

ELEONORA LEDÓCHOWSKA

WPLYW CZASU NA STOPIEŃ PRZEESTRYFIKOWANIA TRIACYLOGLICEROLI W CIĄGŁYM PROCESIE ENZYMATYCZNYM

Streszczenie

Badania prowadzono na przykładzie acydolizy niskoerukowego oleju rzepakowego kwasem stearynowym. Jako katalizator stosowano immobilizowany enzym Lipozyme IM. Czas procesu był zmienny i wynosił od 5 do 180 min. Z produktów acydolizy izolowano wolne kwasy tłuszczowe (WKT) i triacyloglicerole (TAG), w których oznaczano skład kwasów tłuszczowych oraz skład tych kwasów w pozycjach zewnętrznych *sn*-1,3 i wewnętrznej *sn*-2 cząsteczek TAG. Stwierdzono, że kwas stearynowy wbudowywał się głównie w pozycje *sn*-1,3 TAG oleju rzepakowego (max. 22%). Wbudowywanie to trwało aż do momentu ustalenia się stanu równowagi dynamicznej (30 min.), uzyskując ujednoczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1,3 TAG ze składem tych kwasów we frakcji WKT. Wydłużanie czasu reakcji nie powodowało już dalszego wzrostu ilości wbudowanego kwasu stearynowego w pozycje zewnętrzne TAG, natomiast powodowało niewielkie wbudowywanie się tego kwasu również w pozycje *sn*-2 TAG.

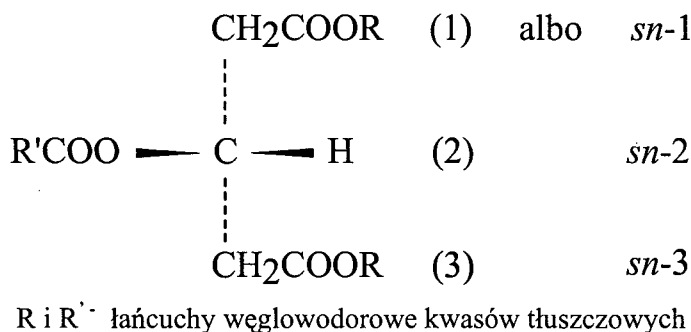
Wstęp

Właściwości fizyczne i chemiczne tłuszczów uwarunkowane są przede wszystkim składem i budową triacylogliceroli. Jednym ze sposobów modyfikacji tych właściwości w przemyśle tłuszczowym jest proces przeestryfikowania. Proces ten polega na wymianie pozycji grup acylowych zarówno wewnątrz jednej cząsteczki triacyloglicerolu, jak i pomiędzy różnymi cząsteczkami. Zmianie w tym procesie ulega struktura triacylogliceroli, natomiast budowa kwasów tłuszczowych pozostaje niezmienną [8, 18].

Proces przeestryfikowania prowadzić można w obecności katalizatorów chemicznych i biologicznych. W ciągu ostatnich lat wzrosło znaczenie katalizatorów biolo-

gicznych. Katalizatorami tymi mogą być enzymy lipolityczne zwane lipazami. Naturalną funkcją tych enzymów jest katalizowanie reakcji hydrolizy acylogliceroli. Ponieważ reakcja ta jest odwracalna, dlatego zmieniając środowisko reakcji na ubogie w wodę można zmienić kierunek reakcji w stronę estryfikacji [10].

Wiadomo, że enzymy charakteryzują się swoistą specyficznością. Mogą być one specyficzne w stosunku do pozycji wiązania estrowego w cząsteczce triacyloglicerolu (rys. 1) lub też mogą charakteryzować się specyficznością w stosunku do struktury kwasów tłuszczowych, a więc w stosunku do długości łańcuchów węglowodorowych tych kwasów lub stopnia ich nienasycenia [5, 6, 20].



Rys. 1. Pozycje *sn-1*, *sn-2* i *sn-3* w cząsteczce triacyloglicerolu.

Fig. 1. Representation of *sn*-nomenclature for triacylglycerols.

Jeżeli proces enzymatycznego przeestryfikowania prowadzony jest w obecności katalizatora regio- lub stereospecyficznego, wówczas mogą zachodzić reakcje uboczne obniżające wydajność właściwej frakcji triacyloglicerolowej [10, 19]. Reakcje te spowodowane są migracją acyli kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycjami zewnętrznymi *sn-1,3* a pozycją wewnętrzną *sn-2* w cząsteczkach niepełnych acylogliceroli. Zwiększając stężenie katalizatora lipazowego i redukując czas trwania reakcji możemy istotnie eliminować niepożądane reakcje uboczne [1]. Wysokie stężenie katalizatora i krótki czas kontaktu między katalizatorem a reagentami jest charakterystyczny dla reaktorów kolumnowych z wypełnieniem, natomiast niższe stężenie katalizatora i dłuższy czas reakcji stosowany jest w reaktorach okresowych z mieszaniem [10, 19].

Wcześniejsze nasze prace dotyczące enzymatycznego przeestryfikowania triacylogliceroli prowadzone były w reaktorach okresowych [11-16], natomiast w obecnych badaniach proces przeestryfikowania prowadzony był w kolumnie wypełnionej enzymem, przez którą przepływała mieszanina reakcyjna.

Celem tej pracy było zbadanie wpływu czasu prowadzenia reakcji w reaktorze przepływowym wypełnionym enzymem na stopień przeestryfikowania triacylogliceroli.

Materiały i metody badań

Surowce

Badania prowadzono w układzie modelowym, na przykładzie acydolizy. Substratami w tych reakcjach były: rafinowany niskoerukowy olej rzepakowy otrzymany z ZPT Olvit w Gdańsku i kwas stearynowy (Merck) użyte w stosunku wagowym 5:1,5 [10]. Taki stosunek reagentów zapewniał uchwycenie zachodzących zmian, a jednocześnie substraty te miały odpowiednią lepkość w temperaturze reakcji. Skład ważniejszych kwasów tłuszczowych obu reagentów pokazano w tab. 1.

Tabela 1

Skład ważniejszych kwasów tłuszczowych w substratach użytych do enzymatycznego przeestryfikowania. Composition of more important fatty acids in substrates used for enzymatic interesterification.

Substrat	Udział kwasów tłuszczowych, [%] Composition of fatty acid						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	inne
Olej rzepakowy Rapeseed oil	5,3	0,3	1,8	60,3	20,3	8,7	3,3
Kwas stearynowy Stearic acid	1,2	-	98,0	0,5	-	-	0,3

Katalizator

Katalizatorem tego procesu był enzym lipolityczny z *Rizomucor miehei* o nazwie handlowej Lipozyme IM (Novo Nordisk, Dania). Enzym ten był immobilizowany na makroporowatej żywicy anionowymiennej i charakteryzował się specyficznością w stosunku wiązań estrowych w pozycjach *sn*-1,3 triacylogliceroli. Zawartość wody w enzymie wynosiła 3%.

Przeestryfikowanie enzymatyczne

Reaktor stanowiła szklana kolumna o średnicy 1 cm z płaszczem wodnym, zawierająca nieruchome złożo katalizatora w ilości 2 g, przez który przepływała mieszanina tłuszczowa. Mieszanina ta po wypłynięciu z kolumny była zawracana do układu. Szybkość wypływu wynosiła 7 kropel/min, a temperatura reakcji wynosiła 65°C. Przy doborze parametrów reakcji kierowano się danymi literaturowymi [7], informacją handlową producenta enzymu [9] oraz własnym doświadczeniem [10]. Zmiennym parametrem był czas prowadzenia procesu, który wynosił: 5; 10; 20; 30; 45; 60; 90; 120; 150 i 180 min.

Analiza produktów enzymatycznego przeestryfikowania

W procesie enzymatycznego przeestryfikowania, a także acydolizy zachodzą równocześnie dwie reakcje: częściowa hydroliza triacylogliceroli [TAG] oraz ponowna estryfikacja niepełnych acylogliceroli. Zatem otrzymane produkty obok triacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych (które były obecne w mieszaninie wyjściowej), zawierają również pewne ilości niepełnych acylogliceroli, głównie diacylogliceroli.

Otrzymane produkty acydolizy rozdzielano, metodą chromatografii kolumnowej, na frakcję niepolarną zawierającą triacyloglicerole oraz na frakcję polarną zawierającą WKT i niepełne acyloglicerole. Następnie z frakcji polarnej izolowano wolne kwasy tłuszczowe metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej.

W uzyskanych TAG i we frakcji WKT oznaczano skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

Izolacja triacylogliceroli z produktów przeestryfikowania

Oddzielanie triacylogliceroli od niepełnych acylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych wykonywano metodą chromatografii kolumnowej [3]. W tym celu produkt enzymatycznego przeestryfikowania (2 g) rozpuszczano w 5 ml mieszaniny eteru naftowego i eteru etylowego 87:13 (v/v) i наносono na kolumnę chromatograficzną wypełnioną żelem krzemionkowym Kieselgel 60 (70–230 mesh). Żel ten był wcześniej suszony przez 4 h w 160°C, a następnie nawadniany do 5%. Frakcję niepolarną zawierającą triacyloglicerole eluowano mieszaniną eter naftowy:eter etylowy 87:13 (v/v), a frakcję polarną, składającą się z wolnych kwasów tłuszczowych i niepełnych acylogliceroli wymywano eterem etylowym. Prawidłowość rozdziału sprawdzano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w układzie rozwijającym eter naftowy:eter etylowy:kwas octowy 70:30:0,8 (v/v/v) [2].

Wydzielanie wolnych kwasów tłuszczowych z frakcji polarnej

Frakcję polarną zawierającą WKT i niepełne acyloglicerole rozdzielano metodą preparatywnej chromatografii cienkowarstwowej w układzie rozwijającym eter naftowy:eter etylowy:kwas octowy 70:30:0,8 (v/v/v) [2]. Pasma zawierające WKT zeskrobywano i eluowano eterem etylowym, a następnie rozpuszczalnik odparowywano pod obniżonym ciśnieniem.

Określanie składu kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolach i w wolnych kwasach tłuszczowych

Skład kwasów tłuszczowych określano metodą chromatografii gazowej po uprzedniej estryfikacji lub przeestryfikowaniu prób metanolem zgodnie z Normą Polską PrPN-ISO 5509 [17]. Do analizy stosowano chromatograf gazowy Pay-Unicam 4550 z detektorem płomieniowo jonizacyjnym (FID), wyposażony w kolumnę chro-

matograficzną J&W Scientific DB-23 (0,25 mm x 30 m). Temperatura kolumny wynosiła 180°C, a temperatura detektora i dozownika 250°C. Gazem nośnym był hel. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych wyliczano za pomocą integratora Hewlett-Packard 3392A.

Określanie struktury triacylogliceroli

Strukturę triacylogliceroli oznaczano za pomocą metody Brockerhoffa z modyfikacjami Drozdowskiego [4]. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność enzymu, lipazy trzustkowej, do selektywnej hydrolizy wiązań estrowych w pozycji *sn*-1,3 TAG, przy założeniu, że pozycje te są równocenne. Produkty lipolizy rozdzielano metodą preparatywnej chromatografii cienkwarstwowej i badano skład kwasów tłuszczowych wyizolowanych *sn*-2 monoacylogliceroli. W oparciu o uzyskane wyniki oraz znajomość składu kwasów tłuszczowych triacylogliceroli wyjściowych wyliczano skład procentowy tych kwasów w pozycjach *sn*-1,3 triacylogliceroli.

Wyniki badań i dyskusja

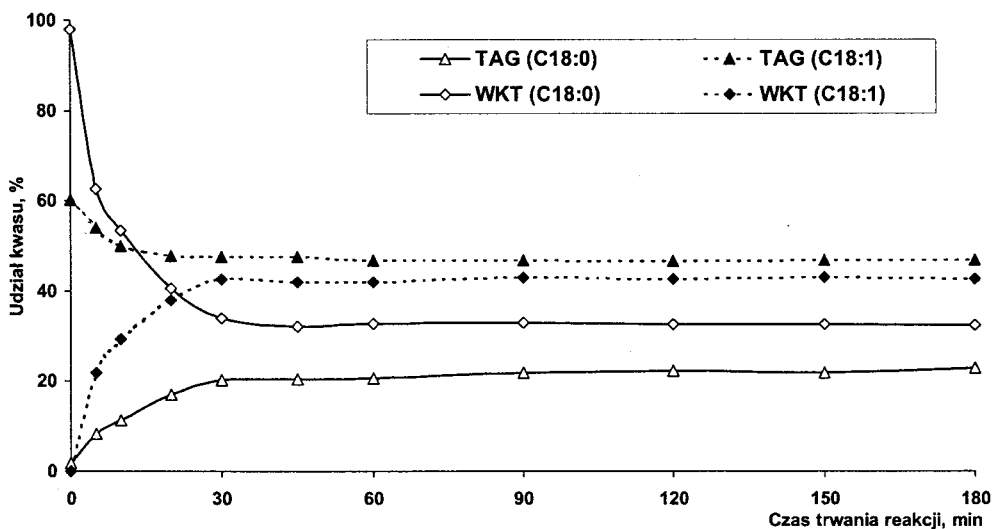
W mieszaninie wyjściowej obecne były dwie frakcje: olej rzepakowy, który stanowił frakcję triacyloglicerolową i kwas stearynowy, który stanowił frakcję wolnych kwasów tłuszczowych.

W pracy śledzono wbudowywanie się kwasu stearynowego w cząsteczki triacylogliceroli oleju rzepakowego w czasie.

Zmiany udziału procentowego dwóch głównych kwasów tłuszczowych, stearynowego i oleinowego w funkcji czasu we frakcji WKT i TAG pokazano na rys. 2. Analizując te wykresy widać, że w miarę wydłużania czasu trwania reakcji acydolizy następował wzrost udziału procentowego kwasu stearynowego w cząsteczkach triacylogliceroli oleju rzepakowego, a spadek udziału tego kwasu we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych. Najwięcej kwasu stearynowego wbudowywało się w ciągu pierwszych 30 min. trwania reakcji (od 1,8% do 22%). Po tym czasie ilość wbudowywanego kwasu stearynowego osiągała stałą wartość, świadczącą o ustaleniu się równowagi dynamicznej układu. Dalsze wydłużanie czasu reakcji (do 180 min.) nie powodowało już istotnych zmian ilości wbudowywanego kwasu stearynowego w triacyloglicerole oleju rzepakowego ani ubytku tego kwasu z frakcji WKT. Podobne zależności obserwowano śledząc spadek udziału procentowego kwasu oleinowego we frakcji triacyloglicerolowej, a wzrost jego we frakcji WKT (rys. 2).

Ponieważ jednak użyty w reakcji acydolizy biokatalizator Lipozyme IM charakteryzował się, wg informacji producenta [9], specyficznością w stosunku do wiązań estrowych w pozycji *sn*-1,3 triacylogliceroli, stąd istotnym było porównywanie w produktach acydolizy procentowego składu kwasów tłuszczowych we frakcji WKT ze składem tych kwasów, nie tylko w całkowitych triacyloglicerolach, ale również w po-

zycjach *sn*-1,3 tych triacylogliceroli. W tym celu triacyloglicerole wyizolowane z produktów reakcji poddawano enzymatycznej hydrolizie w obecności lipazy trzustkowej. Mieszaninę po hydrolizie rozdzielano, izolowano frakcję *sn*-2 monoacylogliceroli i oznaczano w niej skład kwasów tłuszczowych. Następnie znając skład kwasów tłuszczowych całych triacylogliceroli oraz tych kwasów w pozycji wewnętrznej *sn*-2 wyliczano skład kwasów tłuszczowych w pozycjach zewnętrznych *sn*-1,3, przy założeniu, że pozycje te są równocenne.



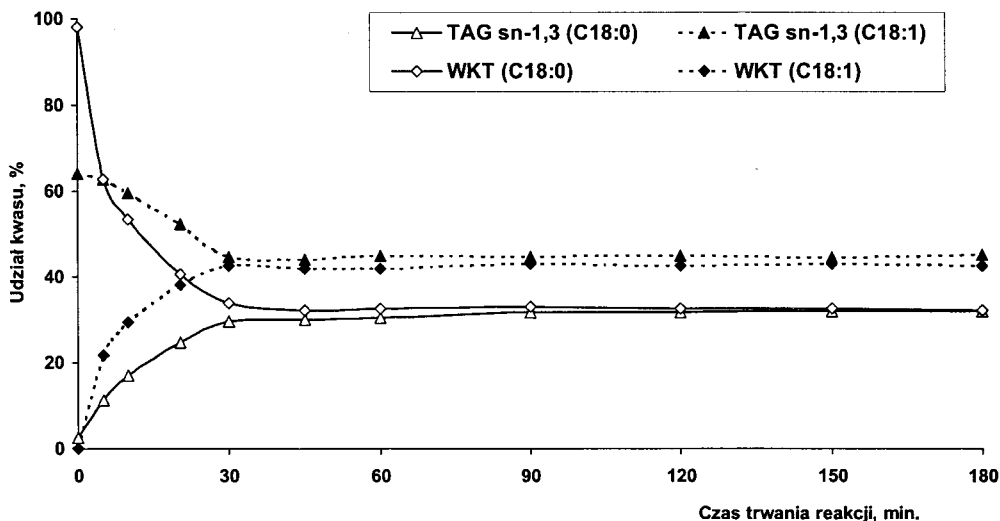
Rys. 2. Zmiany procentowego udziału kwasu stearynowego ($C_{18:0}$) i oleinowego ($C_{18:1}$) we frakcjach WKT i TAG wyizolowanych z produktów enzymatycznej acydolizy oleju rzepakowego kwasem stearynowym, w zależności od czasu trwania reakcji.

Fig. 2. Changes of percentages of stearic acid ($C_{18:0}$) and oleic acid ($C_{18:1}$) in FFA fractions and TAGs isolated from products of enzymatic acidolysis of rapeseed oil with stearic acid, in relation of reaction time.

Zmiany udziału procentowego kwasu stearynowego i oleinowego w WKT i w poz. *sn*-1,3 TAG w funkcji czasu pokazano na rys. 3. Analizując te wykresy można zauważyć, podobnie jak na poprzednich wykresach, że w miarę wydłużania się czasu trwania reakcji wzrastał udział kwasu stearynowego wbudowywanego w pozycje *sn*-1,3 TAG (od 2,5% do 30%) oraz malał jego udział we frakcji WKT, aż do ustalenia się stanu równowagi dynamicznej, co następowało po ~ 30 min. W stanie tym procentowy skład kwasów tłuszczowych w WKT był podobny do składu tych kwasów w pozycjach *sn*-1,3 TAG.

Czas trwania procesu enzymatycznego przeestryfikowania jest jednym z czynników powodujących migracje acyli z poz. *sn*-2 do poz. *sn*-1,3, co prowadzi do zmiany

składu kwasów tłuszczowych również w poz. *sn*-2. W przypadku stosowania do procesu przeestryfikowania enzymów regioselektywnych, zmiany takie są niekorzystne, ponieważ powodują pogorszenie jakości założonego produktu przez powstanie triacylogliceroli ze zmienionym składem kwasów tłuszczowych w poz. *sn*-2, które będą produktami ubocznymi reakcji.



Rys. 3. Zmiany procentowego udziału kwasu stearynowego ($C_{18:0}$) i oleinowego ($C_{18:1}$) we frakcjach WKT i w pozycjach *sn*-1,3 TAG wyizolowanych z produktów enzymatycznej acydolizy oleju rzepakowego kwasem stearynowym, w zależności od czasu trwania reakcji.

Fig. 3. Changes of percentages of stearic acid ($C_{18:0}$) and oleic acid ($C_{18:1}$) in FFA fractions and in *sn*-1,3 positions of TAGs isolated from products of enzymatic acidolysis of rapeseed oil with stearic acid, in relation of reaction time.

Zmiany składu kwasów tłuszczowych w poz. zewnętrznych *sn*-1,3 i w poz. wewnętrznej *sn*-2 triacylogliceroli wyizolowanych z produktów acydolizy prowadzonej w różnych czasach przedstawiono w tab. 2. Analizując dane zawarte w tej tabeli stwierdzono, że wydłużanie czasu trwania reakcji z 30 do 60 min. powodowało wzrost udziału procentowego kwasu stearynowego w poz. *sn*-2 z 1,6% do 2,5%, natomiast dalsze wydłużenie czasu trwania reakcji do 90 min i 180 min. powodowało wzrost udziału tego kwasu w poz. *sn*-2 do ~4,5%.

Reasumując stwierdzić należy, że prowadząc proces enzymatycznego przeestryfikowania w kolumnie wypełnionej enzymem, gdzie zapewnione było wysokie stężenie biokatalizatora, czas wymagany do osiągnięcia stanu równowagi dynamicznej był krótki i wynosił ~30 min. W podobnych badaniach, prowadzonych w reaktorach okre-

sowych z mieszaniem, czas ten był 6 razy dłuższy [10] i wynosił ~ 3h. Stwierdzono również, że redukując czas reakcji można istotnie ograniczyć niepożądane reakcje uboczne spowodowane migracją acyli z poz. sn-2, prowadzące do powstania produktów ubocznych reakcji.

Tabela 2

Procentowa zawartość kwasu stearynowego i oleinowego w pozycji sn-2 i w pozycjach sn-1,3 triacylogliceroli wyizolowanych z mieszaniny wyjściowej i z produktów enzymatycznej acydolizy oleju rzepakowego kwasem stearynowym (5:1,5), w zależności od czasu trwania reakcji.

Percentage of stearic and oleic acid in sn-2 position and in sn-1,3 position of TAGs from initial blend and TAGs isolated from acidolysis products of rapeseed oil with stearic acid (5:1,5) in relation to reaction time.

Rodzaj próby Sample	Czas trwania reakcji [min.] Reaction time	Udział procentowy kwasu w pozycji [%] Percentage of fatty acid in position			
		sn-2 triacylogliceroli		sn-1,3 triacylogliceroli	
		C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:0}	C _{18:1}
Mieszanina wyjściowa Initial blend		0,5	49,5	2,5	64,1
Produkt	5	1,1	47,5	11,3	62,7
Produkt	10	1,2	46,2	17,0	59,5
Produkt	30	1,6	45,3	30,6	44,6
Produkt	60	2,5	45,7	30,5	45,1
Produkt	90	4,5	43,1	30,7	46,0
Produkt	180	4,6	43,3	31,6	45,1

Wnioski

1. Kwas stearynowy wbudowywał się głównie w pozycje sn-1,3 cząsteczek triacylogliceroli oleju rzepakowego. Wbudowywanie to trwało aż do momentu ustalenia się równowagi dynamicznej układu, uzyskując ujednoczenie składu kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1,3 TAG ze składem tych kwasów we frakcji WKT.
2. Najwięcej kwasu stearynowego wbudowywało się w ciągu pierwszych 30 min. (od 2,5% do 30,6%). Po tym czasie, w warunkach prowadzonego procesu, ustalał się stan równowagi dynamicznej.
3. Dalsze wydłużanie czasu reakcji nie powodowało już istotnych zmian w składzie kwasów tłuszczowych w poz. sn-1,3 TAG, natomiast powodowało migrację acyli z poz. sn-2 do poz. sn-1,3 i wbudowywanie się kwasu stearynowego również w poz. sn-2 (z 1,6 do 4,5%, po 90 min).
4. Prowadzenie procesu przeestryfikowania w kolumnie wypełnionej enzymem (wysokie stężenie katalizatora), w porównaniu z reaktorem okresowym, pozwala na

skrócenie czasu osiągnięcia stanu równowagi dynamicznej układu do 30 min. Ogranicza to istotnie niepożądane reakcje uboczne spowodowane migracją acyli z poz. *sn-2*, prowadzące do powstawania produktów ubocznych.

LITERATURA

- [1] Bloomer S., Adlerkrecht P., Matiasson B.: *Biocatalysis*, **5**, 1991, 145.
- [2] Christie W.W.: *Lipids Analysis* (2nd ed.), Oxford England: Pergamon Press 1982, s. 93-96.
- [3] DGF Standard Methods, 1991, C-III 3b.
- [4] Drozdowski B.: Wpływ budowy glicerydów i występujących w nich kwasów tłuszczowych na mechanizm hydrolizy enzymatycznej. *Zesz. Nauk. Politechniki Gdańskiej*, 217, *Chemia* **25**, 1974, 18.
- [5] Gandhi N.N.: Applications of lipase. *JAOCS*, **74**, 6, 1997, 621.
- [6] Fitch Haumann B.: Structured lipids allow fat tailoring. *Inform*, **8**, 1997, 1004.
- [7] Forssell P., Parovuori P., Linko P., Poutanen K.: Enzymatic transesterification of rapeseed oil and lauric acid in a continuous reactor. *JAOCS*, **70**, 1993, 1105.
- [8] Jakubowski A.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji konsystencji tłuszczów. *Tuszcze Jadalne*, **28**, 1990, 21.
- [9] Informacja handlowa, 665a-GB 200, 1992 HSv, Novo Industrii A/S.
- [10] Ledóchowska E.: Wybrane aspekty enzymatycznego przeestryfikowania triacylogliceroli. Praca habilitacyjna. *Zesz. Nauk. Politechniki Gdańskiej* 575, *Chemia* **43**, Gdańsk 1999.
- [11] Ledóchowska E., Wilczyńska E.: Comparison of oxidative stability of chemically and enzymatically interesterified fats. *Fett/Lipid*, **100**, 8, 1998, 343.
- [12] Ledóchowska E.: Effect of diacylglycerols formed during enzymatic interesterification of fats on the stability of crystal forms., *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **7/48**, 3, 1998, 405.
- [13] Ledóchowska E., Datta I.: Optimization of enzymatic interesterification of fats to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **7/48**, 4, 1998, 683.
- [14] Ledóchowska E.: Enzymatic interesterification of blends of liquid and totally hydrogenated fats to obtain the margarine base stocks of minimal content of *trans* isomers. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **8/49**, 1, 1999, 65.
- [15] Ledóchowska E.: Crystal structure of products of enzymatic interesterification of rapeseed oil with fats being palmitic acid carriers. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **8/49**, 4, 1999, 57.
- [16] Ledóchowska E., Datta I.: Wpływ frakcji nietriacyloglicerolowej na stabilność oksydacyjną tłuszczu przeestryfikowanego chemicznie i enzymatycznie. *Żywność. Technologia. Jakość*, **1 (18)**, 1999, 15.
- [17] Norma Polska, Pr PN-ISO 660. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny 1995.
- [18] Rozendaal A.: Interesterification of oil and fats. *Inform*, **3**, 1992, 1232.
- [19] Rozendaal A., Macrae A.R., *Interesterification of oil and fats. w: Lipid technologies and applications*. 1997, ed. M. Dekker, New York, s. 233-253.
- [20] Villeneuve P., Foglia T.A.: Lipase specificities: Potential application in lipid bioconversion. *Inform*, **8**, 1997, 640.

EFFECT OF REACTION TIME IN A FLOW REACTOR FILLED WITH ENZYME ON THE DEGREE OF INTERESTERIFICATION OF TRIACYLGLYCEROLS

S u m m a r y

Investigations were carried out on enzymatic acidolysis of low erucic acid rapeseed oil with stearic acid. Immobilized Lipozyme IM was used as the biocatalyst. The reaction time, varied from 5 to 180 minutes. From the products of acidolysis, free fatty acids (FFA) and triacylglycerols (TAGs) were isolated and their fatty acid composition as well as the compositions of these fatty acids in *sn*-1,3 and *sn*-2 positions of the triacylglycerol molecules were determined. It was affirmed that stearic acid was incorporated mainly in position *sn*-1,3 of the triacylglycerol molecules of rapeseed oil (max. 22%). The incorporation of stearic acid continued until the moment of attainment of dynamic equilibrium (30 min.), thus unification of composition of fatty acids in position *sn*-1,3 TAG in relation to the composition of these acids in the FFA fraction. Further extension of reaction time had no effect on the increase of the amount of incorporated stearic acid in position *sn*-1,3, but caused insignificant incorporation in position *sn*-2 TAGs as well. ❖