

SINTESIS *HARD BUTTER* SECARA TRANSESTERIFIKASI NIR-ACAK MENGGUNAKAN STEARIN SAWIT DAN MINYAK KELAPA

Donald Siahaan dan Ricardo R. del Rosario¹

ABSTRAK

Hard butter merupakan lemak yang menyerupai lemak kakao dalam sifat pelelehan dan pemadatan. Pembuatan hard butter secara komersial mengaplikasikan hidrogenasi parsial yang menghasilkan juga isomer *trans*; dan interesterifikasi kimia yang melebarkan kisaran titik leleh produk akhirnya. Fraksionasi merupakan alternatif lain, namun menghasilkan sifat kelelehan dan kepadatan yang tidak dikehendaki. Studi ini bertujuan untuk mempelajari transesterifikasi nir acak dari stearin sawit (PST) dan minyak kelapa (CNO) untuk mensintesa hard butter menggunakan katalis sodium metilat, lipozyme IM (LIM) atau lipase dari *Rhizopus delemar* (RDL). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi proporsi PST, semakin tinggi juga titik leleh hard butter yang diperoleh. Substrat terbaik di antara unit percobaan yang diamati adalah pada rasio PST-CNO 1:1 (b/b). Pada rasio ini, hard butter yang dihasilkan memiliki titik leleh 35,5, 32,8 dan 33,4°C, masing masing untuk katalis sodium metilat, LIM dan RDL. Rendemen hard butter yang diperoleh berbeda nyata, 86,4, 72,3 dan 76,4% untuk masing-masing katalis. TAG dengan nomor karbon ekuivalen (ECN) 30-34 yang semula terdapat pada CNO tereliminasi dan kisaran ECN untuk campuran PST - CNO memendek dari ECN 30-54 menjadi ECN 36-48. Hard butter memiliki sifat supercooling yang mirip dengan lemak kakao, namun pada suhu yang sedikit lebih tinggi dan waktu yang relatif lebih lama. Hasil-hasil ini mengindikasikan terjadinya transesterifikasi nir acak pada reaksi dengan katalis enzimatis maupun kimiawi.

Kata kunci : Hard butter, Lipozyme IM, minyak kelapa, *Rhizopus delemar* lipase, stearin sawit, sodium metilat, transesterifikasi

PENDAHULUAN

Hard butter merupakan lemak yang mempunyai kemiripan sifat kepadatan dan kelelehan dengan lemak kakao: kisaran titik leleh yang sempit, padat pada suhu kamar dan segera mencair pada suhu fisiologis (10). Aplikasi komersial dari hard butter adalah sebagai pelapis pada produk-produk permen, coklat dan snack dan pengganti lemak susu pada beragam produk susu (11).

Pembuatan hard butter secara komersial dilakukan dengan hidrogenasi parsial minyak kelapa (CNO) atau minyak inti sawit untuk memperoleh lemak dengan titik leleh sekitar 37°C, kemudian penataan

ulang triasilgliserol dengan interesterifikasi kimiawi (16). Sekitar 40-60% isomer *cis* dari lemak akan dikonversi menjadi isomer *trans* selama proses hidrogenasi parsial. Lemak *trans* telah dibuktikan oleh para ahli epidemiologi dan klinik sebagai lemak yang diasosiasikan dengan peningkatan lipoprotein densitas rendah pada darah manusia dan meningkatkan resiko terkena penyakit jantung termasuk aterosklerosis dan trombosis (2,3,6,9,13,17). Di lain pihak, transesterifikasi kimia biasanya menata triasilgliserol secara acak sehingga kisaran titik leleh melebar.

Fraksionasi dan interesterifikasi nir-acak merupakan alternatif terhadap hidrogenasi parsial dalam produksi hard butter.

¹Institute of Food Science and Technology,
University of the Philippines Los Baños

Teknik modifikasi yang demikian tidak menghasilkan asam lemak trans sebagai hasil samping dan lemak ditata sedemikian rupa sehingga sifat pelelehannya relatif lebih baik. Minyak kelapa memiliki kisaran pelelehan yang sempit namun titik lelehnya rendah. Dengan fraksionasi secara kristalisasi menggunakan pelarut aseton, minyak kelapa dapat menghasilkan stearin kelapa, namun titik leleh stearin kelapa biasanya di bawah 32°C (15). Stearin kelapa sawit (PST) sebagai salah satu hasil samping fraksionasi minyak kelapa sawit mentah mengandung cukup kaya asam palmitat dan asam oleat dan harganya relatif murah serta memungkinkan dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam pembuatan *hard butter* (5,7). Tulisan ini merupakan laporan hasil penelitian transesterifikasi nir-acak dari PST dan minyak kelapa dalam rangka mensintesis *hard butter*.

BAHAN DAN METODE

Stearin sawit dan minyak kelapa komersial (MinolaTM) serta lemak kakao diperoleh dari Vegeoil Philippine Inc. of Manila, Philippines. Minyak dan lemak tersebut dinetralisasi dengan KOH 0.1 N. Sabun yang terbentuk difiltrasi dengan kertas saring biasa. Lipozyme IM (LIM, *Rhizomucor miehei* lipase) dan lipase *Rhizopus delemar* lipase (RDL) diberikan secara cuma-cuma masing-masing oleh the NOVO Nordick Bioindustrials Inc., Denmark dan Laboratorium Biologi Molekuler, Institut Biologi Molekuler dan Bioteknologi, University of the Philippines Los Baños. Sodium metilat, pelarut organik, standar metil ester asam lemak dan triasilgliserol merupakan kimia berkualitas analitis yang diperoleh dari distributor resmi di Los Banos.

Prosedur transesterifikasi

Campuran PST/minyak kelapa pada rasio 2:1, 1:1, 1:2 dan 1:3 (berdasarkan bobot) dengan bobot total 50 g, ditransesterifikasikan dan diaduk di dalam penangas air sambil digoyang dengan satu satu dari tiga sistem katalis. Kondisi reaksi transesterifikasi kimia yang diterapkan adalah 4% sodium methylate sebagai katalis, 50°C selama 3 jam dan tanpa pelarut. Pada perlakuan yang menggunakan LIM atau RDL sebagai katalis, kondisi proses adalah 10% enzim dengan kadar air 10%, selama 18 jam, pada suhu 45°C, dan dilarutkan dalam 50 ml n-hexana. Setelah proses sintesis, katalis dan pelarut dipisahkan secara filtrasi sesuai metode Siahaan (17).

Prosedur analisis

Bahan baku dan lemak kakao dianalisis komposisi asam lemaknya (AOAC Method 963.22, 14) dengan kromatograf gas Hewlett-Packard Model 5890A yang dilengkapi dengan detektor FID dan integrator HP Model 3396, serta kolom 80/100 Chromosorb-WAW yang mengandung 10% DEGS (3 mmid x 216 mm). Elusi ester keluar setelah disuntikkan pada kolom dengan kondisi kolom pada suhu terprogram 80-200°C (8°C/menit) dengan gas pembawa nitrogen pada kecepatan aliran 20 ml/menit.

Hard butter yang dihasilkan difraksionasi dengan menggunakan kromatografi kolom florasil terhidrasi 7% (8) untuk memperoleh triasilgliserol murni (TAG). Rendemen *hard butter* dihitung sebagai rasio bobot TAG yang diperoleh dan bobot bahan baku keseluruhan. Titik leleh TAG ditetapkan secara tabung kapiler menurut AOAC method 920.175 (1). Sifat pematangan dievaluasi dengan teknik Jensen's

cooling curve method (15). Profil TAG dianalisis menggunakan Shimadzu LC-9A yang dilengkapi oven Shimadzu CTO 6A, Shimadzu SLC-6B system controller, detektor spektrofotometri Shimadzu SPD-6A UV-Visible ($\lambda = 214$ nm) dan Shimadzu C-R4A Chromatopac sebagai integrator. Kolom yang digunakan adalah TSK-Gel ODS 300 x 4,0 mmid (5 μ m) dan Zorbax ODS 150 x 4,0 mm id (5 μ m) yang disusun seri. Sistem pelarut yang dipakai adalah asetonitril:tetrahidrofur (7:3 v/v) dengan kecepatan alir 2,0 ml/menit pada 55°C (15).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Substrat (PST dan minyak kelapa) serta lemak kakao, berdasarkan hasil analisis, mengandung lebih dari 96% triasilglicerol (TAG). Komposisi asam lemak dan TAG serta titik leleh dari TAG disajikan pada Tabel 1 dan tidak berbeda dengan data yang dilaporkan oleh beberapa peneliti (5, 14, 16). Titik leleh minyak kelapa sebesar 24,9°C dan relatif lebih rendah dari lemak kakao (33,8°C). Hal ini berhubungan dengan komposisi asam lemaknya yang relatif lebih pendek dan didominasi asam laurat dan miristat serta TAG dominan adalah ECN 32-40. Sedangkan lemak kakao didominasi oleh asam stearat, palmitat dan miristat dengan kisaran ECN 52-54.

Stearin kelapa sawit merupakan sumber asam palmitat dan oleat yang relatif murah dengan kandungan masing-masing 57,6 and 33,8%. Kedua asam lemak utama penyusun TAG stearin kelapa sawit ini diperlukan dalam modifikasi minyak dalam lemak dalam rangka pembuatan *hard butter* yang menyerupai lemak kakao. Titik

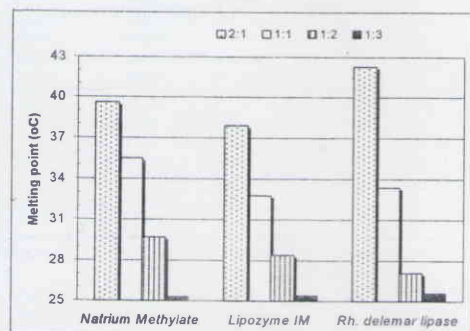
leleh PST relatif lebih tinggi dari lemak kakao yaitu 48,1°C karena perbedaan komposisi asam lemak dan TAGnya. PST tersusun atas TAG (terutama ECN 48-50) yang lebih rendah dari lemak kakao (ECN 52 dan 54) namun PST mengandung asam lemak tidak jenuh yang lebih tinggi dibanding lemak kakao.

Tabel 1. Komposisi asam lemak dan TAG serta titik leleh dari minyak kelapa, PST dan lemak kakao

Asam lemak	Stearin Sawit %ab/b	Minyak Kelapa %ab/b	Lemak kakao % b/b
C8 + C10	-	8,8 + 6,5	-
C12	0,3	49,3	-
C14	2,7	18,3	-
C16	57,6	8,6	26,1
C18	5,5	0,9	31,0
C18:1	33,8	5,3	38,7
C18:2	-	3,0	4,2
Triasilglicerol	% molar	% molar	% molar
ECN 30	-	3,9	-
ECN 32	-	11,8	-
ECN 34	-	19,0	-
ECN 36	-	20,3	-
ECN 38	-	17,2	-
ECN 40	-	9,6	-
ECN 42	-	7,0	-
ECN 44	-	3,2	-
ECN 46	-	1,5	-
ECN 48	20,4	-	-
ECN 50	55,1	-	-
ECN 52	19,5	-	77,8
ECN 54	5,0	-	22,2
Slip melting point, °C	48,1	24,9	33,8

Untuk menghasilkan *hard butter*, interesterifikasi kimiawi nir-acak antara minyak kelapa dan metil ester dari asam stearat dan miristat memberikan rendemen yang rendah dan hasil samping yang tidak dikehendaki serta adanya substrat yang tidak tereaksikan sebagaimana dilaporkan oleh Siahaan (15). Transesterifikasi minyak kelapa dengan palm stearin merupakan alternatif lain untuk memperoleh rendemen yang lebih baik dan hasil samping yang minimum.

Transesterifikasi palm stearin dan minyak kelapa dengan rasio substrat dan jenis katalis yang berbeda memberikan hasil *hard butter* dengan titik leleh sebagai mana disajikan pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin besar proporsi PST, semakin tinggi juga titik leleh *hard butter* yang dihasilkan. Rasio PST-minyak kelapa terbaik di antara unit eksperimen adalah 1:1 (b/b) untuk setiap jenis katalis yang digunakan.



PST:CNO weight ratio	Sodium methylate °C	Lipozyme IM °C	RDL °C
2:1	39,6 fg	37,9 f	42,3 h
1:1	35,5 e	32,8 d	33,4 d
1:2	29,7 c	28,4 bc	27,1 b
1:3	25,3 a	25,4 a	25,6 a

Gambar 1. Titik leleh dari *hard butter* yang diproduksi pada rasio substrat dan katalis yang berbeda

Pada rasio ini, titik leleh *hard butter* yang diperoleh masing-masing 35,5, 32,8 dan 33,4°C, bila menggunakan katalis sodium metilat, LIM dan RDL. Rendemen *hard butter* yang dihasilkan berbeda nyata yaitu masing-masing 86,4, 72,3 dan 76,4% bila menggunakan sodium metilat, LIM dan RDL sebagai katalis. Hasil samping reaksi transesterifikasi ini adalah sabun, di-

dan monoasilgliserol (sebagaimana hasil yang pemisahan yang diperoleh dengan metode kromatografi kolom florisil, data tidak ditunjukkan).

Hard butter yang dihasilkan mengalami perubahan TAG. Pada minyak kelapa, asam kaprilat dan kaprat terutama terdistribusi sebagai TAG ECN 30-34 yang merupakan 34% dari TAG minyak kelapa; dan kedua asam lemak ini seluruhnya terlokasi di posisi sn-1 dan sn-3 (4). Tabel 2 menunjukkan bahwa TAG ECN 30-34 tidak terdapat dalam *hard butter* yang dihasilkan tanpa memandang jenis katalis yang digunakan. Kemungkinan kedua asam lemak ini telah teresterifikasi ke dalam TAG dengan yang lebih tinggi dari PST, sedemikian sehingga kisaran ECN campuran PST - CNO setelah transesterifikasi menjadi lebih pendek dari ECN 30-54 menjadi ECN 36-48.

Tabel 2. Profil TAG *hard butter* yang dihasilkan dari campuran CNO - PST rasio 1:1 menggunakan beberapa katalis yang berbeda

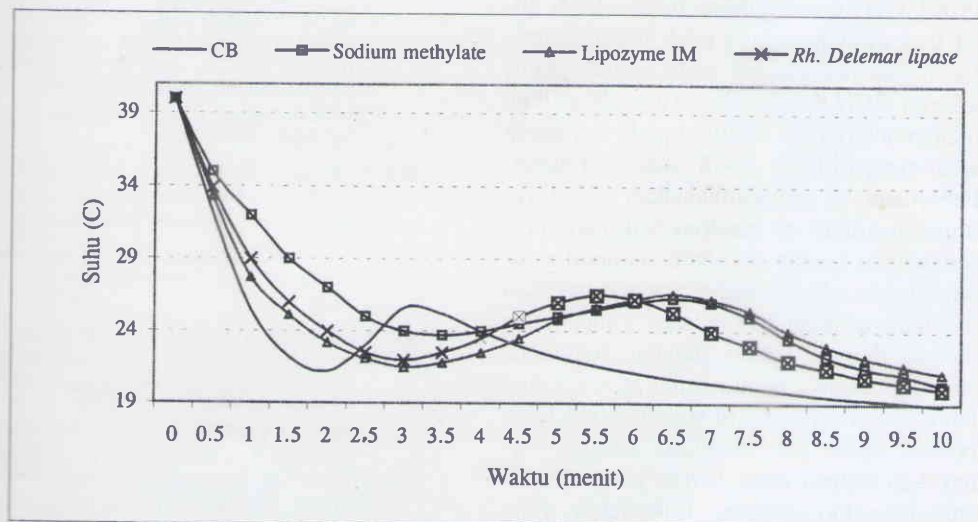
Triasilgliserol	Sodium methylate % molar	LIM % molar	RDL % molar
ECN 30	-	-	-
ECN 32	-	-	-
ECN 34	-	-	-
ECN 36	-	27.7	28.2
ECN 38	4.9	23.6	23.5
ECN 40	17.5	21.1	19.7
ECN 42	23.3	13.9	17.2
ECN 44	16.8	6.9	11.4
ECN 46	18.9	5.0	-
ECN 48	18.5	1.9	-

Fenomena ini sekaligus mengindikasikan terjadinya transesterifikasi nir-acak baik perlakuan dengan katalis kimia maupun enzimatis. Temuan sejenis juga dilaporkan pada studi sebelumnya oleh Siahaan yang menggunakan minyak kelapa dan metil ester sebagai substrat (15).

Karakteristik solidifikasi dari *hard butter* yang dihasilkan pada proses transesterifikasi minyak kelapa - PST (1:1 b/b) disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 2. *Hard butter* tersebut memiliki sifat yang mirip dengan lemak kakao khususnya dalam sifat *supercooling*, namun suhu *supercooling* sedikit lebih tinggi (23,4 – 25,7°C vs 21,2°C pada lemak kakao), dan waktu padat yang lebih lama (5,5 – 6,0 menit vs 3,0 menit pada lemak kakao). Sifat ini sekaligus mengkonfirmasi *hard butter* yang dihasilkan memiliki kisaran titik leleh yang pendek, yang merupakan sifat penting dari lemak kakao dan *hard butter*. Sekaligus, sifat ini mengkonfirmasi bahwa telah terjadi interesterifikasi nir-random pada proses pembuatan *hard butter*.

Tabel 3. Karakteristik pemadatan dari lemak kakao dan *hard butter* yang diproduksi dengan bahan baku stearin sawit – minyak kelapa 1:1 (rasio bobot) dan katalis yang berbeda

Sifat	Lemak kakao	Sodium methyle	LIM	RDL
Suhu <i>supercooling</i> , °C	21,2	23,7	21,5	22,0
Waktu <i>supercooling</i> , menit	2,0	3,5	3,0	3,0
Suhu pemadatan, °C	25,6	26,0	26,6	26,5
Waktu pemadatan, menit	3,0	6,0	5,5	5,5
Kenaikan suhu, °C	4,4	3,3	5,1	4,5



Gambar 2. Kurva *supercooling* dari lemak kakao dan *hard butter* yang diproduksi pada rasio CNO-PST 1:1 dengan katalis yang berbeda

KESIMPULAN

Titik leleh stearin sawit adalah 48,1°C dan terutama tersusun dari asam palmitat dan oleat dan TAG ECN 48-50. Titik leleh minyak kelapa adalah 24,9°C dan terutama tersusun dari asam laurat dan miristat dan TAG ECN 32-40. Studi ini menunjukkan bahwa semakin tinggi poporsi PST, semakin tinggi titik leleh *hard butter* yang dihasilkan dengan rasio optimum adalah perbandingan bobot yang seimbang (1:1) antara PST dan minyak kelapa. *Hard butter* tersebut memiliki titik leleh 35,5, 32,8 dan 33,4°C bila menggunakan masing-masing katalis sodium metilat, LIM dan RDL. Rendemen hasil berbeda nyata tergantung katalis dengan nilai masing-masing adalah 86,4, 72,3 dan 76,4% bila menggunakan katalis sodium metilat, LIM dan RDL. Profil TAG menunjukkan bahwa ECN 30-34 dari minyak kelapa telah terinteresterifikasi dan menghilang pada produk akhir; kisaran ECN *hard butter* yang dihasilkan memendek dari ECN 30-54 pada campuran awal menjadi ECN 36-48 pada *hard butter*. Fenomena ini mengindikasikan terjadinya transesterifikasi nir-random baik pada proses dengan katalis enzimatis maupun sodium metilat. *Hard butter* yang dihasilkan mempunyai sifat pemadatan yang mirip dengan lemak kakao dengan fenomena *supercooling*nya namun suhu *supercooling* lebih tinggi serta waktu *supercooling* lebih pendek. Sifat ini sekaligus mengkonfirmasi bahwa *hard butter* yang dihasilkan memiliki kisaran titik leleh yang pendek dan terjadinya transesterifikasi nir-acak.

DAFTAR PUSTAKA

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). AOAC Inc., USA.
2. ARO, A. M. JAUHIANEN, R. PARTANEN, I. SALMINEN, and M. MUTANEN. 1997. Stearic acid, trans fatty acids and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein (a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 65:1419-1426.
3. ASCHERIO, A., E. B. RIMM, E. L. GIOVANUCCI, D. SPIEGELMAN, M. J. STAMPFER and W. C. WILLET. 1996. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *British Med. J.* 313:84-90.
4. AUDIJE-GREGORIO, M. B. R. 1995. Tryacylglycerol profile and stereospecific analysis of coconut oil. Master's Thesis. University of The Philippines Los Banos, Philippines.
5. BERGER, K. G. 1986. Palm oil products (Why and how to use them). *Food Technol.* 40(9):72-79.
6. HU, F. B., M. J. STAMPFER, J. E. MANSON, E. RIMM, G. A. COLDITZ, B. A. ROSNER, C. H. HENNEKENS, and W. C. WILLET. 1997. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women. *New Eng. J. Med.* 337:1491-1499.
7. HUI, Y. H. (ed). 1996b. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (5th edition) Volume 2: Oil and oilseeds. John Wiley and Sons, Inc., USA.
8. KATES, M. 1972. Isolation, analysis and identification of lipids. John Wiley and Sons, Inc., USA.
9. KROMHOUT, D., A. MENOTTI, B. BLOEMBERG, C. ARAVANIS, H. BLACKBURN, R. BUZINA, A. S. DONTAS, F. FIDANZA, S. GIAMPOALI, A. JANSEN, M. KARVONEN, M. KATAN, A. NISSINE, S. NEDELJKOVIC, J. PEKKANEN, M. PEKKARINEN, S. PUNSER, L. RANANEN, B. SIMIC, and H. TOSHIMA. 1995. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the seven countries study. *Preventive Med* 24:308-315.
10. PAULICKA, F. R. 1976. Specialty fats. *JAOCS* 53(6):421-424.
11. PEÁSE, J. J. 1985. Confectionery fats from palm oil and lauric oil. *JAOCS* 62(2):425-430.

12. PHOLSONGKRAM, K. 1997. MCFA enrichment of coconut oil by low temperature fractionation. Dissertation. University of the Philippines Los Banos. Philippines.
13. PIETENIN, P., A. ASCHERIO, P. KORHONEN, A. M. HARTMAN, W. C. WILLET, D. ALBANES, and J. VIRTAMO. 1997. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in cohort of Finnish men: the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Am. J. Epidemiol.* 145:876-887.
14. RAY, S. and D. K. BHATTACHARYYA. 1993. Detection of interesterified fat in hydrogenated fat by lipase hydrolysis and by cooling curve analysis. *JAOCS* 70(9):923-925.
15. SIAHAAN, D. 1999. Production of hard butter and structured lipid from coconut (*cocos nucifera* L.) Oil. Dissertation. University of the Philippines Los Banos. Philippines.
16. SRIDHAR, R., G. LAKSHMINARAYANA and T. N. B. KAIMAL. 1988. Modification of selected Indian vegetable fats into cocoa butter substitutes by lipase-catalyzed ester interchange. *JAOCS* 65(6):900-904.
17. TROISI, R., W. C. WILLET and S. C. WEISS. 1992. Trans fatty acid intake in relation to serum lipid concentrations in adult men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:1019-1024.

Non-random transesterification of palm stearin and coconut oil for hard butter synthesis

Donald Siahaan and Ricardo R. del Rosario¹

Abstract

Hard butter is a specialty fat that imitates to some extent the melting and solidification properties of cocoa butter. Commercially practice of hard butter manufacturing consists of partial hydrogenation which produces trans isomers; and chemical interesterification which gives wider range of melting point of the finished products. Fractionation and non-random interesterification are alternatives to partial hydrogenation but produce undesirable hard butter. The current study describes non-random transesterification of palm stearin with coconut oil to synthesize hard butter using sodium methylate, lipozyme IM or Rhizopus delemar lipase as catalyst. The higher the proportion of PST, the higher the melting point of hard butter obtained. The best substrate among unit experiments observed was PST-CNO at ratio 1:1 (w/w), regardless type of catalyst used. In this ratio, the hard butter obtained had melting points of 35.5, 32.8 and 33.4°C, for sodium methylate, LIM and RDL as catalyst, respectively. The yield of hard butter obtained were significantly different, i.e. 86.4, 72.3 and 76.4% when sodium methylate, LIM and RDL were used as catalyst, respectively. The TAG of ECN 30-34 of CNO were disappeared, regardless the catalyst used; ECN range of PST - CNO blend were shortened from ECN 30-54 to ECN 36-48. The hard butters behaved like cocoa butter in term of solidification characteristics, showed a supercooling phenomenon, but having slightly higher supercooling temperature, and took longer time for solidification to occur. The results suggested non-random transesterification took place, both in chemical and lipase catalyzed reactions.

Key words: Coconut oil, hard butter, Lipozyme IM, palm stearin, *Rhizopus delemar* lipase, sodium methylate, transesterification

¹Institute of Food Science and Technology,
University of the Philippines Los Baños

Introduction

Hard butter is a specialty fat that imitates to some extent the melting and solidification properties of a relatively expensive edible fat so called cocoa butter. Cocoa butter has a narrow melting range, brittle at room temperature but liquefies immediately at physiological temperature (10). Current commercial applications of hard butter are as cocoa butter substitute in fat-coated products (such as chocolate products, confectioneries and snack foods) and as milk-fat substitute in dairy-like products (11).

The general commercial practice of manufacturing hard butter consists of partial hydrogenation of coconut oil or palm kernel oil to obtain fat with melting point around 37°C and then triacylglycerol rearrangement by chemical interesterification (16). During the partial hydrogenation process, about 40-60% *cis* isomers of the oil is converted to *trans* isomers. Some epidemiologists and clinical researchers have associated the *trans* fats with elevation of low density lipoprotein level in human blood and increasing risk of cardiovascular diseases including atherosclerosis and thrombosis (2, 3, 6, 9, 13, 17). On the other hand, chemical interesterification randomly rearranges triacylglycerols that gives wider range of melting point.

Fractionation and non-random interesterification are alternatives to partial hydrogenation for hard butter production. The modification techniques do not produce *trans* fatty acids as side-product and rearrangement fat to fit the desired melting characteristics. Coconut oil (CNO), that has a narrow melting range but relatively low melting point, can be fractionated by fractional crystallization in

acetone to obtain coconut stearin (CST); however, the melting point of the CST usually below 32°C (15). Palm stearin (PST) is an inexpensive source of fat rich in palmitic and oleic acids (5, 7), and might be utilized as raw material in hard butter synthesis. The current study describes non-random transesterification (ester-ester interchange) of palm stearin and coconut oil to synthesize hard butter.

Materials and Methods

RBD Palm stearin, RBD coconut oil (MinolaTM) and cocoa butter were supplied by Vegeoil Philippine Inc. of Manila, Philippines. The oil and fats were neutralized with 0.1 N of KOH and soap formed was filtered out using filter paper. Lipozyme IM (LIM, *Rhizomucor miehei* lipase) and *Rhizopus delemar* lipase (RDL) were kindly donated by the NOVO Nordick Bioindustrials Inc., Denmark and Molecular Biology Laboratory of the National Institute of Molecular Biology and Biotechnology, University of the Philippines Los Baños, respectively. Sodium methylate, organic solvents, standards of fatty acid methyl esters and triacylglycerols were analytical grade and were purchased from local distributors.

Transesterification procedures

PST/CNO blend in ratios of 2:1, 1:1, 1:2 and 1:3 w/w with a total weight of 50 g, were transesterified and shaken in the water bath in different catalyzing systems. The condition for chemical transesterification was 4% sodium methylate as catalyst, 50°C for 3 hr and solvent free. When LIM or RDL was used as catalyst, condition was 10% enzyme-load containing 10% water, 18 hr, 45°C, in 50 ml

n-hexane. Afterwards, the catalyst and solvent were removed according to method developed by Siahaan (15).

Analytical procedures

The raw materials and cocoa butter were subjected to fatty acid profile analysis (AOAC Method 963.22, 1) using Hewlett-Packard Model 5890A GC equipped with FID detector and HP Model 3396 integrator, and 80/100 Chromosorb-WAW column containing 10% DEGS (3 mmid x 216 mm). Elution of esters was carried out with programmed temperature from 80 to 200°C at 8°C/min, and nitrogen gas at flow rate of 20 ml/min.

The crude hard butter was fractionated using 7%-hydrated-florisil column chromatography (8) to obtain triacylglycerol (TAG). The yield of hard butter was calculated as weight ratio of TAG recovered to the total weight of raw materials. The TAG's slip melting point was determined according to AOAC method 920.175 (capillary tube method, 1). Solidification behavior was studied using Jensen's cooling curve method (15). TAG profile was determined using a Shimadzu LC-9A equipped with Shimadzu CTO 6A column oven, Shimadzu SLC-6B system controller, Shimadzu SPD-6A UV-Visible Spectrophotometric detector ($\lambda = 214$ nm) and Shimadzu C-R4A Chromatopac as the integrator. The columns used were a series of TSK-Gel ODS 300 x 4.0 mmid (5 μ m) and Zorbax ODS 150 x 4.0 mm id (5 μ m). The solvent system used was acetonitril:tetrahydrofuran (7:3 v/v) with a flow rate of 2.0 ml/min at 55°C (15).

Results and Discussions

The substrates (PST and CNO) and CB contained more than 96% triacylglycerol (TAG) fraction. Fatty acid composition, triacylglycerol composition and melting point of their TAG fraction are presented in Table 1 and comparable to published data (5, 14, 16).

Table 1. Fatty acid and TAG compositions and slip melting point of CNO, PST, and CB

Fatty Acid	Palm Stearin %w/w	Coconut Oil %w/w	Cocoa butter % w/w
C8 + C10	-	8.8 +6.5	-
C12	0.3	49.3	-
C14	2.7	18.3	-
C16	57.6	8.6	26.1
C18	5.5	0.9	31.0
C18:1	33.8	5.3	38.7
C18:2	-	3.0	4.2
Triacylglycerol	% molar	% molar	% molar
ECN 30	-	3.9	-
ECN 32	-	11.8	-
ECN 34	-	19.0	-
ECN 36	-	20.3	-
ECN 38	-	17.2	-
ECN 40	-	9.6	-
ECN 42	-	7.0	-
ECN 44	-	3.2	-
ECN 46	-	1.5	-
ECN 48	20.4	-	-
ECN 50	55.1	-	-
ECN 52	19.5	-	77.8
ECN 54	5.0	-	22.2
Slip melting point, °C	48.1	24.9	33.8

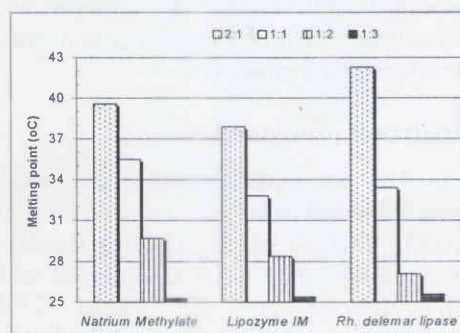
Note : ECN = Equivalent carbon number

The melting point of CNO was 24.9°C, lower than of CB. CNO consisted of lauric and myristic acids as predominant fatty acids and ECN 32-40 as predominant triacylglycerols. For obtaining hard butter, non-random chemical interesterification of CNO with methyl esters or stearic and myristic acids gave relatively low yield and high amount of undesirable by-products and unreacted substrates, as previously reported by Siahaan (15). Transester-

ification of CNO with other inexpensive fat such as palm stearin is an alternative that reduces the undesired by products and elevates the yield of hard butter.

Palm stearin is an inexpensive source of palmitic and oleic acids; 57.6 and 33.8%, respectively. Both palmitic and oleic acids are important in the modification of oil and fat into hard butter to imitate cocoa butter. The melting point of PST was higher than CB, 48.1 and 33.8°C, respectively, due to differences in their fatty acid and triacylglycerol compositions. PST consisted of TAG with lower equivalent carbon number (predominantly ECN 48-50) than cocoa butter (ECN 52 and 54). However, PST composed of lower amount of unsaturated fatty acids that contributed to its higher melting point, compare to cocoa butter.

The melting points of hard butter obtained using different substrate ratios and catalysts are shown in Figure 1. As expected, the higher the proportion of PST, the higher the melting point of hard butter produced. The best substrates among experiment units observed was PST-CNO at ratio 1:1 (w/w), regardless type of catalyst used. In this ratio, the hard butter obtained had melting points of 35.5, 32.8 and 33.4°C, for sodium methylate, LIM and RDL as catalyst, respectively. The yield of hard butter obtained were significantly different, 86.4, 72.3 and 76.4% when sodium methylate, LIM and RDL were used as catalyst, respectively. Within the same catalyst treatment, there was no significant difference of TAG recovery/yield of hard butter. The side-products of the transesterification reaction were soap, di- and monoacylglycerol and entrapped triacylglycerol (as confirmed by florisil column chromatography data, the data is not shown).



PST:CNO weight ratio	Sodium methylate °C	Lipzyme IM °C	RDL °C
2:1	39.6 fg	37.9 f	42.3 h
1:1	35.5 e	32.8 d	33.4 d
1:2	29.7 c	28.4 bc	27.1 b
1:3	25.3 a	25.4 a	25.6 a

Note: means that not having a common letter are significantly different ($P < 0.05$)

Figure 1. Melting point of hard butter produced at different substrate ratios and catalyst

In the original CNO, caprylic and capric acids are mostly distributed in TAG ECN 30-34 which account for 34% of TAG in CNO. The acids completely located at sn-1 and sn-3 positions, as reported by Audije-Gregorio (4). As shown in Table 2, the TAG ECN 30-34 of CNO were disappeared, regardless the catalyst used; and the acids most possibly were interesterified into the higher ECN TAG of PST, so that ECN range of PST - CNO blend were shortened from ECN 30-54 to ECN 36-48. This phenomenon indicated that non-random transesterification took place, both in chemical and lipase catalyzed reactions. These non-randomization reactions were in line with the findings of our previous studies on chemical and lipase-catalyzed interesterification of CNO with methyl esters (15).

Tabel 2. TAG profile of hard butters obtained from CNO-PST blend at weight ratio of 1:1 and different catalyst

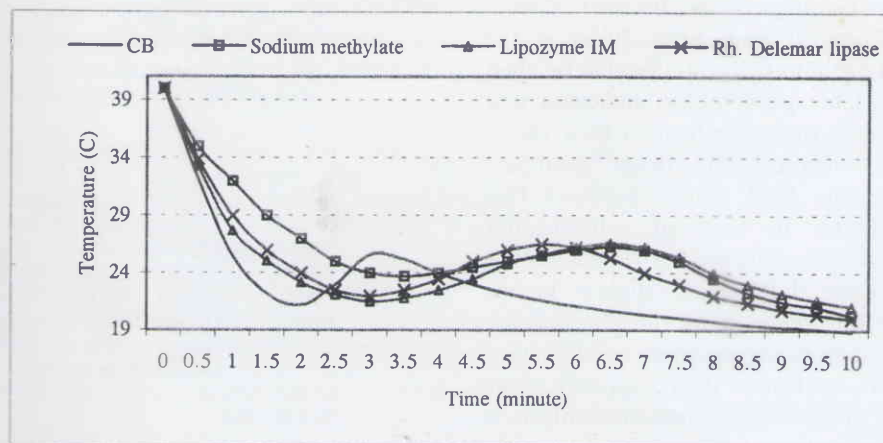
Triacyl-glycerol	Sodium methylate %molar	LIM %molar	RDL % molar
ECN 30	-	-	-
ECN 32	-	-	-
ECN 34	-	-	-
ECN 36	-	27.7	28.2
ECN 38	4.9	23.6	23.5
ECN 40	17.5	21.1	19.7
ECN 42	23.3	13.9	17.2
ECN 44	16.8	6.9	11.4
ECN 46	18.9	5.0	-
ECN 48	18.5	1.9	-

Solidification characteristics of the hard butter that using CNO - PST blend (1:1 w/w) as raw materials and the reference cocoa butter (CB) are shown in Table 3 and Figure 2. The hard butters behaved like cocoa butter in term of solidification characteristics, showed a supercooling phenomenon, but having slightly higher supercooling temperature (23.4 - 25.7, °C vs 21.2°C of CB), took longer time for solidification to occur (5.5

- 6.0 min vs 3.0 min of CB). These solidification behaviors also confirmed their relatively short melting range, the important characteristic of hard butter. Furthermore, these solidification behaviors confirmed also the non-randomization interesterification of the reactions.

Tabel 3. Solidification characteristics of CB and hard butter produced at CNO-PST ratio 1:1 and different catalyst

Characteristic	Cocoa butter	Sodium methylate	LIM	RDL
Supercooling temperature, °C	21.2	23.7	21.5	22.0
Time for supercooling, minute	2.0	3.5	3.0	3.0
Solidification temperature, °C	25.6	26.0	26.6	26.5
Time for Solidification, minute	3.0	6.0	5.5	5.5
Rise in temperature, °C	4.4	3.3	5.1	4.5

**Figure 2.** Cooling curve of cocoa butter (CB) and hard butter produced at CNO - PST ratio 1:1 and different catalyst

Conclusions

The melting point of CNO was 24.9°C, consisted of lauric and myristic acids as predominant fatty acids and ECN 32-40 as predominant triacylglycerols. Palm stearin is a sole source of palmitic and oleic acids; 57.6 and 33.8%, respectively. The melting point of PST was 48.1°C. PST consisted of TAG with predominantly ECN 48-50.

This experiment revealed that the higher the proportion of PST, the higher the melting point of hard butter obtained. The best substrates among experiments units observed was PST-CNO at ratio 1:1 (w/w), regardless type of catalyst used. The hard butter obtained had melting points of 35.5, 32.8 and 33.4°C for sodium methylate, LIM and RDL as catalyst, respectively. The yield were significantly different, 86.4, 72.3 and 76.4% when sodium methylate, LIM and RDL were used as catalyst, respectively. The TAG profile revealed that ECN 30-34 of CNO were disappeared, regardless the catalyst used; ECN range of the finished product were shortened from ECN 30-54 in the original blend to ECN 36-48 in the finished product. This phenomenon indicated that non-random transesterification took place, both in chemical and lipase catalyzed reactions. The hard butters behaved like cocoa butter in term of solidification characteristics, showed a supercooling phenomenon, but having slightly higher supercooling temperature, longer time for solidification to occur. These solidification behaviors confirmed their relatively short melting range and the non-randomization interesterification of the reactions.

References

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (15th ed.). AOAC Inc., USA.
2. ARO, A. M. JAUHIANEN, R. PARTANEN, I. SALMINEN, and M. MUTANEN. 1997. Stearic acid, trans fatty acids and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein (a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 65:1419-1426.
3. ASCHERIO, A., E. B. RIMM, E. L. GIOVANUCCI, D. SPIEGELMAN, M. J. STAMPFER and W. C. WILLET. 1996. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *British Med. J.* 313:84-90.
4. AUDIJE-GREGORIO, M. B. R. 1995. Triacylglycerol profile and stereospecific analysis of coconut oil. Master's Thesis. University of The Philippines Los Banos, Philippines.
5. BERGER, K. G. 1986. Palm oil products (Why and how to use them). *Food Technol.* 40(9):72-79.
6. HU, F. B., M. J. STAMPFER, J. E. MANSON, E. RIMM, G. A. COLDITZ, B. A. ROSNER, C. H. HENNEKENS, and W. C. WILLET. 1997. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women. *New Eng. J. Med.* 337:1491-1499.
7. HUI, Y. H. (ed). 1996b. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (5th edition) Volume 2: Oil and oilseeds. John Wiley and Sons, Inc., USA.
8. KATES, M. 1972. Isolation, analysis and identification of lipids. John Wiley and Sons, Inc., USA.
9. KROMHOUT, D., A. MENOTTI, B. BLOEMBERG, C. ARAVANIS, H. BLACKBURN, R. BUZINA, A. S. DONTAS, F. FIDANZA, S. GIAMPOALI, A. JANSEN, M. KARVONEN, M. KATAN, A. NISSINE, S. NEDELJKOVIC, J. PEKKANEN, M. PEKKARINEN, S. PUNSER, L. RANANEN, B. SIMIC, and H. TOSHIMA. 1995. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the seven countries study. *Preventive Med* 24:308-315.
10. PAULICKA, F. R. 1976. Specialty fats. *JAOCS* 53(6):421-424.
11. PEASE, J. J. 1985. Confectionery fats from palm oil and lauric oil. *JAOCS* 62(2):425-430.

12. PHOLSONGRAM, K. 1997. MCFA enrichment of coconut oil by low temperature fractionation. Dissertation. University of the Philippines Los Banos. Philippines.
13. PIETENIN, P., A. ASCHERIO, P. KORHONEN, A. M. HARTMAN, W. C. WILLET, D. ALBANES, and J. VIRTAMO. 1997. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in cohort of Finnish men: the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Am. J. Epidemiol.* 145:876-887.
14. RAY, S. and D. K. BHATTACHARYYA. 1993. Detection of interesterified fat in hydrogenated fat by lipase hydrolysis and by cooling curve analysis. *JAACS* 70(9):923-925.
15. SIAHAAN, D. 1999. Production of hard butter and structured lipid from coconut (*cocos nucifera* L.) Oil. Dissertation. University of the Philippines Los Banos. Philippines.
16. SRIDHAR, R., G. LAKSHMINARAYANA and T. N. B. KAIMAL. 1988. Modification of selected Indian vegetable fats into cocoa butter substitutes by lipase-catalyzed ester interchange. *JAACS* 65(6):900-904.
17. TROISI, R., W. C. WILLET and S. C. WEISS. 1992. Trans fatty acid intake in relation to serum lipid concentrations in adult men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56:1019-1024.

ooOoo