

ANALISIS HASIL SINTESIS BERENZIM ESTER FRUKTOSA ASID LEMAK DARIPADA DISTILAT ASID LEMAK SAWIT DALAM MEDIUM TANPA PELARUT MENGGUNAKAN SPEKTRUM RESONANS NUKLEUS

(Analysis of Products of Fructose-Fatty Acid Ester Enzymatic Synthesis from Palm Fatty Acid Distillate (PFAD) in Solvent-free Medium)

Mohd Wahid Samsuddin*, Mamot Said, Zurhana Husin, Halimahtun Zahrah Md Som

Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan, Fakulti Sains & Teknologi UKM, 43600 Bangi, Selangor.

*Corresponding author: wahid@ukm.my

Abstrak

Sejenis surfaktan nonionik yang boleh dibiodegradasi telah dihasilkan daripada tindakbalas antara fruktosa dengan distilat asid lemak sawit (DALS) dalam medium tanpa pelarut menggunakan lipase pegun dari *Candida antartica* (Novozyme 435) sebagai mangkin. Parameter optimum untuk penghasilan ester fruktosa asid lemak (EFAL) adalah pada 70 °C, nisbah molar (fruktosa/DALS) 1:1, 8 % (w/w) lipase dan 7 hari sintesis. Pemisahan EFAL menggunakan kromatografi turus menghasilkan 2 jenis ester, iaitu monoester fruktosa dan diester fruktosa. Struktur EFAL terpisah ditentukan secara spektroskopi RMN ¹³C membuktikan bahawa ester tersebut terdiri daripada satu campuran isomer monoester (α atau β pada kedudukan C1 atau C6 gelang furanosa dan piranosa) dan satu campuran isomer diester (α atau β pada kedudukan C1 atau C6 gelang furanosa). Komposisi utama dalam EFAL tulen adalah fruktosa oleat dengan kandungan bagi monoester fruktosa sebanyak 19.0 % dan diester fruktosa 50.7 %.

Kata kunci: Distilat asid lemak sawit (DALS), fruktosa, Novozyme 435, ester fruktosa asid lemak (EFAL).

Abstract

A degradable nonionic surfactant was prepared from fructose and palm fatty acid distillate (PFAD) in solvent-free medium using immobilized *Candida antartica* Lipase (Novozyme 435) as a biocatalyst. Optimal parameters for the production of fructose fatty acid ester (FFAE) at 70 °C, molar ratio (fructose/ PFAD) 1:1, 8 % (w/w) lipase for 7 days of synthesis respectively. The separation of FFAE by column chromatography produced 2 types of esters, fructose monoester and fructose diester. Structure elucidation by ¹³C NMR confirmed that EFAL was a mixture of monoester isomers (α or β monoacylated at C1 or C6 of furanose and pyranose ring) and a mixture of diester isomers (α or β monoacylated at C1 and C6 of furanose ring). Purified FFAE contained fructose oleate as a major product with 19 % fructose monoester and 50.7 % fructose diester.

Keywords: Palm fatty acid distillate (PFAD), fructose, Novozyme 435, fructose fatty acid ester (FFAE)

Pendahuluan

Sintesis ester gula dengan kaedah kimia melibatkan pelarut toksik dan mangkin tak organik akan menghasilkan kesan residu toksik pada hasil akhir. Suhu tinggi semasa tindak balas menyebabkan hasil akhir dari campuran berbagai warna dan berlaku proses pendehidratan dan pengsiklikan bagi alkohol gula [1]. Kaedah kimia tidak selektif dan produk mengandungi berbagai campuran sebatian yang sukar dipisahkan dan menyebabkan kos penulenan produk menjadi mahal [2]. Contoh nya pengemulsian daripada sorbitol mengandungi 50 komponen isomer.

Kaedah berenzim merupakan suatu kaedah alternatif yang menarik bagi sintesis ester gula. Proses yang selektif dimungkinkan oleh enzim lipase dilakukan dibawah keadaan lembut. Kaedah ini dapat mengelakkan kemungkinan berlakunya penyahidratan atau pengkramelan alkohol gula. Tindakbalas ini juga serupa dengan tapak jalan biosintesis dalam sel sehingga makenisme tindak balas dan prosesnya dilihat lebih mesra alam berbanding sintesis kimia secara pukal. Sintesis surfaktan secara berenzim dalam larutan akuus pertama kali dilapor oleh Seino et al. pada tahun 1984 [3]. Oleh kerana kehadiran rantai ester terpilih secara termodinamik dalam medium air rendah, maka kaedah berenzim dalam medium pelarut lain dikaji. Walau bagaimanapun, proses ini dihadkan oleh kelarutan kedua-dua substrat serta penggunaan reagen sebagai agen pelarutan dan pelarut yang toksik. Antara kajian yang menggunakan pelarut [4,5], piridina dan dimetilformamida (DMF) dengan terbitan gula alkil [6] atau terbitan asetal [7,8] atau agen pelarutan untuk gula [9,10,11] seperti asid

organoborani. Tsuzuki et al. pada tahun 1999 [12] juga melaporkan penggunaan pelarut menyebabkan ketidakstabilan lipase dan sukar dikendalikan dalam skala yang besar.

Sebagai alternatif sintesis berenzim tanpa pelarut digunakan. Kaedah ini dapat meminimumkan kos kos penghasilan ester gula, selamat dan aliran proses dapat dipermudahkan. Keberkesanan dari hasil sintesis, dilakukan dengan kaedah analisis biasa, kromatografi, spektroskopi inframerah dan resonans magnet nukleus.

Bahan dan Kaedah

Novozyme 435 (Lipase *Candida antartica* B pegun) dibekalkan oleh Science Technics Sdn Bhd (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) dengan aktiviti ialah 7000 PLU/g (unit propil laurat) pada 60 °C (Helaian data Novozyme 435). Fruktosa (ketulenan 99%) daripada Merck, Distilat asid lemak daripada Jomalina Food Industries, Kelang. Spesifikasi sampel (Nilai asid lemak bebas 70% min, Kelembapan dan ketulenan 1.0 %, Nilai penyabunan 95% min.). Kesemua pelarut yang digunakan jenis Analytical Grade.

Kumpulan berfungsi dianalisis menggunakan Spektrofotometer Inframerah Perkin Elmer Model GX. Spektrum ¹H RMN dan ¹³C RMN dirakamkan oleh Spektrometer Resonans Magnet Nukleus (JOEL 400 MHz). Tegangan permukaan ditentukan menggunakan alat Tensiometer Kruss K10 ST digital (Hamburg, Germany). Kromatografi Cecair Prestasi Tinggi jenama Jasco PU-1580 Intelligent HPLC pump.

Campuran tindak balas berenzim ini mengandungi 15 mmol DALS, 15 mmol fruktosa dan 8 % (w/w) Novozym 435. Tindakbalas ini dilakukan dalam botol terbuka pada suhu 70 °C dan kelajuan 300 rpm secara berkelompok. Pensampelan dilakukan pada setiap 1 hari sehingga hari ke 7. Selepas tindak balas berakhir, campuran tindak balas diekstrak dengan larutan kloroform: metanol (2:1, v/v) dan diempar dengan pencampur vorteks selama 15 saat. Lipase kemudiannya dipisahkan dengan kaedah penurasan biasa. Pelarut pula dibiarkan meruap dengan menggunakan alat penyejat bernitrogen (N-EVAP™ model 111, USA) sehingga kepada berat tetap. Pengubahsuaian parameter sintesis dilakukan terhadap nisbah molar substrat, kepekatan lipase, suhu dan masa tindak balas supaya keadaan optimum tindak balas diperolehi. Antara julat parameter yang dikaji adalah [Nisbah molar (fruktosa:DALS) 10:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, dan 1:10, kepekatan lipase (% w/w) 1, 5, 8 dan 10, suhu (°C) 55, 60, 65, 70 dan 75, masa 1 hingga 7 hari]. Hasil tindak balas dipisahkan menggunakan cara biasa seperti kromatografan lapisan nipis, preparatif, turus dan prestasi tinggi. Penentuan struktur hasil tindak balas menggunakan Spektroskopi Inframerah (IM) dan Spektroskopi Resonans Magnet Nukleus (RMN).

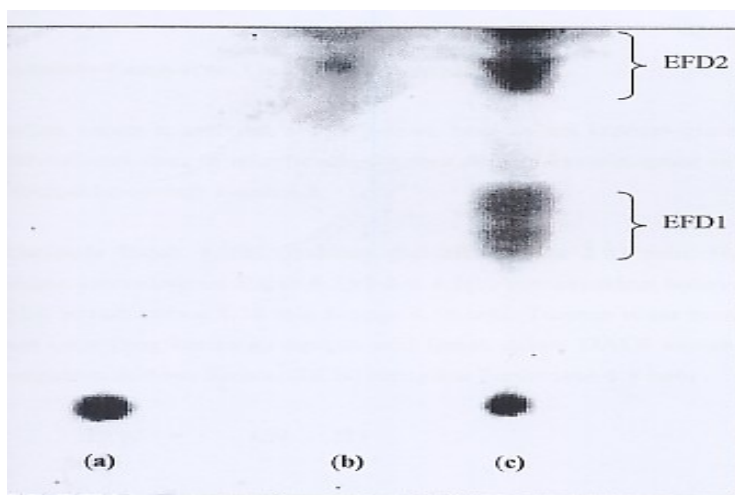
Analisis asid lemak yang berpenggantian pada EPAL dikenalpasti dengan melakukan tindak balas alkoholisis terhadap EPAL tulen (EFD1 dan EFD2). Penentuan asid lemak ester yang diperolehi daripada tindak balas ini dianalisis dengan kromatografi gas dan alkoholisis berdasarkan Akoh dan Swanson 1988 [2].

Hasil dan Perbincangan

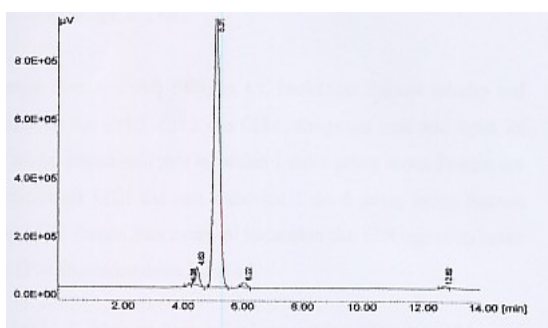
Dalam kajian ini, EFAL diperolehi dari tindak balas antara fruktosa dan DALS dengan kehadiran mangkin lipase Novozyme. Merujuk kepada kajian oleh Sultani et al [13] tindak balas antara fruktosa dan asid lemak antara C8:0 - C18:3 pada nisbah molar substrat yang tertentu menghasilkan 2 jenis ester mono dan diester fruktosa. Analisis campuran tindak balas menggunakan kromatografi lapisan nipis (KLN) seperti dalam Rajah 1.

Daripada Rajah 1 menunjukkan bahawa kedudukan tompok EFAL selepas disembur dengan 5 % (v/v) asid sulfurik pekat dalam etanol ke atas plat kromatografi ialah pada nilai R_f 0.53, 0.88 dan 0.94. Pada nilai R_f 0.53, didapati terdapat 2 tompok yang saling bertindih. Pertindihan tompok ini menunjukkan bahawa produk yang terhasil terdiri dari campuran isomer struktur dengan panjang rantai asid lemak yang berbeza. Manakala tompok substrat DALS adalah pada nilai R_f 0.94. Tompok warna pada nilai R_f 0.53 dan 0.88 adalah ungu dan pada nilai R_f 0.94 pula adalah coklat. Daripada kajian Akoh dan Swanson [14], warna coklat adalah mewakili asid manakala ungu bagi ester. Perbezaan warna tompok ini membuktikan tompok ester adalah pada nilai R_f 0.53 dan 0.88. Dengan sistem pelarut yang sama, Khaled [15] memperoleh ester pada nilai R_f 0.5, gula pada tompok asidan dan asid lemak pada 0.9. Dalam kajian ini tompok ester pada nilai R_f 0.53 dilabel sebagai EFD1 dan R_f 0.88 sebagai EFD2. Bagi analisis secara kuantitatif, setiap puncak hasil dalam kromatogram KCPT bagi EFAL dikenalpasti dengan membandingkannya dengan kromatogram substrat DALS seperti ditunjukkan dalam Rajah 2. Daripada Rajah 2, fruktosa dielusikan pada 2.83 min. Hasil daripada perbandingan kromatogram Rajah 2(a) dan Rajah 2(b) menunjukkan bahawa masa elusi bagi DALS adalah antara 4.38 min hingga 6.30 min. Turutan

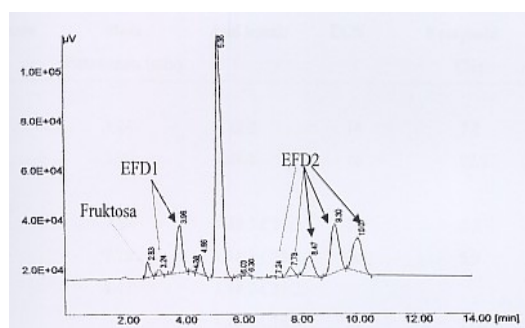
asa mengeluskan setiap komponen ester yang berkaitan dengan asid lemak dalam DALS adalah berdasarkan kepada anggaran nombor karbon (ECN) mengikut persamaan $ECN = CN - 2D$ dimana, ECN anggaran nombor karbon, CN nombor karbon, dan D ikatan ganda dua.



Rajah 1: Kedudukan tompok pada plat kromatografi lapisan nipis bagi (a) fruktosa, (b) DALS dan (c) campuran tindakbalas EFAL dalam sistem pelarut kloroform: metanol:asid asetik:air (80:10:8:2, v/v/v/v)



(a)



(b)

Rajah 2: Perbandinagn kromatogram KCPT bagi (a) DALS dan (b) campuran tindakbalas EFAL oleh kolum Symmetty Shield RP 18, 5 μ m (4.6 x 250 mm) pada suhu 55°C dengan kadar alir 1 ml/min dan dikesan dengan penyebar cahaya terserak (Eurosep DDL31). Fasa bergerak merupakan campuran asetonitril:metanol:asid asetik (30:69.7:0.3,v/v/v).

Nilai anggaran nombor karbon (ECN) bertambah, maka semakin berkurang kepolaran sesuatu komponen ester fruktosa. Daripada Rajah 2(b) didapati EFD1 dieluskan pada 3.24 min dan EFD2 dieluskan pada 7.24 min, 7.78 min, 9.30 min dan 10.07 min. EFD1 dieluskan terlebih dahulu berbanding EFD2 menunjukkan bahawa EFD1 adalah monoester iaitu lebih polar berbanding EFD2 iaitu diester [16]. Dalam kajian ini, 2 jenis ester telah berjaya disintesiskan iaitu EFD1 dan EFD2. Penentuan kumpulan asid lemak yang berikatan dengan ester dikenalpasti berdasarkan kepada julat piawai asid lemak metil ester antara (C12:0-C18:3). Peratus komposisi setiap asid lemak ditentukan daripada luas puncak kromatogram. Analisis selektiviti tindakbalas berenzim lipase menunjukkan bahawa asid oleik (C18:1) mempunyai keselektifan yang tinggi dalam kedua-dua hasil EFD1 dan EFD2. Manakala asid palmatik (C16:0) pula mempunyai keselektifan yang rendah. Ketiga tiga jenis asid lemak

C18:3, C18:2, dan C18:1 ini bertindak sebagai penukarganti pada kedudukan 1 atau 6 gelang isomer furanosa dan piranosa membentuk EFD1 dan pada kedudukan 1 atau 6 gelang isomer furanosa membentuk EFD2. Turutan masa mengelusi berdasarkan nilai ECN bagi setiap isomer EFD1 dan EFD2 ditunjukkan dalam Jadual

Komponen	Masa Penahanan (min)	Asid lemak	ECN	Komposisi (%)
EFD 1	3.24	C18:2	14	7.8
	3.96	C18:1	16	92.2
EFD 2	7.24	C18:3- C18:3	24	0.7
	7.78	C18:2 - C18:3	26	5.9
	8.47	C18:2 - C18:2, C18:1 - C18:3	28	17.3
	9.30	C18:1 - C18:2	30	41.6
	10.07	C18:1 - C18:1	32	34.5

1.

Jadual 1 : Masa penahanan setiap komponen bagi EFD1 dan EFD2 berdasarkan nilai ECN

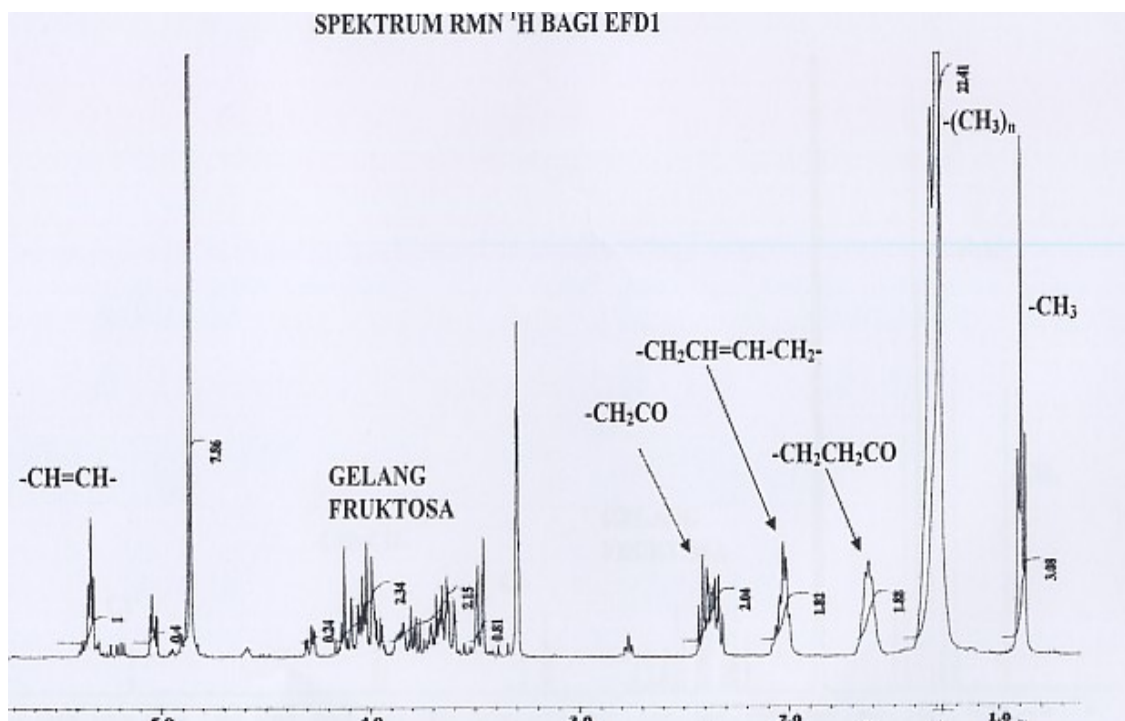
Daripada Jadual 1, menunjukkan bahawa masa elusi setiap isomer komponen EFD1 dan EFD2 berdasarkan nilai ECN menepati analisa keselektifan DALS terhadap fruktosa. Didapati sebanyak 92.2% isomer fruktosa yang berikatan dengan asid oleik (C18:1) daripada jumlah keseluruhan EFD1 pada masa penahanan 3.96 min. Komposisi bagi isomer fruktosa yang berikatan dengan asid oleik (C18:1) dan asid oleik (C18:2) adalah sebanyak 41.6% merupakan komponen diester utama dalam EFD2. Masa penahanan isomer EFD2 ini ialah pada 9.39 min. Kedua-dua komponen EFD1 dan EFD2 yang berjaya dipisahkan dan seterusnya digunakan sebagai piawai luaran dalam analisis KCPT.

Jadual 2: Data regangan ciri struktur yang terdapat dalam spectrum IM EFD1 dan EFD2 pada nombor gelombang tertentu

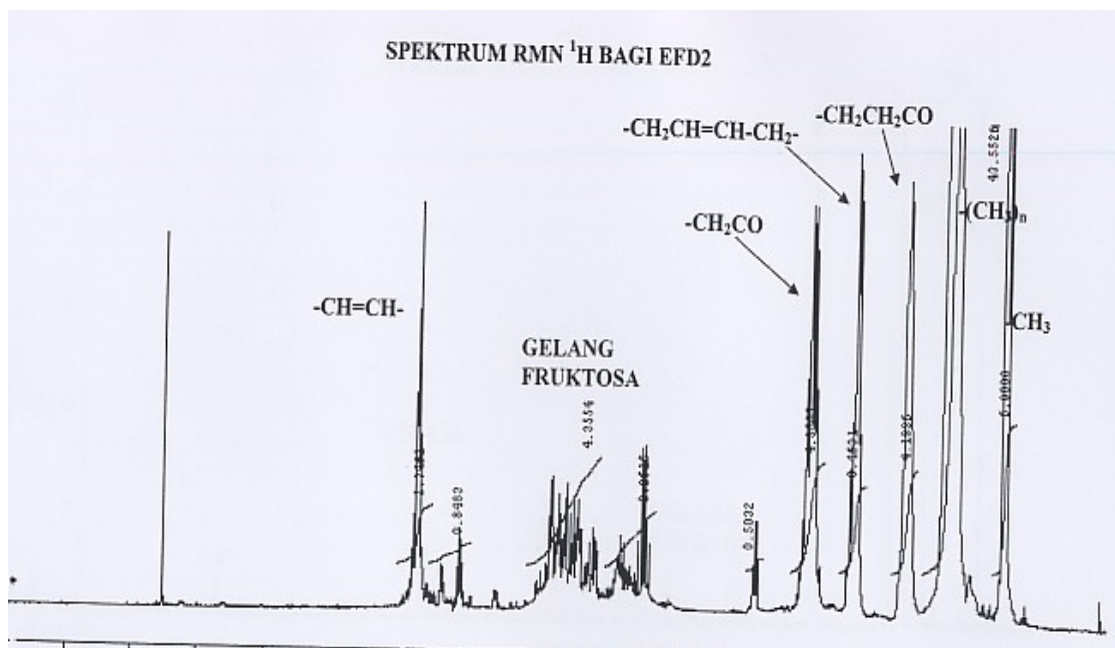
Regangan ciri	Keamatan puncak	Nombor gelombang (cm ⁻¹)	
		EFD 1	EFD 2
Ikatan -OH	Kuat dan lebar	3417.7	3445.0
Ikatan C-H dalam -CH ₂ atau -CH ₃	Kuat	2854.0,	2852.0,
		2924.7	2921.7
Ester karbonil, C=O	Kuat	1737.7	1740.8
Ikatan C=C atau Gelang aromatik	Sederhana	1638.2	-
Rantai -CH ₂	Sederhana	1459.2	1467.0
Ikatan C-O (bagi ester)	Sederhana	1062.4-	1095.0-
		1179.4	1179.2
Ikatan (CH) ₂	Sederhana	-	720.6

Daripada Jadual 2, regangan ciri terpenting adalah regangan karbonil ($\text{C}=\text{O}$). Didapati regangan ciri $\text{C}=\text{O}$ bagi EFD1 dan EFD2 adalah pada nombor gelombang 1737.7 cm^{-1} dan 1740.8 cm^{-1} dengan keamatan regangan yang kuat. Regangan ciri karbonil bagi EFD1 dan EFD2 ini didapati berada dalam julat regangan $\text{C}=\text{O}$ bagi ester iaitu antara $1735\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ dengan keamatan regangan yang kuat [17]. Manakala nilai regangan $\text{C}=\text{O}$ dalam DALS berlaku pada nombor gelombang 1709.0 cm^{-1} . Pada nilai gelombang tersebut, regangan ciri $\text{C}=\text{O}$ merupakan regangan ciri bagi asid. Perbezaan nilai gelombang bagi regangan ciri $\text{C}=\text{O}$ dalam DALS serta EFD1 dan EFD2 membuktikan bahawa tindak balas pengesteran telah berlaku dengan lengkap.

Struktur yang diwakili oleh setiap puncak spektrum RMN ^1H bagi EFD1 dan EFD2 dikenalpasti dengan membandingkannya terhadap anjakan kimia pada puncak tertentu dalam fruktosa oleat [15]. Dalam spektrum RMN ^1H setiap puncak mewakili bilangan proton tertentu. Integrasi setiap puncak ini penting untuk menentukan jumlah keseluruhan bilangan proton yang terdapat dalam EFD1 (spektrum 1) dan EFD2 (spektrum 2). Jumlah proton yang telah ditentukan seterusnya dibandingkan dengan nilai proton teori bertujuan untuk menentukan jenis ester iaitu samada monoester atau diester fruktosa. Kaedah ini digunakan oleh Dzulkefly et al. [18] untuk menentukan jenis ester.

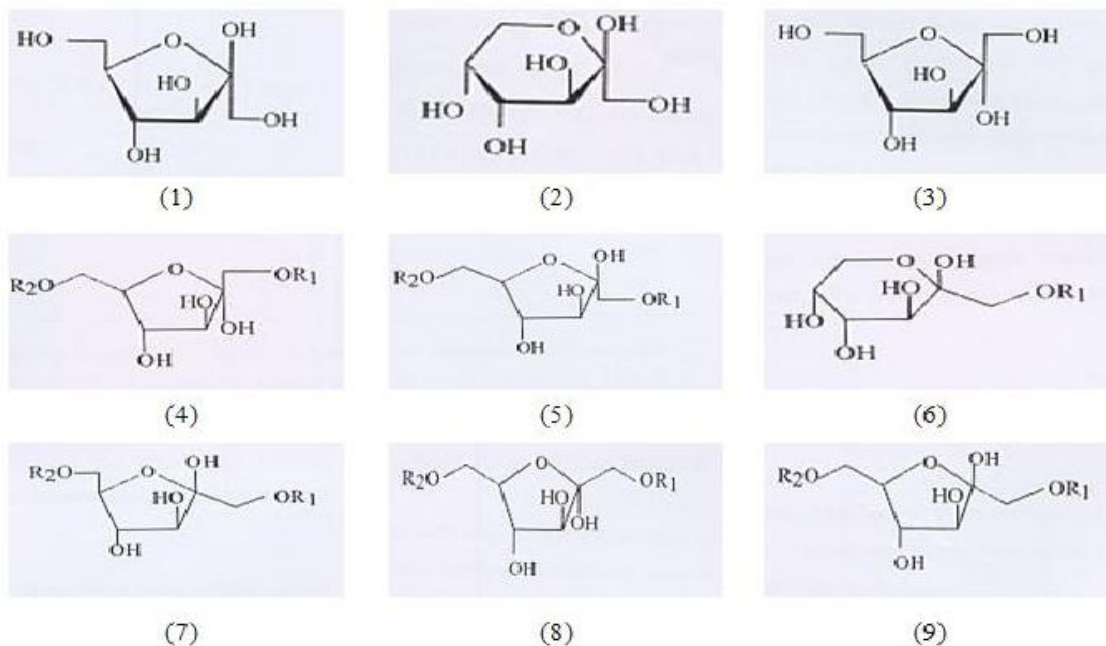


Spektrum 1

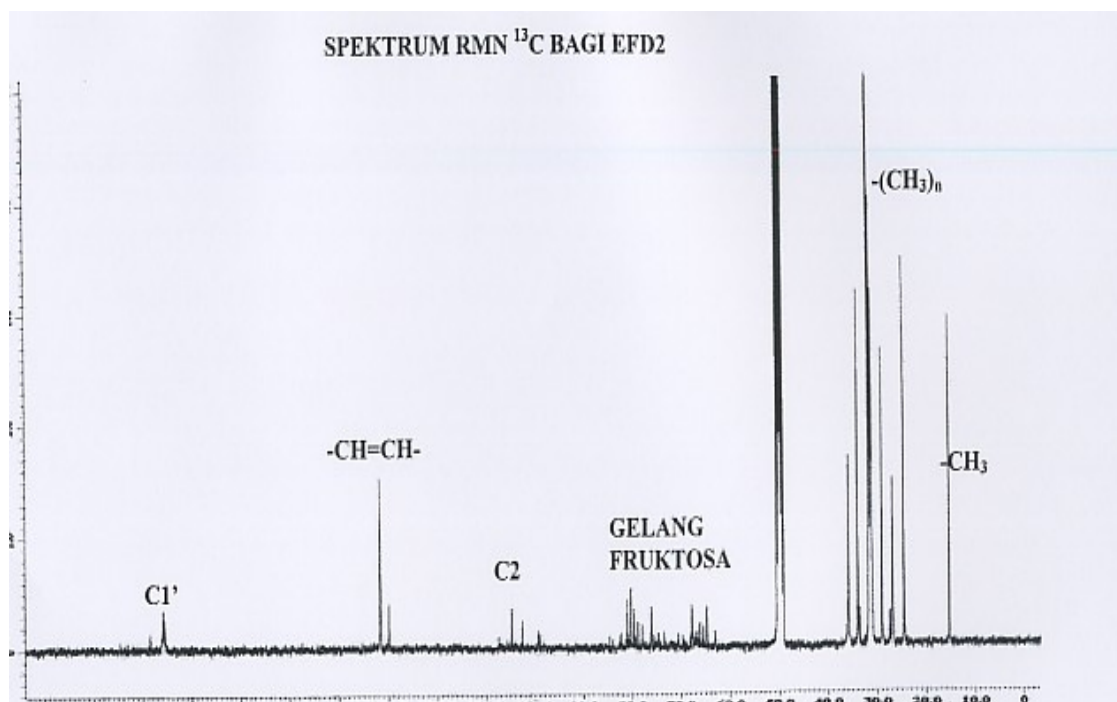


Spektrum 2

Spektrum RMN proton (^1H) bagi fruktosa yang diperolehi adalah kompleks. Keadaan ini akibat daripada kehadiran campuran isomer fruktosa dalam bentuk furanosa dan piranosa. Maka kajian terhadap kedua-dua terbitan fruktosa ini dilakukan dengan analisis spektrum RMN ^{13}C untuk menentukan komposisinya yang sebenar. Spektrum RMN ^{13}C fruktosa yang menunjukkan kehadiran isomer α dan β dalam gelang furanosa dan piranosa. Anjakan kimia (ppm) setiap puncak yang mencirikan setiap isomer β -fruktopiranosa (1), α -fruktofuranosa (2), dan β -fruktofuranosa (3) berdasarkan Bock dan Thøgersen [19]. Analisis bilangan proton anggaran dalam EFD1 terhadap bilangan proton teori dengan RMN ^1H menunjukkan bahawa EFD1 adalah monoester fruktosa. Merujuk kepada analisis kandungan isomer fruktosa, isomer struktur monoester yang telah diperolehi adalah terdiri daripada isomer β -fruktopiranosa, α -fruktofuranosa, dan β -fruktofuranosa. Oleh kerana lipase Novozyme 435 yang digunakan dalam kajian ini adalah spesifik terhadap alkohol primer [20]. Maka, salah satu siri isomer-isomer bagi monoester fruktosa yang berikatan dengan asid oleik adalah 6- α -fruktofuranosa oleat (4), 6- β -fruktofuranosa oleat (5), 1- β -fruktopiranosa oleat (6), dan 1- β -fruktofuranosa oleat (7). Hasil ini merupakan struktur yang mungkin terdapat dalam monoester fruktosa dengan rantai DALS.

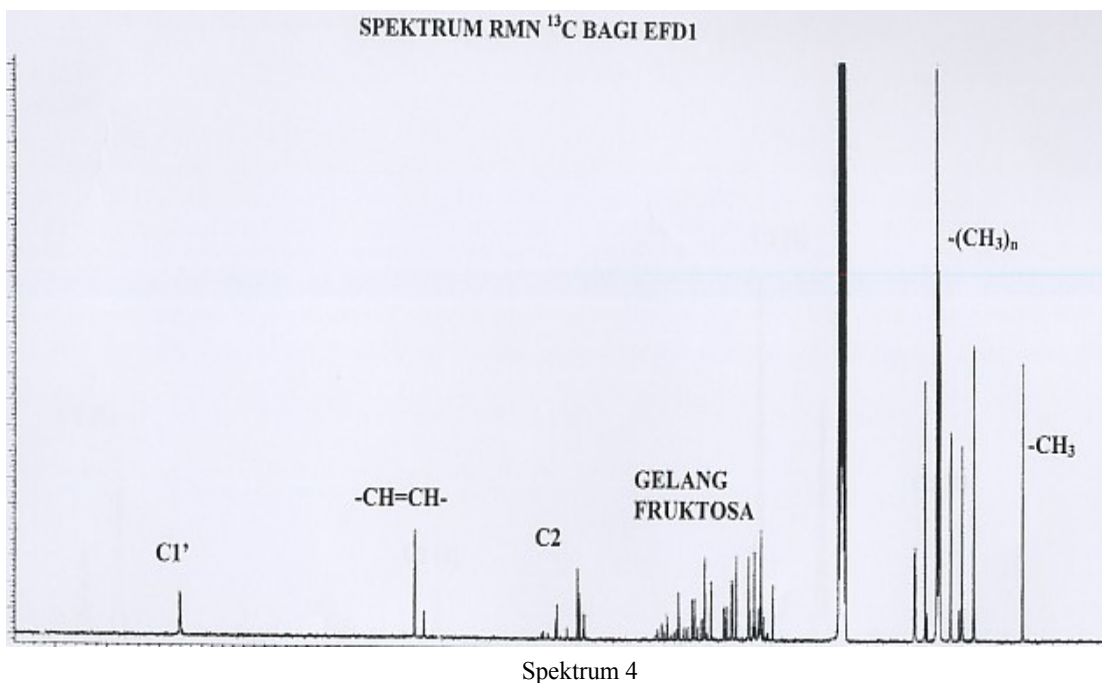


- (4) $R_1 = H$, $R_2 = \text{Rantai DALS (C12:0 – C18:3)}$ (7) $R_1 = \text{Rantai DALS (C12:0 – C18:3)}$, $R_2 = H$
 (5) $R_1 = H$, $R_2 = \text{Rantai DALS (C12:0 – C18:3)}$ (8) $R_1 = R_2 = \text{Rantai DALS (C18:0 – C18:3)}$
 (6) $R_1 = \text{Rantai DALS (C12:0 – C18:3)}$, $R_2 = H$ (9) $R_1 = R_2 = \text{Rantai DALS (C18:0 – C18:3)}$



Spektrum 3

Jenis puncak pada anjakan kimia tertentu dalam spektrum RMN ^{13}C bagi EFD1 (Spektrum 3) dikenalpasti dengan membandingkannya terhadap data RMN ^{13}C monoester fruktosa daripada kajian Scheckermann et al [21].



Data analisis puncak spektrum RMN ^{13}C bagi EFD1 dirumuskan dalam Jadual 3. Daripada jadual ini membuktikan bahawa EFD1 terdiri dari campuran isomer 6β -fruktofuranosa, 6α -fruktofuranosa, 1β -fruktofuranosa, dan 1β -fruktopiranos. Perbezaan keamatan puncak pada C2 dalam spektrum ^{13}C RMN bagi EFD1 menunjukkan bahawa isomer 1β -fruktofuranosa adalah merupakan hasil major [22]. Bagi diester fruktosa pula, struktur yang dijangkakan sama seperti dalam kajian yang dilakukan oleh Arcos et al. [23]. Isomer bagi diester fruktosa terdiri daripada campuran isomer struktur 1,6-dioleal- β -fruktofuranosa (8) dan 1,6-dioleal- α -fruktofuranosa (9).

Jadual 3 : Data nilai anjakan kimia (ppm) dalam spektrum RMN ^{13}C bagi EFD1 dalam pelarut CD_3OD

Karbon	Komponen 3	Komponen 4	Komponen 5	Komponen 6
C1	66.5	64.8	65.2	67.4
C2	104.4, 104.2	102.3	99.1 – 99.0	100.3 – 99.9
C3	84.2	76.4	74.6	69.8
C4	78.3	77.2	75.9	70.7
C5	80.9	80.8	80.9	72.2
C6	67.5	65.3	62.9	65.5

Anjakan kimia (ppm) bagi rantai karbon asid lemak adalah sama seperti berikut: 176.3(C1'), 131.7 dan 131.6 (C=C), 35.8(C2'), 33.8(C3'), 31.6, 31.5, 31.4, 31.2, 31.0, 28.9, 26.7, 24.5 ($-\text{CH}_2-$) dan 15.2(CH_3).

Anjakan kimia pada puncak-puncak tertentu ^{13}C RMN bagi EFD2 (spektum 4) dikenalpasti dan ditunjukkan dalam Jadual 4. Daripada Jadual 4, menunjukkan diester fruktosa terdiri dari campuran isomer berbagai siri panjang rantai asid lemak dan salah satunya adalah 1,6-dioleal- β -fruktofuranosa dan 1,6-dioleal- α -fruktofuranosa.

Jadual 4: Data nilai anjakan kimia (ppm) bagi pelbagai isomer dalam spektrum RMN ^{13}C bagi EFD 2 dalam CD_3OD .

Karbon	komponen 7	komponen 8
C1	66.1	67.8
C2	102.5	104.8
C3	78.8	n
C4	76.0	79.7
C5	81.0	80.2
C6	n	64.7

Anjakan kimia (ppm) bagi rantai karbon asid lemak adalah sama seperti berikut: 175.9 dan 175.7 ($\text{C1}'$), 131.7 dan 129.9 ($\text{C}=\text{C}$), 35.8 ($\text{C2}'$), 33.9 ($\text{C3}'$), 31.7, 31.5, 31.3, 31.2, 31.0, 26.9, 24.6 ($-\text{CH}_2-$) dan 15.3 (CH_3).

Kesimpulan

Distilat asid lemak sawit (DALS) merupakan bahan sampingan proses penapisan minyak sawit secara fizikal yang mengandungi $83.6\% \pm 0.02$ asid-asid lemak bebas. Julat siri panjang asid-asid lemak tersebut adalah diantara $\text{C12:0} - \text{C18:3}$ dengan jumlah berat molekul puratanya ialah 275.58 g/mol . Dalam kajian ini, DALS dengan berbagai komposisi asid lemak terbukti boleh digunakan dalam pembuatan ester fruktosa asid lemak (EFAL). EFAL disediakan daripada tindakbalas pengesteran secara terus antara fruktosa dan DALS dengan kehadiran mangkin lipase Novozym 435. Semasa tindakbalas berlaku, DALS bertindak balas sebagai penderma alkil dan medium tindakbalas (keadaan leburan) dalam sintesis berenzim tanpa pelarut. Ini menunjukkan bahawa DALS adalah setanding serta boleh menggantikan sumber asid lemak yang tulen. Kelebihan DALS berbanding asid lemak bebas yang tulen adalah ianya jauh lebih murah dan mudah didapati. Oleh itu, kos bahan mentah dapat diminimumkan bagi tujuan pengkomersilan.

Penghargaan

Terima-kasih diucapkan kepada FELDA kerana pemberian geran (No. Projek D/10/2000).

Rujukan

1. Akoh, C.C. & Swanson, B.G. 1990. Optimized synthesis of sucrose polyesters: Comparison of physical properties of sucrose polyesters, raffinose polyesters and salad oils. *J. Food Sci.* 55: 236-243.
2. Klivanov, A.M. 1989. Enzymatic catalyst in anhydrous organic solvents. *Trans. Biochem. Sci.* 12: 141-144.
3. Seino, H., Uchibori, T., Nishitani, T., & Inamasu, S. 1984. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acids (1): Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *JOACS* 61: 1761-1765.
4. Chopineau, J., McCafferty, F.D., Therisod, M. & Klinov, A.M. 1988. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oil catalyzed by lipases in nonaqueous medium. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 208-214.
5. Riva, S., Chopineau, J., Kieboom, A.P.G. & Klivanov, A.M. 1988. Protease catalyzed regioselective of Sugars and related compounds in anhydrous dimethylformamides. *JOACS* 110: 584-585.
6. Mutua, L.N. & Akoh, C.C. 1993. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in nonaqueous media by *Candida* sp. Lipase *JOACS* 70: 43-46.
7. Fregapane, V., Sarney, D.B. & Vulfson. 1991. Enzymatic solvent-free synthesis of sugar acetyl fatty acid esters. *Enzyme. Microb. Technol.* 13: 796-800.

8. Sarney, D.B., Kalleler, H., Fregapane, G., & Vulfson, E.N. 1994. Chemo-enzymatic synthesis of disaccharides fatty acid ester. *JOACS* 71: 71-74.
9. Ikeda, I. & Klinov, A.M. 1993. Lipase-catalyzed acylation of sugars solubilized in hydrophobic solvents by complexion. *Biotechnology and Bioengineering* 42:788-791.
10. Oguntimein, G.B., Edmann, H. & Schmidt, R.D. 1993. Lipase catalysed synthesis of sugar in organic solvents. *Biotechnology Letters* 15: 175-180.
11. Schlotterbeck, A., Lang, S., Wray, V. & Wagner, F. 1993. Lipase catalyzed monoacylation of Fructose . *Biotechnology Letters* 15: 61-64.
12. Tsuzuki, W., Kitamura, Y., Suzuki, T. & Kobayasi. 1999. Synthesis of sugar fatty acid esters by Modified lipase. *Biotechnology and Bioengineering* 64: 267-271.
13. Soultani, S., Engasser, J.M. & Ghoul, M. 2001. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor Molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *J. Molecular Catalysis B:Enzymatic* 11: 725-731.
14. Akoh, C.C. & Swanson, B.G. 1987. One-stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters. *J.Food Sci.* 12: 139-149.
15. Khaled, N., Montet, D., Farines, M. & Graille, J. 1992. Synthesis of sugar monoester by biocatalyst. *Oleagineux* 47(4): 181-189.
16. Jung, S., Coulun, M., Girardin, M. & Ghoul, M. 1998. Structure and surface-active property determination of fructose monooleates. *J.Surfactant and Detergent* 1: 53-57.
17. Mahmood, K. & Rahman, N.A. 1997. Kaedah spektroskopi dalam pengenalanpastian sebatian organik. Kuala Lumpur: Universiti Malaya.
18. Dzulkefly, K., Obaje, O.J., Kassim, A., Ee, G.C.L. & Suhaimi, H. 2000. Nuclear magnetic resonance characterization of reaction products of interesterification of peracetylated α -D-glucopyranose and fatty acid methyl ester. *JOACS* 77(1):43-47.
19. Bock, K. & Thógersen, H. 1982. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of mono and oligosaccharides. *Annu. Rep. NMR Spectros.* 13: 1-57.
20. Björkling, F., Godtfredson, S.E. & Kirk, O. 1989. A highly selective enzyme-catalyzed esterification of simple glucosides. *J. Chem. Soc, Chem Comm.* 14: 934-935.
21. Scheckermann, C., Schlotterbeck, A., Schmidt, M., Wray, V., & Lang, S. 1995. Enzymatic Monoacylation of fructose. *Biotechnology Letters* 15: 157-162.
22. Zurhana Mat Hussin . 2004. Sintesis berenzim ester fruktosa asid lemak daripada distilat asid lemak Sawit dalam medium tanpa pelarut. Tesis Ijazah Sarjan Sains. Universiti Kebangsaan Malaysia.
23. Arcoz, J.A., Bernabe',M. & Otero, C. 1998. Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses. *Enzyme Microb. Technol.* 22:27-34.