

OPTIMASI PROSES GLISEROLISIS ENZIMATIK PADA MINYAK SAWIT UNTUK MENINGKATKAN HASIL MONOGLISERIDA

Jenny Elisabeth, Angga Jatmika, dan O.P. Sitanggang

ABSTRAK

Pengaruh faktor suhu dan kadar air dalam proses gliserolisis antara minyak sawit mentah (MSM), stearin minyak sawit, dan minyak inti sawit (MIS) dengan gliserol dipelajari dengan menggunakan lipase Lipozyme-IM sebagai biokatalisator. Kandungan MG dan DG tertinggi pada hasil gliserolisis MSM dan MIS diperoleh pada perlakuan suhu reaksi terprogram, yakni dengan penurunan suhu sebesar 10°C dari suhu reaksi awal setelah 24 jam reaksi. Untuk MSM digunakan suhu reaksi awal 50 °C dan MIS 40 °C. Hasil ini berhubungan dengan perbedaan titik cair yang dimiliki oleh masing-masing jenis fraksi gliserida. Dengan penurunan suhu sebesar 10°C, maka kesetimbangan reaksi akan bergeser dan mendorong proses hidrolisis trigliserida (TG) menjadi digliserida (DG) dan DG menjadi monogliserida (MG). Kandungan asam lemak bebas (ALB) pada produk gliserolisis juga meningkat dengan peningkatan waktu reaksi. Hal ini mengindikasikan bahwa aktifitas lipase Lipozyme-IM relatif rendah dalam proses esterifikasi antara ALB dan gliserol. Kadar air dalam substrat juga berpengaruh terhadap kandungan MG dan DG dalam produk gliserolisis. Semakin tinggi kadar air dalam substrat maka kandungan MG dan DG cenderung semakin meningkat dan kandungan MG tertinggi terdapat pada perlakuan kadar air 12%.

Kata kunci : Minyak sawit, monogliserida, digliserida, lipase, gliserolisis enzimatis

PENDAHULUAN

Mono- dan digliserida (MG dan DG) merupakan surfaktan non-ionik yang digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil pada produk-produk pangan, kosmetika, dan farmakoseutika. MG dan DG dikategorikan sebagai bahan pengemulsi yang aman untuk bahan pangan, sehingga penggunaannya mencapai 75% dari total bahan pengemulsi yang dibutuhkan pada industri pangan dunia. *World Health Organization (WHO)* membatasi bahwa campuran MG dan DG sebagai bahan pengemulsi (EEC Code 471) harus mengandung minimum 70% MG dan DG, dengan kandungan MG minimum 30% dan kandungan gliserol dan trigliserida (TG) maksimum 10% (5).

Saat ini MG dan DG untuk industri pangan diproduksi secara gliserolisis kimiawi dengan pencampuran gliserol, minyak/lemak alami dan katalis alkali Ca(OH)_2 , serta membutuhkan perlakuan pemanasan suhu 240-250°C (10). Proses gliserolisis kimiawi ini membutuhkan konsumsi energi tinggi, serta menghasilkan produk MG dan DG yang berwarna gelap, rasa yang tidak enak serta terbentuk senyawa-senyawa toksik hasil peroksidasi dan polimerisasi. Karena itu penggunaan reaksi sintesis enzimatis dengan katalis lipase banyak memperoleh perhatian, yang menghasilkan MG dan DG yang lebih aman serta membutuhkan biaya produksi dan pengelolaan limbah yang lebih rendah.

Beberapa penelitian tentang produksi MG dan DG dengan proses gliserolisis enzimatis telah dilakukan, baik dalam

sistim mikroemulsi (4) ataupun gliserolisis fase padat (6), dengan enzim bebas dan imobil (7), serta dengan atau tanpa penggunaan pelarut organik (1). Jenis minyak dan lemak yang digunakan adalah triolein, lemak sapi, dan beberapa jenis minyak nabati seperti minyak sawit, minyak kelapa, minyak zaitun, minyak jagung, minyak *rapeseed*, dan minyak kedelai. Elisabeth *et al.* (2) telah mempelajari proses gliserolisis minyak sawit mentah (MSM) dan turunannya, serta minyak inti sawit (MIS) untuk menghasilkan MG dan DG dengan lipase *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) sebagai katalisator. Produk hasil gliserolisis mengandung DG yang cukup tinggi (40-50%), namun kandungan MG masih relatif rendah (10%). Makalah ini melaporkan hasil penelitian lanjutan tentang pengaruh faktor suhu dan kadar air dalam meningkatkan kandungan MG dan DG pada proses gliserolisis MSM, stearin sawit dan MIS.

BAHAN DAN METODE

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah MSM, stearin dan MIS yang diperoleh dari PT Pamina (PT Perkebunan Nusantara IV). Enzim yang digunakan adalah lipase imobil dari *R. miehei* (Lipozyme-IM) produksi Novo Nordisk Bioindustry Inc., Denmark. Pelarut dan bahan kimia yang digunakan merupakan produk Merck, Jerman dengan kualitas analitik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Oleo Pangan - Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan.

Reaksi gliserolisis enzimatik

Minyak dan gliserol dicampur dengan rasio molar 1:3 sebanyak 5 g dalam erlenmeyer tertutup, serta ditambahkan lipase

Lipozyme-IM sebanyak 5% (b/b). Untuk perlakuan kadar air, dilakukan penghilangan air yang terdapat pada MSM dan gliserol dengan menggunakan *molecular sieves* 3Å dan selanjutnya kadar air pada reaktan ditepatkan dengan penambahan air pada gliserol. Campuran tersebut diinkubasi pada kecepatan pengadukan orbital 300 rpm dan waktu reaksi minimum 24 jam. Adapun suhu reaksi yang digunakan berbeda untuk masing-masing jenis minyak, yaitu :

- Untuk MSM dan stearin digunakan 4 tingkat suhu :
 - a. Suhu tetap 40°C (T_{40})
 - b. Suhu tetap 50°C (T_{50})
 - c. Suhu awal 40°C dan diturunkan menjadi 30°C setelah 24 jam reaksi (T_{40-30})
 - d. Suhu awal 50°C dan diturunkan menjadi 40°C setelah 24 jam reaksi (T_{50-40})
- Untuk MIS digunakan 3 tingkat suhu :
 - a. Suhu tetap 30°C (T_{30})
 - b. Suhu tetap 40°C (T_{40})
 - c. Suhu awal 40°C dan diturunkan menjadi 30°C setelah 24 jam reaksi (T_{40-30})

Pemisahan lipase imobil dilakukan dengan penyaringan dan residu gliserol dihilangkan dengan penambahan air. Fraksi lipida diekstraksi dengan campuran petroleum eter dan metanol (1:1, v/v) dan kemudian pelarut diuapkan dengan evaporator vakum. Semua reaksi dilakukan dengan dua kali ulangan dan analisis dilakukan secara duplo.

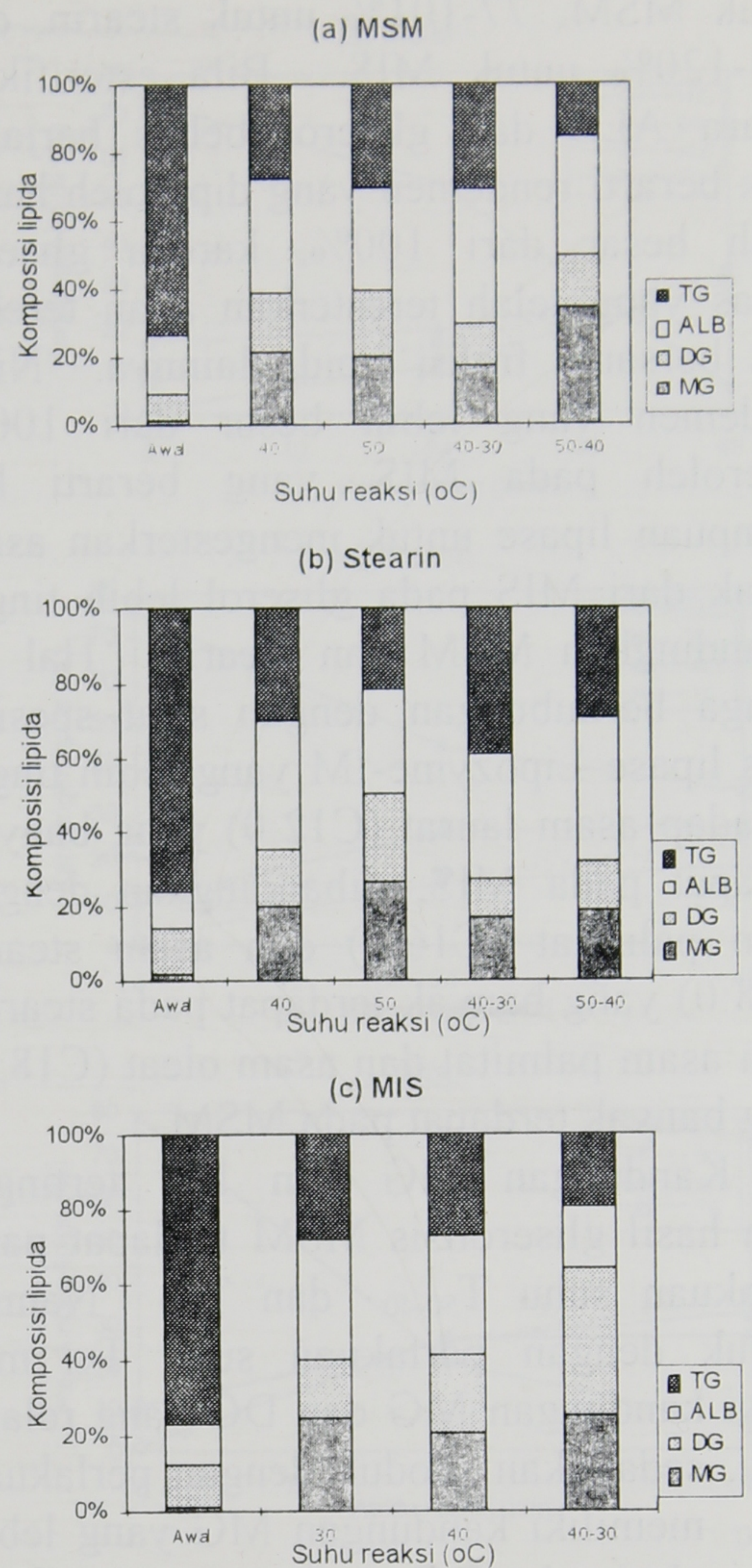
Analisis

Komposisi lipida dalam produk dianalisis dengan kromatografi lapis tipis

(*thin layer chromatography*/TLC) pada plat yang dilapisi dengan silika gel 60 dan dielusi dengan pelarut petroleum eter:dietil eter:asam asetat (70:30:1 v/v/v). Spot yang diperoleh dideteksi di bawah sinar UV setelah penyemprotan dengan larutan 2',7'-diklorofluoresens 0,2% dalam etanol, kemudian dikerok, diekstrak, dan ditimbang. Komposisi gliserida dihitung berdasarkan berat relatif dari masing-masing ekstrak fraksi. Rendemen dihitung dari perbandingan berat produk hasil gliserolisis dengan berat awal minyak yang digunakan. Titik cair minyak, yang digunakan sebagai bahan baku, dianalisis dengan metode AOCS Cc3-25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Faktor suhu reaksi mempengaruhi komposisi lipida pada produk gliserolisis MSM, stearin, maupun MIS (Gambar 1). Penggunaan suhu reaksi yang berbeda berkaitan dengan sifat fisik minyak, yakni titik cairnya. Berdasarkan hasil analisis, kisaran titik cair MSM, stearin, dan MIS, masing-masing adalah 35-39°C, 49-51°C, dan 26-28°C. Dengan penggunaan suhu reaksi awal 30 dan 40°C, maka MIS tetap terdapat dalam bentuk cair. Di sisi lain, penggunaan suhu reaksi 40 dan 50°C menyebabkan MSM terdapat dalam bentuk cair dan tidak demikian halnya pada suhu reaksi 30°C, sedangkan stearin masih terdapat dalam bentuk yang relatif padat meskipun pada suhu reaksi 50 °C. Dalam keadaan cair maka interaksi antar substrat dan antara substrat dengan lipase akan berlangsung lebih baik, sehingga konversi TG menjadi DG dan DG menjadi MG juga akan lebih tinggi.



Gambar 1. Komposisi lipida pada MSM, stearin, dan MIS awal dan hasil gliserolisis enzimatik dengan beberapa program suhu reaksi.

Kandungan MG, DG dan ALB pada produk gliserolisis ketiga minyak meningkat dibandingkan kandungan awalnya, diikuti dengan penurunan kandungan TG. Kandungan ALB pada produk gliserolisis ini mencapai lebih dari 30%. Data ini mengindikasikan bahwa lipase yang digunakan memiliki keterbatasan dalam proses esterifikasi antara ALB dan gliserol. Hal tersebut didukung oleh data rendemen yang diperoleh, yang berkisar antara 85-102%

untuk MSM, 77-101% untuk stearin, dan 108-120% untuk MIS. Bila esterifikasi antara ALB dan gliserol bebas berjalan baik berarti rendemen yang diperoleh harus lebih besar dari 100%, karena gliserol bebas yang telah teresterkan akan terekstrak bersama fraksi lipida lainnya. Nilai rendemen yang lebih besar dari 100% diperoleh pada MIS, yang berarti kemampuan lipase untuk mengesterkan asam lemak dari MIS pada gliserol lebih tinggi dibandingkan MSM dan stearin. Hal ini diduga berhubungan dengan sifat spesifisitas lipase Lipozyme-IM yang lebih tinggi terhadap asam laurat (C12:0) yang banyak terdapat pada MIS, dibandingkan dengan asam palmitat (C16:0) dan asam stearat (C18:0) yang banyak terdapat pada stearin, serta asam palmitat dan asam oleat (C18:1) yang banyak terdapat pada MSM.

Kandungan MG dan DG tertinggi pada hasil gliserolisis MSM terdapat pada perlakuan suhu T_{50-40} dan T_{50} . Namun produk dengan perlakuan suhu T_{50} memiliki kandungan MG dan DG yang relatif sama, sedangkan produk dengan perlakuan T_{50-40} memiliki kandungan MG yang lebih tinggi daripada DG. Dengan demikian penurunan suhu sebesar 10°C setelah 24 jam reaksi (T_{50-40}) dapat menghasilkan produk dengan kandungan MG yang lebih tinggi, yakni sebesar 30,3%, dibandingkan dengan penggunaan suhu tetap 50°C (T_{50}) sebesar 21,0%. Hasil ini berhubungan dengan perbedaan titik cair yang terdapat pada masing-masing fraksi gliserida, di mana titik cair MG lebih tinggi daripada DG dan DG lebih tinggi daripada TG. Penurunan suhu menyebabkan MG dan juga sebagian DG terdapat dalam bentuk padat, sehingga kecepatan konversi DG menjadi MG akan menjadi lebih kecil.

Pada hasil gliserolisis stearin, kandungan MG dan DG pada perlakuan suhu

tetap lebih tinggi dibandingkan suhu terprogram. Kandungan MG dan DG juga cenderung meningkat dengan peningkatan suhu reaksi, sehingga kandungan MG dan DG tertinggi terdapat pada perlakuan suhu T_{50} , masing-masing sebesar 24,5% dan 21,9%. Hasil MG dan DG yang diperoleh dari stearin ini juga lebih kecil dibandingkan dengan MSM. Hal ini disebabkan dengan penggunaan suhu reaksi maksimum 50°C , maka hampir semua fraksi gliserida yang ada dalam stearin terdapat dalam keadaan padat dan menghambat proses interaksi antara substrat dengan lipase. Penggunaan suhu reaksi yang lebih tinggi pada substrat stearin ini mungkin dapat meningkatkan jumlah MG dan DG, karena suhu reaksi maksimum untuk Lipozyme-IM adalah 70°C , namun sudah tentu umur penggunaan lipase tersebut akan berkurang.

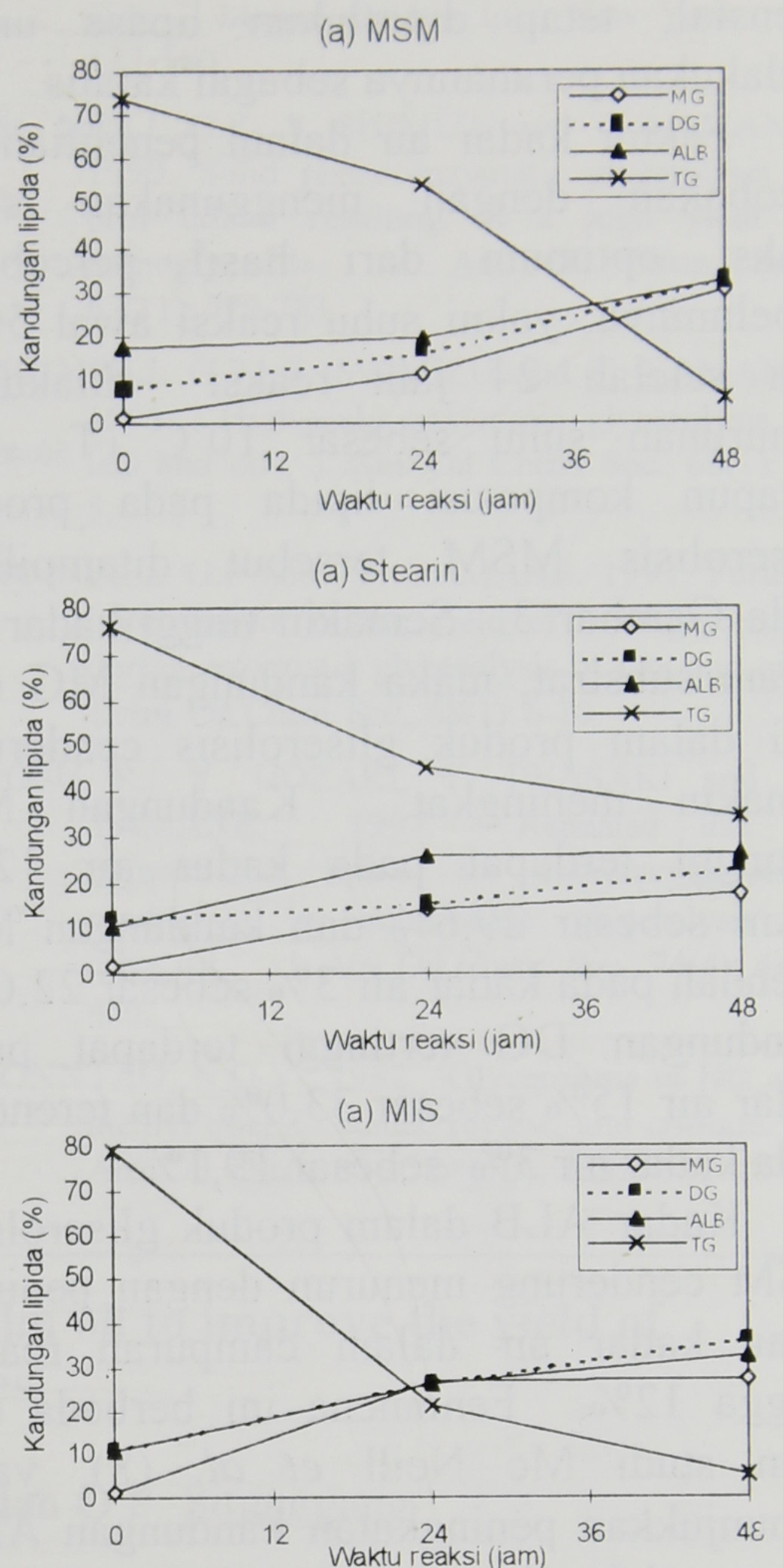
Total kandungan MG dan DG tertinggi pada produk gliserolisis MIS adalah pada perlakuan suhu terprogram dengan suhu awal 40°C dan setelah 24 jam dilakukan penurunan suhu sebesar 10°C (T_{40-30}). Kandungan MG dan DG tersebut masing-masing sebesar 24,6% dan 36,0%. Di sisi lain, kandungan MG pada produk gliserolisis dengan suhu reaksi 40°C lebih rendah dibandingkan suhu reaksi 30°C , sedangkan kandungan DG-nya lebih tinggi. Kandungan MG yang lebih rendah ini dapat disebabkan oleh terhidrolisisnya MG menjadi ALB dan gliserol, karena MG terdapat dalam keadaan cair pada suhu yang lebih tinggi. Di sisi lain, peningkatan kandungan DG dapat disebabkan oleh meningkatnya kecepatan reaksi hidrolisis TG menjadi DG oleh peningkatan suhu reaksi. Dalam hal ini terdapat perbedaan aktifitas hidrolitik dari masing-masing fraksi gliserida, yang ditandai kecepatan hidrolitik pada fraksi TG lebih besar dibandingkan

fraksi DG. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan spesifisitas lipase terhadap jenis molekul gliserida maupun karena jumlah fraksi TG yang lebih banyak dibandingkan DG dalam reaktan.

Pengamatan komposisi lipida pada produk gliserolisis setelah reaksi 24 dan 48 jam ditampilkan pada Gambar 2. Pengamatan dilakukan hanya pada perlakuan suhu optimum hasil percobaan sebelumnya, yakni pada MSM digunakan suhu reaksi terprogram T_{50-40} , pada stearin digunakan suhu reaksi tetap T_{50} , dan pada MIS digunakan suhu reaksi terprogram T_{40-30} .

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada proses gliserolisis stearin terjadi peningkatan kandungan MG dan DG yang relatif kecil setelah waktu reaksi 24 jam. Hal ini mengindikasikan bahwa kesetimbangan reaksi telah dapat tercapai pada waktu reaksi sekitar 24 jam dengan menggunakan suhu tetap. Sebaliknya pada penggunaan suhu terprogram, penurunan suhu sebesar 10°C akan mengubah kesetimbangan reaksi dan mendorong proses hidrolisis TG menjadi DG dan DG menjadi MG. Seperti telah dijelaskan sebelumnya, penurunan suhu akan mengubah molekul MG menjadi bentuk padat, sehingga memperkecil kemungkinan interaksi molekul MG dengan lipase dan proses hidrolisis MG menjadi ALB dan gliserol dapat dihambat.

Kandungan ALB juga meningkat setelah 24 jam reaksi dan penurunan suhu reaksi sebesar 10°C . Hal ini memperkuat dugaan bahwa aktifitas lipase Lipozyme-IM memang rendah dalam proses esterifikasi antara ALB dengan gliserol. Selain itu, perbedaan polaritas antara gliserol dengan substrat lipida juga merupakan faktor penghambat pada proses esterifikasi tersebut.



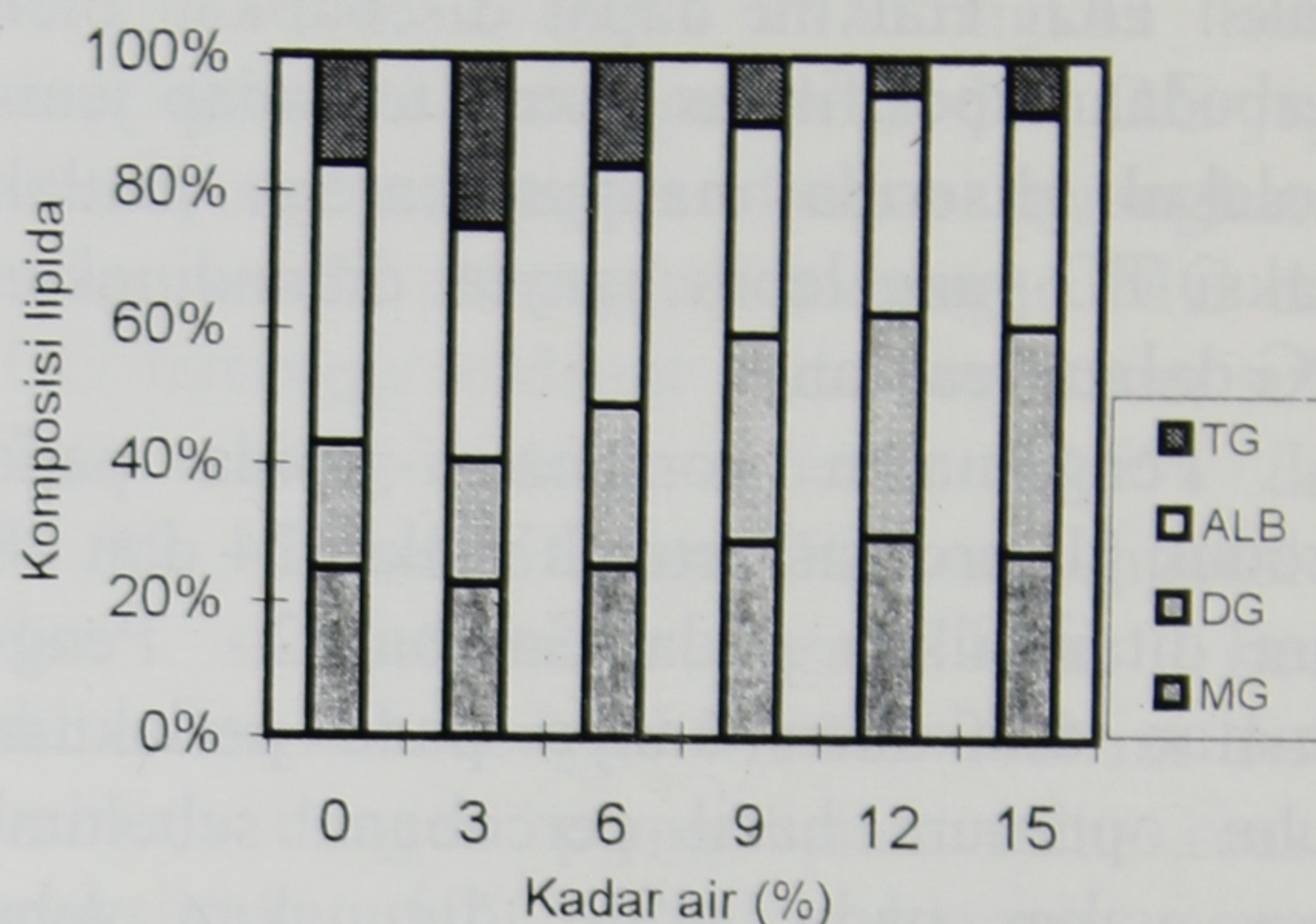
Gambar 2. Perubahan kandungan lipida pada proses gliserolisis MSM, stearin dan MIS setelah 24 dan 48 jam reaksi.

Aktifitas hidrolitik maupun aktifitas lipase dalam mengesterkan ALB pada gliserol sangat dipengaruhi oleh kadar air dalam campuran reaksi. Hal ini terlihat dari hasil penelitian yang menunjukkan bahwa kadar air dalam campuran reaksi berpengaruh sangat nyata ($p < 0.01$) terhadap kandungan MG dan DG dalam produk gliserolisis MSM. Penelitian Haryadi (3) juga telah menunjukkan bahwa sejumlah kecil air, yang disebutnya dengan air

esensial, tetap diperlukan lipase untuk melakukan peranannya sebagai katalis.

Faktor kadar air dalam penelitian ini dicobakan dengan menggunakan suhu reaksi optimum dari hasil percobaan sebelumnya, yakni suhu reaksi awal 50°C dan setelah 24 jam reaksi dilakukan penurunan suhu sebesar 10°C (T_{50-40}). Adapun komposisi lipida pada produk gliserolisis MSM tersebut ditampilkan pada Gambar 3. Semakin tinggi kadar air dalam substrat, maka kandungan MG dan DG dalam produk gliserolisis cenderung semakin meningkat. Kandungan MG tertinggi terdapat pada kadar air 12%, yakni sebesar 29,6% dan kandungan MG terendah pada kadar air 3% sebesar 22,6%. Kandungan DG tertinggi terdapat pada kadar air 15% sebesar 33,0% dan terendah pada kadar air 3% sebesar 19,1%.

Kadar ALB dalam produk gliserolisis MSM cenderung menurun dengan peningkatan kadar air dalam campuran reaksi hingga 12%. Fenomena ini berbeda dengan studi Mc Neill *et al.* (8), yang menunjukkan peningkatan kandungan ALB pada produk gliserolisis lemak sapi dengan peningkatan kadar air dari 0,6 menjadi 12,5% menggunakan lipase *Pseudomonas fluorescens*. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan kebutuhan air untuk aktifitas maksimum masing-masing jenis lipase. Gambar 3 juga memperlihatkan bahwa pada proses gliserolisis MSM tetap terjadi pembentukan ALB, meskipun kadar air dalam campuran reaksi telah dihilangkan dengan menggunakan *molecular sieves* 3A. Hal ini mengindikasikan bahwa kebutuhan air bagi aktifitas katalitik lipase Lipozyme-IM telah dapat dipenuhi oleh kandungan air yang terdapat dalam bahan penyangga lipase tersebut, karena Lipozyme-IM merupakan lipase imobil.



Gambar 3. Komposisi lipida pada produk hasil gliserolisis enzimatis MSM dengan kadar air yang berbeda.

KESIMPULAN

Kandungan MG dan DG tertinggi pada produk gliserolisis MSM dan MIS diperoleh pada perlakuan suhu reaksi terprogram, yakni dengan penurunan suhu sebesar 10°C dibandingkan suhu reaksi awal setelah 24 jam reaksi. Untuk MSM digunakan suhu reaksi awal 50 °C dan MIS 40 °C. Adapun kandungan MG dan DG pada produk gliserolisis MSM dan MIS tersebut masing-masing adalah 30,3% dan 21,0% serta 24,6% dan 36,0%. Kandungan ALB pada produk gliserolisis juga meningkat dengan peningkatan waktu reaksi. Hal ini mengindikasikan bahwa aktifitas lipase Lipozyme-IM relatif rendah dalam proses esterifikasi antara ALB dan gliserol.

Kadar air dalam substrat juga berpengaruh terhadap kandungan MG dan DG dalam produk gliserolisis MSM. Semakin tinggi kadar air dalam substrat maka kandungan MG dan DG cenderung semakin meningkat. Kandungan MG dan DG tertinggi terdapat pada perlakuan kadar air 12%, masing-masing sebesar 29,6% dan 32,8%.

DAFTAR PUSTAKA

- ARCOS, J.A. dan C. OTERO, 1996. Enzyme, medium, and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(6): 673-682.
2. ELISABETH, J., A. JATMIKA, E. NAINGGOLAN dan D. M. MALAU. 1998. Preparasi mono- dan digliserida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatik. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 6(1):79-87.
3. HARYADI, P. 1996. Synthesis of monoesters and mono- and diacylglycerol from butteroil by lipase-catalyzed esterification in microaqueous media. Dissertation. Univ. of Wisconsin, Madison, USA.
4. HOLMBERG, K. dan E. OSTERBERG, 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(9): 1544-1548.
5. KROG, N.J., 1990. Food emulsifiers and their chemical and physical properties *dalam* Food Emulsions, K. Larrson dan S.E. Friberg (eds.). Marcel Dekker Inc., New York. pp 127-180.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. SONNTAG, N.O.V., 1982. Glycerolysis of fats and methyl esters – status, review, and critique. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59 (10): 795A-802A.

Enzymatic glycerolysis optimization of palm oil to improve the yield of monoglycerides

Jenny Elisabeth, Angga Jatmika, dan O.P. Sitanggang

Abstract

Effects of reaction temperature and initial water content in enzymatic glycerolysis process of crude palm oil (CPO), palm stearin, and palm kernel oil (PKO) were studied as an effort to increase the yield of monoglycerides (MG). Lipozyme-IM lipase was used as biocatalyst. The highest yield of MG and DG from CPO and PKO were obtained at programmed reaction temperature, which the reaction temperature was reduced as 10°C after 24 hours reaction time. The initial reaction temperature for CPO was 50°C and PKO was 40°C. This treatment related to the melting point characteristic of each kind of oils and glyceride fractions. By reducing the reaction temperature as 10°C, the reaction equilibrium was altered and led the conversion of triglyceride (TG) to diglyceride (DG) and DG to MG molecules. Free fatty acid (FFA) content of the glycerolysis product was increased as increasing of reaction time. It indicates that the activity of Lipozyme-IM lipase was relatively low for esterifying the free fatty acid with glycerol. The initial water content in reaction mixture influenced the yield of MG and DG from CPO. Increasing the initial water content could increase the the yield of MG and DG, which the highest yield of MG and DG were obtained at 12% initial water content, i.e. 29.6% and 32.8%, respectively.

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

Introduction

Mono- and diglycerides (MG and DG) are non-ionic surfactants used as food, cosmetic, and pharmaceuticals emulsifiers and stabilizers. They are categorized as GRAS (Generally Recognized As Safe) emulsifiers for the food industry. The directives of the World Health Organization (WHO) requires that these mixtures (EEC code 471) have at least 70% MG and DG with a minimum of 30% MG, and that the contents of both glycerol and triglyceride (TG) must be below 10%.

Nowadays, MG and DG are produced by chemical synthesis in which glycerol, oil/fat, and an alkaline catalyst are mixed and heated to almost 250°C. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ is used as catalyst in the production of MG and DG for the food industry. This process is very energy consuming, results in the formation of dark-colored by-products with an undesirable flavor and toxic by peroxidation and polymerization. Therefore, using of lipase-catalyzed enzymatic synthesis is interesting, which is possible to produce more safety product and also low production and waste treatment cost.

A few articles on the production of MG and DG by enzymatic glycerolysis in different reaction systems with and without organic solvents (1), solid phase glycerolysis (6), with immobilized enzyme and with free enzyme (7) or in microemulsions (4). Fats and oils have been used as substrate was triolein, tallow, and vegetable oils like palm, coconut, olive, corn, rapeseed, and soybean oil. Furthermore, Elisabeth *et al.* (1998) also studied the glycerolysis of crude palm oil (CPO), palm stearin and olein, and palm kernel oil (PKO) to produce MG and DG by using Lipozyme-IM (*Rhizomucor miehei*) as catalyst. The glycerolysis product contained a rather

high yield of DG (40-50%), but the yield of MG was low (10%).

The present paper describes the further study about the effect of reaction temperature and moisture content to improve the yield of MG and DG from CPO, palm stearin, and PKO.

Materials and Methods

The oils used in this research were CPO, palm stearin, and PKO that supplied by PT Pamina Adolina, North Sumatera, Indonesia. Immobilized lipase of *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) was obtained from Novo Nordisk Bioindustry Ltd., Denmark. All solvents and chemicals were purchased from Merck, Germany, and had analytical grade. The research was carried out in Food Laboratory of IOPRI.

Enzymatic glycerolysis

A mixture of anhydrous glycerol and oil with molar ratio 1:3 was prepared in a 25 ml capped-erlenmeyer flask. The Lipozyme-IM was used at 5% (w/w) of substrate mixture. The water content arrangement were conducted by adding certain amount of water into the glycerol after removing initial water content in the glycerol and oil with molecular sieves 3Å. The mixture was incubated in an orbital shaker at 300 rpm at least 24 hours. Air in the flask was replaced by N_2 gas. The reaction temperature was different for each kind of oils. There were 4 levels of reaction temperature for enzymatic glycerolysis of CPO and palm stearin : (a) 40°C (T_{40}); (b) 50°C (T_{50}); (c) Initial temperature 40°C and reduced to 30°C after 24 hours reaction time (T_{40-30}); (d) Initial temperature 50°C and reduced to 40°C after 24 hours reaction time (T_{50-40}).

There were 3 levels of reaction temperature for enzymatic glycerolysis of PKO : (a) 30°C (T_{30}); (b) 40°C (T_{40}); (c) Initial temperature 40°C and reduced to 30°C after 24 hours reaction time (T_{40-30})

Inactivation of the lipase and removal of the excess glycerol was achieved by extraction of the reaction mixture with petroleum ether/methanol (1:1, v/v), and the immobilized lipase was filtered. All reactions 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 0.2% (b/v) in ethanol and scrapped off. The TG and free fatty acid (FFA) fraction was extracted by petroleum ether, DG fraction by petroleum ether/diethyl ether 1:1 (v/v), and MG fraction by diethyl ether. The composition of reaction mixture was analyzed by the relative weight% of each fraction. The yield was calculated as the weight of glycerolysis product divided by the initial weight of substrate oil, expressed as a percentage. The melting point of oil that used as substrate were determined with AOCS Cc3-25 (1993) method.

Results and Discussion

The reaction temperature influenced the lipid composition of CPO, palm stearin, and PKO after the enzymatic glycerolysis, as shown in Figure 1. Use of the different reaction temperature was related to the melting point of each kind of the oils. The

CPO, palm stearin, and PKO had the range of melting point 35-39°C, 49-51°C, and 26-28°C, respectively. At the reaction temperature 30°C and 40°C, PKO was still in liquid form during the reaction. In the case of CPO, it was liquid at the reaction temperature 40°C and 50°C, but it was in solid form in 30°C.

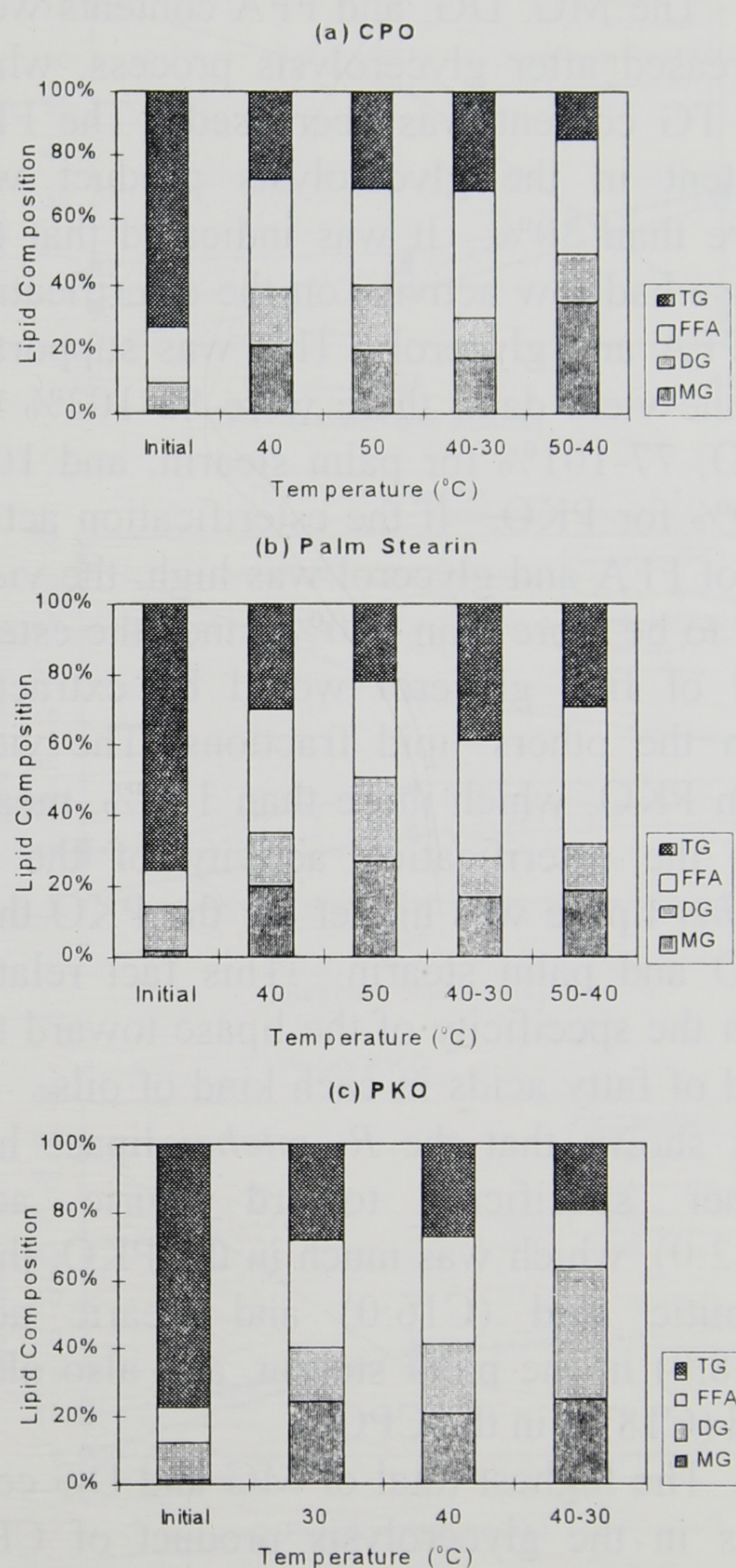


Figure 1. Lipid composition of initial CPO, palm stearin, PKO, and their glycerolysis product with several reaction temperature programs.

In contrast, palm stearin remained in solid form even at 50°C. In liquid form, interaction among the substrate molecules, i.e. between glycerol and oil, and between the substrate and the enzyme molecules occurred better in the solid form. Therefore, the conversion of TG into DG and DG into MG could be more effective.

The MG, DG, and FFA contents were increased after glycerolysis process, while the TG content was decreased. The FFA content in the glycerolysis product was more than 30%. It was indicated that the lipase had low activity on the esterification of FFA and glycerol. This was supported by the yield data; there were 85-102% for CPO, 77-101% for palm stearin, and 108-120% for PKO. If the esterification activity of FFA and glycerol was high, the yield had to be more than 100%, since the esterified of free glycerol would be extracted with the others lipid fractions. The yield from PKO, which more than 100%, means that the esterification activity of the *R. miehei* lipase was higher for the PKO than CPO and palm stearin. This fact related with the specificity of the lipase toward the kind of fatty acids in each kind of oils. It was shown that the *R. miehei* lipase had higher specificity toward lauric acid (C12:0), which was much in the PKO, than palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) in the palm stearin, and also oleic acid (C18:1) in the CPO.

The highest total of MG and DG contents in the glycerolysis product of CPO were obtained by reaction temperature T_{50-40} and T_{50} . But the MG and DG content of the glycerolysis product at reaction temperature T_{50} were in approximately equal amounts, whereas the product at T_{50-40} had higher MG than DG content. This describes that reduction in reaction temperature as 10°C after 24 hours reaction time

could increase the MG content. The MG content at T_{50-40} was approximately 30.3%, whereas 21.0% of MG was obtained at T_{50} . This results related with the melting point of each glyceride fraction, which the MG has a higher melting point than the corresponding DG and TG. By reducing the reaction temperature, the MG and also the DG molecules exceeded its solubility limit and begins to precipitate from solution and inhibited the further hydrolysis reaction of DG into MG.

The MG and DG contents of the glycerolysis product of palm stearin by using fixed temperature were higher than programmed temperature. The MG and DG contents were increased with the increasing of reaction temperature. The highest MG and DG contents in glycerolysis product of palm stearin were obtained at the fixed reaction temperature 50°C (T_{50}), that were 24.5% and 21.9%, respectively. These result were lower than MG and DG contents in glycerolysis product of CPO. It could be explained that at reaction temperature 50°C, almost all fractions in the palm stearin were in solid form and inhibited the interaction of substrate and lipase molecules. Using a higher reaction temperature for the palm stearin might increase the MG and DG contents, since the maximum temperature for Lipozyme-IM activity is 70°C. But using the high reaction temperature could decrease the life time of lipase.

The highest total of MG and DG content in the glycerolysis product of PKO was obtained at the programmed reaction temperature, i.e. with initial temperature 40°C and reduced it as 10°C after 24 hours reaction time (T_{40-30}). The MG and DG contents were 24.6% and 36.0%, respectively. In another hand, the MG content in glycerolysis product of PKO by using

reaction temperature 40°C was lower than 30°C , but the DG content was higher. The lower MG content reflected that the MG fraction was degraded into FFA and glycerol. By using the higher temperature MG molecules might not in the solid form and the lipase could interact with and hydrolyzed them. However, increasing of DG content could be occurred by the higher reaction rate in hydrolysis of TG into DG with the higher reaction temperature. The result indicated that the lipase had different hydrolytic activity toward each kind of glyceride molecule, whereas the lipase had high activity toward the TG molecules than DG molecules. This could be caused by the different of lipase specificity toward the kind of glyceride molecule and also that the amount of TG was higher than DG molecule and increase the interaction between lipase and TG molecule.

The lipid composition in the glycerolysis product of CPO, palm stearin, and PKO with 24 and 48 hours reaction time were shown in Figure 2. The optimum reaction temperature from the previous research was used, i.e. programmed temperature T_{50-40} for CPO, fixed temperature T_{50} for palm stearin, and programmed temperature T_{40-30} for PKO.

Figure 2 shows that the MG and DG contents of glycerolysis product of palm stearin were only slightly increase after 24 hours reaction time. This indicates that equilibrium was probably reached after 24 hours reaction time with the fixed reaction temperature. This agrees with the results of Mc Neill et al. (6) that equilibrium of glycerolysis reaction with different type oil and fat was reached in about 25 hours. In contrary, the equilibrium was altered by reducing temperature as 10°C at programmed reaction temperature and increase the hydrolysis of TG into DG and DG into MG.

As described before, reduction of reaction temperature might precipitate the MG molecules into solid form, decreased the possibility of interaction between MG and lipase molecules, and inhibited the hydrolysis of MG into FFA and glycerol.

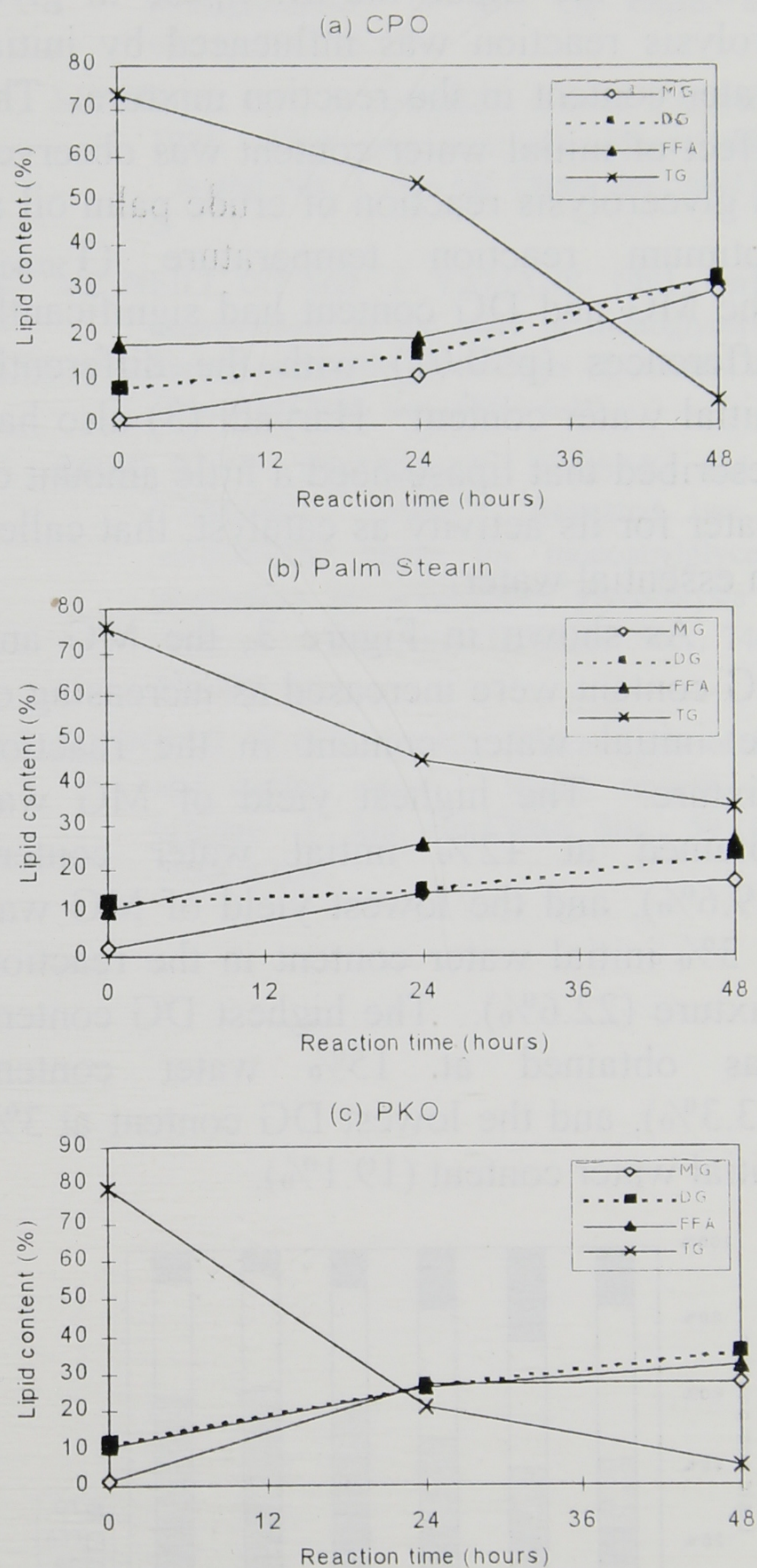


Figure 2. The composition of the reaction mixture during the enzymatic glycerolysis of crude palm oil, palm stearin, and palm kernel oil.

The FFA content was also increased after 24 hours reaction time and reduction

of reaction temperature. This result supports our previous assumption (2) that the Lipozyme-IM lipase has a low esterification activity toward FFA and glycerol in glycerolysis process.

The hydrolytic and esterification activity of the Lipozyme-IM lipase in glycerolysis reaction was influenced by initial water content in the reaction mixture. The effect of initial water content was observed in glycerolysis reaction of crude palm oil at optimum reaction temperature (T_{50-40}). The MG and DG content had significantly differences ($p < 0.01$) with the differently initial water content. Haryadi (3) also had described that lipase need a little amount of water for its activity as catalyst, that called an essential water.

As shown in Figure 3, the MG and DG content were increased as increasing of the initial water content in the reaction mixture. The highest yield of MG was obtained at 12% initial water content (29.6%), and the lowest yield of MG was at 3% initial water content in the reaction mixture (22.6%). The highest DG content was obtained at 15% water content (33.3%), and the lowest DG content at 3% initial water content (19.1%).

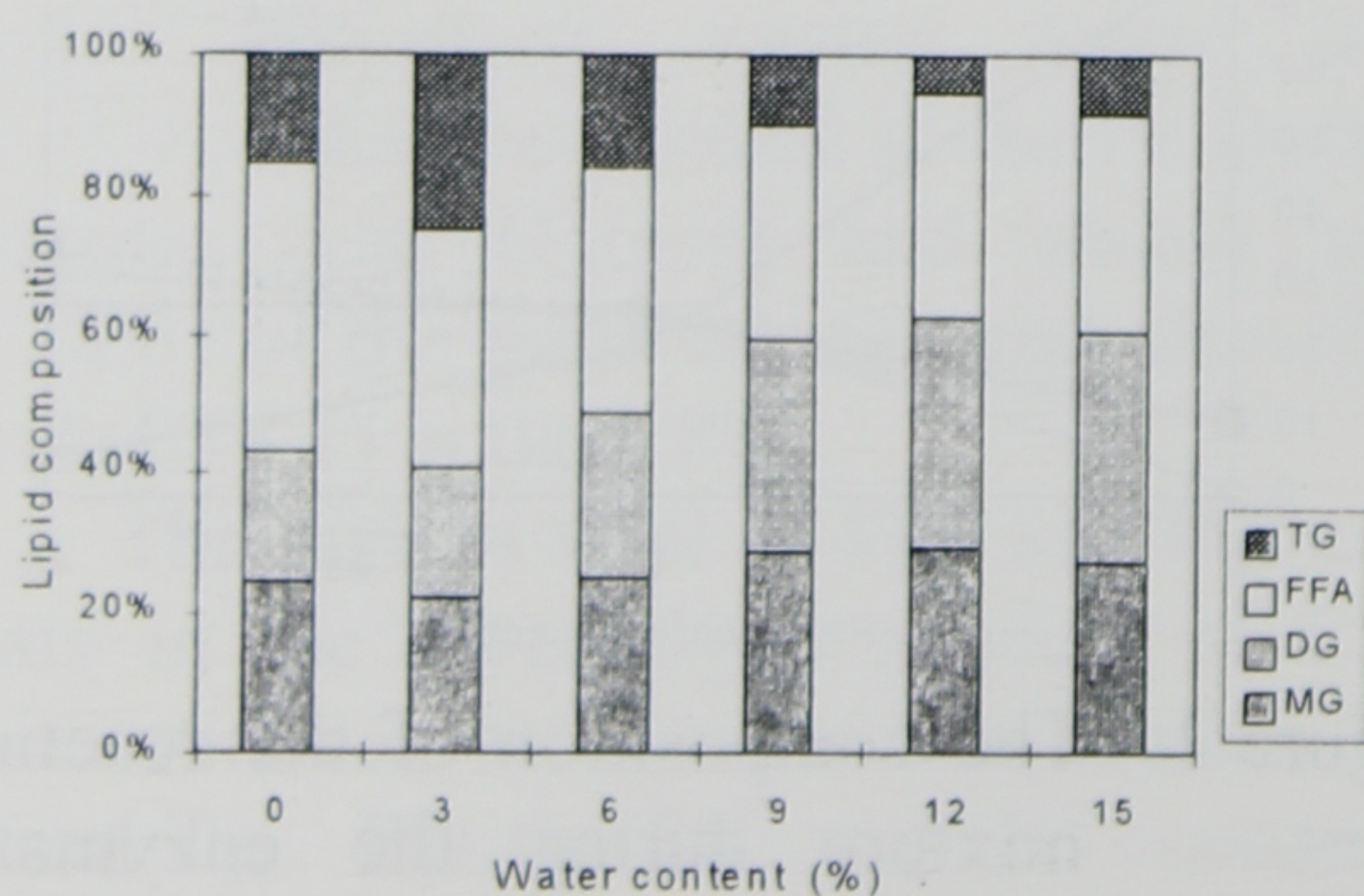


Figure 3. The effect of initial water content on the lipid composition of glycerolysis product of crude palm oil.

The FFA content was decreased as increasing of initial water content in the reaction mixture up to 12%. This phenomenon was opposed to Mc Neill *et al.* (8), who stated that the FFA content was increased in glycerolysis product of tallow as increasing the water content from 0.6% to 12.5% using *Pseudomonas fluorescens* lipase. This indicates that each kind of lipase need different optimum water content for their maximum enzymatic activity. Figure 3 was also shown that FFA was still performed during the glycerolysis process although the initial water content was low and had removed by adding the molecular sieves 3Å. This result also indicates that the water necessity of Lipozyme-IM for its catalytic activity could be fulfilled by the water content in support material of the lipase, since the lipase is an immobilized one.

Conclusions

The highest yield of MG and DG from CPO and PKO by enzymatic glycerolysis process were obtained at programmed reaction temperature. The programmed reaction temperature for CPO was initial temperature 50°C and reduced it to 40°C, and for PKO was initial temperature 40°C and reduced it to 30°C after 24 hours reaction time. The yields of MG and DG from CPO were 30.3% and 21.0%, and from PKO were 24.6% and 36.0%, respectively. FFA content of the glycerolysis product was increased as increasing of reaction time. This indicates that the activity of Lipozyme-IM lipase was relatively low for esterifying the free fatty acid with glycerol.

The initial water content in reaction mixture influenced the yield of MG and DG from CPO. Increasing the initial water

content up to 12% was increased the yield of MG and DG. The highest yield of MG and DG were obtained at 12% initial water content, i.e. 29.6% and 32.8%.

References

1. ARCOS, J.A. dan C. OTERO, 1996. Enzyme, medium, and reaction engineering to design a low-cost, selective production method for mono- and dioleoylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73(6): 673-682.
2. ELISABETH, J., A. JATMIKA, E. NAINGGOLAN dan D. M. MALAU. 1998. Preparasi mono- dan digliserida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatik. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 6(1):79-87.
3. HARYADI, P. 1996. Synthesis of monoesters and mono- and diacylglycerol from butteroil by lipase-catalyzed esterification in microaqueous media. Dissertation. Univ. of Wisconsin, Madison, USA.
4. HOLMBERG, K. dan E. OSTERBERG, 1988. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65(9): 1544-1548.
5. KROG, N.J., 1990. Food emulsifiers and their chemical and physical properties. *In Food Emulsions*, K. Larrson dan S.E. Friberg (eds.). Marcel Dekker Inc., New York. pp 127-180.
6. 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.
7. MC NEILL G.P., S. SHIMIZU and T. YAMANE. 1991. High-yield enzymatic glycerolysis of is and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68(1): 1-5.
8. 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.
9. 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.
10. SONNTAG, N.O.V., 1982. Glycerolysis of fats and methyl esters - status, review, and critique. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59 (10): 795A-802A.

ooOoo