

Stanisław Ptasznik

Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego w Warszawie

Otrzymywanie diacylogliceroli z oleju rzepakowego na drodze enzymatycznej

The obtaining of diacylglycerol from rapeseed oil by enzymatic way

Słowa kluczowe: diacyloglicerole, triacyloglicerole, enzym, olej rzepakowy

Diacyloglicerole występują w niewielkich ilościach w naturalnych olejach roślinnych zależnie od ich gatunku i pochodzenia. Diacyloglicerole (*sn-1,3* DAG i *sn-1,2 (2,3)* DAG) posiadają cenne właściwości prozdrowotne, między innymi wpływają na metabolizm i w konsekwencji obniżają masę ciała, dlatego też znalazły zastosowanie w walce z otyłością.

DAG można otrzymać na drodze enzymatycznej z zastosowaniem enzymów lipolitycznych, w bezpośredniej syntezie z kwasów tłuszczowych i glicerolu, glicerolizie lub poprzez hydrolizę tłuszczów. W niniejszej pracy przeprowadzono próby otrzymywania diacylogliceroli z oleju rzepakowego. W procesach zastosowano preparat enzymatyczny Lipozyme® RM IM Novozymes Dania o działaniu specyficznym w stosunku do pozycji *sn-1,3* TAG. Proces prowadzono w reaktorze periodycznym, z mieszadłem, pod próżnią, bez rozpuszczalnika. Określono parametry procesu oraz dokonano analizy uzyskanego produktu. Proces enzymatycznej glicerolizy oleju rzepakowego umożliwia otrzymanie nowego produktu — oleju diacyloglicerolowego.

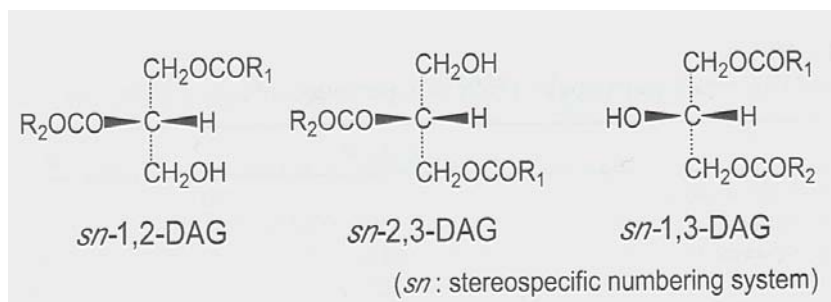
Key words: diacylglycerols, triacylglycerols, enzyme, rapeseed oil

Natural vegetable oils contain small amounts of diacylglycerols depending on the oil type and origin. Diacylglycerols (*sn-1,3* DAG and *sn-1,2 (2,3)* DAG) possess valuable properties for human health. Metabolism of DAG causes body weight regulation and shows antiobesity effect. DAG may be obtained on enzymatic way with the use of lipolytic enzymes or prepared by esterifying glycerol with fatty acids, by glycerolysis or hydrolysis of fats and oils. In this study investigations on obtaining of DAG from rapeseed oil were carried out. 1,3 position of TAG selective lipase Lipozyme® RM IM Novozymes Denmark was used in this study. Process was carried out in the periodic reactor with stirrer, under vacuum, without solvent. The raw material was refined rapeseed oil and glycerol. The parameters of process and analytical indicators of obtained product was determined. The enzymatic glycerolysis process of rapeseed oil affords possibilities for obtaining the new product called diacylglycerol oil.

Wprowadzenie

Procesy modyfikacji na drodze enzymatycznej stanowią aktualnie priorytetowy kierunek w badaniach nad tłuszczami w wielu krajach świata. Wiele ośrodków badawczych prowadzi badania nad restrukturyzacją triacylogliceroli (TAG)

tłuszczów, stosując enzymy lipolityczne (Ptasznik i in. 2005). W wyniku tych badań w niektórych krajach powstały instalacje przemysłowe (np. Japonia, Stany Zjednoczone). W Polsce badania nad wykorzystaniem enzymów jako biokatalizatorów w modyfikacji tłuszczów mają tylko zakres laboratoryjny (Ledóchowska 1998, Ptasznik i in. 2004, Adamczak, Bednarski 2005). Technologie z zastosowaniem enzymów są proekologiczne i eliminują uciążliwe dla środowiska procesy chemiczne. Diacyloglicerole (DAG) można otrzymać na drodze enzymatycznej z zastosowaniem enzymów lipolitycznych, w bezpośredniej syntezie z kwasów tłuszczowych i glicerolu, alkoholizacji (glicerolizacji) lub hydrolizacji tłuszczów (Waldinger, Schneider 1996). Proces glicerolizacji umożliwia otrzymanie diacylogliceroli na drodze chemicznej w wysokiej temperaturze (ok. 200°C), jak również enzymatycznej w niskiej temperaturze (ok. 50°C) (McNeill i in. 1990, Watanabe i in. 2003, 2004). Występujące w tłuszczach nienasycone kwasy tłuszczowe są podatne na zmiany chemiczne (w szczególności oksydację), dlatego też niska temperatura procesu enzymatycznego ma duże znaczenie ze względu na zabezpieczenie przed niepożądanymi zmianami. Diacyloglicerole wytwarzane w Japonii stanowią produkt rynkowy i są określane jako tzw. olej diacyloglicerolowy (DAG oil) przeznaczony do użytku domowego. Diacyloglicerole posiadają cenne właściwości prozdrowotne i znalazły zastosowanie w diecie dla ludzi otyłych w celu obniżenia masy ciała (Armand i in. 1994). Inne właściwości DAG pozwoliły na zastosowanie ich jako emulgatorów i stabilizatorów w różnych produktach spożywczych, kosmetykach i farmaceutykach.

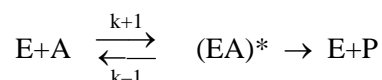


Lipazy stanowią bardzo ważną grupę enzymów o szerokich możliwościach zastosowania w różnych reakcjach chemicznych (Hult, Holmquist 1997). Podstawową funkcją lipaz jest kataliza hydrolizy triacylogliceroli do kwasów tłuszczowych, monoacyloglicerolu, diacylogliceroli i glicerolu. W reakcji enzymatycznej można wyróżnić trzy zasadnicze etapy. Pierwszy etap to zetknięcie cząsteczek substratów z powierzchnią cząsteczki enzymu i związanie ich na powierzchni enzymu, co zapewnia optymalne dla zajścia reakcji ułożenie grup reagujących. Ten etap reakcji ma charakter entropowy (spadek entropii układu enzym-substrat). Drugi etap stanowi oddziaływanie substratu z enzymem, prowadzące do powstania

formy kompleksu enzym-substrat. Ten etap opisuje teoria stanu przejściowego. Trzecim etapem jest zajście reakcji katalitycznej, czyli przekształcenie kompleksu aktywnego enzym-substrat na kompleks enzym-produkt i następnie jego rozpad na produkt i wolny enzym (Stryer 1997).

Teoria stanu przejściowego ma na celu wyjaśnienie mechanizmu reakcji chemicznej zachodzącej w roztworze oraz znalezienie zależności pomiędzy parametrami kinetycznymi i termodynamicznymi reakcji. Teoria stanu przejściowego znajduje zastosowanie do reakcji katalizowanych przez enzymy. Punktem wyjścia w teorii stanu przejściowego są rozważania nad zmianami energii swobodnej w czasie przemiany substratów w produkty. Do zajścia reakcji niezbędne jest powstanie aktywnego kompleksu przejściowego o większym zasobie energii swobodnej niż substraty i produkty. Utworzenie takiego kompleksu wymaga wydatkowania pewnej ilości energii zwanej energią aktywacji reakcji.

Kompleks aktywny znajduje się w stanie równowagi chemicznej z substratami, a szybkość jego rozpadu na produkty decyduje o szybkości reakcji:



E — enzym, A — substrat, P — produkt,
(EA)* — kompleks aktywny enzym-substrat,
k+1, k-1 — stałe szybkości reakcji.

Zgodnie z prawami termodynamiki swobodna energia AG^* reakcji znajdującej się w stanie równowagi wynosi

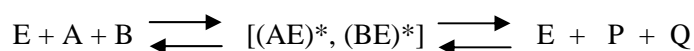
$$AG^* = -RT/n \cdot K^*$$

Wartość energii swobodnej reakcji możemy odnieść do entalpii i entropii reakcji,

$$AG^* = AH^* - TAS^*;$$

w równaniu tym AG^* , AH^* i AS^* oznaczają odpowiednio zmianę swobodnej energii, entalpii i entropii przy przejściu od substratów do stanu zaktywowanego. Wielkości te są nazywane dalej swobodną energią, entalpią i entropią aktywacji.

Większość reakcji enzymatycznych przebiega z udziałem dwu lub więcej różnych substratów i nawet wtedy, gdy pozornie mamy do czynienia z reakcją jednosubstratową, w reakcji tej występują inne substraty, np. cząsteczki wody, jony wodorowe, koenzymy pełniące funkcje substratów, których stężenie w czasie reakcji nie ulega zmianom. Typowym przykładem reakcji wielosubstratowych są reakcje katalizowane przez dehydrogenazy lub transferazy. Ogólnie przebieg reakcji wielosubstratowej można przedstawić poniższym równaniem (Martinelle, Hult 1994).



W reakcji występują dwa substraty (A, B), dwa produkty (P, Q) oraz pewna liczba kompleksów przejściowych. W praktyce występuje wiele substratów i wiele produktów. Przebieg reakcji można śledzić oznaczając wybrany charakterystyczny parametr, np. stężenie produktu.

Material i metody

Substratami procesu były: rafinowany olej rzepakowy, glicerol, preparat enzymatyczny Lipozyme® RM IM uzyskany z *Rhizomucor miehei* osadzony na makroporowatej anionowej żywicy fenolowej, pochodzący z Novozymes A/S Dania. Rafinowany olej rzepakowy pochodził z zakładu przemysłowego i charakteryzował się następującym składem kwasów tłuszczowych: C_{14:0} — 0,1%, C_{16:0} — 4,8%, C_{18:0} — 1,9%, C_{18:1} — 60,4%, C_{18:2} — 19,3%, C_{18:3} — 9,3%, C_{20:0} — 0,5%, C_{20:1} — 2,0%, C_{22:0} — 0,2%, C_{22:1} — 1,5%.

W celu charakterystyki i optymalizacji procesu glicerolizy przeprowadzono szereg doświadczeń biorąc pod uwagę następujące parametry: stosunek molowy substratów, temperaturę reakcji, zawartość wody początkowej w glicerolu, czas reakcji.

Proces prowadzono w reaktorze periodycznym szklanym o objętości całkowitej 500 cm³, z mieszadłem 800 obr./minutę, pod próżnią, bez rozpuszczalnika. Parametry reakcji były następujące: dodatek enzymu — 8%, stosunek molowy TAG/GL od 3 do 1/3, temperatura reakcji od 45 do 60°C, zawartość wody początkowej w glicerolu od 1 do 6%, czas reakcji od 3 do 24 godzin. Proces przerywano przez odsączenie preparatu Lipozyme® RM IM od mieszaniny reakcyjnej. Skład kwasów tłuszczowych substratów i produktów reakcji oznaczano metodą chromatografii gazowej.

Analizy wykonano zgodnie z metodami:

- oznaczanie składu kwasów tłuszczowych przy użyciu chromatografii gazowej (aparatury firmy Hewlett-Packard 6890, kolumna 60 m BTX 70), według PN-ISO 5508,
- oznaczanie składu produktu przeestryfikowania metodą chromatografii kolumnowej według AOCS Recommended Cd 11c-93,
- oznaczanie mono- i diacylogliceroli za pomocą chromatografii gazowej według AOCS Official Method Cd 11b-91 (1997),
- oznaczanie liczby kwasowej według PN-ISO 660.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzony proces glicerolizy oleju rzepakowego z użyciem enzymu w kierunku maksymalizacji uzyskania diacylogliceroli wykazał, że zastosowane warunki procesu umożliwiły uzyskanie zróżnicowanego produktu zawierającego diacyloglicerole (DAG), triacyloglicerole (TAG), monoacyloglicerole (MAG) oraz wolne kwasy tłuszczowe (WKT). Najlepszy uzyskany produkt charakteryzował się zawartością poszczególnych składników na poziomie: DAG 80%, TAG 13%, MAG 5%, WKT 2%.

Wpływ stosunku molowego triacylogliceroli i glicerolu na skład produktu

Przeprowadzono serię sześciu doświadczeń mającą na celu określenie zależności pomiędzy ilością substratów – oleju rzepakowego i glicerolu a ilością otrzymywanych diacylogliceroli (DAG). Przyjęto czas reakcji 12 godzin, temperaturę 50°C, dodatek enzymu 8%. Stosunek molowy triacylogliceroli (TAG) do glicerolu (GL) wynosił od 3 do 1/3 w poszczególnych procesach. Stechiometryczne ilości substratów (TAG/GL 2:1) pozwoliły na maksymalną konwersję TAG na DAG zgodnie z teoretycznym równaniem stechiometrycznym:



Olej rzepakowy stanowi mieszaninę triacylogliceroli, dlatego pod symbolem TAG należy rozumieć średni ciężar molowy wynikający ze wszystkich istniejących triacylogliceroli. W przypadku użytego oleju rzepakowego zawierającego $x = 10$ różnych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład TAG, przy uwzględnieniu wszystkich możliwych teoretycznie izomerów, liczba możliwych TAG oznaczona symbolem N będzie wynosić — $N = x^3$, czyli $N = 1000$ (Sreenivasan 1978, Drozdowski 1988). W oparciu o skład kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego wyliczono matematycznie średni ciężar molowy hipotetycznego triacyloglicerolu, który wynosi 885,572. W przypadku czystego trójoleinianu ciężar molowy wynosi 887. Jak widać ciężar molowy trójoleinianu jest zbliżony do teoretycznie wyliczonego ciężaru molowego hipotetycznego triacyloglicerolu. Stosowane oznaczenie TAG jest ogólnym oznaczeniem, pod którym należy rozumieć średni ciężar molowy. Dla łatwiejszego zrozumienia zagadnienia w rozważaniach teoretycznych można przyjąć, że reakcja glicerolu przebiega z czystym trójoleinianem.

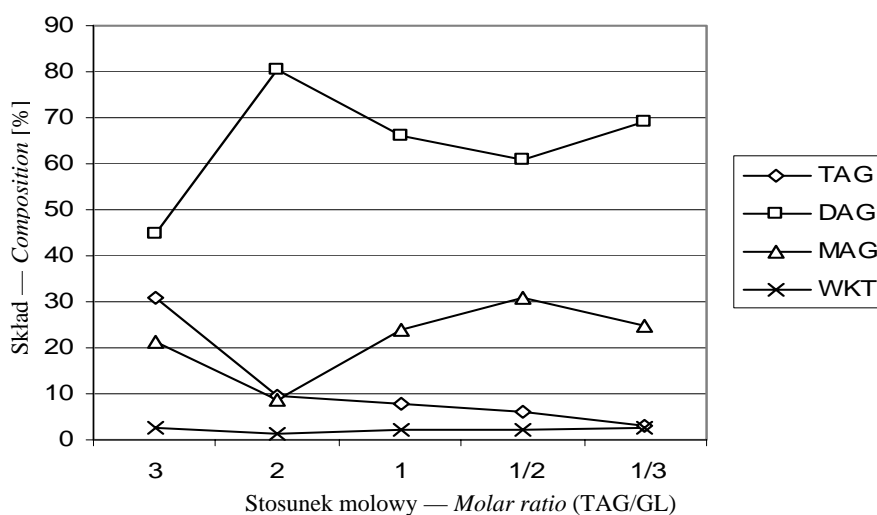
Wzrost zawartości glicerolu w mieszaninie wyjściowej powodował zwiększenie ilości monoacylogliceroli (MAG) w produkcie reakcji.

Wolne kwasy tłuszczowe powstawały w niewielkich ilościach od 1,5 do 2,6% bez wyraźnej relacji pomiędzy substratami.

Tabela 1

Wpływ stosunku molowego substratów na skład produktu. Czas 12 h, dodatek enzymu 8%, temp. 50°C, zawartość wody w glicerolu 1% — *The effect of substrates molar ratio on the composition of product. Time 12 h, enzyme addition 8%, temp. 50°C, water content in glycerol 1%*

Stosunek molowy <i>The molar ratio</i> TAG/GL	Skład produktu — <i>Product composition</i> [%]			
	TAG <i>TAG</i>	DAG <i>DAG</i>	MAG <i>MAG</i>	WKT <i>FFA</i>
3:1	31,0 ± 0,11	45,0 ± 0,11	21,5 ± 0,11	2,5 ± 0,10
2:1	9,4 ± 0,10	80,5 ± 0,15	8,6 ± 0,06	1,5 ± 0,06
1:1	7,9 ± 0,10	66,0 ± 0,15	24,1 ± 0,10	2,0 ± 0,10
1:2	6,0 ± 0,10	61,0 ± 0,11	31,0 ± 0,11	2,0 ± 0,10
1:3	3,2 ± 0,10	69,2 ± 0,11	25,0 ± 0,10	2,6 ± 0,10



Rys. 1. Wpływ stosunku molowego substratów na skład produktu — *Influence of the substrate molar ratio on product composition*

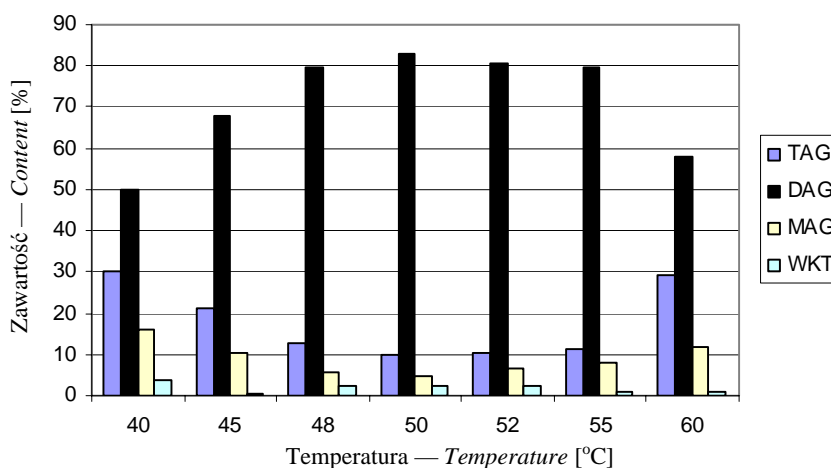
Wpływ temperatury na skład produktu

Aktywność enzymu zależy w dużej mierze od temperatury. W przypadku stosowanego biokatalizatora Lipozyme® RM IM optymalny zakres temperatury dla tego procesu został określony na $50 \pm 2^\circ\text{C}$. Zarówno poniżej, jak i powyżej tej wartości obserwuje się obniżenie zawartości DAG w produkcie.

Tabela 2

Wpływ temperatury na skład produktu. Czas 12 h, dodatek enzymu 8%, stosunek molowy TAG/GL 2:1, zawartość wody w glicerolu 1% — *The effect of temperature on the composition of product. Time 12 h, enzyme addition 8%, molar ratio TAG/GL 2:1, water content in glycerol 1%*

Temperatura reakcji Reaction temperature [°C]	Skład produktu — <i>Product composition</i> [%]			
	TAG TAG	DAG DAG	MAG MAG	WKT FFA
45	21,0 ± 0,10	68,0 ± 0,11	10,2 ± 0,10	0,8 ± 0,06
48	12,5 ± 0,11	79,5 ± 0,15	5,5 ± 0,06	2,5 ± 0,10
50	9,9 ± 0,10	82,9 ± 0,15	4,9 ± 0,06	2,3 ± 0,10
52	10,5 ± 0,10	80,7 ± 0,15	6,5 ± 0,06	2,3 ± 0,10
55	11,5 ± 0,11	79,5 ± 0,15	8,0 ± 0,06	1,0 ± 0,06
60	29,2 ± 0,06	58,0 ± 0,11	12,0 ± 0,10	0,8 ± 0,06



Rys. 2. Wpływ temperatury na skład produktu reakcji — *The effect of temperature on the composition of product*

Wpływ zawartości wody początkowej w glicerolu na skład produktu

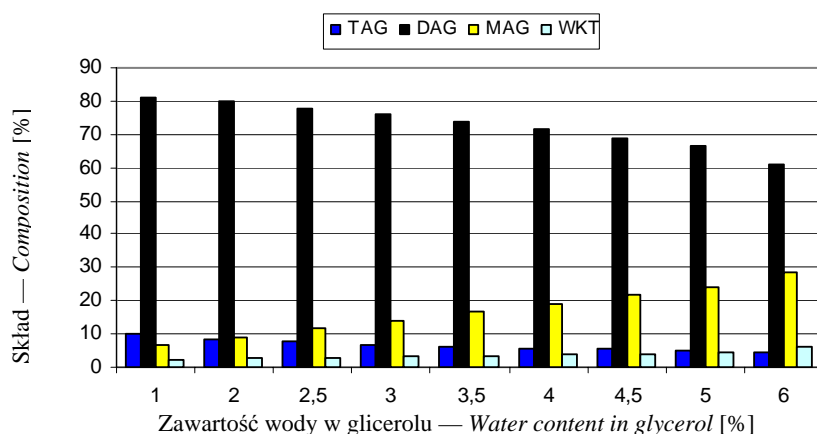
Zawartość początkowa wody w glicerolu 1% powoduje hydrolizę TAG w 90% i przy dalszym wzroście zawartości wody ich poziom ulega obniżeniu.

Wzrost zawartości wody w glicerolu powyżej 2% wpływa na zmniejszenie zawartości diacylogliceroli w produkcie końcowym, przy jednoczesnym zwiększeniu monoacylogliceroli. Najniższy poziom MAG w ilości 6,8% zaobserwowano przy 1% obecności wody w glicerolu. Poziom WKT wynosił od 1,8 do 5,9%.

Tabela 3

Wpływ zawartości wody początkowej w glicerolu na skład produktu. Dodatek enzymu 8%, czas 12 h, temp. 50°C, TAG/GL 2:1 — *The effect of initial water content in glycerol on the composition of product. Enzyme addition 8%, time 12 h, temp. 50°C, TAG/GL 2:1*

Zawartość wody w glicerolu <i>Water content in glycerol [%]</i>	Skład produktu — <i>Product composition [%]</i>			
	TAG <i>TAG</i>	DAG <i>DAG</i>	MAG <i>MAG</i>	WKT <i>FFA</i>
1	9,8 ± 0,10	81,3 ± 0,10	6,8 ± 0,11	2,1 ± 0,11
2	8,1 ± 0,10	80,1 ± 0,10	9,8 ± 0,11	1,8 ± 0,10
2,5	7,4 ± 0,10	77,5 ± 0,10	13,2 ± 0,11	1,9 ± 0,06
3	6,8 ± 0,10	76,0 ± 0,15	15,2 ± 0,10	2,0 ± 0,06
3,5	6,3 ± 0,10	76,3 ± 0,15	15,3 ± 0,10	2,1 ± 0,10
4	5,8 ± 0,06	70,3 ± 0,15	21,6 ± 0,10	2,3 ± 0,10
4,5	5,4 ± 0,06	68,3 ± 0,15	22,5 ± 0,10	3,8 ± 0,10
5	4,9 ± 0,10	65,5 ± 0,15	25,0 ± 0,10	4,6 ± 0,10
6	4,5 ± 0,10	61,0 ± 0,10	28,6 ± 0,10	5,9 ± 0,11



Rys. 3. Wpływ zawartości wody na skład produktu — *The effect of water content in glycerol on the composition of product*

Wpływ czasu reakcji na skład produktu

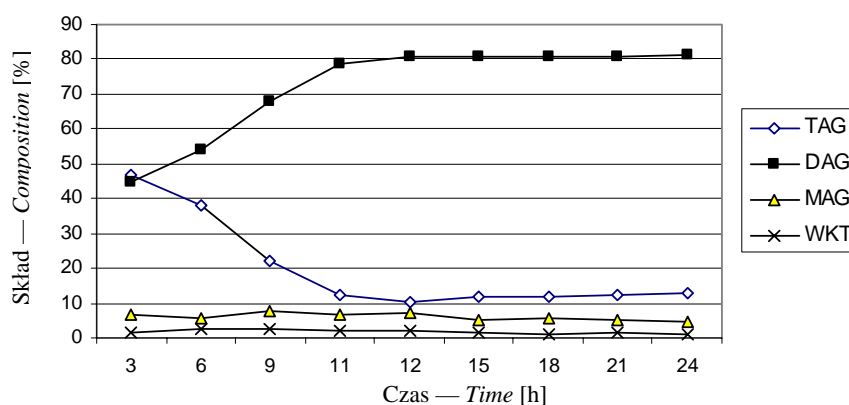
Doświadczenia przeprowadzone w czasie 12 godzin pozwoliły na uzyskanie zawartości DAG w produkcie na poziomie 70–80%. W celu sprawdzenia, czy zwiększenie czasu reakcji wpłynie na zwiększenie wydajności i przyrost DAG, przeprowadzono procesy w czasie wynoszącym 24 godziny. Procesy enzymatycznej glicerolizy realizowane w czasie 24 godzin umożliwiły osiągnięcie maksy-

malnej ilości diacylogliceroli w produkcie, która wynosiła około 82%. Biorąc jednak pod uwagę dwukrotnie dłuższy czas reakcji i niewielki wzrost diacylogliceroli w produkcie, jako optymalny czas procesu zasadne było przyjęcie 12 godzin. W tabeli 4 ujęto wyniki obrazujące zawartość poszczególnych składników produktu glicerolizy. Wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 6 doświadczeń. Na wykresie (rys. 4) przedstawiono przebieg reakcji glicerolizy w funkcji czasu. Krzywa obrazująca zawartość diacylogliceroli w produkcie osiągnęła optymalną wartość po 12 godzinach, zaś dalszy jej przebieg nie wskazywał na znaczące wzrosty.

Tabela 4

Skład produktu w zależności od czasu reakcji. TAG/GL 2:1, temp. 50°C, dodatek enzymu 8%, zawartość wody w glicerolu 1% — *Product composition as a function of the reaction time, TAG/GL 2:1, temp. 50°C, enzyme addition 8%, the water content in glycerol — 1%*

Czas reakcji Reaction time [h]	Skład produktu — <i>Product composition</i> [%]			
	TAG TAG	DAG DAG	MAG MAG	WKT FFA
3	47,0 ± 0,11	45,0 ± 0,11	6,5 ± 0,11	1,5 ± 0,11
6	38,0 ± 0,11	54,0 ± 0,11	5,5 ± 0,11	2,5 ± 0,10
9	22,0 ± 0,10	68,0 ± 0,15	7,5 ± 0,11	2,5 ± 0,10
11	12,3 ± 0,10	78,8 ± 0,15	6,8 ± 0,11	2,1 ± 0,10
12	10,1 ± 0,10	80,8 ± 0,15	7,2 ± 0,10	1,5 ± 0,10
15	12,0 ± 0,10	81,0 ± 0,15	5,2 ± 0,10	1,8 ± 0,06
18	12,0 ± 0,10	80,9 ± 0,15	5,9 ± 0,11	1,2 ± 0,06
21	12,5 ± 0,10	81,0 ± 0,11	5,1 ± 0,10	1,4 ± 0,11
24	12,9 ± 0,10	81,5 ± 0,11	4,5 ± 0,10	1,1 ± 0,06



Rys. 4. Skład produktu w zależności od czasu reakcji — *Product composition as a function of the reaction time*

Podsumowanie

Przeprowadzono badanie procesu glicerolizy oleju rzepakowego z użyciem enzymu w kierunku maksymalizacji uzyskania diacylogliceroli. Zastosowanie optymalnych warunków procesu umożliwiło uzyskanie produktu o następującym składzie: diacyloglicerole — 80%, triacyloglicerole — 10%, monoacyloglicerole — 5–8% oraz wolne kwasy tłuszczowe — 1,5–2,5%.

Wydajność procesu zależy od stosunku molowego substratów (olej rzepakowy/glicerol – TAG/GL). Dla badanego procesu najkorzystniejszy okazał się stechiometryczny stosunek molowy TAG/GL = 2. Powyżej tej wartości obserwuje się wyższą zawartość triacylogliceroli natomiast poniżej tej wartości następuje wzrost zawartości monoacylogliceroli w produkcie.

Wzrost zawartości wody początkowej w glicerolu wpływa na obniżenie zawartości diacylogliceroli w produkcie przy czym optymalna jej zawartość wynosi około 1%.

Optymalny zakres temperatury prowadzenia procesu został określony na 48 do 55°C. Powyżej tej wartości stwierdzono wyraźny spadek zawartości diacylogliceroli w produkcie.

Prowadzenie procesu enzymatycznej glicerolizy w czasie 24 godzin nie jest celowe, gdyż powoduje niewielki wzrost wydajności DAG. Za optymalny czas procesu uznano 12 godzin, uzyskując zawartość diacylogliceroli na poziomie 80%.

Proces enzymatycznej glicerolizy oleju rzepakowego stwarza możliwości otrzymywania nowego typu produktu — oleju diacyloglicerolowego.

Literatura

- Adamczak M., Bednarski W. 2005. Doskonalenie wybranych właściwości lipaz oraz ich zastosowanie w kontrolowanej modyfikacji lipidów. W: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności. Praca zbiorowa pod redakcją E. Kołakowskiego, W. Bednarskiego, S. Bieleckiego, AR w Szczecinie, 275-294.
- Armand M., Pasquier B., André M., Borel P., Senft M., Peyrot J., Salducci J., Portugal H., Jaussan V., Lairon D. 1999. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am. J. Clin Nutr.* 70: 1096-1106.
- Drozdowski B. 1988. Lipidy. W: *Chemia Żywności*. PWN: 147-154.
- Hult K., Holmquist M. 1997. Kinetics, molecular modeling, and synthetic applications with microbial lipases, *Methods Enzymol. Part B. Lipases, enzyme characterization and utilization*, 286: 386-405.
- Ledóchowska E., Datta I. 1998. Optimization of enzymatic interesterification of fat to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 7/48, 4: 683-691.
- Martinelle M., Hult K. 1994. Kinetics of triglyceride lipase. [In:] *Lipases their structure, biochemistry and application*. Wooley P., Petersen S.B. (ed.), Cambridge: 159-180.

- McNeill G.P., Shimizu S., Yamane T. 1990. Solid Phase Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67: 779.
- Negishi S., Arai Y., Arimoto S., Tsuchiya K., Takahashi I. 2003. Synthesis of 1,3-Dicapryloyl-2-docosahexaenoylglycerol by a combination of nonselective and sn-1,3-Selective Lipase Reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80, 10: 971-974.
- Ptasznik S., Jerzewska M., Ropelewska M. 2004. Enzymatyczna strukturyzacja triacylogliceroli tłuszczów zawierających średnio i długo łańcuchowe polienowe kwasy tłuszczowe rodziny n-3 (omega-3) z zastosowaniem biokatalizatora o działaniu niespecyficznym. [W:] XII Międzynarodowa Konferencja Naukowa Postępy w technologii tłuszczów roślinnych, Piešťany, Słowacja, Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego, Warszawa: 30-50.
- Ptasznik S., Jerzewska M., Ropelewska M. 2004. Próby enzymatycznego przeestryfikowania mieszanek olejów rzepakowego i rybiego o zróżnicowanym poziomie kwasów tłuszczowych polienowych oraz ocena uzyskanych produktów, *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXV (1): 204-212.
- Ptasznik S., Jerzewska M., Ropelewska M. 2005. Enzymatyczna restrukturyzacja triacylogliceroli mieszanek tłuszczowych. [W:] Enzymatyczna modyfikacja składników żywności, praca zbiorowa pod redakcją E. Kołakowskiego, W. Bednarskiego, S. Bieleckiego, AR w Szczecinie, 313-333.
- Sampling and Analysis Commercial Fats and Oils. 1997. Quantative Separation of Monoglycerides, Diglycerides and Triglycerides by Silica Gel Column Chromatography. AOCS Recommended Cd 11c-93. Reapproved.
- Sampling and Analysis Commercial Fats and Oils. 1997. Mono- and Diglycerides Determination by HPLC_ELSD. AOCS Official Method Cd 11d-96. Reapproved.
- Sampling and Analysis Commercial Fats and Oils. 1997. Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography. AOCS Official Method Cd 11b-91. Reapproved.
- Sreenivasan B. 1978. Interesterification of fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55: 796-805.
- Stryer L. 1997. *Enzymy: podstawowe pojęcia i kinetyka*. W: Biochemia. PWN, Warszawa.
- Verger R., de Haas G.H. 1976. Interfacial enzyme kinetic of lipolysis. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 5: 77-117.
- Waldinger C., Schneider M. 1996. Enzymatic Esterification of Glycerol III. Lipase-Catalyzed Synthesis of Regioisomerically Pure 1,3-sn-Diacylglycerols and 1(3)-rac-Monoacylglycerols Deived from Unsaturated Fatty Acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 11: 1513-1519.
- Watanabe T., Shimizu M., Sugiura M., Sato M., Kohori J., Yamada N., Nakanishi K. 2003. Optimization of Reaction Conditions for the production of DAG Using Immobilized 1,3-Regiospecific Lipase Lipozyme RM IM. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80, 12: 1201-1207.
- Watanabe T., Yamaguchi H., Yamada N., Lee I. 2004. Manufacturing Process of Diacylglycerol Oil. [In:] *Diacylglycerols Oil*. Editors: Katsuragi Y., Yasukawa T., Matsuo N., Flickinger B.D., Tokimitsu I., Matlock M.G. AOCS Press, Champaign, Illinois: 253-261.
- Yasukawa T., Katsuragi Y. 2004. Diacylglycerols. [In:] *Diacylglycerols Oil*. Editors: Katsuragi Y., Yasukawa T., Matsuo N., Flickinger B. D., Tokimitsu I., Matlock M.G. AOCS Press, Champaign, Illinois: 1-11.