

PEMBUATAN KARBOHIDRAT ESTER SEBAGAI BIOSURFAKTAN SECARA ENZIMATIS

T. Herawan, Rakmi A.R.¹ dan Purboyo Guritno

ABSTRAK

Karbohidrat ester atau gula ester adalah suatu molekul sintesis. Surfaktan ini memiliki sifat-sifat pengemulsi, pelarutan, detergensi dan pembusakan yang sangat menarik.

Meskipun sintesis karbohidrat ester secara kimia telah berhasil ditemukan, namun produk yang dihasilkan selalu merupakan campuran dari karbohidrat monoester, diester, triester, dan highester (poliester). Masalah ini dapat dihindari apabila karbohidrat ester disintesis dengan bantuan enzim.

Melihat produksi minyak sawit yang cukup tinggi, minyak sawit memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai bahan baku oleokimia, khususnya sebagai bahan baku karbohidrat ester untuk biosurfaktan.

Kata kunci : karbohidrat ester, biosurfaktan.

PENDAHULUAN

Surfaktan atau *surface active agent* atau sering juga disebut *emulsifier* merupakan suatu molekul amphipatic atau amphiphilic yang mengandung gugus hydrophilic dan lipophilic dalam satu molekul yang sama. Senyawa ini akan meningkatkan kestabilan emulsi dengan menurunkan tegangan antarmuka, antara fasa, minyak, dan air. Secara umum, kegunaan surfaktan adalah untuk menurunkan tegangan antarmuka, meningkatkan kestabilan partikel yang terdispersi dan mengontrol jenis formasi emulsi (misalnya *oil in water (O/W)* atau *water in oil (W/O)*). Di samping itu, surfaktan akan terserap ke dalam permukaan partikel minyak atau air sebagai penghalang yang akan mengurangi atau menghambat penggabungan (*coalescence*) dari partikel yang terdispersi (18).

Surfaktan dibagi menjadi empat bagian penting dan digunakan secara meluas pada hampir semua sektor industri modern.

Jenis-jenis surfaktan tersebut adalah surfaktan anionik, surfaktan kationik, surfaktan nonionik, dan surfaktan amfoterik.

Surfaktan anionik adalah senyawa yang bermuatan negatif dalam bagian aktif permukaan (*surface-active*) atau pusat hydrophobicnya (misalnya RCOO-NA, R adalah *fatty hydrophobe*). Kation yang biasa digunakan pada senyawa ini adalah Na⁺, NH₄⁺, dan triethanolamonium. Sebagian besar surfaktan jenis ini seperti alkil sulfat, alkilbenzene sulfonat, dan alkiletoksikarboksitat biasanya digunakan sebagai *emulsifier*, pembersih dan busa sabun.

Surfaktan kationik adalah senyawa yang ditandai dengan adanya muatan positif pada gugus antar muka hydrophobic (*hydrophobic surface-active*). Surfaktan jenis ini seperti garam benzalkonium, amidoamina, aminimida biasanya digunakan sebagai *fabric softener*, *deodorant*, penyegar mulut, *cream*, *lotion* dan shampoo.

Surfaktan amfoterik memiliki fungsi asam dan basa dalam strukturnya yang muatannya bergantung kepada pH, sehingga dapat menunjukkan sifat anionik pada pH

1) Associate Professor di University Kebangsaan Malaysia (UKM)

tinggi dan dapat juga menunjukkan sifat kationik pada pH rendah. Meskipun surfaktan jenis ini memiliki sifat iritasi yang sangat rendah dan mampu menurunkan sifat iritasi dari surfaktan anionik, namun surfaktan jenis ini masih sangat terbatas, baik produksi maupun penggunaannya, karena harganya yang relatif mahal dan kalah bersaing dengan jenis surfaktan lainnya. Alkilbetain, alkildimetilamin, dan turunan imidazolium adalah termasuk surfaktan jenis ini.

Surfaktan nonionik merupakan kelompok surfaktan yang berkembang dengan pesat. Surfaktan jenis ini berbeda dengan surfaktan yang telah disebutkan sebelumnya, karena tidak bermuatan atau tidak terjadi ionisasi daripada molekul. Beberapa surfaktan jenis ini dapat digunakan pada berbagai nilai pH dan sangat toleran terhadap konsentrasi elektrolit. Surfaktan nonionik dibagi menjadi dua kelompok, yaitu a) ester asam lemak dari polihidrik alkohol (seperti gliseril stearat, propilen glikol ester, sorbitan ester, dan gula ester) dan b) turunan polialkoksilat (18).

Pada saat ini total produksi surfaktan anionik masih menempati peringkat tertinggi, yaitu sekitar 66% dari total produksi surfaktan dunia, sedangkan surfaktan kationik hanya 9%, surfaktan nonionik 24% dan amfoteik kurang dari 1% (19). Namun demikian, berdasarkan studi yang dilakukan oleh Freedonia Group dari Cleveland, Amerika Serikat, diperkirakan pada suatu saat penggunaan surfaktan anionik akan semakin menurun dan digantikan dengan surfaktan nonionik, karena sifat surfaktan nonionik yang fleksibel (3).

Perhatian masyarakat terhadap masalah lingkungan hidup mengakibatkan bahan baku surfaktan dan produk yang dihasilkan menjadi suatu isu yang penting. Sejalan dengan makin berkembangnya berbagai jenis produk petrokimia, berbagai penelitian dan

pengembangan dalam pemanfaatan minyak dan lemak nabati maupun hewani telah dilakukan sebagai upaya dalam diversifikasi dan pengembangan produk. Saat ini terdapat berbagai jenis surfaktan yang berasal dari lemak dan minyak alami seperti alfa sulfo fatty acid ester, sabun, monoalkilfosfat, alkilsulfat, alkilglukosida, alkiletoksilat, alkanolamida, dan gula (karbohidrat) ester (23). Karbohidrat ester sebagai salah satu surfaktan nonionik yang *biodegradable* dan sangat ramah terhadap lingkungan memiliki peluang yang sangat besar untuk dikembangkan dalam produk-produk makanan maupun produk konsumsi yang lain.

Karbohidrat ester

Karbohidrat ester mulai dikenal sejak tahun 50-an dan umumnya merupakan suatu senyawa sintetik yang jarang ditemukan dalam bentuk alami. Karbohidrat ester merupakan surfaktan yang memiliki sifat *solubilizing*, *emulsifying*, *detergent*, dan *foaming* yang sangat menarik. Nilai *hydrophile/lipophile balance* (HLB), yang merupakan salah satu sifat surfaktan akan turun dengan bertambahnya jumlah ikatan asam lemak. Struktur dan kepolaran dari surfaktan ini membuat surfaktan ini menjadi surfaktan nonionik yang stabil pada seluruh nilai pH (12).

Penyediaan karbohidrat ester (khususnya sukrosa ester) secara komersial pertama kali dipublikasikan oleh Osipow *et al.* (16) pada tahun 1956. Proses yang digunakan adalah transesterifikasi antara sukrosa dengan metilester asam lemak dengan katalis potasium metoksi dan pelarut dimetil formamide. Proses dilakukan pada suhu 95°C dan tekanan vakum (16). Karena pelarut yang digunakan berbahaya untuk kesehatan, maka produk yang dihasilkan kurang aman bila digunakan untuk produk-produk makanan dan kosmetik. Oleh karena itu,

proses interesterifikasi antara sukrosa dengan metil ester tanpa menggunakan pelarut, dilakukan pada suhu 170-187°C dengan menggunakan katalis sabun (lithium, sodium dan potasium). Namun produk yang dihasilkan seringkali berwarna coklat karena terjadi karamelisasi akibat pemanasan pada suhu tinggi (22).

Meskipun beberapa peneliti telah cukup berhasil dalam sintesis karbohidrat ester secara kimia, namun produknya selalu masih berupa campuran antara karbohidrat monoester, diester, triester, dan highester (termasuk poliester) (12). Masalah tersebut dapat dipecahkan jika sintesis karbohidrat ester dilakukan secara enzimatik. Masalah utama yang dihadapi pada sintesis karbohidrat ester secara enzimatik adalah kelarutan karbohidrat yang sangat rendah pada pelarut organik, padahal biasanya sintesis ester secara enzimatik memerlukan pelarut organik seperti heksane, oktane, atau khloroform. Dua di antara sedikit pelarut organik lainnya yang dapat melarutkan karbohidrat adalah piridine dan dimetilformamide (10). Tetapi tentu saja kedua pelarut ini tidak dapat digunakan dalam sintesis karbohidrat ester, karena sifatnya yang cukup beracun dan berbahaya untuk kesehatan. Berbagai penelitian telah dilakukan dalam upaya meningkatkan proses dengan cara modifikasi jenis pelarut dan karbohidrat atau dengan memberikan bahan tambahan seperti zat pelarut (*solubizing agent*).

Sintesis karbohidrat ester secara enzimatik menggunakan pelarut buffer telah berhasil dilakukan oleh Seino dan Uchibori (22) dengan proses transesterifikasi antara berbagai jenis karbohidrat seperti glukosa, fruktosa dan sorbitol dengan asam stearat, oleat dan linoleat dalam larutan buffer pada 40°C selama 24 - 96 jam. Enzim yang digunakan adalah lipase yang berasal dari berbagai jenis mikroorganisme seperti *Rhizopus*,

Enterobacterium, *Aspergillus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Candida cylindracea*, *Mucor miehei*, dan *Pencillium*. Hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa lipase yang berasal dari *Candida cylindracea* memiliki keaktifan untuk sintesis karbohidrat ester yang paling tinggi dibandingkan dengan mikroorganisma yang lain. Kondisi optimum untuk aktivitas ini adalah pada nisbah (ratio) karbohidrat/asam lemak = 0.05 M/0,2 M, jumlah lipase 4 g/l, pH campuran 5.4 (dalam fosfat buffer) dan waktu reaksi 72 jam. Meskipun pada keadaan ini konversi asam lemak adalah 60%, namun produknya masih merupakan campuran antara sukrosa monoester, diester dan highester (22).

Therizod dan Klivanov juga melakukan asilasi sejumlah karbohidrat menggunakan lipase dan pyridine sebagai pelarut. Namun, karena pyridine merupakan pelarut yang berbahaya untuk kesehatan dan lipase kurang aktif pada pelarut jenis ini, maka sintesis yang dilakukan oleh mereka kurang dapat memecahkan masalah.

Janssen *et al.* (9) melakukan esterifikasi enzimatik antara karbohidrat dan asam lemak dalam sistem dua fasa dengan air sebagai pelarut polarnya serta menggunakan lipase dari *Candida rugosa* sebagai biokatalis. Fasa air merupakan larutan jenuh karbohidrat dan fasa organik mengandung asam lemak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa laju esterifikasi dengan menggunakan monosakarida fruktosa dan glukosa sebagai substrat, berturut-turut adalah 0,3 dan 0,02 mmole/g jam. Namun pada sistem yang menggunakan disakarida sukrosa sebagai substrat tidak menunjukkan adanya esterifikasi. Hal ini menunjukkan bahwa untuk sistem dua fasa hanya baik untuk substrat monosakarida.

Sementara itu, Khaled *et al.* melakukan sintesis fruktosa oleat menggunakan

Lipozyme, 1-3 specific lipase yang berasal dari *Mucor miehei* dalam berbagai jenis pelarut organik seperti heksane, kloroform, etil eter, isopropanol, tert-butyl alkohol, fosfat buffer dan lain-lain. Dari sejumlah pelarut organik yang dicoba, reaksi hanya terjadi pada pelarut tert-butyl alkohol dengan hasil 7%. Secara umum hasil penelitian Khaled *et al.* menunjukkan bahwa reaksi masih menghasilkan produksi yang rendah pada sistem batch, namun memberikan produksi yang cukup tinggi (hingga 44%) pada sistem kontinu (11, 12).

Ljunger *et al.* (13) menggunakan acetonitrile sebagai pelarut organik. Hasil penelitiannya yang menggunakan lipase dari *Candida antarctica* sebagai katalis menunjukkan bahwa glukosa tidak perlu larut dalam pelarut organik. Mono-asilasi terjadi pada gugus hidroksil primer pada karbohidrat dan jumlah glukosa serta asam lemak (oktanoat) berpengaruh kepada laju reaksi dan distribusi produk.

Beberapa penelitian telah menggunakan aditif atau zat pelarut untuk menaikkan kelarutan karbohidrat di dalam pelarut organik. Sebagai contoh adalah penggunaan asam boronat sebagai aditif. Asam boronat dikenal untuk melarutkan gula dengan membentuk kompleks karbohidrat boronat yang akan terkondensasi secara *reversible* dengan karbohidrat. Karbohidrat boronat biasanya larut dalam pelarut organik nonpolar dan secara cepat akan terhidrolisis dengan penambahan sedikit air (15).

Schlotterbeck *et al.* (21) menggunakan asam fenilboronat sebagai *solubilizing agent* pada proses monoasilasi fruktosa dengan mencampurkan asam stearat, fruktose, asam fenilboronat, dan immobilized lipase dari *Mucor miehei* (lipozyme IM60) dalam pelarut n-heksane. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pada ratio asam fenilboronat: fruktosa = 1:1, dihasilkan produksi gli-

kolipid yang paling tinggi (40%), sementara pada kandungan asam fenilboronat yang lebih tinggi (ratio 3: 1), walaupun karbohidrat larut dalam n-heksane namun produksi yang diperoleh sangat rendah (21). Sementara itu, Oguntimein *et al* melakukan penggunaan berbagai jenis pelarut dan *solubilizing agent* pada sintesis glukosa dan fruktosa ester dengan menggunakan Lipozyme TM20 (*Mucor miehei*) dan SP 382 (*Candida* sp.) sebagai katalis. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa dengan menggunakan pelarut tert-butyl alkohol reaksi antara glukosa atau fruktosa dengan asam stearat terjadi setelah 24 jam, sedangkan untuk jenis karbohidrat yang lain seperti maltosa dan palatinosa tidak terjadi reaksi. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa untuk pelarut tertentu seperti heksane, benzene, heptane, tert-metil eter, toluene dan dioxene harus ditambahkan asam fenilboronat atau butilboronat supaya reaksi dapat berlangsung, sedangkan tert-butyl alkohol tidak memerlukan penambahan bahan kimia tersebut (15). Namun hasil penelitian Ikeda dan Klivanov menunjukkan bahwa dengan menggunakan lipase dari *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus arrhizus* dan *Chromobacterium viscosum*, asilasi antara karbohidrat dengan asam lemak dalam pelarut tert-butyl alkohol (dan beberapa pelarut yang lain) tidak dapat terjadi tanpa adanya asam fenilboronat. Hal ini menunjukkan bahwa karbohidrat harus larut dengan sempurna agar dapat bereaksi (7), serta menunjukkan bahwa lipase dari mikroorganisma yang berlainan mempunyai keaktifan yang berlainan juga dalam pelarut yang sama. Dalam hal ini, lipase dari *Mucor miehei* dan *Candida* sp. memiliki keaktifan yang relatif lebih tinggi dibandingkan lipase jenis lain pada pelarut tert-butyl alkohol.

Scheckerynann (20) membandingkan kedua metode yang dilakukan oleh beberapa

peneliti di atas dengan melakukan monoasilasi fruktosa secara enzimatis. Asilasi fruktosa dilakukan dengan asam lemak rantai panjang (palmitat, stearat) dalam pelarut heksane atau pelarut 2-metil-2-buthanol. Pada metode pertama, monoasilasi fruktosa dilakukan dengan ratio molar asam lemak/fruktosa 15/1 dalam pelarut 2-metil-2buthanol menggunakan lipozim sebagai katalis. Pada metode kedua, monoasilasi dilakukan dalam pelarut heksane dengan ratio molar asam lemak/fruktosa/asam fenilboronat = 1/3/4.5. Metode pertama menghasilkan campuran C-1 dan C-6 monoasilasi fruktosa ester, sedangkan metode kedua hanya menghasilkan C-1 monoester (20).

Selain melakukan modifikasi pada penggunaan pelarut maupun bahan *solubilizing agent*, beberapa peneliti juga melakukan modifikasi dalam karbohidrat yang digunakan. Beberapa peneliti melakukan asilasi menggunakan karbohidrat asetal, seperti yang dilakukan oleh Fregapane *et al.* (4, 5), menggunakan alkil glikosida (14) dan menggunakan *acetylated* karbohidrat (1). Ketiga derivat karbohidrat tersebut relatif lebih mudah larut dalam pelarut organik dan mudah terjadi asilasi. Di antara ketiga metode tersebut, metode Akoh (1) memiliki potensi untuk dikembangkan karena bahan baku yang digunakan (misalnya glukosa penta asetat) relatif lebih murah bila dibandingkan dengan turunan karbohidrat yang digunakan pada dua metode yang lain. Namun dalam metode ini Akoh menggunakan pelarut benzene yang mempunyai sifat karsinogenik yang penggunaannya sangat dibatasi. Oleh sebab itu, penggunaan pelarut ini sukar untuk diterapkan dalam skala komersial.

Di antara metode-metode yang dilakukan oleh beberapa peneliti di atas, metode yang dilakukan oleh Khaled *et al* (11, 12) memiliki peluang untuk dikembangkan

karena metode yang dilakukannya menggunakan pelarut yang relatif aman bagi kesehatan yaitu tert-butil alkohol. Dengan memodifikasi bahan baku (menggantikan karbohidrat dan asil yang digunakan) diharapkan akan dihasilkan karbohidrat ester yang mempunyai kualitas yang cukup baik sebagai surfaktan.

Lipase sebagai biokatalis

Enzim yang sering digunakan dalam sintesis karbohidrat ester adalah lipase (EC 3. 1. 1.3) yang diisolasi dari hewan maupun mikroorganisma. Lipase adalah karboksilesterase yang menghidrolisis gliserida dengan adanya air.

Lipase yang berasal dari mikroorganisme adalah *Rhizopus*, *Enterbacterium*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Candida cilindracea*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, dan *Penicillium*. Pada saat ini lipase yang sudah dapat digunakan secara komersial adalah *immobilise* lipase yang berasal dari *Candida antarctica* (Novozyme 435), *Mucor miehei* (Lipozyme IM), serta *Candida cilindracea* (Sigma).

Minyak sawit sebagai bahan baku karbohidrat ester

Minyak sawit telah lama dikenal di dunia dan merupakan komoditas andalan bagi negara Indonesia, Malaysia dan beberapa negara di Afrika. Sampai saat ini, sebagian besar konsumsi minyak sawit hanya digunakan sebagai minyak goreng atau margarine, dan hanya sekitar 10% digunakan sebagai bahan oleokimia. Bahan baku yang digunakan untuk industri oleokimia, termasuk industri karbohidrat ester, pada umumnya berasal dari minyak kelapa (*cocunut oil*) atau dari *beef tallow*.

Minyak sawit banyak mengandung asam palmitat (40%) asam oleat (43%),

asam linoleat (10%) dan asam stearat (6%). Komposisi asam lemak ini hampir sama dengan komposisi asam lemak *beef tallow* yang mengandung asam palmitat (37%), asam oleat (40%), dan asam stearat (20%). Sedangkan minyak inti sawit mengandung asam laurat (50%), miristat (18%), oleat (19%) dan palmitat (9%). Komposisi asam lemak ini hampir sama dengan komposisi asam lemak minyak kelapa yang banyak mengandung asam laurat (50%), miristat (19%), palmitat (11%) dan oleat (8%).

Apabila dilihat dari komposisi asam lemaknya, minyak sawit dan minyak inti sawit memiliki peluang besar untuk digunakan sebagai bahan baku oleokimia, khususnya untuk bahan baku karbohidrat ester. Sehubungan dengan makin diperlukannya surfaktan yang aman dan ramah terhadap lingkungan, serta diikuti dengan besarnya potensi minyak sawit, secara teknis maupun kuantitas untuk dijadikan bahan baku karbohidrat ester, perlu dilakukan sebuah penelitian untuk meningkatkan sintesis karbohidrat ester dari minyak sawit secara enzimatik. Saat ini, penelitian sedang dilakukan dengan memodifikasi metode yang dilakukan oleh Khaled (12) dan Akoh (1).

KESIMPULAN

Karbohidrat ester dapat disintesis dengan cara enzimatik. Minyak sawit memiliki potensi yang sangat besar untuk digunakan sebagai bahan baku karbohidrat ester. Penelitian dan kajian lebih lanjut untuk meningkatkan dan mengembangkan sintesis karbohidrat ester dari minyak sawit secara enzimatik sangat diperlukan.

DAFTAR PUSTAKA

- AKOH and CASIMIR, C. 1994. Enzymatic synthesis of acetylated glucose fatty acid esters in organic solvent. *JAACS* 71 (3): 319- 323.
- ANONIMOUS. 1993. Oleochemical provide 20% of U. S, surfactants, *INFORK* 4 (10): 1166.
- BRARINA, TOM. 1995. *Surfactants '95. Household and Personal Product Industry (Happi)*, 32 (6): 91-103, 192.
- FREGAPANE, GIUSEPPE, DOUGLAS B. SARNEY, and EVGENY N. VULFSON. 1991. Enzymic solvent free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme Microb. Technol.* 13 (10): 796-800.
- FREGAPANE, GIUSEPPE, DOUGLAS B. SAMEY, SYDNEY G. GREENBERG, DOROTHY J. KNIGHT and EVGENY N. VULFSON. 1994. Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. *JAACS*, 71 (1): 87-323
- GERHARTZ, WOLFGANG. 1990. *Enzymes in Industry-production and application.* VCH Publishers, New York. 321 p.
- IKEDA, ISAO AND ALEXANDER M. KLIBANOV. 1993. Lipase catalyzed acylation of sugars solubilized in Hydrophobic solvents by complexation. *Biotech. and Bioeng.*, 42 (9): 788-791.
- ISHIGAMI, Y. 1993. Biosurfactants face increasing interest. *INFORM*, 4 (10): 1156-1165.
- JANSSEN, A. E. M., A. G. LEFFERTS and K-VAN'T RIET. 1990. Enzymatic synthesis of carbohydrate in aqueous media, *Biotechnology letters* 12 (10): 711-716.
- JANSSEN, A.E.M, C- KLABBERS, M.C.R FRANSSEN, and K. VAN'T RIET. (1991)- Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in 2-pyrrolidone. *Enzyme Microb. technol.*, 13 (7): 565- 572.
- KHALED, N., D. MONTET, M. PINA, and J, GRAILLE. 1991. *Biotechnology letters*, 13 (3): 162-172.
- KHALED, N., D. MONTET, M. FAFINES, M. PIMA and J. GRAILLE. 1992. Synthèse de mono-esters de sucre par biocatalyse. *Oleagineux*, 47 (4): 181-189.
- LJUNGER, GUDRUN, PATRICK ADLER-CREUTZ, and BO MATTIASSON. 1994. Lipase catalyzed acylation of glucose. *Biotechnology letters*, 16 (11): 1167-1172.
- MUTTIA, LYDIA N. and CASIMIR C. AKOH. 1993. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida* sp. lipase. *JAACS*, 70 (1): 43-46.

15. OGUNTIMEIN, GBEKELOLUWA B., HELMUT ERDMANN, and ROLF D. SCHMID. 1993. Lipase catalyzed synthesis of sugar ester in organic solvent. *Biotechnology letters*, 15 (2): 175- 180.
16. OSIPOW, L., FOSTER DEE SNELL, WILLIAM C. YORK, and ARTHUR FINCHLER. 1956. Methods of reparation fatty acid esters of sucrose, *Ind. Eng. Chem.*, 48 (9): 1459- 1462.
17. PARKER, KENNETH J., K. JAMES and J. HURFORD. 1976. Sucrose ester surfactants a solventless process and the products thereof ACS Symposium series 41, 97- 114.
18. RIEGER, MARTIN M. (editor). 1985. *Surfactant in cosmetics*. Surfactant science series, Marcel Dekker, Inc. New York. 488p.
19. SARNEY, DOUGLAS B. and EVGENY N. VULFSON. 1995. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends in Biotechnology*, 13 (5): 164 - 172.
20. SCHECKERMANN, CHRISTIAN, ANDREA SCHLOTTERBECK, MICHAEL SCHMIDT, VICTOR WRAY, and SIEGMUND LANG. 1995. Enzymatic monoacylation of fructose by two procedures. *Enzyme Microb. Technol.*, 17 (2): 157-162.
21. SCHLOTTERBECK, ANDREA, SIEGMUND LANG, VICTOR WRAY, and FRITZ WAGNER. 1993. Lipase catalyzed monoacylation of fructose. *Biotechnology letters*, 15 (1): 61-64.
22. SEINO, HAJIME and TSUYOSHI UCHIBORI. 1984. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (1). *JAACS*, 61 (1): 1761 - 1765.
23. THUSIMA, RIKIO, SHUJI TAGATA, YUKINAGA YOKOTA and AKIRA FUJII. 1993. Surfactants from natural fats and oils. *INFORM*, 4 (6): 680-693.

ooOoo

