

UPAYA PENINGKATAN PRODUKSI MONO- DAN DIGLISERIDA DARI MINYAK SAWIT MENTAH DENGAN PROSES GLISEROLISIS ENZIMATIK

Jenny Elisabeth, Donald Siahaan, dan H.H. Situmorang¹

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dalam upaya meningkatkan produksi mono- dan digliserida (MG dan DG) dari minyak sawit mentah dengan teknik gliserolisis enzimatis. Proses reaksi dengan katalis lipase mikrobial komersial dilakukan antara gliserol dan minyak sawit mentah dengan rasio molar 3:1, kadar air dalam campuran reaksi sebesar 12%, suhu 50°C, kecepatan pengadukan 300 rpm, dan waktu reaksi 24 jam. Penggunaan silika gel sebagai bahan pengikat gliserol untuk perbaikan pencampuran gliserol dalam minyak sawit tidak menunjukkan pengaruh yang positif terhadap peningkatan sintesis MG dan DG. Lebih lanjut, penggunaan rasio molar gliserol dan minyak sawit 2:1 dan penambahan gliserol yang dilakukan satu kali pada awal reaksi telah menghasilkan produk dengan kandungan MG dan DG yang maksimum. Upaya untuk memperbaiki tingkat pencampuran gliserol dan minyak sawit dengan teknik penambahan gliserol yang bertahap juga tidak menunjukkan hasil yang positif, karena kondisi substrat yang telah memadat pada saat penambahan gliserol yang kedua dan ketiga kalinya. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa penggunaan lipase campuran, yakni Lipozyme-IM (Rhizomucor miehei) dan Novozym-435 (Candida antarctica) secara bersamaan, lebih efektif dibandingkan dengan penggunaan Lipozyme-IM saja ataupun Lipozyme-IM dan Novozym-435 yang digunakan secara bertahap. Dengan penggunaan lipase campuran diperoleh produk dengan kandungan MG dan DG masing-masing sebesar 44,0% dan 6,1%. Kandungan α -MG dalam produk gliserolisis umumnya lebih rendah dibandingkan dengan kandungan MG total. Hal ini mengindikasikan bahwa MG yang terdapat pada produk gliserolisis tidak hanya terdiri dari 1- dan 3-MG, tetapi juga 2-MG.

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

PENDAHULUAN

Mono- dan digliserida (MG dan DG) dari minyak nabati maupun hewani merupakan bahan pengemulsi yang banyak digunakan pada industri pangan, farmasi, dan kosmetika. Sifat dari bahan pengemulsi ini adalah mudah larut dengan bentuk yang bervariasi yakni cair, plastis, maupun padat, bergantung pada proses dan bahan baku yang digunakan. Selain itu MG dan DG juga digunakan sebagai bahan interme-

dier dalam industri kimia seperti deterjen dan alkil resin (10).

Umumnya MG dan DG diproduksi secara kimiawi dengan mereaksikan campuran gliserol, minyak, dan katalis alkali pada suhu tinggi (240-260°C). Proses gliserolisis ini menghasilkan produk dengan kandungan 35-60% MG dan DG. Selain membutuhkan energi tinggi, penggunaan suhu tinggi juga menghasilkan produk dengan warna yang gelap, aroma yang tidak diinginkan, serta produk samping yang bersifat toksik bagi manusia. Oleh

¹Alumnus Fakultas Pertanian Unika St. Thomas, Medan

karena itu beberapa usaha telah dilakukan untuk mengembangkan proses sintesis MG dan DG dengan suhu reaksi moderat menggunakan lipase sebagai katalisator (3, 9).

Sintesis MG dan DG dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatis telah dilakukan, dan skrining terhadap beberapa jenis lipase mikrobial menunjukkan bahwa lipase *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) merupakan katalisator yang terbaik. Dengan menggunakan minyak sawit sebagai bahan baku dapat dihasilkan produk MG dan DG yang kaya asam oleat, yang diketahui memiliki peran positif terhadap kesehatan. Di samping itu, produk yang dihasilkan juga dapat digunakan sebagai sumber vitamin A dan E sekaligus, karena proses enzimatis dengan penggunaan suhu reaksi yang relatif rendah dapat mempertahankan kandungan karoten dan vitamin E yang terdapat dalam minyak sawit (4).

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diperoleh bahwa sintesis MG dan DG dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatis tersebut belum mencapai hasil yang optimal. Kandungan MG yang tertinggi hanya sekitar 13%, meskipun kandungan DG sudah mencapai lebih dari 50% (4). Lebih lanjut, studi tentang pengaruh suhu reaksi dan kadar air dalam campuran reaksi menunjukkan bahwa kandungan MG dan DG pada produk gliserolisis telah menunjukkan peningkatan, yang masing-masing mencapai lebih dari 30%. Produk gliserolisis minyak sawit yang dihasilkan pada penelitian sebelumnya mengandung asam lemak bebas (ALB) yang relatif tinggi. Hal ini diduga karena aktivitas lipase Lipozyme-IM yang relatif rendah dalam proses esterifikasi antara ALB dan gliserol selama reaksi berlangsung (5).

Salah satu masalah yang ditemui pada reaksi gliserolisis adalah gliserol yang di-

gunakan sebagai salah satu substrat memiliki kelarutan yang rendah dalam minyak atau lemak. Dengan masalah yang sama pada reaksi esterifikasi antara alkohol dan asam lemak, Berger dan Schneider (2) memberikan solusi dengan menggunakan silika gel sebagai bahan pengikat alkohol. Dengan cara ini alkohol akan dilepaskan secara bertahap selama proses reaksi esterifikasi berlangsung. Di samping itu penggunaan silika gel memberikan keuntungan lain dalam proses enzimatis, yakni menghindari proses penggumpalan enzim imobil yang dapat menyebabkan enzim kehilangan aktivitasnya.

Penelitian ini dirancang untuk meningkatkan hasil sintesis MG dan DG ber-bahan baku minyak sawit mentah (MSM) melalui perbaikan pencampuran gliserol dengan minyak. Upaya yang dilakukan adalah dengan menggunakan silika gel sebagai bahan pengikat gliserol dalam jumlah yang bervariasi, serta teknik dan frekuensi penambahan gliserol pada campuran reaksi yang berbeda, yakni dilakukan sebanyak satu kali pada awal reaksi atau beberapa kali secara bertahap. Upaya lain yang dilakukan adalah dengan menggunakan lipase mikrobial campuran dari *R. miehei* dan *C. antartica*, yang digunakan secara bersamaan ataupun terpisah dan bertahap.

BAHAN DAN METODE

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah MSM yang diperoleh dari PT Pamina Adolina Perkebunan Nusantara IV. Enzim yang digunakan adalah lipase imobil dari *R. miehei* (Lipozyme-IM) dan *C. antartica* (Novozym-435) produksi Novo Nordisk Bioindustry Inc., Denmark. Pelarut dan bahan

Kimia yang digunakan merupakan produk Merck, Jerman dengan kualitas analitik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Oke Pangan - Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan.

Reaksi gliserolisis enzimatik

Minyak dan gliserol dicampur dengan rasio molar 1:3 sebanyak 5 gr dalam erlenmeyer tertutup, serta ditambahkan katalis lipase sebanyak 5% (b/b substrat campuran). Sebelumnya dilakukan penghilangan air yang terdapat pada MSM dan gliserol dengan menggunakan *molecular sieves* 3Å dan selanjutnya kadar air pada reaktan ditetapkan pada 12% (b/b) dengan penambahan air pada gliserol. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu reaksi 50°C, kecepatan pengadukan orbital 300 rpm, dan waktu reaksi 24 jam.

Untuk pengamatan pengaruh penggunaan silika gel, jumlah silika gel yang digunakan bervariasi berdasarkan rasio berat silika gel dan gliserol yakni 0,25 : 1; 0,50 : 1; 0,75 : 1, dan 1 : 1. Silika gel ditambahkan pada campuran reaksi sesaat sebelum reaksi.

Untuk perlakuan teknik penambahan gliserol, jumlah gliserol yang digunakan juga bervariasi berdasarkan rasio molar gliserol dan MSM, yakni 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, dan 5 : 1. Perlakuan ini difaktorialkan dengan frekuensi penambahan gliserol yang dilakukan sebanyak 1 kali pada awal reaksi; 2 kali pada awal reaksi dan 12 jam setelah reaksi; serta 3 kali pada awal reaksi, 4 dan 8 jam setelah reaksi. Penambahan gliserol dilakukan dengan proporsi yang sama pada setiap kali penambahan.

Pengamatan terhadap penggunaan lipase campuran Lipozyme-IM dan Novozym-435 dilakukan dengan menambahkan

kedua jenis lipase secara bersamaan pada awal reaksi atau dengan menambahkan Lipozyme-IM pada awal reaksi dan digantikan dengan Novozym-435 setelah 12 jam kemudian. Jumlah lipase dalam bentuk tunggal maupun campuran adalah 5% (b/b substrat campuran), dan lipase campuran digunakan dengan perbandingan yang sama. Kedua perlakuan ini dibandingkan dengan perlakuan yang menggunakan lipase Lipozyme-IM saja.

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. Kandungan α -monogliserida (α -MG) dilakukan dengan metode AOCS Cc11-57 (1993) dan rendemen dihitung dari perbandingan berat produk hasil gliserolisis dengan berat awal minyak yang digunakan.

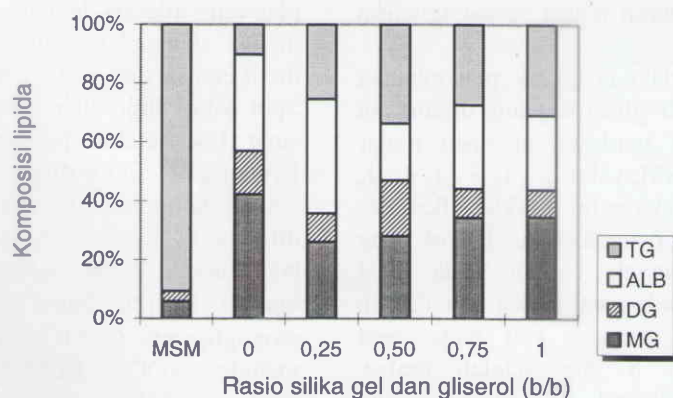
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh penggunaan silika gel

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan MG, DG, dan ALB pada produk hasil gliserolisis MSM adalah lebih tinggi, serta kandungan trigliserida (TG)-nya lebih rendah dibandingkan dengan kandungan awal yang terdapat pada CPO. Kandungan MG dan DG tertinggi terdapat pada produk gliserolisis MSM yang tidak menggunakan silika gel, yakni masing-masing sebesar 42,3% dan 14,7%. Penggunaan silika gel sebagai bahan pengikat gliserol tidak menunjukkan pengaruh yang positif terhadap peningkatan kandungan MG dan DG dari produk gliserolisis MSM. Adapun komposisi lipida yang terdapat MSM dan produk gliserolisisnya ditampilkan pada Gambar 1.

Penggunaan silika gel yang tidak efektif dalam proses gliserolisis enzimatis

MSM ini karena lipase mengalami penurunan aktivitas yang disebabkan oleh menurunnya aktivitas air dalam campuran reaksi. Hal ini disebabkan silika gel tidak hanya mengikat gliserol, tetapi juga air yang terdapat dalam campuran reaksi. Air dalam jumlah tertentu tetap dibutuhkan untuk mempertahankan struktur tiga dimensi dan aktivitas katalitik enzim lipase. Studi Gioielli *et al.* (6) menunjukkan bahwa aktivitas transesterifikasi lipase *R. miehei* terbaik adalah pada kadar air sekitar 7% (b/b lipase) pada suhu reaksi 45°C. Lebih lanjut Hariyadi (7) menunjukkan bahwa aktivitas esterifikasi maksimum dari lipase *R. miehei* adalah dengan kadar air 10% (b/b lipase). Hasil penelitian Elisabeth *et al.* (5) sebelumnya juga telah membuktikan bahwa aktivitas gliserolitik lipase *R. miehei* adalah pada kadar air 12% (b/b substrat), yang mengindikasikan bahwa lipase ini membutuhkan kadar air yang lebih tinggi untuk aktivitas gliserolitiknya.



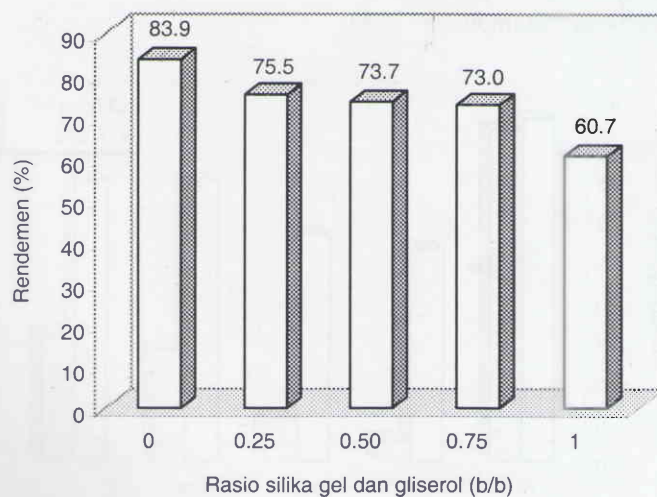
Gambar 1. Komposisi gliserida pada MSM dan produk hasil gliserolisisnya dengan jumlah penggunaan silika gel yang berbeda. Substrat gliserol dan MSM dengan rasio molar 3:1, 5% lipase Lipozyme-IM 5% (b/b substrat), suhu 50°C, pengadukan orbital 300 rpm, kadar air 12%, waktu reaksi 24 jam.

Dengan demikian penting kiranya dilakukan pengaturan penambahan air pada campuran reaksi. Untuk menghindarkan menurunnya aktivitas air pada campuran reaksi, maka penambahan silika gel dapat dilakukan setelah dicampurkan dengan gliserol, sehingga diharapkan silika gel tidak mengikat air lagi. Penambahan air juga jangan dilakukan pada gliserol melainkan pada substrat minyak atau lipase, sehingga aktivitas air cukup baik untuk mempertahankan aktivitas lipase.

Peningkatan penggunaan silika gel juga menurunkan rendemen produk gliserolisis (MG dan DG), seperti yang ditampilkan pada Gambar 2. Dengan demikian penggunaan silika gel sebagai bahan adsorber gliserol harus dilakukan secara hati-hati dan tidak mempengaruhi aktivitas

lipase dengan mempertahankan kandungan air yang terdapat dalam campuran reaksi.

Kandungan α -MG pada produk gliserolisis MSM ternyata juga sangat dipengaruhi oleh penggunaan silika gel, seperti yang terlihat pada Gambar 3. Kandungan α -MG pada produk gliserolisis tanpa penggunaan silika gel hampir sama dengan kandungan MG total, sedangkan kandungan α -MG pada produk yang menggunakan silika gel jauh lebih rendah dibandingkan dengan kandungan MG total. Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan MG yang terdapat pada produk gliserolisis sebagian besar bukan terdiri dari α -MG, tetapi β - atau 2-MG. Hal ini berkaitan dengan sifat spesifisitas sn 1,3- dari Lipozyme-IM yang hanya reaktif terhadap asam lemak yang terdapat pada posisi 1 dan 3 dari kerangka gliserol.



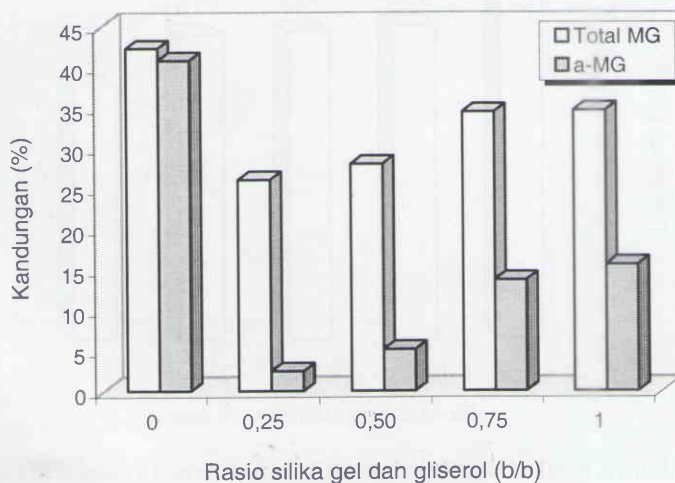
Gambar 2. Rendemen hasil gliserolisis ezimatik MSM dengan jumlah penggunaan silika gel yang berbeda.

Kandungan 2-MG yang tinggi pada perlakuan dengan penambahan silika gel mengindikasikan bahwa MG terbentuk dari hasil hidrolisis MSM dan pembentukan MG dari hasil esterifikasi antara asam lemak dengan gliserol relatif kecil. Sebaliknya, kandungan α -MG yang cukup tinggi pada produk gliserolisis tanpa penggunaan silika gel dapat terjadi melalui reaksi esterifikasi antara asam lemak dengan gliserol pada posisi 1 dan 3, serta terjadinya migrasi asil dari posisi 2 ke posisi 1 dan 3 dari kerangka gliserol.

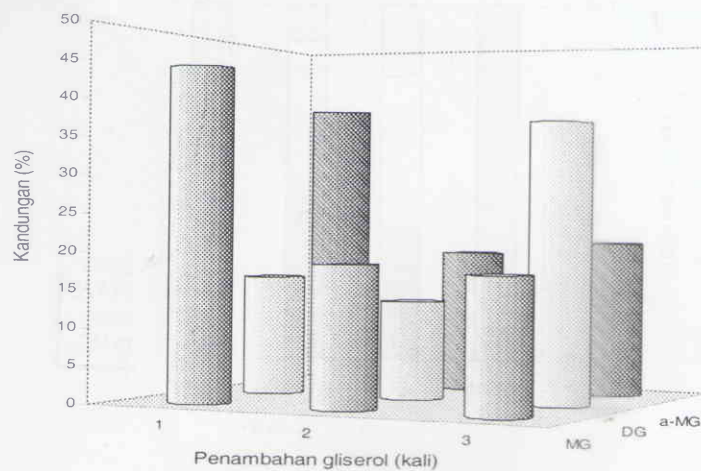
Pengaruh frekuensi penambahan gliserol

Penelitian juga menunjukkan bahwa penambahan gliserol yang dilakukan lebih dari satu kali tidak efektif untuk meningkatkan kandungan MG dan DG pada produk gliserolisis MSM. Adapun kandungan MG, DG, dan α -MG pada produk gliserolisis MSM dengan teknik penambahan gliserol yang berbeda ditampilkan pada Gambar 4.

Kandungan MG tertinggi terdapat pada perlakuan penambahan gliserol satu kali, yakni sebesar 44,5% diikuti dengan penambahan gliserol sebanyak dua dan tiga kali masing-masing sebesar 18,7% dan 17,8%. Kandungan α -MG pada produk gliserolisis relatif sama dengan kandungan MG total, yang menunjukkan bahwa hampir semua MG merupakan molekul 1- dan 3-MG. Kandungan MG yang lebih rendah pada penambahan gliserol yang dilakukan lebih dari satu kali karena substrat terdapat dalam keadaan padat pada saat penambahan gliserol kedua dan ketiga kalinya. MG memiliki titik cair yang lebih rendah dari pada DG dan titik cair DG lebih rendah dari pada TG. Terbentuknya MG dan DG pada saat pertengahan reaksi menyebabkan kondisi substrat memadat dan menyebabkan interaksi antara molekul substrat dan lipase menjadi terhambat serta gliserol menjadi lebih sukar larut dalam minyak.



Gambar 3. Kandungan α -MG pada produk hasil gliserolisis MSM dengan jumlah penggunaan silika gel yang berbeda

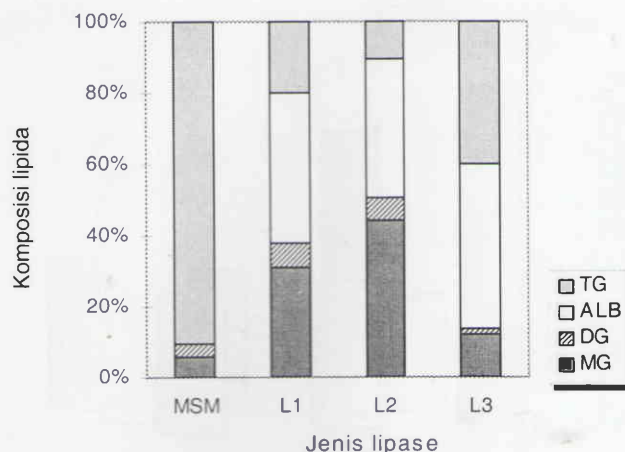


Gambar 4. Kandungan MG, DG, dan α -MG pada produk gliserolisis MSM dengan teknik penambahan gliserol yang berbeda. Substrat gliserol dan MSM dengan rasio molar 2:1. Penambahan gliserol 1 kali dilakukan pada awal reaksi, penambahan gliserol 2 kali dilakukan pada awal reaksi dan setelah 12 jam reaksi, sedangkan penambahan gliserol 3 kali dilakukan pada awal reaksi, 4 dan 8 jam setelah reaksi.

Perlakuan dengan penambahan gliserol dua kali memiliki kandungan MG total dan DG yang relatif sama, sedangkan dengan penambahan gliserol tiga kali dihasilkan produk dengan kandungan DG yang lebih tinggi dibandingkan MG, serta sebaliknya dengan perlakuan penambahan gliserol satu kali yang menghasilkan produk dengan kandungan MG yang lebih tinggi dibandingkan DG. Kandungan DG yang lebih tinggi dibandingkan MG mengindikasikan bahwa konversi TG menjadi DG dapat berlangsung dengan lebih baik dibandingkan konversi DG menjadi MG.

Pengaruh jenis dan penggunaan lipase

Kandungan TG yang relatif rendah dan kandungan ALB yang masih cukup tinggi pada produk gliserolisis menunjukkan bahwa reaksi hidrolisis dari TG MSM dapat berlangsung dengan baik, namun terdapat hambatan pada reaksi esterifikasi antara ALB dengan gliserol bebas. Oleh sebab itu pada penelitian ini juga dicobakan penggunaan lipase campuran Lipozyme-IM dan Novozym-435. Novozym-435 diketahui memiliki aktivitas esterifikasi yang tinggi. Komposisi lipida pada produk gliserolisis dengan penggunaan lipase yang berbeda ditampilkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Komposisi lipida pada produk gliserolisis MSM dengan penggunaan lipase yang berbeda. (L1 = Lipozyme-IM, L2 = campuran Lipozyme-IM dan Novozym-435 yang digunakan sekaligus, dan L3 = Lipozyme-IM pada 12 jam pertama dan Novozym-435 pada 12 jam berikutnya)

Pada Gambar 5 terlihat bahwa dengan lipase campuran yang digunakan sekaligus (L2) dihasilkan produk dengan kandungan MG tertinggi, yakni sebesar 44,0%, dan TG yang terendah sebesar 10,1%. Hal ini berkaitan dengan sifat spesifisitas dari masing-masing jenis lipase yang digunakan, dan diduga kedua jenis lipase ini saling mendukung dalam proses katalitik gliserolitik terhadap MSM. Lipase Lipozyme-IM memiliki spesifisitas posisional sn1,3-, sedangkan lipase Novozym-435 memiliki spesifisitas posisional acak terhadap letak asam lemak pada kerangka gliserol (1).

Penambahan Lipozyme-IM dan Novozym-435 pada waktu yang berbeda menghasilkan kandungan MG yang terendah, bahkan lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan lipase Lipozyme-IM saja. Hal ini menunjukkan bahwa aktifitas lipase Novozym-435 terhadap substrat yang telah termodifikasi oleh Lipozyme-IM adalah rendah. Terdapat beberapa

keadaan yang dapat menyebabkan hal ini, di antaranya adalah substrat yang terdapat dalam keadaan padat pada saat penambahan Novozym-435 (setelah 12 jam reaksi), sehingga interaksi antara substrat dan molekul enzim terhambat; ataupun spesifisitas lipase Novozym-435 yang relatif rendah terhadap molekul gliserol atau terhadap molekul asam lemak yang merupakan hasil hidrolisis oleh Lipozyme-IM. Dengan demikian reaksi esterifikasi antara gliserol dengan molekul asam lemak tidak terjadi, yang diindikasikan dengan kandungan ALB tinggi.

KESIMPULAN

Penggunaan silika gel sebagai bahan pengikat gliserol untuk perbaikan pencampuran gliserol dalam minyak sawit tidak menunjukkan pengaruh yang positif terhadap peningkatan sintesis MG dan DG. Dengan penggunaan rasio molar gliserol

dan minyak sawit 2:1 dan penambahan gliserol yang dilakukan satu kali pada awal reaksi telah menghasilkan produk dengan kandungan MG dan DG yang maksimum. Upaya memperbaiki tingkat pencampuran gliserol dan minyak sawit dengan teknik penambahan gliserol yang bertahap juga tidak menunjukkan hasil yang positif, karena kondisi substrat yang telah memadat pada saat penambahan gliserol yang kedua dan ketiga kalinya. Peningkatan sintesis MG dapat diharapkan dengan penggunaan dua jenis lipase, yakni Lipozyme-IM dan Novozym-435 sekaligus, sebagai biokatalis. Dengan penggunaan lipase campuran dapat dihasilkan produk gliserolisis dengan kandungan MG 44,4% dan DG 6,1%. Kandungan α -MG dalam produk gliserolisis umumnya lebih rendah dibandingkan dengan kandungan MG total. Hal ini menunjukkan bahwa MG yang terdapat pada produk gliserolisis tidak hanya terdiri dari 1- dan 3-MG, tetapi juga 2-MG.

DAFTAR PUSTAKA

1. ANONIMOUS. 1997. Lipozyme-IM and Novozym-435 (product leaflets). Novo Nordisk Bio-industrial Group, Denmark.
2. BERGER, M. and M.P. SCHNEIDER. 1992. Enzymatic esterification of glycerol II: Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac monoacyl-glycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(7): 961-965.
3. ELFMAN-BORJESSON, I. and M. HARROD. 1999. Synthesis of monoglycerides by glycerolysis of rapeseed oil using immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(6): 701-706.
4. ELISABETH, J., A. JATMIKA, E. NAINGGOLAN dan D. M. MALAU. 1998. Preparasi mono- dan digliserida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatik. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 6(1): 79-87.
5. ELISABETH, J., A. JATMIKA, dan O.P. SITANGGANG. 1999. Optimasi proses gliserolisis enzimatik pada minyak sawit untuk meningkatkan hasil monogliserida. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 7(3): 173-186.
6. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA, and M.S. AUGUSTO. 1994. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(6): 579-582.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. PANTZARIS, T.P. 1995. Pocketbook of Palm Oil Uses. Third edition. PORIM, Malaysia.

Improvement in mono- and diglycerides production from palm oil by enzymatic glycerolysis

Jenny Elisabeth, Donald Siahaan, and H.H. Situmorang

Abstract

This study was conducted to increase the yield of mono- and diglycerides (MG and DG) from crude palm oil by enzymatic glycerolysis method. The commercial microbial lipases, i.e. Lipozyme-IM (Rhizomucor miehei) and Novozym-435 (Candida antarctica), were used as catalyst. The reaction conditions for the synthesis of MG and DG were molar ratio of glycerol and palm oil 3:1, lipase 5% (w/w reaction mixture), initial water content 12% (w/w), constant temperature 50°C, 300 rpm, and 24 hours reaction time. Silica gel was used to adsorb the glycerol to overcome the problems of low glycerol solubility in the oil. It was shown that using of the silica gel in the reaction mixture did not increase the yield of MG and DG. Furthermore, using of molar ratio 2:1 between glycerol and palm oil and addition of the glycerol before the process gave a product with maximum MG and DG content. The stepwise addition of glycerol in two and three step to avoid lipase inactivation was another effort to increase the yield of MG and DG. However, this method did not give a positive effect since the substrate became solid at the second and third step of glycerol adding. Using mixture of two kinds of lipase in the same portions was an effective catalyst to improve the yield of MG compared to the use of lipase in single form or stepwise. With the mixed lipase, a glycerolysis product with 44.0% MG and 6.1% DG was obtained. The α -MG content was lower than the total MG content. It means that MG in the glycerolysis product was not only in 1- and 3-MG, but also in 2-MG form.

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

Introduction

Mono- and diglycerides (MG and DG) from vegetable oil or animal fat are emulsifying agents widely used in food, cosmetic, and pharmaceutical industries. The emulsifiers have high solubility in oil or fat and may be produced in several forms: liquid, plastic, or solid, depends on the kind of oil or fat that was used as feedstock. MG and DG can be also used as intermediate substances in chemical industries, such as detergent and alkyl resin (10).

Nowadays, MG and DG are produced by chemical synthesis (glycerolysis) in which glycerol, oil/fat, and particular alkaline catalyst are mixed and heated at high temperature (240-260°C). Usually, the energy consuming process gives 35-60% MG and DG content in the

product. In addition, the process gives drawback in the formation of dark-colored by-products with an undesirable flavor and toxic matter caused by peroxidation and polymerization. Therefore, lipase-catalyzed enzymatic synthesis is intensively developed, which is possible to produce more safe product with relatively low temperature process (3,9).

Synthesis of MG and DG from palm oil by enzymatic glycerolysis has been studied, in which screening of the lipases showed that Lipozyme-IM (*Rhizomucor miehei* lipase) was an effective catalyst (4,5). By using crude palm oil as substrate, an olein-rich MG-DG could be produced. Oleic acid is considered has a positive effect to human health. In addition, MG and DG from palm oil could be used as source of carotenes (pro vitamin A) and vitamin E, since the enzymatic

¹Alumni of Faculty of Agriculture, St. Thomas Univ.

process with low temperature could retain the carotenes and vitamin E in the palm oil (4).

As reported in the previous studies, the reaction conditions had not been optimized yet to synthesize a product with high yield of MG. The glycerolysis product from the palm oil contained a rather high yield of DG (50-55%), but the yield of MG was low (<13%) (4). Further improvement in the yield of MG up to 33% had been obtained by programmed reaction temperature and adjusting the initial water content in the reaction mixture. The glycerolysis product also had relatively high content of free fatty acid. This results indicated that the lipase had low activity to esterify the fatty acid molecule with glycerol due to low solubility of the glycerol in the oil (5).

To solve the same problem, Berger and Schneider (2) recommended a technique using adsorption of glycerol onto silica gel. Silica gel acts as a reservoir of glycerol and the glycerol will release step by step during the esterification process. This technique also solves the other problem, in avoiding the immobilized lipase aggregation by the free glycerol which leads to a loss in enzyme activity.

The study was designed to increase the yield of MG using palm oil as base material by improving the solubility of glycerol in palm oil using the silica gel as glycerol adsorber and different technique and frequency of glycerol addition in the reaction mixture. Another prospective way to increase the yield of MG is using several kinds of lipase, as a mixture of lipases or stepwise adding of lipases.

Materials and Methods

The oil used in this research was crude palm oil that supplied by PT Pamina Adolina, North Sumatera, Indonesia. Immobilized lipase of *Rhizomucor*

miehei (Lipozyme-IM) and *Candida antartica* (Novozym-435) were obtained from Novo Nordisk Bioindustry Ltd., Denmark. All solvents and chemicals were purchased from Merck, Germany, as analytical grade materials. The research was conducted in the Food Laboratory of Indonesian Oil Palm Research Institute.

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 was carried out by adding water 12% (w/w of substrate mixture) into the glycerol after removing initial water content in the glycerol and palm oil with molecular sieves 3Å. The mixture was incubated in an orbital shaker at 300 rpm, 50°C, and 24 hours.

Investigation on the effect of silica gel was conducted by using different ratio of silica gel to glycerol (w/w), i.e. 0.25 : 1, 0.50 : 1, 0.75 : 1, and 1 : 1. The silica gel was added into glycerol before glycerolysis reaction.

For glycerol addition technique, the molar ratio of glycerol to palm oil and frequency of glycerol addition were studied. The ratios were 2 : 1, 3 : 1, 4 : 1, and 5 : 1, and the glycerol addition was carried out on 3 ways, i.e. once (before reaction), twice (before and 12 hours after reaction), and three times (before reaction, 4-, and 8 hours after reaction). Glycerol was added at the same portion for each.

Two kinds of lipase were used for the glycerolysis process and added in mixture form before reaction or Lipozyme-IM was added first before reaction and it was replaced with Novozym-435 after 12 hours reaction time. Treat-

ment using Lipozyme-IM was used as control.

Inactivation of the lipase and removal of the excess glycerol were achieved by extraction of the reaction mixture into petroleum ether/methanol (1:1, v/v), and the immobilized lipase was filtered. Then, the upper layer was vacuum-evaporated in order to obtain lipid fraction. All reactions were conducted 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'-dichlorofluorescen 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 calculated as relative weight of each fraction. The yield was calculated as weight ratio of glycerolysis product and the initial weight of substrate oil, expressed as a percentage. α -Monoglyceride content was determined with AOCS Cc11-57 (1993) method.

Results and Discussions

Silica gel as glycerol adsorber

MG, DG, and FFA content in the glycerolysis product of palm oil were higher and the triglyceride (TG) content was lower than in the initial content of these components in palm oil. The highest MG and DG content was achieved in treatment without silica gel, i.e. 42.3% and 14.7%, respectively. Using of the silica gel did not give a positive effect to

increase the MG and DG yield in the glycerolysis product. The lipid composition for the palm oil and its glycerolysis product was shown in Figure 1.

The result suggested that using of silica gel affected lipase activity, probably due to decreasing of water activity. The silica gel was not only act as glycerol adsorber, but it also adsorbed water in the reaction mixture and the enzyme might be dried. Lipases require water in a certain amount to maintain its lipase activity and its three-dimensional molecular structure. Gioielli *et al.* (6) stated that the water content for the best transesterification activity of lipase from *R. miehei* was 7% (w/w lipase) at reaction temperature 45°C. Furthermore, Hariyadi (7) reported that maximum esterification activity of *R. miehei* lipase was at 10% (w/w lipase) water content. On the previous study, Elisabeth *et al.* (5) showed that the *R. miehei* lipase needed water content 12% (w/w substrate) for its best glycerolytic activity. It means that the lipase needed higher water content for the glycerolytic activity.

From the experiment results, it was suggested to control the water activity and adjust the water content in the enzyme preparation if using the silica gel as glycerol adsorber. To avoid decreasing of water activity, the silica gel should be mixed to glycerol before adding into the reaction mixture and the water should not be mixed with glycerol for adjusting water content in the reaction mixture. Therefore, the water activity could be maintained for the best lipase activity. Increasing of the ratio of silica gel to glycerol also reduced the yield of MG and DG, as shown in Figure 2. It means that using of silica gel as glycerol adsorber has to be done carefully and does not affect the lipase activity by maintaining the water content in the reaction mixture.

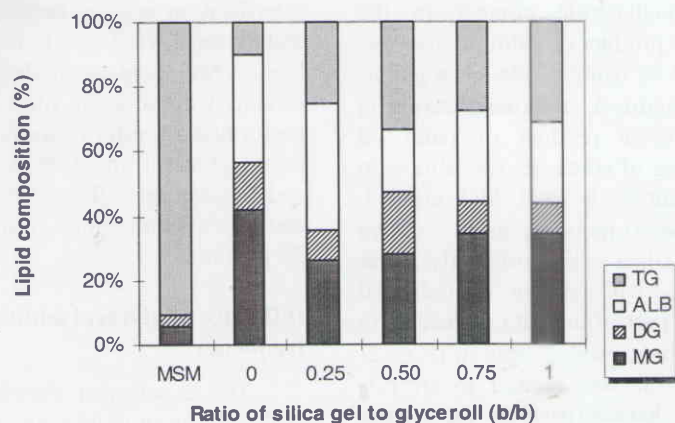


Figure 1. The lipid composition of palm oil after and before glycerolysis process at different amount of silica gel used as glycerol adsorber. Substrate glycerol and palm oil with molar ratio 3:1, Lipozyme-IM 5% (w/w substrate), temperature 50°C, orbital shaker at 300 rpm, water content 12%, 24 hours reaction time.

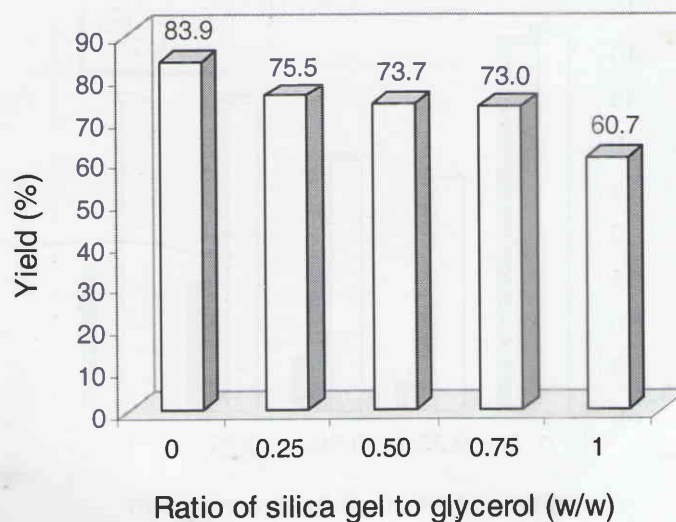


Figure 2. Yield of enzymatic glycerolysis product from palm oil at different amount of silica gel used as glycerol adsorber.

α -Monoglyceride content in the glycerolysis product of palm oil also was not affected by using of the silica gel, as shown in Figure 3. α -Monoglyceride in the glycerolysis product of palm oil without using of silica gel was almost in same amount with total MG content, whereas the α -monoglyceride content with using silica gel significantly lower than the total MG content. It indicated that a large part of the MG molecules in the glycerolysis product was in β - or 2-MG form. It was related to sn 1,3-specificity characteristic of the lipase, which it had high reactivity to fatty acid at the 1st and 3rd position of the glycerol backbone.

High 2-MG content in the glycerolysis product with using silica gel as glycerol adsorber indicated that the MG molecules were performed by hydrolysis of glyceride molecule in palm oil and

esterification activity between fatty acid and glycerol was low. On the other hand, high 2-MG content in the glycerolysis product without using silica gel could be performed by esterification reaction between glycerol and fatty acid at the 1st and 3rd position of the glycerol backbone, and also acyl migration from 2nd to 1st or 3rd position.

Influence of glycerol addition frequency

The experiment showed that glycerol addition in more than once was not effective to increase the yield of MG in the glycerolysis product of palm oil. The MG, DG, and α -MG content in the glycerolysis product with different glycerol addition technique was shown in Figure 4.

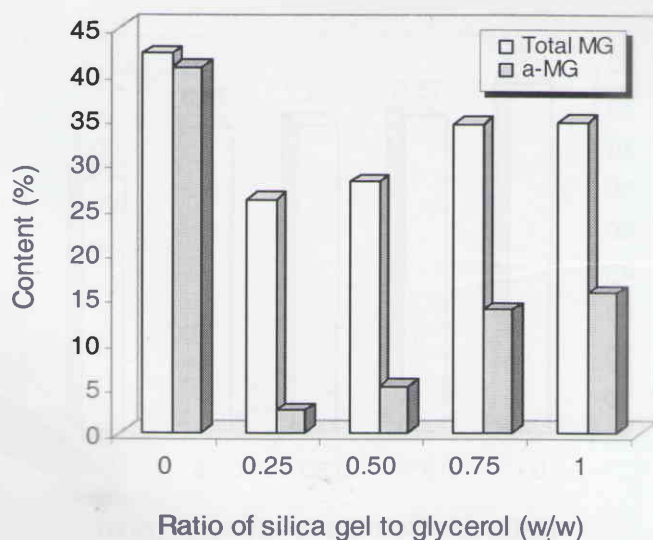


Figure 3. α - and total monoglyceride content in the glycerolysis product of palm oil at different amount of silica gel used as glycerol adsorber.

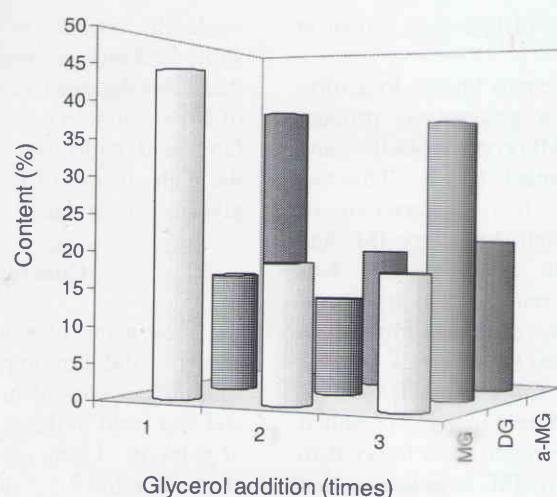


Figure 4. MG, DG, and α -MG content in the glycerolysis product of palm oil with different glycerol addition technique

The highest MG content was achieved in the glycerolysis product with once glycerol addition before reaction, i.e. 44.5%, whereas the MG content with twice and three times glycerol addition were 18.7% and 17.8%, respectively. α -MG content in the glycerolysis product of palm oil was relatively in same amount with total MG content. It indicated that almost all of the MG molecules in the glycerolysis product were in 1- and 3-MG form. The lowest α -MG content in the glycerolysis product with more than once of glycerol addition could be caused by the solid form of substrate when the glycerol was added at the second and third step. MG has lower melting point than DG and DG has lower melting point than TG. Performing of MG and DG during the glycerolysis reaction made the solidification of the substrate and inhibited the interaction between substrate and lipase molecules, and also made the lower solubility of glycerol in the oil.

The glycerolysis product with twice glycerol addition had relatively same amount of total MG and DG content. On

the other hand, the glycerolysis product with three times glycerol addition had higher DG than MG content, and the glycerolysis product with once glycerol addition had higher MG than DG content. The higher DG content than MG indicated that TG conversion into DG was carried out in better way than conversion DG into MG.

Influence of lipase and addition technique

The TG content in the glycerolysis product of palm oil was relatively low, but the FFA content was still high. It indicated that hydrolytic activity for the TG molecule in palm oil was relatively high, but there was an inhibition on the esterification reaction between fatty acid and free glycerol molecule. In this research, we tried to use two kinds of lipase, i.e. Lipozyme-IM (*Rhizomucor miehei*) and Novozym-435 (*Candida antarctica*), to improve the esterification activity. Novozym-435 has relatively high esterification activity. The lipid composition of the glycerolysis product

with different use of lipases is shown in Figure 5.

Using of the two lipases in a mixture (L2) gave a glycerolysis product with the highest MG content (44.0%) and the lowest TG content (10.1%). This was related to the specificity characteristic of each lipase, which Lipozyme-IM had sn1,3- positional specificity and Novozym-435 had random positional specificity to the fatty acid position at the glycerol backbone (1).

Addition of Lipozyme-IM and Novozym-435 at different time (L3) resulted the lowest MG content, even lower than using of Lipozyme-IM. It indicated that the Novozym-435 lipase activity to the modified-substrate by Lipozyme-IM was low. There were several reasons for this indication, such as the substrate was in solid form when Novozym-435 added into the reaction mixture, and low specificity of Novozym-435 lipase to the glycerol molecules or to the fatty acid molecules resulted from the Lipozyme-IM activity. Solidification of substrate

made the interaction between the substrate and enzyme molecules was inhibited. On the other hand, low specificity of Novozym-435 lipase to the glycerol or fatty acid molecules were indicated by the high content of free fatty acid in the glycerolysis product.

Conclusion

The using of silica gel as glycerol adsorber did not improve the glycerol solubility in the oil or increase the MG and DG yield in the glycerolysis product of palm oil. Using glycerol and palm oil at molar ratio 2 : 1 and addition of the glycerol in once before the process gave a product with maximum MG and DG content. Improving the solubility glycerol in the palm oil by glycerol addition stepwise in two and three steps also did not give a positive effect, since the substrate became solid at the second and third step of glycerol addition.

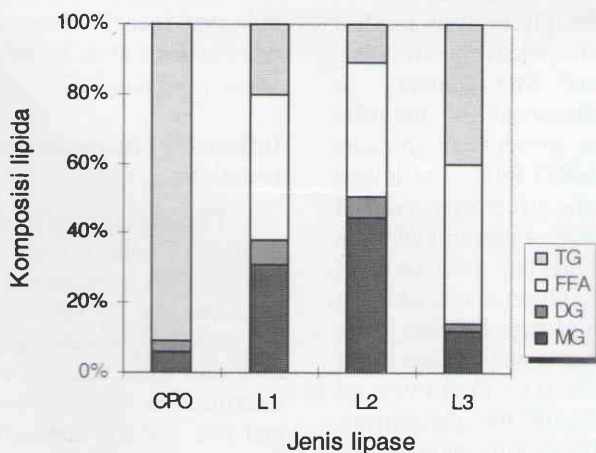


Figure 5. Lipid composition of the glycerolysis product of palm oil with different using of lipase. (L1 = Lipozyme-IM, L2 = mixture of Lipozyme-IM and Novozym-435 add together, L3 = Lipozyme-IM at first 12 hours reaction time and replaced with Novozym-435 at the next 12 hours reaction time)

Improvement in the yield of MG could be achieved by using mixture of two kinds of lipase, i.e. Lipozyme-IM and Novozym-435, in the same portions. With the mixed lipase, a glycerolysis product with 44.0% MG and 6.1% DG was resulted. The α -MG content was lower than the total MG content. It means that MG in the glycerolysis product was not only in 1- and 3-MG, but also in 2-MG form.

References

1. ANONIMOUS. 1997. Lipozyme-IM and Novozym-435 (product leaflets). Novo Nordisk Bioindustrial Group, Denmark.
2. BERGER, M. and M.P. SCHNEIDER. 1992. Enzymatic esterification of glycerol II: Lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1(3)-rac monoacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(7): 961-965.
3. ELFMAN-BORJESSON, I. and M. HARROD. 1999. Synthesis of monoglycerides by glycerolysis of rapeseed oil using immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76(6): 701-706.
4. ELISABETH, J., A. JATMIKA, E. NAING-GOLAN dan D. M. MALAU. 1998. Preparasi mono- dan diglisierida dari minyak sawit dengan proses gliserolisis enzimatik. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 6(1): 79-87.
5. ELISABETH, J., A. JATMIKA, dan O.P. SITANGGANG. 1999. Optimasi proses gliserolisis enzimatik pada minyak sawit untuk meningkatkan hasil monogliserida. *J. Penelitian Kelapa Sawit* 7(3): 173-186.
6. GIOIELLI, L.A., R.N.M. PITOMBO, M. VITOLO, R. BARUFFALDI, M.N. OLIVEIRA, and M.S. AUGUSTO. 1994. Acidolysis of babassu fat catalyzed by immobilized lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(6): 579-582.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. PANTZARIS, T.P. 1995. Pocketbook of Palm Oil Uses. Third edition. PORIM, Malaysia.

ooOoo

