

Enzymatyczna modyfikacja naturalnych triacylogliceroli

Marek Adamczak

Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Enzymatic modification of natural triacylglycerols and the properties of the obtained products

Summary

Structured triacylglycerols (sTAG) are chemical compounds with a precisely defined chemical and stereochemical structure whose natural nutritional and physico-chemical properties have been modified. Modified TAG can be synthesized with the application of genetic engineering, physical, chemical and enzymatic methods. Due to the demand for the precisely determined structure of the resulting sTAG, their synthesis with the use of lipases is preferred.

Prepared pure fatty acids or their esters, as well as synthetic monoacid triacylglycerols are necessary for sTAG synthesis. The use of such unnatural substrates requires additional processes and is cost consuming. Additionally, it can lead to loss of valuable components present in natural oils and contribute to a decrease in the oxidative stability of the resulting products. The application of naturally occurring fats or oils can considerably simplify sTAG synthesis and reduce the costs of the processes.

Recently, much attention has been paid to an assessment of nutritional properties of structured triacylglycerols or acylglycerols.

The aim of this article is to present the methods of sTAG synthesis, including examples of the use of naturally occurring triacylglycerols as substrates.

Key words:

biocatalysis, fat, oil modification, lipase, organic solvent, structured triacylglycerol.

Adres do korespondencji

Marek Adamczak,
Katedra Biotechnologii
Żywności,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. J. Heweliusza 1,
10-718 Olsztyn;
e-mail:
marek.adamczak@
uwm.edu.pl

1. Wstęp

Strukturyzowane triacyloglicerole (sTAG) są związkami chemicznymi o zmodyfikowanych w stosunku do naturalnych triacylogliceroli właściwościach żywieniowych i fizykochemicznych,

charakteryzującymi się ściśle zdefiniowaną budową chemiczną i stereochemiczną (1). Synteza TAG o zmodyfikowanych właściwościach, może być prowadzona z zastosowaniem metod inżynierii genetycznej, metod fizycznych, chemicznych oraz enzymatycznych (2,3). Z uwagi na wymagania dotyczące ściśle określonej budowy sTAG ich synteza preferowana jest obecnie z użyciem lipaz.

Do syntezy sTAG stosowane są przygotowane w tym celu czyste kwasy tłuszczowe bądź ich estry, a także syntetyczne triacyloglicerole, najczęściej monokwasowe (4-6). Wykorzystanie tego rodzaju nienaturalnych substratów wymaga realizacji dodatkowych procesów i jest kosztowne, a poza tym może prowadzić do utraty cennych składników obecnych w naturalnych olejach i przyczyniać się do obniżenia stabilności oksydacyjnej otrzymanych produktów. Zastosowanie naturalnie występujących tłuszczów lub olejów może znacznie ułatwić procedurę syntezy sTAG oraz obniżyć koszty realizacji procesów.

Ostatnio wiele uwagi zwraca się na ocenę właściwości żywieniowych strukturyzowanych triacylogliceroli, bądź acylogliceroli (2,7,8). Celem publikacji jest przedstawienie metod syntezy sTAG, w tym przede wszystkim zaprezentowanie przykładów zastosowania jako substratów naturalnie występujących triacylogliceroli.

2. Enzymatyczna synteza strukturyzowanych triacylogliceroli

Właściwości lipaz oraz warunki katalizy z ich udziałem w mediach niekonwencjonalnych są przedmiotem innych opracowań (9-13), dlatego w prezentowanej pracy przedstawione będą głównie możliwości zastosowania lipaz w modyfikacji triacylogliceroli. Wybrane przykłady reakcji katalizowanych przez lipazy i wykorzystywanych w syntezie sTAG przedstawiono na rysunku 1 i 2.

Oryginalną metodę otrzymywania sTAG z wydajnością ponad 90% zaproponował Haraldsson z zespołem (14-17). Polega ona na enzymatycznej syntezie 1,3-DAG, a następnie wprowadzaniu kwasu tłuszczowego w pozycję 2 w efekcie reakcji chemicznej z wykorzystaniem 1-(3-dimetyloaminopropyl)-3-etylokarboimidu (EDCI), w obecności 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP).

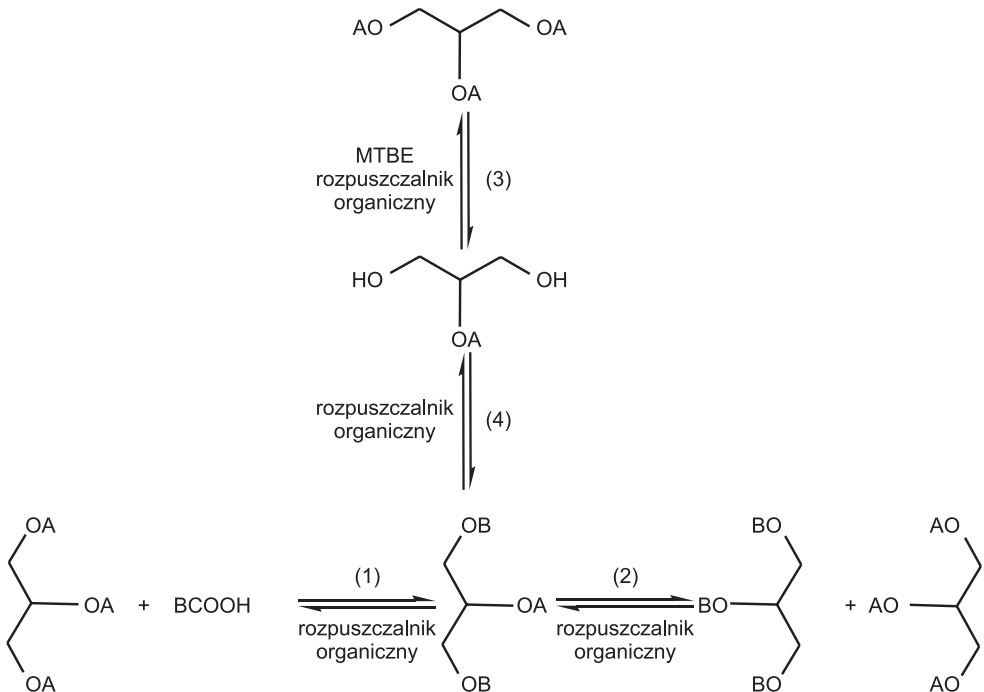
Projektowanie budowy chemicznej strukturyzowanych triacylogliceroli nie sprawia żadnych problemów, ponieważ znane są wymagania, skład chemiczny i budowa chemiczna, jakim powinny sprostać TAG o korzystnych właściwościach żywieniowych, leczniczych lub funkcjonalnych (tab. 1).

Tabela 1

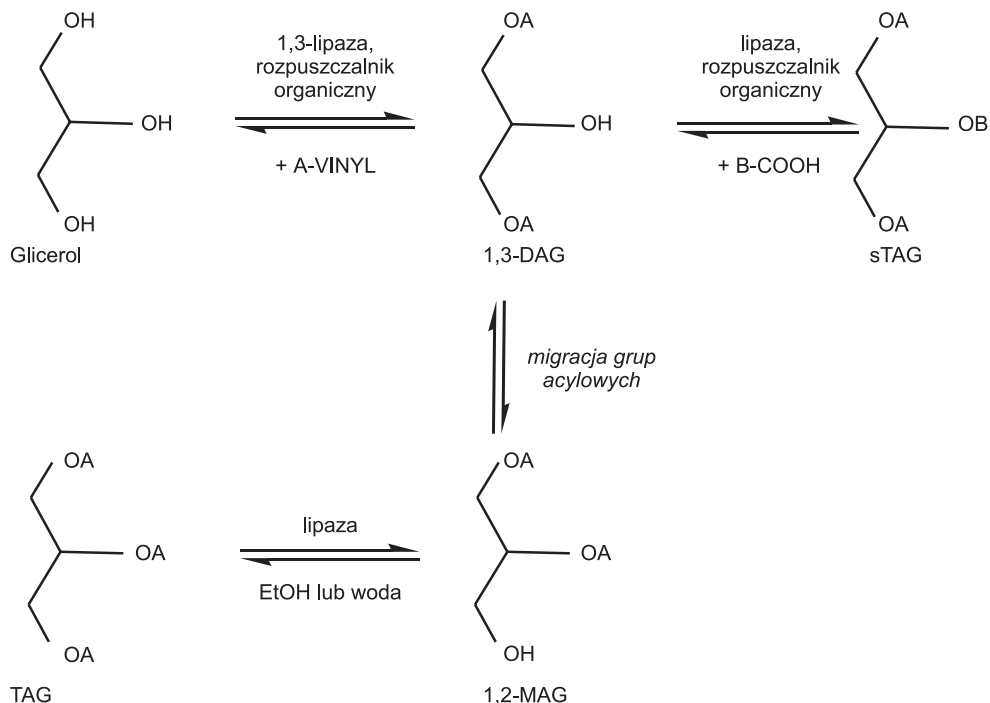
Przykłady zastosowań wybranych sTAG

Grupa zastosowań	Przykład	Literatura
medycyna i żywienie człowieka	substytuty mleka kobiecego	(18,19)
	lipidy podawane dożylnie	(20)
	tłuszcze i oleje o obniżonej kaloryczności	(21,22)
żywność funkcjonalna	tłuszcze plastyczne	(23-25)
	substytuty masła kakaowego	(26-28)
	tłuszcze smaźalnice*	(29-30)
	tłuszcze o korzystnych właściwościach reologicznych	(23,31)

* oleje otrzymywane głównie z roślin transgenicznych



Rys. 1. Możliwości syntezy sTAG z wykorzystaniem lipaz o specyficzności 1,3-*sn*. (1) reakcja acydolizy; (2) reakcja transestryfikacji; (3,4) dwuetapowa synteza sTAG polegająca na syntezie 2-MAG w reakcji etanolizy (3), a następnie estryfikacji otrzymanych 2-MAG z kwasami tłuszczowymi (4). MTBE – eter metyl-*tert*-butylowy, 1,3-lipaza – lipaza *sn*-1,3-selektywna. Reakcje przedstawiono niestechiometrycznie, bez wskazania produktów ubocznych.



Rys. 2. Katalizowana przez lipazy synteza sTAG z 1,3-DAG jako produktem pośrednim.

3. Naturalne tłuszcze i oleje stosowane do syntezy sTAG

Właściwości sTAG determinuje skład kwasów tłuszczowych oraz ich rozmieszczenie w cząsteczce TAG. Komponując, projektując budowę nowego sTAG należy uwzględnić korzystne oddziaływanie na organizm ludzki poszczególnych kwasów tłuszczowych (tab. 2).

Tabela 2

Właściwości kwasów tłuszczowych stosowanych w syntezie sTAG (2,32)

Kwasy tłuszczowe	Właściwości
1	2
krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) (C2-C6)	kwasy tłuszczowe o niskiej kaloryczności (2:0-3,5 kcal/g; 3:0-5,0 kcal/g; 4:0-6 kcal/g; 6:0-7,5 kcal/g); szybko absorbowane przez organizm ludzki z uwagi na rozpuszczalność w wodzie i budowę chemiczną
średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe (MCFA) (C8-C12)	są transportowane żyłą wrotną bezpośrednio do wątroby z uwagi na wielkość cząsteczki i rozpuszczalność w wodzie; metabolizm MCFA jest tak szybki jak glukozy i nie uzależniony od obecności karnityny; wykazują niewielką tendencję do akumulacji, jako tłuszcz zapasowy, z uwagi na niewielką podatność na reestryfikację do TAG; mogą powodować wzrost poziomu cholesterolu w serum

1	2
długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (LCFA) (C14-C24); polienowe kwasy tłuszczowe (PEFA)	prekursory syntezy eikozanoidów; NNKT – kwasy tłuszczowe z rodziny <i>n</i> -6 i <i>n</i> -3, nie syntetyzowane przez organizm ludzki; zwiększają udział cholesterolu HDL i jednocześnie obniżają zawartość LDL i VLDL; obniżają zawartość cholesterolu ogółem w płazmie
sprzężony kwas linolowy*	wykazane właściwości antykancerogenne w układach modelowych

* sprzężony kwas linolowy jest kwasem długołańcuchowym, ale wyodrębniono go w zestawieniu dla wykazania jego korzystnych, unikatowych właściwości żywieniowych

Należy jednocześnie pamiętać o tym, że lipaza trzustkowa charakteryzuje się *sn*-1,3 selektywnością pozycyjną. Po hydrolizie triacylogliceroli powstają wolne kwasy tłuszczowe oraz 2-monoacylo-*sn*-glicerol, który następnie jest reestryfikowany do TAG. Lipaza ta również wykazuje selektywność wobec kwasów tłuszczowych, tj. długości ich łańcucha węglowego oraz stopnia nienasylenia. Szybciej uwalniane są z acylogliceroli MCFA niż LCFA.

3.1. Oleje roślinne w syntezie sTAG

Większość olejów roślinnych zawiera kwasy tłuszczowe polienowe w pozycji *sn*-2 i nasycone kwasy tłuszczowe w pozycjach zewnętrznych (tab. 3). Taka budowa naturalnych triacylogliceroli może umożliwić ich zastosowanie jako źródła polienowych kwasów tłuszczowych, a w specyficznych warunkach jako substratu do syntezy monoacylogliceroli zawierających w pozycji *sn*-2 polienowe kwasy tłuszczowe (33-35).

Tabela 3

Przykłady triacylogliceroli niektórych olejów roślinnych i tłuszczów stosowanych w syntezie sTAG

Tłuszcz/Olej	TAG		
masło kakaowe	POS	SOS	POP
olej kokosowy	DDD	CDD	CDM
olej z nasion palmowych	DDD	MOD	ODO
olej z oliwek	OOO	OOP	OLO
olej z ogórecznika	LLL	PGG	OOO
olej z wiesiołka	LLL	PGG	OOO
olej palmowy	POP	POO	OLO
olej z orzeszków ziemnych	OOL	POL	OLL
olej canola	OOLi	OOO	OOLn
olej z krokosza	LLL	LLO	LLP
olej słonecznikowy	LLL	LLO	LLP
olej lniany	LnLnLn	LnLnL	LnLnO

C – 10:0 (kwas kaprylowy), D – 12:0 (kwas laurynowy), M – 14:0 (kwas mirystynowy), P – 16:0 (kwas palmitynowy), S – 18:0 (kwas stearynowy), O – 18:1 (kwas oleinowy), L – 18:2 (kwas linolowy), Ln – 18:3 (kwas linolenowy), G – 18:3 (kwas γ -linolenowy).

Oleje są modyfikowane i wykorzystywane w chemicznej lub enzymatycznej syntezie tłuszczów piekarskich, cukierniczych i margaryn (tab. 4). Zastosowanie metod enzymatycznych w syntezie tłuszczów specjalnego przeznaczenia jest szeroko opisane w literaturze, jednak w procesach przemysłowych powszechnie wykorzystywane są wciąż metody chemiczne. Można podać jednak przykłady, które wyraźnie wskazują na zalety metod enzymatycznych. Prowadząc enzymatyczną interestryfikację częściowo uwodornionego oleju sojowego z mieszaniną innych olejów otrzymano, np. sTAG, w których udział nienasyconych kwasów tłuszczowych typu *trans* został znacznie obniżony w porównaniu do produktów otrzymanych metodą syntezy chemicznej (36,37). Znaczne zmniejszenie udziału kwasów tłuszczowych typu *trans* w otrzymanym produkcie uzyskano prowadząc reakcję enzymatyczną w środowisku nadkrytycznego CO₂ i wodoru (38).

Tabela 4

Przykłady praktycznego wykorzystania modyfikacji tłuszczów i olejów

Oleje/Tłuszcze	Proces	Zastosowanie	Literatura
olej palmowy	enzymatyczna interestryfikacja	produkty cukiernicze	(39)
olej z oliwek	enzymatyczna interestryfikacja	produkty cukiernicze	(40)
olej słonecznikowy i rzepakowy	enzymatyczna interestryfikacja	produkty cukiernicze	(41)
olej słonecznikowy	chemiczna interestryfikacja	tłuszcz piekarniczy	(42,43)
olej sojowy	chemiczna interestryfikacja	produkty cukiernicze	(36,37)
stearyna palmowa i olej kokosowy	enzymatyczna interestryfikacja	margaryny	(44)
olej sojowy	uwodornienie	margaryny	(38)

Jednym z najbardziej cenionych tłuszczów cukierniczych jest masło kakaowe, ale jego wysoka cena zmusza do poszukiwań metod syntezy produktów zbliżonych składem, budową chemiczną, a także właściwościami fizykochemicznymi, do naturalnego masła kakaowego. Tłuszcz masła kakaowego charakteryzuje się specyficzną budową triacylogliceroli i unikatowym składem kwasów tłuszczowych, zatem do jego syntezy są preferowane selektywne substratowo i pozycyjnie lipazy. Przykłady składu frakcji triacylogliceroli otrzymanych po enzymatycznej interestryfikacji oleiny palmowej przedstawiono w tabeli 5.

Oleje roślinne stosowane są także jako substrat do syntezy sTAG spełniających specyficzne wymagania żywieniowe. Z oleju palmowego metodą syntezy enzymatycznej otrzymano substytutu tłuszczu mlekowego, które następnie zastosowano w żywieniu niemowląt (46). Lipazy wykorzystano także jako katalizator reakcji acydolizy, mającej na celu wymianę długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-3 triacylogliceroli oleju z orzeszków ziemnych, na kwas oleinowy (47). W ostatnim czasie stosując regresję wielomianową zoptymalizowano warunki reakcji enzymatycznej umożliwiającej wprowadzenie do oleju kokosowego kwasów polienowych z grupy *n*-3 i *n*-6 (48).

Tabela 5

Skład kwasów tłuszczowych frakcji triacylogliceroli w produkcie otrzymanym po interestryfikacji oleiny palmowej (45)

Produkt	Udział triacylogliceroli (%)							
	OOL	POL	POO	POP	SOO	POS	SOS	SSS
CB	0,2	2,4	2,2	18,9	2,4	41,3	29,7	1,9
1	0,4	1,4	2,3	15,3	2,9	44,1	29,6	1,5
2	0,7	2,1	6,0	16,0	6,1	38,7	23,1	0,7
3	0,7	1,5	1,7	13,7	3,6	38,5	24,8	0,7

CB-maśło kakaowe, O-kwas oleinowy, P-kwas palmitynowy, L-kwas linolenowy; frakcje triacylogliceroli otrzymane po wytrąceniu z wykorzystaniem heksanu i acetonu w proporcji do mieszaniny reakcyjnej 1:10 (w/v) (frakcja 1) lub 1:5 (w/v) (frakcja 2) oraz acetonu (frakcja 3, 1:10 (w/v)).

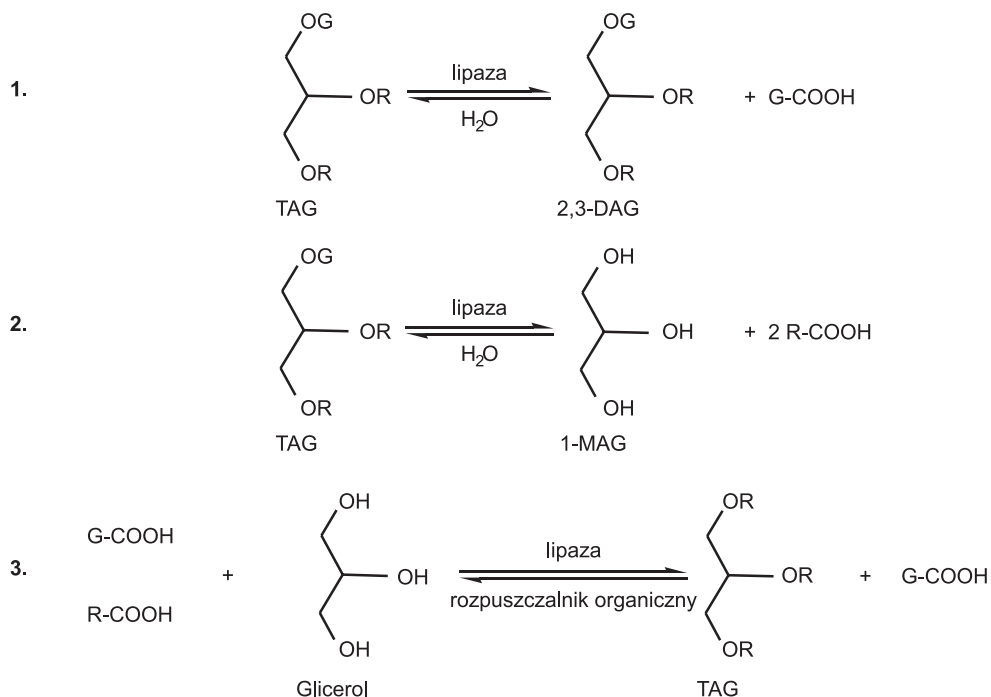
Ważną grupę olejów roślinnych stanowią te, które zawierają duże ilości kwasu γ -linolenowego (18:3, *n*-6; GLA). GLA jest stosowany w leczeniu różnych chorób oraz jako składnik kosmetyków. Jest to również produkt pośredni w syntezie kwasu arachidonowego (20:4, *n*-6; AA). Głównym źródłem GLA jest olej z *Oenothera biennis* (wiesiołek dwuletni) (49), *Borago officinalis* (ogórecznik) (50) i *Ribes nigrum* (czarna porzeczka) (51). Wciąż jednak poszukiwane są nowe źródła tego kwasu tłuszczowego (52). Duże zainteresowanie wzbudza w ostatnim czasie olej z *Echium vulgare* L. (żmijowiec pospolity), jako źródło kwasu γ -linolenowego oraz stearydynowego (18:4). W ostatnim czasie wykazano wiele pozytywnych aspektów oddziaływania kwasu stearydynowego na organizm ludzki, w tym działanie przeciwnowotworowe (53).

Oleje zawierające duże ilości GLA stosowano jako substraty w syntezie sTAG bogatych w *n*-3 PEKT lub GLA, np. w wyniku reakcji acydolizy średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych z olejem z wiesiołka (54-55) lub ogórecznika (56-60).

Oleje bogate w GLA stosuje się także do otrzymywania koncentratów tego kwasu po selektywnej hydrolizie (rys. 3.1.) bądź wzbogacania w GLA frakcji acylogliceroli (rys. 3.2.) lub wolnych kwasów tłuszczowych (rys. 3.3). Shimada i wsp. (61,62) wykorzystując lipazę z *Rhizopus delemar* uzyskali frakcję wolnych kwasów tłuszczowych zawierającą ponad 97% GLA. Rahmatullah i wsp. (63,64) wykazali przydatność lipaz do otrzymywania produktów bogatych w GLA dwiema metodami stosując:

1) preparat Lipozyme RM IM do estryfikacji wolnych kwasów tłuszczowych uzyskanych z olejów z ogórecznika i wiesiołka, zwiększono zawartość GLA we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych do około 70%,

2) lipazę z *Candida rugosa* do hydrolizy bioolejów uzyskano frakcję acylogliceroli zawierającą około 50% GLA.

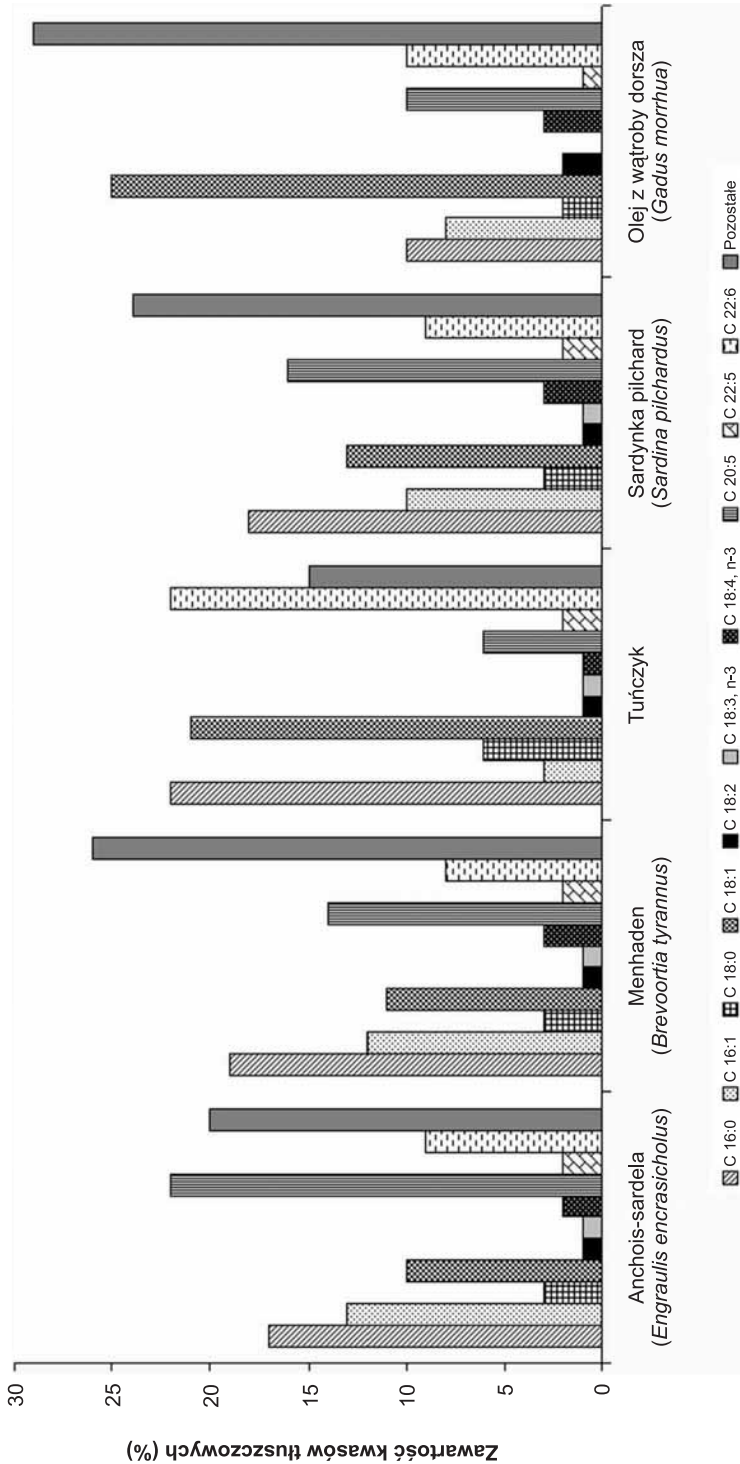


Rys. 3. Przykłady otrzymywania koncentratów kwasu γ -linolowego (GLA), we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w wyniku reakcji hydrolizy katalizowanej, przez selektywną lipazę względem GLA (1) lub we frakcji acylogliceroli z użyciem lipazy nieselektywnej wobec GLA (2); we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w wyniku reakcji estyfikacji z zastosowaniem lipazy nieselektywnej wobec GLA (3).

3.2. Oleje rybne w syntezie sTAG

Oleje rybne zawierają około 50 różnych kwasów tłuszczowych i są głównym źródłem kwasu eikozapentaenowego (EPA) oraz dokozaheksaenowego (DHA) (rys. 4). W ostatnim czasie opublikowano kilka prac z zakresu syntezy sTAG na bazie olejów rybnych zawierających średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe w pozycji *sn*-1 i *sn*-3 oraz PEKT w pozycji *sn*-2 (65-68). W tabeli 6 przedstawiono skład kwasów tłuszczowych oleju z tuńczyka oraz sTAG otrzymanych po reakcji acydolizy z tym olejem.

Różnorodność kwasów tłuszczowych w olejach rybnych sprawia zwykle trudności w uzyskaniu czystych koncentratów DHA lub EPA. Brak jest lipaz, które wykazują selektywność w stosunku do tych kwasów tłuszczowych. Triacyloglicerole zawierające DHA i EPA były syntetyzowane przez Haraldssona i wsp. (69,70). Koncentracja DHA i EPA w triacyloglicerolach była wyższa niż 90%, po przeprowadzeniu kinetycznego rozdzielania katalizowanego przez lipazy oraz po zastosowaniu różnych technik chromatograficznych (HPLC lub chromatografia na jonach srebrnych) (8).



Rys. 4. Porównanie składu głównych kwasów tłuszczowych olejów rybich.

Tabela 6

Porównanie składu kwasów tłuszczowych występujących w pozycji *sn-1(3)*- i *sn-2* triacylogliceroli oleju z tuńczyka oraz sTAG po acydolizie tego oleju¹

Kwas tłuszczowy	Zawartość kwasu tłuszczowego (mol %)			
	olej z tuńczyka		sTAG	
	<i>sn-1(3)</i>	<i>sn-2</i>	<i>sn-1(3)</i>	<i>sn-2</i>
8:0	ND	ND	41,9	0,5
14:0	1,9	1,8	0,9	1,8
16:0	14,7	7,2	3,7	7,1
16:1	4,9	0,8	1,1	1,1
17:0	0,8	0,4	0,3	0,5
17:1	1,1	0,4	0,3	0,3
18:0	5,0	0,4	0,7	0,4
18:1	15,4	3,3	2,5	3,2
18:2	1,0	0,4	0,3	0,3
20:4	2,0	0,7	0,7	0,6
20:5	3,5	2,2	1,6	2,1
22:6	8,8	11,9	7,8	12,4

ND – nie oznaczano

¹reakcja acydolizy oleju z tuńczyka i kwasu kaprylowego, katalizowana przez lipazę *Rhizopus delemar*

Lipazy stosowane do koncentracji i oczyszczania EPA i DHA mogą być podzielone na dwie kategorie: selektywne w stosunku do kwasów tłuszczowych z rodziny *n-3*, innych niż EPA i DHA oraz te, które działają na EPA lub DHA. Do pierwszej kategorii należą lipazy z *Pseudomonas* sp. (71), *Pseudomonas fluorescens* (72), *Candida antarctica* (lipaza B) (73) i *Geotrichum candidum* (74). Lipazy z *Candida rugosa* (75), *Rhizopus delemar* (76) i *Rhizomucor miehei* (77) umożliwiają rozdzielenie EPA i DHA, działając selektywnie na EPA.

3.3. Modyfikacja tłuszczu mikrobiologicznego i tłuszczu z alg

Mikroorganizmy tzw. olejo-dajne gromadzą tłuszcz w ilości ponad 20% ogólnej zawartości składników suchej masy biomasy (78). Najbardziej przydatne oleje mikrobiologiczne są produkowane przez grzyby mikroskopowe i drożdże. Są one wartościowym źródłem PEKT z rodziny *n-3* i *n-6* oraz kwasu γ -linolenowego (GLA, 18:3, *n-6*), dihomo- γ -linolenowego (DHGLA; 20:3, *n-6*), kwasu arachidonowego (AA, 20:4, *n-6*), EPA (20:5, *n-3*) lub DHA (22:6, *n-3*) (tab. 7).

Olej mikrobiologiczny (SCO, *Single Cell Oil*) może być także zbliżony swoim składem i właściwościami do masła kakaowego, np. wytwarzany przez mutanty lub hybrydy *Cryptococcus curvatus* z zablokowaną aktywnością desaturazy Δ^9 (78).

Tabela 7

Główne źródła polienowych kwasów tłuszczowych (78)

Rodzaj kwasu polienowego	Źródło kwasu	Całkowita zawartość PEKT (%)	Wydajność syntezy PEKT (mg/g oleju)	
<i>n</i> -6 GLA	rośliny: wiesiołek	6-10	–	
	ogórecznik	19-25	–	
	czarna porzeczka	17	–	
	grzyby mikroskopowe: <i>Mortierella isabelina</i>	10	55	
	<i>Mucor circinelloides</i>	15-18	–	
	DHGLA	grzyby mikroskopowe: <i>Mortierella alpina</i> 1S-4	7-23	28-123
AA				
<i>n</i> -3 EPA	algi <i>Chlorella minutissima</i>	35-40	–	
	grzyby mikroskopowe: <i>Mortierella alpina</i> 1S-4	20	64	
	<i>Pythium irregulare</i>	25	25	
	DHA	olej rybi	7-14	–
		grzyby mikroskopowe: <i>Thraustochytrium aureum</i>	49	70

Wysokowartościowe żywieniowo tłuszcze można uzyskać z alg lub cyjanobakterii, np. *Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Nannochloris* sp., *Manalanthus salina* lub *Chlorella pyrenoidosa* (78). Generalnie zawartość kwasów tłuszczowych w suchej masie mikroalg (20-40% lipidów w suchej biomacie) wynosi 3-6%. Na podstawie materiałów przedstawionych przez japońską firmę Sun Chlorella wynika, że stosowane przez nich mikroalgi zawierają 81,8% nienasyconych i 18,2% nasyconych kwasów tłuszczowych.

Robles-Medina i wsp. (79) przedstawili wydajną metodę syntezy sTAG zawierających duże ilości PEKT. Zastosowali lipazę z *Candida antarctica* do estryfikacji glicerolu i koncentratu PEKT uzyskanego z mikroalg. Stosując kwasy tłuszczowe z *Phaeodactylum tricorutum* otrzymali triacyloglicerole zawierające 42,5% EPA, zaś w modyfikacji lipidów z *Porphyridium cruentum* powstałe triacyloglicerole zawierały 43,4% AA (kwas arachidonowy) i 45,6% EPA.

Iwasaki i wsp. (80) opracowali warunki syntezy sTAG typu MLM stosując olej zawierający duże ilości DHA i DPA, wytwarzany przez *Schizochytrium* sp. SR21. Produkt

reakcji zawierał kwas kaprylowy w pozycji *sn*-1 i *sn*-3 triacylogliceroli, a DHA lub DPA w pozycji *sn*-2. Z zastosowaniem lipazy z *Pseudomonas* sp. KWI-56 otrzymano 36% pożądaných triacylogliceroli, z czego 77-78% charakteryzowało się właściwą konfiguracją typu MLM, a stosując lipazę z *Rhizomucor miehei* otrzymano 22% sTAG zawierających PEKT w pozycji *sn*-2.

3.4. Modyfikacja tłuszczu mlekowego

Zmniejszające się spożycie tłuszczu mlekowego oraz wysokotłuszczowych produktów mlecznych spowodowało wzrost zainteresowania nowymi metodami produkcji strukturyzowanego tłuszczu lub modyfikowanego tłuszczu mlekowego o lepszych właściwościach fizycznych, zmniejszonej kaloryczności i pożądaných walorach smakowo-zapachowych (81). Enzymatyczna modyfikacja tłuszczu mlekowego najczęściej prowadzona jest metodą interestryfikacji (tab. 8). Produkty tego typu reakcji charakteryzują się tym samym składem kwasów tłuszczowych, zmianie ulega rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w TAG, co prowadzi do zmian fizycznych właściwości tłuszczu mlekowego (tab. 9).

Tabela 8

Przykłady lipaz stosowanych do katalizy interestryfikacji tłuszczu mlekowego

Preparaty lipaz	Środowisko reakcji	Literatura
<i>Mucor miebei</i> (Lipozyme 10.000L)	mikroemulsja	(82)
<i>Mucor miebei</i> (Lipozyme 10.000L)	rozpuszczalnik organiczny	(83)
<i>Rhizopus niveus</i> (Lipase N)	odwrócone micelle	(84)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	środowiska o różnych ilościach wody	(85)
<i>Pseudomonas fragi</i>	mikroemulsja	(86)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	izooktan	(85)
<i>Rhizomucor miebei</i>	bez rozpuszczalnika	(87)

Tabela 9

Porównanie zmian pozycji wybranych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mlekowym po reakcji interestryfikacji katalizowanej przez lipazę z *Rhizopus niveus* w układzie odwróconych miceli (84)

Kwas tłuszczowy	Kwas tłuszczowy w pozycji <i>sn</i> -2 (%)		Kwas tłuszczowy w pozycji <i>sn</i> -1,3 (%)	
	A	B	A	B
12:0	5,9	4,2	3,9	5,0
14:0	18,1	19,3	11,5	11,2
16:0	32,1	37,2	27,0	19,9
18:0	8,1	9,0	7,4	4,5
18:1	19,1	18,9	17,5	23,8

A – tłuszcz natywny, B – tłuszcz po interestryfikacji

Balcao i wsp. (88) prowadzili modyfikację tłuszczu mlekowego w kombinowanym procesie polegającym na hydrolizie i interestryfikacji katalizowanej przez lipazę z *Mucor javanicus*, immobilizowaną na hydrofobowej membranie typu *hollow fiber*. Produkt charakteryzował się lepszymi właściwościami żywieniowymi, obniżona została zawartość kwasu laurynowego, mirystynowego i palmitynowego, a zwiększona zawartość monoenoowych kwasów tłuszczowych.

Acydoliza bezwodnego tłuszczu mlekowego z kwasem oleinowym została szeroko opisana przez Balcao i wsp. (89-92). Wykazali oni, że lipaza z *Mucor circinelloides* (wcześniej nazywany *Mucor javanicus*) immobilizowana na membranie typu *hollow fiber* wykazywała niską selektywność w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a katalizowała głównie wymianę kwasu mirystynowego, palmitynowego i stearynowego na kwas oleinowy. Zmodyfikowany tłuszcz mlekowy charakteryzował się wyższą temperaturą topnienia i zawierał o 27% więcej kwasu oleinowego, zaś mniej laurynowego (7,5%), mirystynowego (5,7%) i palmitynowego (6,1%) (92).

Christensen i Holmer (19) poddali tłuszcz mlekowy acydolizie, używając koncentrat polienowych kwasów tłuszczowych (18:1, 18:2, 20:5, 22:6) i preparat Lipozyme RM IM. Otrzymane triacyloglicerole cechowały się zbliżonym składem kwasów tłuszczowych i właściwościami do tych zawartych w mleku kobiecym, i przydatne były, podobnie jak substytut mleka kobiecego – Betapol, w żywieniu niemowląt.

Tłuszcz mlekowy w podwyższonej temperaturze (>30°C) jest płynny i dlatego nie jest stosowany w piekarnictwie, cukiernictwie, produkcji margaryny, *etc.* Zmiany temperatury topnienia oraz udziału frakcji tłuszczu stałego osiągnięto po enzymatycznej interestryfikacji tłuszczu mlekowego z olejami: rzepakowym (93), słonecznikowym lub sojowym (94), canola (31,95) i stearynianem palmowym (96,97).

Z uwagi na bardzo korzystne właściwości CLA opracowuje się warunki prowadzenia reakcji enzymatycznych w celu otrzymania triacylogliceroli o zwiększonym udziale tego kwasu (tab. 10).

Tabela 10

Charakterystyka enzymatycznie modyfikowanych triacylogliceroli o zwiększonym udziale CLA

Preparat lipazy	Substraty	Ilość wbudowanego do triacylogliceroli CLA	Literatura
<i>Lipozyme IM</i>	olej palmowy + ester laurynowy CLA	30% (w/w)	(98)
<i>Lipozyme IM60</i> <i>Chirazyme L2</i>	olej kukurydziany + CLA	80% (w/w)	(99)
<i>Candida rugosa</i>	olej menhaden + CLA	20 mol%	(100)
<i>Candida antarctica</i> <i>Mucor miebei</i>	tłuszcz mlekowy + CLA	6% (w/w)	(101)

Do grupy strukturyzowanych lipidów zaliczyć można także strukturyzowane diacyloglicerole (sDAG), tj. 1,3-di-*sn*-acyloglicerole, charakteryzujące się przede wszystkim zdefiniowaną budową chemiczną. DAG wykorzystywane są jako emulgatory. W ostatnim czasie na podstawie długoletnich badań wykazano, że spożywanie DAG w odróżnieniu do TAG powoduje zmniejszenie akumulacji tłuszczu w organizmie ludzkim. W ostatnim czasie zaproponowano zatem warunki wydajnej syntezy DAG, zbudowanych z CLA (102,103).

4. Metody analizy sTAG

Niezależnie od tego czy syntezę sTAG prowadzi się metodą chemiczną czy enzymatyczną, najważniejsza jest właściwa analiza produktów reakcji. Szczególną uwagę zwraca się na analizę stereochemicznej budowy triacylogliceroli i rozlokowania kwasów tłuszczowych, oczywiście poza analizą całkowitego składu kwasów tłuszczowych triacylogliceroli. Konieczne jest także opracowanie metod pozwalających na łatwe i wiarygodne określenie składu mieszaniny reakcyjnej oraz kontrolę zmian składu i budowy syntetyzowanych sTAG. W ostatnim czasie Yamane przedstawił metody i techniki przydatne w analizie składu mieszanin reakcyjnych oraz stereochemicznej budowy triacylogliceroli.

Jedna z najstarszych metod analizy struktury TAG polega na enzymatycznej ich hydrolizie z wykorzystaniem *sn*-1,3-regioselektywnej wieprzowej lipazy trzustkowej (PPL), a następnie określeniu składu kwasów tłuszczowych 2-monoacylo-*sn*-gliceroli, 1,2(2,3)-diacylo-*sn*-gliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych (104). W Polsce informacje o zastosowaniu tej metody do analizy struktury TAG przedstawił Drozdowski (105,106).

Kwasy tłuszczowe obecne w różnych frakcjach estrów glicerolu, po metylacji mogą być analizowane za pomocą chromatografii gazowej lub HPLC. Niestety, wiele wskazuje na to, że PPL nie może być użyta do analizy struktury wszystkich sTAG, gdyż nie hydrolizuje ona, lub hydrolizuje z małą wydajnością wiązania estrowe pomiędzy glicerolem a kwasami tłuszczowymi krótszymi niż 12 atomów węgla, PEKT dłuższymi niż 20 atomów węgla i kwasami tłuszczowymi z grupami utlenionymi.

Alternatywnie struktura TAG może być określona po przeprowadzeniu reakcji z wykorzystaniem odczynnika Grignarda (bromek etylowomagnezowy), która prowadzi do otrzymania 1,2(2,3)-diacylo-*sn*-gliceroli. Metoda ta jest bardziej wiarygodna, lecz żmudna i czasochłonna, a czasami z nieznanymi przyczynami reakcja nie jest możliwa do przeprowadzenia (107). Dokładność metody badania struktury sTAG można zwiększyć stosując do analizy DAG chromatografię cienkowarstwową, chiralną HPLC lub cieczową chromatografię chiralną z detektorem masowym elektrorozpraszania jonizacyjnego (108).

Alternatywą dla stosowania PPL do określania struktury sTAG mogą być inne *sn*-1,3-selektywne lipazy, jak np. lipaza z *Rhizopus arrhizus* (109) czy Lipozyme IM 20

(110). Williams i wsp. (111) opisali natomiast metodę analizy struktury TAG lub fosfolipidów z zastosowaniem również lipazy *Rhizopus arrhizus* lub fosfolipazy A2. W metodzie tej wykorzystuje się właściwość metanolowego roztworu NaOH do metylacji jedynie estrów, podczas gdy metanolowy roztwór HCl umożliwia metylację zarówno wolnych jak i zestryfikowanych kwasów tłuszczowych.

Jedną z najlepszych technik analizy struktury sTAG jest metoda rezonansu magnetycznego, ^{13}C (MNR) lub ulepszona metoda rezonansu magnetycznego o ultra-wysokiej rozdzielczości (112). Techniki tej użyli z powodzeniem Zamora i wsp. (113) do analizy różnych rodzajów olejów z oliwek, natomiast Chandler i wsp. (114) za pomocą techniki NMR ^{13}C określali selektywność lipaz katalizujących reakcję acydolizy.

Grupa Yamane (Uniwersytet w Nagoi) przedstawiła możliwość wykorzystania do analizy sTAG techniki HPLC na wypełnieniu z jonami srebra (80,115) lub z zastosowaniem chiralnych kolumn (116). Chromatografia na jonach srebra umożliwia rozdział nienasyconych kwasów tłuszczowych na podstawie liczby zawartych w nich wiązań podwójnych, ich umiejscowienia oraz ich przestrzennego ułożenia. Metoda chromatografii na złożach chiralnych umożliwia analizę stereoizomerów po otrzymaniu diastereoizomerów acylogliceroli.

Bardzo często do analizy struktury sTAG stosuje się technikę HPLC z detektorem laserowym światła rozproszonego (ELSD, *Evaporative Light Scattering Detector*) (117,118). Zasada działania detektora polega na tym, że rozpuszczalnik odparowywany jest w strumieniu gazu nośnego, w komorze grzewczej, zaś analit jest rozpraszany i w postaci drobnych kropli trafia do komory detektora, w której światło laserowe jest rozpraszane i odbijane. Ilość światła rozproszonego jest mierzona i przeliczana na koncentrację analitu. Z zastosowaniem tej metody możliwy jest rozdział różnych TAG i określenie rozmieszczenia kwasów tłuszczowych, w tym nasyconych, co nie jest możliwe z wykorzystaniem tradycyjnych detektorów (119-122).

Do analizy składu mieszaniny reakcyjnej podczas syntezy sTAG stosowana jest chromatografia cienkowarstwowa z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (TLC-FID, latroscan). Niestety, technika ta umożliwia analizę acylogliceroli, TAG i wolnych kwasów tłuszczowych, ale bez rozdzielenia poszczególnych rodzajów TAG (123).

Chromatografia gazowa jest powszechnie stosowana do określenia składu estrów metylowych kwasów tłuszczowych i tylko niektórych acylogliceroli, ponieważ acyloglicerole nie są związkami lotnymi w warunkach analizy prowadzonej z wykorzystaniem chromatografu gazowego. Istnieje jednak możliwość zastosowania specjalnych technik nastrzykiwania próbek na kolumnę chromatografu gazowego, co umożliwia analizę TAG za pomocą techniki wysokotemperaturowej chromatografii gazowej (HTGC) (80,115).

Modyfikowane TAG mogą występować jako różne formy polimorficzne, co wpływa na właściwości topnienia i krzepnięcia tłuszczu, zawartość frakcji tłuszczu stałego, *etc.* Do analizy tych właściwości stosuje się różnicową kalorymetrię skaningową (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*). Wykorzystując tę technikę zbadano

właściwości produktów interestryfikacji trioleinoilo glicerolu i tripalmitynoilo glicerolu (124) oraz acydolizy kwasu stearynowego z olejem kokosowym (125) lub trioleinoilo glicerolem (126).

W ostatnim czasie bardzo duże zainteresowanie towarzyszy wykorzystaniu techniki MALDI-TOF. Znajduje ona również zastosowanie w analizie lipidów i prawdopodobnie będzie też niedługo używana w analizie budowy sTAG.

5. Podsumowanie

Do niedawna sTAG określane były jako niekonwencjonalne tłuszcze przyszłości (127,128). Obecnie produkty pod handlowymi nazwami Betapol, Salatrim, Captex, Caprenin, Impact, *etc.*, dostępne są na rynku. Wielu tłuszczom i olejom pochodzenia naturalnego przypisuje się właściwości prozdrowotne lub nawet lecznicze, a niektórym spośród nich niekorzystne oddziaływanie na organizm ludzki. Naturalne triacyloglicerole zróżnicowane pod względem właściwości fizycznych, chemicznych i biochemicznych mogą być w łatwy sposób, z wykorzystaniem naturalnych katalizatorów, modyfikowane i doskonalone. Zaletą wykorzystania naturalnych substratów do modyfikacji jest zachowanie w stanie nie naruszonym naturalnych związków chemicznych obecnych w lipidach, np. tokoferoli, związków polifenolowych.

Przedstawione przykłady potwierdzają ogromne możliwości katalityczne lipaz w enzymatycznej syntezie sTAG i wskazują na wzrastające znaczenie metod enzymatycznych zastępujących chemiczną interestryfikację. Zastosowanie syntezy enzymatycznej umożliwiło opracowanie wielu procesów z wykorzystaniem szerokiej palety substratów. Dzięki metodom enzymatycznym możliwe jest otrzymywanie wartościowych produktów o pożądanych właściwościach żywieniowych i leczniczych. W niedalekiej przyszłości technologie opracowane w skali laboratoryjnej, jak się wydaje, będą wdrożone w przemysłowej produkcji sTAG. Wciąż jednak aspekty ekonomiczne nie pozwalają na pełne wykorzystanie przedstawionych bioprocessów. Niezbędne jest dalsze poszukiwanie nowych, bardziej aktywnych i selektywnych oraz stabilnych lipaz. Wiele wskazuje na to, że nowe lipazy pozyskiwane będą z takich źródeł roślinnych (129,130). Ponadto, oprócz skringingu nowych lipaz mikrobiologicznych prowadzone będą prace nad modyfikacją ich właściwości z wykorzystaniem, np. ukierunkowanej ewolucji molekularnej lub metagenomu.

Obok ustalenia parametrów biokatalizy ważne są badania kliniczne nad oddziaływaniem uzyskanych sTAG na organizm ludzki. Konieczne są także badania nad stabilnością oksydacyjną sTAG i charakterystyka ich właściwości fizykochemicznych, w tym opracowanie wiarygodnych metod badania ich struktury.

Więcej informacji o enzymatycznej syntezie sTAG zawierają prace przeglądowe (3,32,131-140).

Wykaz stosowanych skrótów*:

- 1,2-DAG, 1,3-DAG, 2,3-DAG – odpowiednio: 1,2-, 1,3-, 2,3-diacylo-*sn*-glicerole
 2-MAG – 2-monoacylo-*sn*-glicerol
 CLA – sprzężony kwas linolowy
 DAG – diacyloglicerol
 DHA – dokozaheksaenowy kwas tłuszczowy (20:6)
 EPA – eikozapentaenowy kwas tłuszczowy (22:5)
 FFA – wolny kwas tłuszczowy
 GLA – γ -linolenowy kwas tłuszczowy (18:3, *n*-6)
 LCFA – długołańcuchowy kwas tłuszczowy (C14-C24)
 MAG – monoacyloglicerol
 MCFA – średniołańcuchowy kwas tłuszczowy (C8-C12)
 MCT – średniołańcuchowy triacyloglicerol
 MLM – triacyloglicerol zbudowany ze średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych zestryfikowanych w pozycji *sn*-1 i *sn*-3 oraz kwasu długołańcuchowego w pozycji *sn*-2
 NNKT – niezbędny nienasycony kwas tłuszczowy
 PEKT – polienowy kwas tłuszczowy
 SCFA – krótkołańcuchowy kwas tłuszczowy (C2-C6)
 sDAG – strukturyzowany diacyloglicerol
 sTAG – strukturyzowany triacyloglicerol
 TAG – triacyloglicerol

* Znaczenie pozostałych skrótów przedstawiono w tekście pracy.

Podziękowania

Autor składa serdeczne podziękowania Panu Profesorowi Włodzimierzowi Bednarskiemu (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) za cenne dyskusje i rady podczas przygotowania tej publikacji. Publikacja przygotowana w ramach realizacji grantów KBN (PBZ-KBN/021/P06/99 oraz 3 P06T 060 24).

Literatura:

1. Yamane T., (2000), *Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids: monitoring the reaction and increasing the yield*, in: *Enzymes in lipid modification*, Ed. Bornscheuer U. T., Wiley-VCH, Weinheim, 148-169.
2. Osborn H. T., Akoh C. C., (2002), *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 3, 93-103.
3. Bednarski W., Adamczak M., (2003), *Modified lipids and fat mimetics*, in: *Chemical and functional properties of food lipids*, Eds. Sikorski Z. E., Kolakowska A., CRC Press, Boca Raton, 309-324.
4. Yankah V. V., Akoh C. C., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 5, 495-500.
5. Fomuso L. B., Akoh C. C., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 3, 405-410.
6. Fomuso L. B., Akoh C. C., (2002), *Food Res. Internat.*, 35, 15-21.
7. Dierick N. A., Decuyper J. A., Molly K., van Beek E., Vanderbeke E., (2002), *Livestock Prod. Sci.*, 75, 129-142.
8. Haraldsson G. G., Hjaltason B., (2001), *Fish oils as sources of important polyunsaturated fatty acids*, in: *Structured and modified lipids*, Eds. Gunstone F. D., Marcel Dekker, Inc., New York, 313-350.
9. Antczak T., Graczyk J., (2002), *Biotechnologia*, 2, 57, 130-145.
10. Bornscheuer U. T., Adamczak M., Soumanou M. M., (2003), *Lipase-catalysed synthesis of modified lipids*, in: *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, Ed. Gunstone F. D., The Oil Press, Bridgwater, 149-182.

11. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., (1999), *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformation*, Wiley-VCH, Weinheim.
12. Antczak T., Szczęsna-Antczak M., (2003), *Biotechnologia*, 62, 3, 124-138.
13. Antczak T., Szczęsna-Antczak M., (2003), *Biotechnologia*, 62, 3, 139-158.
14. Haraldsson G. G., Halldorsson A., Kulas E., Breivik H., (2000), *AOCS Annual Meeting&Expo*, San Diego, April 25-28, 23.
15. Haraldsson G. G., Halldorsson A., Kulas E., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 11, 1139-1145.
16. Halldorsson A., Magnusson C. D., Haraldsson G. G., (2001), *Tetrahedron Lett.*, 42, 7675-7677.
17. Halldorsson A., Magnusson C. D., Haraldsson G. G., (2003), *Tetrahedron*, 59, 9101-9109.
18. Yang T., Xu X., He C., Li L., (2003), *Food Chem.*, 80, 473-481.
19. Christensen T. C., Holmer G., (1993), *Milchwissenschaft*, 48, 10, 543-548.
20. Lee L.-T., Akoh C. C., Flatt W. P., Lee J. H., (2000), *J. Agric. Food Chem.*, 48, 11, 5696-5701.
21. Auerbach M. H., Chang P. W., Kosmark R., O'Neill J. J., Philips J. C., (1998), *Salatrim: a family of reduced-calorie structured lipids*, in: *Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use*, Ed. Christophe A. B. AOCS Press, Champaign, IL, 89-120.
22. Fomuso L. B., Akoh C. C., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 3, 269-272.
23. Fomuso L. B., Akoh C. C., (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 9, 4482-4487.
24. Seriburi V., Akoh C. C., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 10, 1339-1345.
25. Lai O. M., Ghazali H. M., Chong C. L., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 7, 881-886.
26. Undurraga D., Markovits A., Erazo S., (2001), *Proc. Biochem.*, 36, 933-939.
27. Gitlesen T., Svensson I., Adlercreutz P., Mattiasson B., Nilsson J., (1995), *Industrial Crops and Products*, 4, 167-171.
28. Sellappan S., Akoh C. C., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 11, 1127-1133.
29. Warner K., Knowlton S., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 10, 1317-1322.
30. Mounts T. L., Warner K., List G. R., Neff W. E., Wilson R. F., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 5, 495-499.
31. Rousseau D., Marangoni A. G., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2375-2381.
32. Akoh C. C. (1998), *Structured lipids*, in: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Eds. Akoh C. C., Min D. B., Marcel Dekker, Inc., New York, 699-727.
33. Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W., (2003), *Enzymes in lipid modification*, Greifswald University, Alfried-Krupp Kolleg, Greifswald, Germany, 27.
34. Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W., (2003), *Biotrans, 6th international Symposium on Biocatalysis and Biotransformation*, Olomouc, June 28-July 3, supplement.
35. Adamczak M., (2003), *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, 649-654.
36. Zeitoun M. A. M., Neff W. E., List G. R., Mounts T. L., (1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 461-471.
37. Hurtova S., Schmidt S., Zemanovic J., Simon P., Sekretar S., (1996), *Fett/Lipid*, 98, 60-65.
38. King J. W., Holliday R. L., List G. R., Snyder J. M., (2001), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 107-113.
39. Coleman M. H., Macrae A. R., (1980), *Fat process and composition*, UK Patent, 1 577 933.
40. Chang M. K., Abraham G., John V. T., (1990), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 832-834.
41. Adlercreutz P., (1994), *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 12, 231-254.
42. Foglia T. A., Patruso K., Feairheller S. H., (1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 3, 281-285.
43. Stefan A., Radeghieri A., Rodriguez A. G. V., Hochkoeppler A., (2001), *FEBS Lett.*, 493, 139-143.
44. Zhang H., Xu X., Mu H., Nilsson J., Adler-Nissen J., Hoy C.-E., (2000), *Starch/Starke*, 52, 221-228.
45. Chong C. N., Hoh Y. M., Wang C. W., (1992), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 2, 137-140.
46. King D. M., Padley F. B., (1990), *Milk fat substitutes*, European Patent, EP 0209327.
47. Sridhar R., Lakshminarayana G., Kaimal T. N. B., (1991), *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2069-2071.
48. Rao R., Manohar B., Sambaiah K., Lokesh B. R., (2002), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 9, 885-890.
49. Hudson B. J. F. (1984), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 540-543.
50. Uzzan A. (1986), *Rev. Fr. Corps Gras*, 33, 385-389.
51. Traitler H., Winter H., Richlin U., Ingenbleek Y., (1984), *Lipids*, 19, 923-928.
52. Guil-Guerrero J. L., Gracia Maroto F. F., Gimenez Gimenez A., (2001), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 7, 677-684.

53. Yang B., Gunstone F. D., Kallio H., (2003), *Oils containing oleic, palmitoleic, g-linolenic and stearidonic acid*, in: *Lipids for functional foods and nutraceuticals*, Ed. Gunstone F. D. The Oily Press, Bridgwater, 263-290.
54. Akoh C. C., Jennings B. H., Lillard D. A., (1996), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 8, 1059-1062.
55. Namal Senanayake S. P. J., Shahidi F., (1999), *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3105-3112.
56. Akoh C. C., Moussata C. O., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 6, 697-701.
57. Ju Y.-H., Huang F.-H., Fang C.-H., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 8, 961-965.
58. Namal Senanayake S. P. J., Shahidi F., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 9, 1009-1015.
59. Shimada Y., Suenaga M., Sugihara A., Nakai S., Tominaga Y., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 2, 189-193.
60. Kawashima A., Shimada Y., Nagao T., Ohara A., Matsuhisa T., Sugihara A., Tominaga Y., (2002), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 9, 871-877.
61. Shimada Y., Sugihara A., Shibahiraki M., Fujita H., Nakano H., Nagao A., Terai T., Tominaga Y., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 11, 1465-1470.
62. Shimada Y., Sakai N., Sugihara A., Fujita H., Honda Y., Tominaga Y., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 11, 1539-1543.
63. Rahmatullah M. S. K. S. S., Shukla V. K. S., Mukherjee K. D., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 6, 569-573.
64. Rahmatullah M. S. K. S. S., Shukla V. K. S., Mukherjee K. D., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 6, 563-567.
65. Shimada Y., Sugihara A., Maruyama K., Nagao T., Nakayama S., Nakano H., Tominaga Y., (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 4, 299-303.
66. Jennings B. H., Akoh C. C., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 10, 1133-1137.
67. Xu X., Fomuso L. B., Akoh C. C., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 2, 171-176.
68. Zhou D., Xu X., Mu H., Hoy C.-E., Adler-Nissen J., (2000), *J. Food Lipids*, 7, 263-274.
69. Haraldsson G. G., Hoskuldsson P. A., Sigurdsson S. T., Thorsteinsson F., Gudbjarnason S., (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30, 13, 1671-1674.
70. Haraldsson G. G., Gudmundsson B. O., Almarsson O., (1995), *Tetrahedron*, 51, 3, 941-952.
71. Breivik H., Haraldsson G. G., Kristinsson B., (1997), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 11, 1425-1429.
72. Rakshit S. K., Vasuhi R., Kosugi Y., (2000), *Bioprocess Eng.*, 23, 251-255.
73. Esteban Cerdan L., Robles Medina A., Gimenez Gimenez A., Ibanez Gonzalez M. J., Molina Grima E., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 10, 1329-1337.
74. Shimada Y., Maruyama K., Okazaki S., Nakamura M., Sugihara A., Tominaga Y., (1994), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 9, 951-954.
75. Schmitt-Rozieres M., Deyris V., Comeau L.-C., (2000), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77, 3, 329-332.
76. Shimada Y., Sugihara A., Yodono S., Nagao T., Maruyama K., Nakano H., Komemushi S., Tominaga Y., (1997), *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 2, 138-143.
77. Haraldsson G. G., Kristinsson B., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 11, 1551-1556.
78. Leman J. (1997), *Adv. Appl. Microbiol.*, 43, 195-243.
79. Robles-Medina A., Esteban-Cerdan L., Gimenez-Gimenez A., Camacho-Paez B., Ibanez-Gonzalez M. J., Molina-Grima E., (1999), *J. Biotechnol.*, 70, 379-391.
80. Iwasaki Y., Han J. J., Narita M., Rosu R., Yamane T., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 5, 563-569.
81. Balcao V. M., Malcata F. X., (1998), *Biotechnol. Adv.*, 16, 2, 309-341.
82. Safari M., Kermasha S., Pabai F., Sheppard J. D., (1994), *J. Food Lipids*, 1, 247-263.
83. Safari M., Kermasha S., Pabai F., (1993), *Food Biotechnol.*, 7, 3, 265-273.
84. Safari M., Kermasha S., Lamboursain L., Sheppard J. D., (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 9, 1553-1557.
85. Kalo P., Huotari H., Antila M., (1989), *Finnish J. Dairy Sci.*, XLVII, 1, 29-38.
86. Pabai F., Kermasha S., Morin A., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 42-51.
87. Liew M. Y. B., Ghazzali H. M., Long K., Lai O. M., Yazid A. M., (2001), *Food Chem.*, 72, 447-454.
88. Balcao V. M., Kempainen A., Malcata F. X., Kalo P. J., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 10, 1347-1358.

89. Balcao V. M., Malcata F. X., (1997), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 3, 161-169.
90. Balcao V. M., Kempainen A., Malcata F. X., Kalo P. J., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 23, 118-128.
91. Balcao V. M., Malcata F. X., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 114-123.
92. Balcao V. M., Malcata F. X., (1998), *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 511-519.
93. Kalo P., Vaara K., Antila M., (1986), *Fette Seifen Anstrichmittel*, 9, 362-365.
94. Pal P. K., Bhattacharyya D. K., Ghosh S., (2001), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 1, 31-36.
95. Rousseau D., Marangoni A. G., (1998), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2368-2374.
96. Lai O. M., Ghanali H. M., Cho F., Chong C. L., (2000), *Food Chem.*, 70, 215-219.
97. Nor Hayati I. N., Aminah A., Mamot S., Nor Aini I. N., Noor Lida H. M., (2000), *J. Food Lipids*, 7, 175-193.
98. McNeill G. P., Rawlins C., Peilow A. C., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 11, 1265-1268.
99. Martinez C. E., Vinay J. C., Brieva R., Hill Jr. C. G., Garcia H. S., (1999), *Food Biotechnol.*, 13, 2, 183-193.
100. Gracia H. S., Arcos J. A., Ward D. J., Hill Jr. C. G., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 587-591.
101. Gracia H. S., Arcos J. A., Keough K. J., Hill Jr. C. G., (2001), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11, 623-632.
102. Liao H.-F., Tsai W.-C., Cahng S.-W., Shieh C.-J., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 1857-1861.
103. Guo Z., Sun Y., (2004), *Biotechnol. Prog.*, 20, 619-622.
104. Brockerhoff H. (1965), *J. Lipid Res.*, 6, 10-15.
105. Drozdowski B., (1994), *Analiza strukturalna lipidów metodą enzymatyczną*, w: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*, red. Sikorski Z. E., WNT, Warszawa, 229-231.
106. Drozdowski B., (1974), *Zeszyty Naukowe Politechniki Gdańskiej, Chemia XXV*, 217, 3-86.
107. Brockerhoff H., (1967), *J. Lipid Res.*, 8, 167-169.
108. Myher J. J., Kuksis A., Geher K., Park P. W., Diersen-Schade D. A., (1996), *Lipids*, 31, 2, 207-215.
109. Acros J. A., Gracia H. S., Hill Jr. C. G., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 563-570.
110. Dourtoglou T., Stefanou E., Lalas S., Dourtoglou V., Poulos C., (2001), *Analyst*, 126, 1032-1036.
111. Williams J. P., Khan M. U., Wong D., (1995), *J. Lipid Res.*, 36, 1407-1412.
112. Simova S., Ivanova G., S.L. S., (2003), *Chem. Phys. Lipids*, 126, 167-176.
113. Zamora R., Alba V., Hidalgo F. J., (2001), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 1, 89-94.
114. Chandler I. C., Howarth O. W., Crout D. H. G., (2001), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78, 9, 953-958.
115. Han J. J., Iwasaki Y., Yamane T., (1999), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 1, 31-39.
116. Iwasaki Y., Yasui M., Ishikawa T., Iromescu R., Hata K., Yamane T., (2001), *J. Chromatogr.*, 905, 111-118.
117. Stolyhwo A., Colin D., Guiochon G., (1983), *J. Chromatogr.*, 265, 1-18.
118. Stolyhwo A., Martin M., Guiochon G., (1987), *J. Liquid Chromatogr.*, 10, 1237-1253.
119. Kermasha S., Kubow S., Safari M., Reid A., (1993), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 2, 169-173.
120. Homan R., Andersen M. K., (1998), *J. Chromatogr.: B*, 708, 21-26.
121. Nordback J., Lundberg E., Christie W. W., (1998), *Marine Chem.*, 60, 165-175.
122. Mu H., Kalo P., Xu X., Hoy C.-E., (2000), *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 202-211.
123. Tatara T., Fuji T., Kawase T., Minagawa M., (1983), *Lipids*, 18, 10, 732-736.
124. Seriburi V., Akoh C. C., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 6, 711-716.
125. Rao R., Sankar K. Y., Sambaiah K., Lokesh B. R., (2001), *Eur. Food Res. Technol.*, 212, 334-343.
126. Seriburi V., Akoh C. C., (1998), *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75, 4, 511-516.
127. Leman J., (1993), *Przem. Spoż.*, 47, 45-47, 53.
128. Megremis C. J., (1991), *Food Technol.*, 2, 108-114.
129. Villeneuve P., (2003), *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 105, 308-317.
130. Caro Y., Pina M., Turon F., Guilbert S., Mougeot E., Fetsch D. V., Attwool P., Graille J., (2002), *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 693-703.
131. Bornscheuer U. T., (2001), *Lipid Technol.*, October, 104-107.
132. Bornscheuer U. T., (2000), *Enzymes in lipid modification*, Wiley-VCH, Weinheim.
133. Bornscheuer U. T., (1999), *Recent Res. Devel. Oil Chem.*, 3, 93-106.
134. Knauf V. C., Del Vecchio A. J., (1998), *Genetic engineering of crops that produce vegetable oil*, in: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Eds. Akoh C. C., Min D. B., Marcel Dekker, Inc., New York, 779-805.

135. Lee K.-T., Akoh C. C., (1998), *Food Rev. Int.*, 14, 1, 17-34.
136. Mukherjee K. D., (1998), *Lipid biotechnology*, in: *Food chemistry: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Eds. Akoh C. C., Min D. B., Marcel Dekker, Inc., New York, 589-640.
137. Parkin K. L., (1998), *Biosynthesis of fatty acids and storage lipids in oil-bearing seed and fruit tissues of plants*, in: *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*, Eds. Akoh C. C., Min D. B., Marcel Dekker, New York, 729-778.
138. Iwasaki Y., Yamane T., (2000), *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 10, 129-140.
139. Xu X., (2000), *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 102, 287-303.
140. Gunstone F. D., (1998), *Prog. Lipid Res.*, 37, 5, 277-305.