam lemak pada MSM didominasi oleh asam palmitat (C16:0) dan asam oleat (C18:1), masing-masing sebesar 49,6 dan 40,1 %mol dari total asam lemak, sedangkan asam lemak tidak jenuh ganda yang terdeteksi hanyalah asam linoleat (C18:2n-6) sebesar 8,6 %mol. Pada reaksi asidolisis yang dilakukan, MSM digunakan sebagai sumber molekul TG, sedangkan konsentrat asam lemak n-3 digunakan sebagai sumber asil EPA dan DHA. Konsentrat asam lemak n-3 disiapkan dari minyak ikan tuna. Kandungan EPA dan DHA pada minyak ikan tuna masing-masing adalah sebesar 3,9 dan 12,7 %mol, sedangkan pada konsentrat asam lemak n-3 sebesar 7,8 dan 55,2 %mol.

Tingkat inkorporasi asam lemak n-3

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase dedak padi memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menginkorporasikan asam lemak n-3 pada MSM (Gambar 1).



Gambar 1. Perubahan konsentrasi asam lemak pada minyak sawit merah selama asidolisis dengan konsentrasi asam lemak n-3 dari minyak ikan tuna

Inkorporasi EPA dan DHA telah terjadi pada saat awal reaksi dengan kecepatan yang cukup tinggi. Hasil uji DMRT ($p < 0,01$) menunjukkan bahwa tingkat inkorporasi EPA dan DHA masing-masing telah mencapai maksimum pada waktu reaksi 2 dan 4 jam dengan lipase dedak padi serta 3 dan 6 jam dengan Lipozyme-IM. Dengan demikian, waktu reaksi yang dibutuhkan untuk menghasilkan MSM kaya asam lemak n-3 adalah 4 jam dengan dedak padi dan 6 jam dengan Lipozyme-IM, karena komposisi asam lemak pada hasil asidolisis tidak mengalami perubahan yang nyata lagi. Kandungan EPA dan DHA pada MSM termodifikasi dengan lipase dedak padi masing-masing adalah 7,8 dan 39,4

%mol, sedangkan dengan Lipozyme-IM adalah 6,3 dan 33,8 %mol.

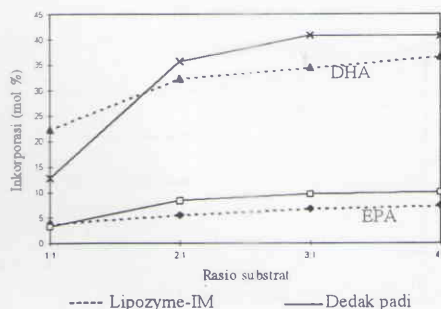
Dengan waktu untuk mencapai keseimbangan EPA yang lebih rendah dibandingkan DHA, dapat dinyatakan bahwa kedua jenis lipase yang digunakan memiliki sifat spesifisitas terhadap EPA yang lebih tinggi dibandingkan DHA. Pedersen dan Holmer (13) telah mengemukakan hal yang sama, yaitu hal ini disebabkan oleh perbedaan jumlah dan letak ikatan rangkap yang terdapat pada kedua jenis asam lemak tersebut. EPA memiliki jumlah ikatan rangkap yang lebih sedikit dan ikatan rangkap pertamanya terletak lebih jauh dari ujung karboksil (posisi 5) dibandingkan DHA yang memiliki 6 buah ikatan rangkap dan letak ikatan rangkap pertamanya lebih dekat dengan ujung karboksil (posisi 4).

Dari Gambar 1 juga terlihat bahwa inkorporasi EPA dan DHA pada MSM diikuti oleh penurunan konsentrasi asam lemak jenuh dan monoenoat, yakni asam lemak C16:0, C18:0, dan C18:1. Penurunan konsentrasi asam lemak terbesar adalah pada asam lemak C16:0 dan C18:1, karena asam lemak ini merupakan asam lemak utama yang terdapat pada MSM. Tingkat penurunan konsentrasi kedua jenis asam lemak tersebut mencapai lebih dari 50 %. Dari Gambar 1 juga terlihat bahwa Lipozyme-IM menghasilkan penurunan konsentrasi C16:0 yang lebih tinggi dibandingkan C18:1. Hal ini dapat dimengerti karena minyak sawit banyak mengandung asam lemak C18:1 pada posisi sn2- molekul trigliserida (TG)nya, diantaranya POP 25,9 % dan POO 18,9 % (12). Dengan sifat spesifisitas posisional sn1,3- yang dimiliki oleh Lipozyme-IM, maka diperkirakan asam lemak C18:1 pada posisi sn2- tidak dapat dipertukarkan dengan asam lemak n-3. Sebaliknya dengan

lipase dedak padi, tingkat penurunan konsentrasi asam lemak C16:0 dan C18:1 hampir sama. Fenomena ini dapat menjelaskan bahwa sifat spesifisitas lipase dedak padi cenderung non-posisional.

Peningkatan rasio substrat, yakni rasio konsentrat asam lemak n-3 dan MSM, dapat meningkatkan inkorporasi EPA dan DHA (Gambar 2). Tingkat inkorporasi EPA dan DHA pada rasio substrat 2:1 dengan menggunakan lipase dedak padi masing-masing adalah 8,2 dan 35,6 %mol, sedangkan dengan Lipozyme-IM adalah 5,5 dan 32,2 %mol. Tingkat peningkatan konsentrasi DHA yang terjadi adalah lebih besar dibandingkan EPA. Hal ini disebabkan karena jumlah DHA yang lebih banyak dalam campuran substrat, sehingga tingkat peluang DHA untuk masuk ke interfase dan berinteraksi dengan sisi aktif enzim juga lebih besar untuk kemudian ditransfer ke molekul gliserida MSM. Dari uji DMRT ($p < 0,01$) juga diperoleh bahwa tidak terjadi peningkatan konsentrasi EPA dan DHA pada peningkatan rasio substrat 3:1 ke 4:1.

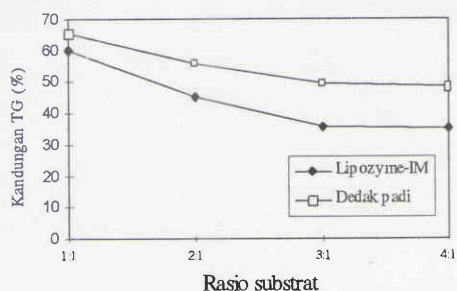
Meskipun peningkatan rasio substrat dapat meningkatkan inkorporasi asam lemak n-3, namun peningkatan konsentrasi EPA dan DHA yang terjadi tidak seimbang dengan peningkatan penggunaan konsentrat asam lemak n-3. Penggunaan konsentrat asam lemak n-3 dalam jumlah yang tinggi membutuhkan biaya yang mahal, karena proses preparasinya menggunakan pelarut dalam jumlah yang cukup besar. Di samping itu, peningkatan jumlah asam lemak bebas yang harus dipisahkan dari campuran reaksi membutuhkan biaya yang lebih tinggi pula. Dengan demikian rasio 2:1 merupakan tingkat rasio substrat yang optimum untuk sintesis MSM kaya asam lemak n-3



Gambar 2. Pengaruh rasio substrat (konsentrat asam lemak n-3 dan MSM) terhadap inkorporasi EPA dan DHA

Kandungan trigliserida (TG)

Kandungan TG dalam produk MSM kaya asam lemak n-3 dengan lipase Lipozyme-IM lebih rendah dibandingkan dengan lipase dedak padi (Gambar 3). Perbedaan kandungan TG ini berhubungan erat dengan aktifitas lipase yang mempengaruhi kesetimbangan reaksi. Pada asidolisis terjadi reaksi yang simultan antara hidrolisis dan esterifikasi untuk proses pertukaran asilnya. Kecepatan reaksi-reaksi ini sangat dipengaruhi oleh kadar air yang terdapat dalam campuran reaksi (7). Dengan kandungan TG yang lebih rendah berarti tingkat aktifitas hidrolitik Lipozyme-IM lebih tinggi daripada dedak padi. Atau dengan perkataan lain, lipase dedak padi memiliki kemampuan yang lebih tinggi dalam mengesterkan asil pada kerangka gliserol molekul gliserida yang terdapat pada MSM. Hal ini juga terlihat pada tingkat inkorporasi EPA dan DHA oleh lipase dedak padi yang lebih tinggi dibandingkan dengan Lipozyme-IM.



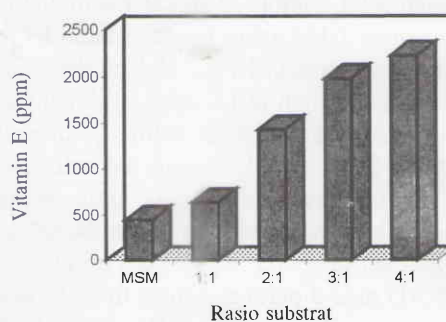
Gambar 3. Pengaruh rasio substrat konsentrat asam lemak n-3 dan MSM terhadap kandungan TG pada MSM termodifikasi.

Dari Gambar 3 juga terlihat bahwa kandungan TG pada produk MSM kaya asam lemak n-3 cenderung menurun dengan peningkatan rasio substrat. Penurunan ini dapat dihubungkan dengan tingkat kompetisi kedua jenis substrat dalam mencapai sisi aktif enzim. Dengan rasio substrat yang tinggi berarti jumlah molekul asam lemak terdapat dalam jumlah yang berlebihan, sehingga molekul-molekul gliserida memiliki peluang yang lebih rendah untuk berinteraksi dengan enzim. Kandungan TG yang rendah ini menunjukkan bahwa tingkat esterifikasi asam lemak pada molekul-molekul gliserida parsial juga rendah. Dengan demikian konversi molekul MG menjadi DG dan DG menjadi TG terjadi dengan laju yang rendah pula.

Kandungan β -karoten dan vitamin E

Dengan reaksi enzimatik selama 6 jam pada suhu 40 °C, maka kandungan β -karoten pada produk MSM kaya asam lemak n-3 dapat dipertahankan lebih dari 65 % dibandingkan dengan kandungan awal-

nya. Kandungan β -karoten awal pada MSM adalah sebesar 488 ppm dan pada produk modifikasinya berkisar antara 380-436 ppm. Penurunan kandungan karoten ini dapat terjadi karena proses oksidasi yang disebabkan oleh radikal-radikal bebas atau peroksida yang terdapat pada konsentrat asam lemak n-3. Oleh karena itu, mutu oksidatif dari minyak ikan dan konsentrat asam lemak n-3 yang digunakan sebagai sumber EPA dan DHA harus memperoleh perhatian yang memadai.



Gambar 4. Kandungan vitamin E pada MSM dan produk modifikasi enzimatisnya dengan beberapa tingkat rasio substrat

Kandungan vitamin E dalam produk MSM kaya asam lemak n-3 meningkat dengan peningkatan rasio substrat yang digunakan (Gambar 4). Hal ini mengindikasikan bahwa vitamin E yang terdapat dalam minyak ikan ikut terekstrak pada MSM kaya asam lemak n-3. Kandungan tokoferol pada minyak ikan cukup tinggi, yakni berkisar antara 200 hingga lebih dari 1000 ppm (18). Dengan rasio substrat 2:1, maka kandungan vitamin E dalam produk meningkat menjadi 1428 ppm dari kandungan awalnya pada MSM sebesar 445 ppm.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dedak padi dapat digunakan sebagai biokatalis dalam menginkorporasikan asam lemak n-3 dari minyak ikan pada MSM. Dibandingkan dengan lipase mikrobial, dedak padi merupakan sumber lipase yang murah harganya dan mudah diperoleh. Namun demikian, masih diperlukan penelitian lebih lanjut tentang karakter, aktifitas dan stabilitas dari dedak padi sebagai katalisator.

Inkorporasi asam lemak n-3 pada MSM telah mencapai maksimum pada waktu reaksi 4 jam dengan lipase dedak padi dan 6 jam dengan Lipozyme-IM. Tingkat rasio substrat, yakni rasio konsentrat asam lemak n-3 dan MSM, yang optimum adalah 2 : 1 (b/b). Produk modifikasi MSM dengan dedak padi sebagai katalisator mengandung EPA dan DHA masing-masing sebesar 8,2 dan 35,6 %mol, sedangkan dengan Lipozyme-IM 5,5 dan 32,2 %mol. Dengan reaksi enzimatis selama 6 jam maka kandungan β -karoten pada MSM dapat dipertahankan lebih dari 65 %, sedangkan kandungan vitamin E-nya meningkat karena vitamin E dari minyak ikan ikut terekstrak dalam produk MSM kaya asam lemak n-3.

DAFTAR PUSTAKA

1. AKOH, C.C., B.H. JENNINGS and D.A. LILLARD. 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(8):1059-1062.
2. AKOH, C.C. 1995. Structured lipids-enzymatic approach. *Inform* 6(9): 1055-1061.
3. APRIYANTONO, A., N.L. PUSPITASARI, SEDARNAWATI dan S. BUDIYANTO. 1989. *Analisa Pangan*. PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
4. CHOO, Y.M., A.N. MA, S.C. YAP, L.K. OOL, and Y. BASIRON. 1997. Red palm oil - a carotene-rich, nutritious oil. *In Nutritional Components of Palm Oil*. Malaysian Palm Oil. AOCS Annual Meeting, Seattle, Washington, USA.
5. ELISABETH, J., F.G. WINARNO, M.A. WIRAKARTAKUSUMAH and D. FARDIAZ. 1994. Extraction of omega-3 fatty acids from pre-cook oil, the canned tuna industries by product. Paper on International Seminar on Fisheries, Oceanography and Remote Sensing. Bogor, November 18-19.
6. ELISABETH, J., A. JATMIKA, K. SINAGA, and H. SEMBIRING. 1998. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 PUFA into palm oil. *Proceeding of International Oil Palm Conference*. Bali, September 23-35, 1998.
7. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA and M.S. AUGUSTO. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(6): 579-582.
8. HUANG, K.H. and C.C. AKOH. 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(11):1277-1280.
9. HUANG, K.H., C.C. AKOH and M.C. ERICKSON. 1994. Enzymatic modification of melon seed oil: Incorporation of eicosapentaenoic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 42(11):2646-2648.
10. NETTLETON, J.A. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J. Am. Diet. Assoc.* 93(1):59-64.
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. PADLEY, F.B., F.D. GUNSTONE, and J.L. HARWOOD. 1995. Occurance and characteristics of oils and fats *dalam* F.D. GUNSTONE, J.L. HARWOOD dan F.B. PADLEY (eds). *The Lipid Handbook*. Chapman & Hall, Great Britain.
13. PEDERSEN, S.B. and G. HOLMER. 1995. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72(2):239-243.
14. PORIM. 1995. *Methods of Test for Palm Oil and Palm Oil Products*.
15. PRABHAKAR, J.V. and K.V.L.VENKATESH. 1986. A simple chemical methods for stabilization of rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 63(5): 644-646.

16. SIMOPOULOS, A.P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω -3 and ω -6 fatty acids : Biological effects and nutritional essentially. Am. Ins. of Nutr. 22:521-527.
17. SRIDHAR, R and G. LAKSHMINARAYANA. 1992. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into groundnut oil by lipase-catalyzed ester interchange. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(10):1041-1042.
18. SYVAOJA, E.L. and K. SALMINEN. 1985. Tocopherols and tocotrienols in Finnish Foods : Fish and Fish Products. J. Am. Oil Chem. Soc., 62(8):1245-1248.1.

Synthesis of n-3 PUFA-rich red palm oil by enzymatic acidolysis

Jenny Elisabeth, Angga Jatmika, and Krismawati Sinaga

Abstract

In this study, acidolysis between n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) concentrate from tuna oil and red palm oil (RPO) was investigated by using of Lipozyme-IM and rice bran lipase as biocatalyst. The n-3 PUFA-rich RPO product perhaps could be used as a food nutritificant and pharmaceutical. Besides the n-3 PUFA, the modified RPO product can be used as a source of provitamin A and vitamin E. The incorporation of EPA and DHA were followed by decreasing of saturated and monounsaturated fatty acids, particularly palmitic (C16:0) and oleic (C18:1) fatty acids. Increasing of substrate ratio, i.e. ratio of n-3 PUFA concentrate and RPO, could increase the extent of EPA and DHA incorporation, but the optimum ratio was 2:1 (w/w) because using of high amount of n-3 PUFA concentrate was relatively expensive. Using of the rice bran lipase could produce a modified RPO product with EPA and DHA content of 7.2 and 37.9 mol %, respectively, and 6.2 and 36.1 mol% by using the Lipozyme-IM. Using of the enzymatic process could retain the β -carotene content for more than 65 % and the vitamin E content could reach more than 1000 ppm, because the tocopherol of fish oil was also extracted in the product.

Key words: palm oil, n-3 PUFA, acidolysis, lipase

Introduction

Fish oil rich in n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), particularly EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5) and DHA (docosahexaenoic acid, C22:6), is known to reduce the risk of cardiovascular diseases, posses antitumor and antiinflammatory effects (16). DHA is present in great quantities in the phospholipids of brain and retina, therefore, it is also categorized as essential nutrient in the fetal and neonatal growth of humans (10). Although fish oil

has many beneficial effects, not everyone like to consume it. Its off-flavour is the main problem for using it in food preparation or as food nutriticants. One possible method to resolve this problem is to incorporate the n-3 PUFA from fish oil into vegetable oil and fat which are commonly consumed.

Several studies about synthesis of vegetable oil containing n-3 PUFA by using enzymatic process have been reported. The use of lipase as biocatalyst to synthesize n-3 PUFA-rich oil is preferred, because this

method has the advantage of relatively mild processing conditions at temperature close to ambient and low pressure. Therefore, it prevents the oxidative deterioration of n-3 PUFA. Sridhar and Lakshminarayana (17) reported the interesterification reaction between groundnut oil and n-3 PUFA methyl ester concentrate by using Lipozyme, lipase from *Mucor miehei*, as biocatalyst. Huang and Akoh (8), Huang *et al.* (9), and Akoh *et al.* (1) also reported the incorporation of n-3 PUFA into vegetable oils, including canola oil, peanut oil, soybean oil, Trisun 80, Trisun 90, and melon seed oil by using IM 60 from *M. miehei* and SP 435 from *Candida antarctica*.

Types of lipase that have been investigated in modified fat and oil are commonly microbial lipases. However, the application of the enzymatic reaction on an industrial scale is limited by the high prices of the microbial lipases. Therefore, other sources of lipase, such as plant lipases, may have advantages according to their low cost and availability aspect. Rice bran is known as an available source of lipase. Its hydrolytic activity causes the high free fatty acid content (40-50 %) of rice bran oil (15). Recently, Ozgul and Turkay (10) demonstrated that the rice bran lipase did not only have hydrolytic activity but also had esterification activity.

Red palm oil (RPO) is a carotene-rich oil, which is produced from crude palm oil by a special refining process and used as an edible oil. Beside the carotene, the content of vitamin E of RPO is also high. The carotenoid and vitamin E content of RPO were 500-700 ppm and 600-1000 ppm, respectively (4). The RPO is also rich in oleic acid, which is known lowering serum cholesterol and increasing the oxidative stability of oil (2).

In this research, modification of fatty acid composition of RPO by incorporation n-3 PUFA was studied. The acidolysis between n-3 PUFA concentrate from tuna oil and RPO was done by using two kinds of lipase, i.e. Lipozyme-IM from *R. miehei* and rice bran. The RPO containing n-3 PUFA has several beneficial qualities, such as (i) the product would serve as a single source of both n-3 PUFA, oleic acid, vitamin A and E, (ii) the carotene and vitamin E of RPO would act as natural barrier for oxidation reaction, both in the product and as long as the production process was done.

The purpose of this study was to investigate the effect of reaction time and ratio of the substrates, i.e. n-3 PUFA concentrate and RPO, on the extent of n-3 PUFA incorporation. In addition, β -carotene and vitamin E content in the modified RPO were also studied.

Materials and Methods

Materials

RPO was kindly provided by PT Kilang Vecolina Bakrie, Jakarta. Tuna oil as pre-cooked oil was obtained from PT Aneka Tuna, Gempol - East Java. Free n-3 PUFA concentrate was prepared from the tuna oil by the urea crystallization method (5). Immobilized lipase from *R. miehei* (Lipozyme-IM) was obtained from Novo Nordisk Bioindustry Ltd, Denmark, and rice bran was obtained from a local rice mill in Pancur Batu, North Sumatera. The study was done at Oleo Food Laboratory, IOPRI from June until September 1998.

Enzymatic acidolysis reaction

The acidolysis reaction between RPO and free n-3 PUFA concentrate was done

by using the Lipozyme-IM and rice bran lipase as biocatalyst. The mixture was incubated in an orbital shaker at 30 °C for 24 hours at 300 rpm. Air in the flask was replaced by N₂ gas to prevent oxidation. All reactions were in duplicate. The reaction was stopped by addition of acetone/ethanol mixture 1:1 (v/v) and the immobilized enzyme or rice bran was filtered. Extraction of lipid fraction was done by adding of hexane, methanol and distilled water, and then the mixture was titrated to shift the pH to alkaline with 0.5 N NaOH methanolic solution to remove the free fatty acids (FFA) in the product. The mixture was separated into two phases by centrifugation and the upper layer was taken out to evaporate the solvent.

Analysis

The residue was esterified with borontrifluoride (BF₃) methanol agent and analyzed by gas chromatography. A Perkin Elmer 8420 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and DB-225 fused silica capillary column (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA.) was used. The temperatures of injector and detector were maintained at 260°C. The column temperature was operated isothermally at 220°C. Hydrogen was used as the carrier gas. The relative content of fatty acid methyl ester (FAME) was quantitated with C17:0 as internal standard.

To analyze the changes of lipids content, the reaction products were separated by thin-layer chromatography (TLC) on pre-coated silica gel 60 plates developed with petroleum ether/ethyl ether/acetic acid (90:10:1 v/v/v) as eluent. Spots of each lipids were visualized by spraying 0.2 % (w/v) 2',7'-dichlorofluorescein in ethanol scraped off. The β -carotene content was

analyzed by PORIM method (14) and the vitamin E content by Funter-Meyer method (3).

Results and Discussion

The predominant fatty acid of RPO was palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1), representing 49.6 and 40.1 mol % of total fatty acid, respectively. The detected PUFA of the RPO was only linoleic acid (C18:2n-6) an average 8.6 mol %. On the acidolysis reaction, the RPO was used as source of triacylglycerol (TAG) molecule and the free n-3 PUFA concentrate was used as an acyl donor of EPA and DHA. The n-3 PUFA concentrate was prepared from tuna oil and yield of the concentrate varied from 20 to 24 % (w/w). The EPA and DHA content of the tuna oil were 3.9 and 12.7 mol %, whereas the n-3 PUFA concentrate were 7.8 and 55.2 mol %.

The extent of n-3 PUFA incorporation

The results obtained in the present experiment suggest that rice bran lipase had a better ability to incorporate n-3 PUFA from tuna oil into RPO (Figure 1).

The incorporation of EPA and DHA into RPO was happened on the initial reaction. Furthermore, the DMRT test proved that the maximum EPA and DHA incorporation were reached at 2 and 4 hours reaction time by rice bran lipase, and 3 and 6 hours by the Lipozyme-IM. It indicated that the fatty acid composition in the acidolysis product did not alter significantly after 4 hours reaction time by rice bran lipase and 6 hours by Lipozyme-IM. Thus, this results demonstrated that the optimum reaction time to produce n-3 PUFA-rich RPO by enzymatic acidolysis was only 4 until 6 hours. •The EPA and DHA content

of the modified RPO by the rice bran lipase was 7,8 and 39,4 mol %, respectively, and 6,3 and 33,8 mol % by Lipozyme-IM.

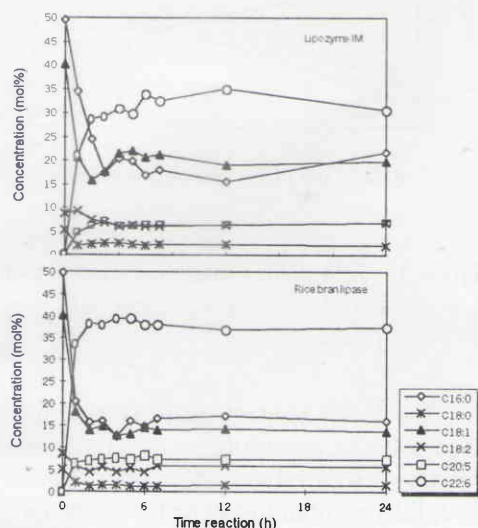


Figure 1. Changes of fatty acid composition of red palm oil during acidolysis with n-3 PUFA concentrate from tuna oil.

Both lipases had higher specificity toward EPA than DHA, since the time to reach EPA equilibrium was lower than DHA. It is accordance with Pedersen and Holmer (13), who stated that specificity of lipases toward fatty acid depended on the amount and position of the double bond. Generally the lipase specificity decrease with increasing unsaturation. EPA has 5 double bonds and its first double bond is located farer from the carboxylic end (5th position), whereas DHA has 6 double bonds and its first double bond is located at 4th position from the carboxylic end.

Figure 1 also showed that the incorporation of EPA and DHA into RPO was followed by decreasing of saturated and monoenoic fatty acid contents, i.e. C16:0,

C18:0 and C18:1. Generally, the major fatty acid contents, C16:0 and C18:1, were reduced by more than 50 % after several hours time reaction. The Lipozyme-IM gave a higher reduction of C16:0 than C18:1. This could be understand because palm oil contain much C18:1 fatty acid at sn2- position of TAG molecule, particularly POP 25,9 % and POO 18,9 % (12). With the sn1,3- positional specificity of Lipozyme-IM, it could be suggested that the C18:1 fatty acid at sn2- position could not be exchanged by the acyl of n-3 PUFA concentrate. On the contrary, the extent of reduction of C16:0 and C18:1 by rice bran lipase were relatively similar. This phenomenon could be explained by the non positional specificity of rice bran lipase.

Increasing the substrate ratio, that was ratio of n-3 PUFA concentrate and RPO, could increase the EPA and DHA incorporation (Figure 2). By using the rice bran lipase and substrate ratio of 2:1, the incorporation of EPA and DHA were 8.2 and 35.6 mol %, whereas by using Lipozyme-IM were 5.5 and 32.2 mol %, respectively. The extent of DHA incorporation was higher than EPA. This could be explained by the amount of DHA molecule in the substrate, which was higher than EPA. Therefore, the opportunity of DHA to adsorp into the interfacial phase, where the acidolysis reaction was occurred, and interact with the enzyme could be increased and then transferred into the glyceride molecule of RPO. The DMRT test proved that there was no increasing of EPA and DHA content by increasing the substrate ratio from 3:1 to 4:1.

Although the increasing of substrate ratio could increase the EPA and DHA incorporation, but the increment was not proporsional to the amount of n-3 PUFA concentrate. Using of high amount of n-3

PUFA concentrate is not preferable, because n-3 PUFA concentrate is relatively expensive caused by using a lot of solvent in its preparation process. Besides, the excessive content of free fatty acid in the mixture causes the neutralization process difficult. Therefore, the substrate ratio of 2:1 was chosen for the next synthesis n-3 PUFA-rich RPO.

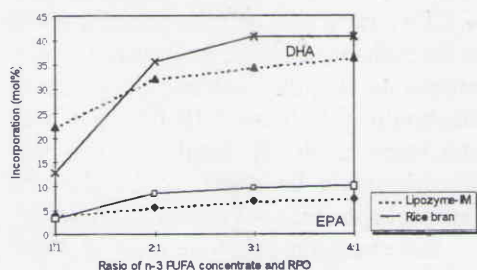


Figure 2. Effect of substrate ratio of n-3 PUFA concentrate and RPO to EPA and DHA incorporation.

TAG content

The TAG content in the modified RPO by Lipozyme-IM was lower than rice bran lipase (Figure 3). The difference related with the lipase activity that affect the equilibrium of reaction. There is a simultaneous reaction between hydrolysis and esterification for the exchange of acyl group in the acidolysis reaction. The velocity of each reaction was affected by the moisture content or A_w value of the substrate (7).

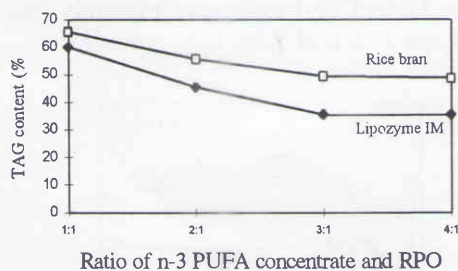


Figure 3. Effect of substrate ratio of n-3 PUFA concentrate and RPO to TAG content.

The lower content of TAG by Lipozyme-IM was according to its higher hydrolytic activity than rice bran lipase. Thus, the rice bran lipase had a better ability to esterify the acyl group of n-3 PUFA concentrate into the glycerol backbone of the RPO glyceride molecules. This was also shown by the higher incorporation of EPA and DHA by the rice bran lipase.

Figure 3 also showed that the TAG content of n-3 PUFA-rich RPO decreased as increasing of substrate ratio. It was related to the competition of two kinds of substrate, they were free n-3 PUFA and glyceride molecule of RPO, to reach the active site of enzyme. A high substrate ratio meant the excessive content of free fatty acids in the mixture and caused the glyceride molecule had low opportunity to interact with the enzyme molecule. The lower TAG content also showed that the esterification between free fatty acid and partial glyceride molecule, mono- and diacylglycerol (MAG and DAG), did not occur too good. Therefore, the conversion of MAG to DAG and DAG to TAG were occurred in a low rate.

β -Carotene and vitamin E contents

With 6 hours of enzymatic reaction at 40°C, the β -carotene content of RPO could be retained more than 65 %. The initial β -carotene content of the RPO was 488 ppm and the modified RPO was range in 380-436 ppm. Decreasing of the β -carotene content could be occurred by the oxidative process, which caused by the free radicals or peroxides in the substrate, especially in the n-3 PUFA concentrate. Therefore, the oxidative quality of the fish oil or n3-PUFA concentrate must have a great attention.

Vitamin E content of the n-3 PUFA-rich RPO increased as increasing of the substrate ratio (Figure 4). This indicates that vitamin E of tuna oil was extracted, too in the modified RPO product. There is a high amounts of vitamin E, particularly tocopherol, in the fish oil, range in 200-1000 ppm (18). By the substrate ratio of 2:1, the vitamin E content of the modified RPO increased to 1428 ppm from the initial content of 445 ppm in the RPO.

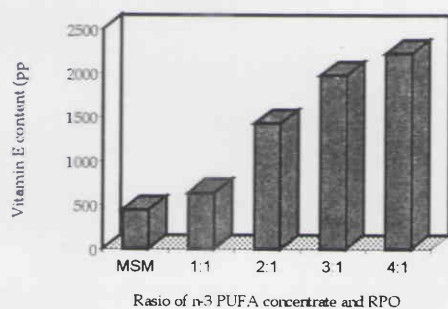


Figure 4. Vitamin E content of RPO and its enzymatic modified product with several ratio of substrate.

Conclusion and Suggestion

Rice bran lipase can be used as biocatalyst to incorporate n-3 PUFA from fish oil into RPO. Compared to the microbial lipases, rice bran is an inexpensive and available source of lipase. Further investigation on its characteristics, activity and stability should be interested.

Incorporation of n-3 PUFA into RPO had been maximum at 4 hours reaction time by the rice bran lipase and 6 hours by the Lipozyme-IM. The optimum ratio of substrate, that was ratio of n-3 PUFA concentrate and RPO, was 2:1 (w/w). By using the rice bran lipase, the incorporation of EPA and DHA were 8.2 and 35.6 mol %, whereas by using Lipozyme-IM were 5.5 and 32.2 mol %, respectively.

With 6 hours of enzymatic reaction, the β -carotene content of RPO could be retained more than 65 %, and the vitamin E content could increased since the tocopherol of fish oil was extracted in the n-3 PUFA-rich RPO product.

References

1. AKOH, C.C, B.H. JENNINGS and D.A. LILLARD. 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(8):1059-1062.
2. AKOH, C.C. 1995. Structured lipids-enzymatic approach. *Inform* 6(9): 1055-1061.
3. APRIYANTONO, A., N.L. PUSPITASARI, SEDARNAWATI, dan S. BUDIYANTO. 1989. *Analisa Pangan*. PAU Pangan dan Gizi IPB, Bogor.
4. CHOO, Y.M., A.N. MA, S.C. YAP, L.K. OOL, and Y. BASIRON. 1997. Red palm oil - a carotene-rich, nutritious oil. *In* Nutritional Components of Palm Oil. Malaysian Palm Oil. AOCs Annual Meeting, Seattle, Washington, USA.
5. ELISABETH, J., F.G. WINARNO, M.A. WIRAKARTAKUSUMAH and D. FARDIAZ. 1994.

- Extraction of omega-3 fatty acids from pre-cook oil, the canned tuna industries by product. Paper on International Seminar on Fisheries, Oceanography and Remote Sensing. Bogor, November 18-19.
6. ELISABETH, J., A. JATMIKA, K. SINAGA, and H. SEMBIRING. 1998. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 PUFA into palm oil. Proceeding of International Oil Palm Conference. Bali, September 23-35, 1998.
 7. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA and M.S. AUGUSTO. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. J. Am. Oil Chem. Soc., 71(6): 579-582.
 8. HUANG, K.H. and C.C. AKOH. 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc., 71(11):1277-1280.
 9. HUANG, K.H., C.C. AKOH and M.C. ERICKSON. 1994. Enzymatic modification of melon seed oil: Incorporation of eicosapentaenoic acid. J. Agric. Food Chem., 42(11):2646-2648.
 10. NETTLETON, J.A. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? J. Am. Diet. Assoc. 93(1):59-64.
 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. PADLEY, F.B., F.D. GUNSTONE, and J.L. HARWOOD. 1995. Occurrence and characteristics of oils and fats *dalam* F.D. GUNSTONE, J.L. HARWOOD dan F.B. PADLEY (eds). The Lipid Handbook. Chapman & Hall, Great Britain.
 13. PEDERSEN, S.B. and G. HOLMER. 1995. Studies of the fatty acid specificity of the lipase from *Rhizomucor miehei* toward 20:1n-9, 20:5n-3, 22:1n-9 and 22:6n-3. J. Am. Oil Chem. Soc., 72(2):239-243.
 14. PORIM. 1995. Methods of Test for Palm Oil and Palm Oil Products.
 15. PRABHAKAR, J.V. and K.V.L.VENKATESH. 1986. A simple chemical methods for stabilization of rice bran. J. Am. Oil Chem. Soc., 63(5): 644-646.
 16. SIMOPOULOS, A.P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω -3 and ω -6 fatty acids: Biological effects and nutritional essentially. Am. Ins. of Nutr. 22:521-527.
 17. SRIDHAR, R and G. LAKSHMINARAYANA. 1992. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into groundnut oil by lipase-catalyzed ester interchange. J. Am. Oil Chem. Soc., 69(10):1041-1042.
 18. SYVAOJA, E.L. dan K. SALMINEN. 1985. Tocopherols and tocotrienols in Finnish Foods: Fish and Fish Products. J. Am. Oil Chem. Soc., 62(8):1245-1248.1.

ooOoo