

LİPAZ ENZİMLERİ İLE YAĞLARIN MODİFİKASYON BİYOTEKNOLOJİSİ

MODIFICATION BIOTECHNOLOGY OF FATS BY LIPASE ENZYMES

Rami AL-TAWEEL, Sibel SUNGUR*

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya AbD

ÖZET: Son yıllarda lipazlar ile katı ve sıvı yağların enzimatik modifikasyonu giderek önem kazanmaktadır. Lipazlar ile yağların modifikasyon teknolojisi geleneksel kimyasal yöntemlerle elde edilebilmesi mümkün olmayan, seçilmiş ve özel ürünlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yeni teknoloji ile gelecekte ucuz ve kolay elde edilebilen yağları istenilen özellikte fonksiyonel yağlara dönüştürmek mümkün olacaktır.

Bu makalede, enzimatik olarak modifiye yağların elde edilmesinde kullanılan lipaz enzimlerinin, kaynakları ve karakteristikleri ile reaksiyonlarına örnekler verilmiştir.

SUMMARY: In last decades, enzymatic modification of oils and fats have become more important due to the increased demand for more specific products. Special and preferred products that can not be obtained by traditional chemical methods can be manufactured by applying modification technologies with lipase enzymes. With this new technology it will be possible to produce tailored functional fats from inexpensive sources in the near future.

In this article, sources, functional properties and reactions of lipase enzymes used in modification of fats and oils are presented.

GİRİŞ

Lipitlerin önemli bir bölümünü teşkil eden gliseritler, gliserinin yağ asitleriyle verdiği esterlerdir, bunlar mono-, di- veya tri ester şeklinde olabilir, en önemlisi trigliseritlerdir. Trigliseritler, besin maddesi olarak kullanılan bitkisel ve hayvansal yağların temel bileşenleridir. Gliseritlerin temel bileşenleri olan yağ asitleri genellikle çift karbon sayılı düz zincirli doymuş veya doymamış karboksilik asitlerdir.

Yağların gliserit bağlarını hidrolizleyen enzimler lipaz enzimleri olarak adlandırılmaktadır. Hidrolizlenme reaksiyonu sonucunda mono-, digliserit, gliserol ve çeşitli yağ asitleri oluşmaktadır.

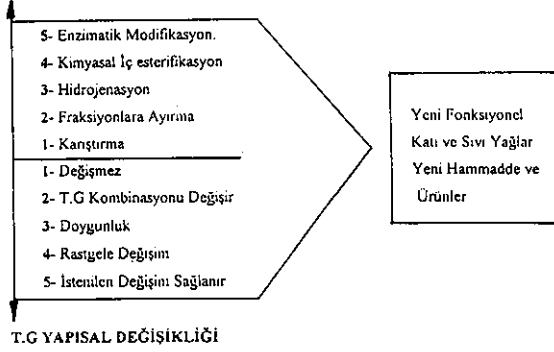
Trigliseritlerin değişik karışımlarından oluşan doğal sıvı ve katı yağlar, teknolojinin önemli hammaddelerinden biridir. Dünyada üretilen yağların % 2,5'u balıklardan, % 23'ü hayvanlardan kalan bölümünün büyük kısmı da soya fasulyesinden olmak üzere bitkilerden elde edilmektedir. Yağların teknolojideki en fazla kullanım pazarını detarjanlar ve kozmetikler oluşturur; daha sonra da sırası ile; yağlamak amacıyla kullanılan yağlar, boyalar, kaplamalar, plastikler, lastik ve tekstil gelir. Dünya üretiminin sadece % 11'i yiyeceklerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır JEFFCOAT (1988).

Trigliseritlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri; zincir uzunluğu, doymuş ve doymamış yağ asitlerinin değişik kombinasyonları, gliserole yağ asitlerinin bağlanma pozisyonları gibi moleküler yapıları ile ilişkilidir. Yağ asitlerinin moleküler zincirlerinin uzaması yağın erime noktasını yükseltmekte, kısalması ve doymamış yağ asit miktarının artması ise erime noktasını düşürmektedir. Katı ve sıvı yağların trigliseritlerinin bileşimi ve/veya moleküler yapısının değiştirilmesi ile erime noktası ve oksidasyona karşı kararlılığı değişen yeni yağlar elde edilebilmektedir. Bu amaçla, karıştırma, damıtma, hidrojenasyon ve esterifikasyon gibi değişik teknikler kullanılabilir. Katı, sıvı yağları gliserol ve yağ asitlerine çevirebilmesi ve tersinir özelliği ile bilinen lipazların yağ teknolojisinde kullanılması sonucunda önceden belirlenen özellikte yağlar üretilmektedir LARZANI ve ark. (1975), FULLBROK (1983), CINTRA ve ark. (1986), BUENROSTO ve LOPEZ (1986).

Lipaz enzimleri diğer enzimler de olduğu gibi substrat spesifiktir, dolayısıyla özel reaksiyonları katalizlemek ve arzu edilen fonksiyonlara sahip trigliseritleri üretmekte kullanılabilir. Katı ve sıvı yağların modifikasyon teknolojilerinin trigliserit yapısında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 1'de verilmektedir.

LİPAZ ENZİMLERİNİN KAYNAKLARI VE ÖZELLİKLERİ

MODİFİKASYON TEKNOLOJİSİ



Şekil 1. Katı ve sıvı yağların modifikasyon teknolojisi
(T.G: trigliserit)

Gliserol ester hidrolaz (EC 3.1.1.3) veya lipazlar bir yağ su fazında mono-, di- ve trigliseritleri hidrolizleyen enzimlerdir. Lipaz enzimleri, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Özellikle bazı fasulye türleri, hububatlar ve mikroorganizmalar bu enzimin kaynaklarıdır. Hayvanlarda değişik lipaz enzimleri bulunmaktadır. Bitkisel lipazların ticari bir uygulaması yoktur, fakat mikrobiyal ve hayvansal lipazlar yeni katkı maddelerinin üretiminde başarı ile kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar, birçok mantar, küf ve bakteriden elde edilebilmektedir SHAHANI (1975).

Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı lipazların büyük çoğunluğu optimum aktivitesini pH 5-7 arasında göstermektedir, fakat kullanılan substrata ve tuzların varlığına bağlı olarak optimum pH

değişebilmektedir. Lipazlar genellikle optimum aktivitesini 30-40°C arasında göstermektedir. Lipazların elde edildiği kaynak, optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık aralığını etkilemektedir KURASHIGE ve ark. (1989), NELSON ve ark. (1977), GROSSKOPF (1965). Çizelge 1'de değişik kaynaklardan elde edilen lipazların optimum pH ve sıcaklık aralıkları görülmektedir.

Çizelge 1. Mikrobiyal lipazların optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık, pH ve substrat seçicilikleri (K.O.U: kısa-, orta-, uzun zincirli yağasit; MG,DG,TG: mono-, di-, trigliserit)

Lipaz	Kaynağı	Optimum		Substrat Seçiciliği
		Sıcaklık (°C)	pH	
Lipaz A	<i>Aspergillus niger</i>	30-40	5,0-7,0	1-,3->>2-, K, O, U yağ asit
Lipaz M	<i>Mucor javanicus</i>	30-45	5,5-8,5	1-,3->2-, O, U yağ asit
Lipaz P	<i>Pseudomonas sp.</i>	40-65	5,0-9,0	1-,3->2-, K, U yağ asit
Lipaz F	<i>Rhizopus javanicus</i>	30-45	5,0-7,5	1-,3->>>2-, O, U yağ asit
Lipaz D	<i>Rhizopus delemar</i>	30-45	5,0-7,0	1-,3->>>2-, O, U yağ asit
Lipaz AY	<i>Candida cylindracea</i>	30-50	5,0-8,0	1-,2-,3-, K, U yağ asit
Lipaz L	<i>Candida lipolytica</i>	25-35	5,0-8,0	1-,3->>2-, O, K, U yağ asit
Lipaz G	<i>Penicillium cytopium</i>	30-50	4,5-7,5	1-,3-,>2-, DG, MG>>>>TG
Lipaz R	<i>Penicillium roqueforti</i>	25-35	6,0-8,0	1-,3->>2-, K, O>>U yağ asit
Lipaz CE	<i>Humicola lanuginosa</i>	40-60	5,5-8,5	1-,3->2-, K, U yağ asit
Lipaz CES	<i>Pseudomonas sp.</i>	50-65	5,0-10,0	1-,2-,3-, K, U yağ asit
Lipaz GC	<i>Geotrichum candidum</i>	40-50	5,0-8,0	1-,2-,3-, Oleik, linoleik asit
Lipaz N	<i>Rhizopus niveus</i>	30-45	5,0-7,0	1-,3->>>2-, O, U yağ asit
Lipaz AK	<i>Pseudomonas sp.</i>	45-55	9,0-11,0	1-,2-,3-, K, U yağ asit

Lipaz enzimlerinin substratları genelde bitkisel ve hayvansal yağlardır. Zeytinyağı, tereyağı ve sentetik gliseritler literatürde belirtilen substratlar arasında yer almaktadırlar. Bir katı veya sıvı yağın hidrolizlenme hızı kullanılan lipaz ile doğrudan ilişkilidir. Lipazın enzim aktivitesini gösterebilmesi için substrat olan yağın su içinde dağılmış olması gerekmektedir. İncelenen trigliseritlerin içerdikleri yağ asitlerinin doymuş veya doymamış olmaları enzimatik hidrolizde önem taşımaktadır.

Mikrobiyal lipazlar pozisyona bağlı spesifiklerine göre iki grup altında incelenmektedir, birinci grup seçici olmayan gruptur ve trigliseritin her üç pozisyonundan da yağ asidi salınımını sağlarlar. Bu seçici olmayan lipazlar trigliseritlerin tamamının serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini gerçekleştirirler.

İkinci grup lipazlar ise sadece belirli pozisyonlardaki yağ asitlerini hidrolizlemektedir. Lipazlar bazen de yağ asitlerine spesifiktir SAVARY ve DENSNUELLE (1956), IWAI (1988).

Gıda endüstrisinde reaksiyon arzu edilen seviyeye ulaştığında enzimler inaktive edilmektedir. Bunun için pH ve/veya sıcaklık kullanılır. Protein yapısında olan enzimler bilindiği gibi sıcaklık etkisi ile denatüre olmaktadır. Bazı lipazların ısı ile inaktivasyon süreleri Çizelge 2'de görülmektedir KILARA (1985).

Çizelge 2. Bazı mikrobiyal lipazların inaktivasyon sıcaklıkları ve süreleri

Lipazın Kaynağı	İnaktivasyon	
	Zaman (Dak.)	Sıcaklık (°C)
<i>Pseudomonas fragi</i>	15	72
<i>Rhizopus delemar</i>	15	50
<i>Aspergillus niger</i>	15	45
<i>Penicillium roqueforti</i>	10	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	70
<i>Geotrichum candidum</i>	15	60
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	40	90

Lipazların endüstriyel ölçekte üretimi genellikle seçilmiş mikroorganizmaların kültürleri ile yapılmaktadır. Bunun başlıca gerekçesi mikrobiyal üretim diğer kaynaklar ile mukayese edildiğinde çok verimlidir ve yeni türlerin daha kararlı yapıların elde edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Yüksek ölçüde spesifik lipazların elde edilebilmesi özel çalışmalar ve teknikler gerektirmektedir. Uzun ve maliyeti oldukça yüksek olan bu çalışmalar şu şekilde sınıflandırılabilir; 1- Doğal kaynaklardan elde edilen mikroorganizmaların seçimli olarak tekrar üretimi, 2- Seçilen organizmaların mutasyonu, 3- Protein mühendisliği, 4- Kültür ortamını değiştirilerek mikroorganizma optimizasyonu, 5- Genetik mühendisliği.

LİPAZLARIN REAKSİYONLARI

Lipaz enzimlerinin reaksiyonlarını endüstriyel uygulamalara göre aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür YAMANE (1988), KURASHIGE ve ark. (1989);

1. Esterlerin hidrolizi
2. Esterlerin sentezi
3. Trans esterifikasyon
 - a. Asidolisis
 - b. Alkolisis
 - c. İç esterifikasyon

Esterlerin Hidrolizi

Lipazlar ile katı ve sıvı yağların hidrolizi sonucunda geleneksel kimyasal metodların kullanıldığı hidrolize göre daha seçilmiş, spesifik yağ asitleri elde edilebilmektedir ISHIDA (1984), MUKATAKA ve ark. (1987). Trigliseritlerin geleneksel kimyasal yöntemler ile hidrolizinde reaksiyon yüksek basınç ve yüksek sıcaklıktaki sistemler ile gerçekleşmekte ve elde edilen koyu renkli ürün karışımı ise saflaştırma gerektirmektedir. Enzim katalizli lipolisis reaksiyonları ise çok daha ılıman şartlar altında yürümekte ve istenilen özellikte spesifik ürünler elde edilebilmektedir MACRAE (1989). Hidrolizleme işlemi sonunda bir trigliserit olan yağlardan yağ asit zincirleri teker teker kopartılarak önce di-, sonra monogliserit ve sonuçta gliserol ve yağ asidi karışımları elde edilebilmektedir.

Lipazların özellikleri elde edildikleri kaynaklara göre değişmektedir. Bazı lipazlar reaksiyonları spesifik olarak hidrolizlemekte bazıları ise belirli yağ asitlerine spesifik olarak aktivite göstermektedir. *Candida cylindracea*, *Pseudomonas sp.* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar spesifik olmayan grubu oluşturmaktadır. Bu enzimler trigliseritlerin bağlarını, gliserolün pozisyonunun üç farklı durumunda da hidrolizlemektedir. Pankreas, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar ise diğer bir grup olan spesifik grubu teşkil eder, bu lipazlar gliserol bağlarının sadece 1. ve 3. pozisyonundaki yağ asitlerini hidrolizlemektedir. Lipaz enzimleri ile özellikle sadece 2. pozisyonun özel yağ asitlerinin kopartılması oldukça zordur. Son yıllarda *Candida cylindracea*

dan izole edilen bir lipazın sadece 2 pozisyonunda yağ asitlerine spesifik olduğu rapor edilmiştir FUKUMOTO ve ark. (1963), KOETTING ve ark. (1988).

Genel olarak lipazların bir çoğu orta uzunluktaki yağ asitlerinin hidrolizini kolaylıkla gerçekleştirmektedir. *Penicillium roquefort* den elde edilen lipaz kısa zincirli yağ asitlerini koparttığı halde uzun zincirli yağ asitleri için hemen hemen hiç aktivite göstermez. Ayrıca lipaz enziminin elde edildiği kaynak lipazların yağ asidine göre seçicilik göstermesine neden olmaktadır. *Geotricum candidum* lipazı sadece tek bir durum için spesifiktir. Bu enzim sadece omega-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun zincirli yağ asitleri (oleik asit, linoleik asit, linolenik asit) için aktivite göstermektedir. Bazı lipaz enzimleri substratları olan gliseritlere spesifik olarak reaksiyon vermektedir. *Penicillium cytopium* lipazı substrat olarak sadece mono- ve digliseritlere aktiftir, trigliseritleri ise hidrolizlemez. Çizelge 1'de değişik mikroorganizmalardan elde edilen lipazların substrat spesifikleri özetlenmiştir. Substrat spesifik lipazların yanında daha gelişmiş özellikte lipazların elde edilebilmesi de mümkündür. Yine enzimin kaynağına bağlı olan bu özellikler, yüksek sıcaklık ve uç pH'larda, organik çözücülerde bile enzimin optimum aktivitesini gösterebilmesidir. Son zamanlarda *Pseudomonas* türü mikroorganizmalardan ve bazı mantarlardan elde edilen lipazlar bu ekstrem koşullarda optimum aktivite gösteren gruba örnek olarak verilebilmektedir KLIVANOV (1987), GRAILLE ve ark. (1988), HALLING (1989).

Esterlerin Sentezi

Lipazların katalizlediği reaksiyonlar tersinir reaksiyonlardır. Reaksiyon ortamının nem oranı reaksiyonun yönünü tayin etmektedir. Sistemin nem seviyesi değiştirilerek hidroliz ve sentez dengesi değiştirilebilir. Sistemde yüksek nem seviyesi hidrolizin senteze göre daha çok olmasına neden olur, düşük nem seviyeleri ise sentez reaksiyonunun lehinedir HENSEN ve EIGTVED (1985), LAZAR ve SEIFEN (1985).

Lipaz enzimleri ile ekstrem mikrosulu koşullarda digliseritler ve yağ asitlerinden trigliseritler sentezlenebilir. Ester sentez reaksiyonları yağ asitleri ve gliserolden mono-, di-, trigliseritlerin elde edilmesinde, serbest yağ asidi ve digliseritler içeren substrat karışımlarında serbest yağ asit miktarını azaltmak için kullanılmaktadır. Balmumu esterleri de lipaz enzimleri ile sentezlenebilmektedir. Bu reaksiyona örnek olarak laurik asit ile lauril alkol arasında lipaz katalizli reaksiyon verilebilir. Reaksiyon sonunda balmumu esteri lauril laurat elde edilmektedir BÜHLER ve WANDREY (1992). Şeker esterlerinin sentezi de yine lipaz katalizli reaksiyonlar ile, substrat olarak yağ asitleri ve glukoz kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir LATTMANN ve ark. (1990).

Trans Esterifikasyon

Asidolisis

Asidolisis reaksiyonlarında trigliserit ve serbest yağ asit karışımları lipaz enzimleri için substrat olarak kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda trigliseritlerin açıl grupları serbest yağ asitleri ile yer değiştirerek yağ asitleri zenginleştirilmiş yeni trigliseritler meydana gelmektedir POSORSKE ve ark. (1988).

Spesifik olmayan lipazlar, trigliseritlere her üç pozisyonunda da rastgele yeni yağ asitlerinin ilave edilmesine neden olmaktadır. Spesifik lipazlar ise, sadece 1. ve 3. pozisyonunda trigliseritlere yeni yağ asitlerinin katılmasını gerçekleştirebilmektedir. Trigliseritlerin asidolisis reaksiyonları ile spesifik özelliklere sahip yeni, değerli ürünler üretilebilmektedir. Hurma yağının temel gliseriti, 1,3 dipalmitoil-2-oleoil gliserol ile stearik asit veya tristearin arasındaki asidolisis reaksiyonuyla, kakao yağının temel gliseritleri olan 1(3)-palmitoil-3(1)-stearoil-2-oleoil gliserol ve 1,3-distearoil-2-oleoil gliserol elde edilebilmektedir. Sonuç olarak ucuz trigliseritlerin asidolisis reaksiyonu, oldukça pahalı olan ve kakao yağı olarak isimlendirilen değerli trigliseritin elde edilebilmesini sağlayabilmektedir. Kakao yağı özellikle gıda ve kozmetik endüstrisinde çok fazla kullanıma sahip bir maddedir CHOO ve ONG (1987), KILARA (1985).

Alkolisis

Lipaz katalizli alkolisis reaksiyonları ile bir trigliserit ve yağ alkolünden, balmumu esterleri elde edilebilmektedir. Substrat olarak gliserol ile trigliseritlerin kullanıldığı alkolisis reaksiyonları (gliserolisis), monogliseritlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır HOLMBERG ve OSTERBERG (1988), YAMANE ve ark. (1987). Fosfolipaz D ile katalizlenen özel bir alkolisis reaksiyonu fosfatidil kolinin, gliserol ile verdiği reaksiyondur. Mikrobiyal fosfolipaz D enziminin katalizlediği reaksiyon sonunda bir biosurfactant (Fosfatidil gliserol) elde edilmektedir JUNEJA ve ark. (1989).

İç esterifikasyon

İç esterifikasyon bir trigliserit karışımının fiziksel özelliklerinin değiştirilerek, yeni modifiye yağ kompozisyonlarının elde edilmesi işlemidir. Yağların geleneksel kimyasal iç esterifikasyon reaksiyonlarında sodyum metoksit veya sodyum metali kullanılmaktadır. Bu maddeler gliserit molekülleri arasında açıl gruplarının transferine neden olmaktadır. Reaksiyonda gliserit molekülleri arasında gliserolün her üç pozisyonundan da yağ asitlerinin rastgele transferi söz konusudur. Bu reaksiyon genellikle yüksek sıcaklıkta oluşmaktadır. Metalik sodyum yerine reaksiyonda katalizör olarak bir lipaz enziminin kullanıldığı sistemlerde, iç esterifikasyon reaksiyonunun olması için lipaz enzimleri ile yağların inkübe edilmesi yeterlidir. İç esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılan lipaz enzimleri spesifik ve spesifik olmayan lipazlar olarak gruplandırılmaktadır. Spesifik olmayan lipazlar, kimyasal iç esterifikasyonda olduğu gibi rastgele yeni gliseritler üretmektedir. Spesifik lipazlar ise sadece belirli pozisyonlarda gliserole bağlı yağ asitlerinin iç esterifikasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir. 1,3 Pozisyonuna spesifik lipaz sadece 1. ve 3. pozisyonlarda iç esterifikasyon reaksiyonlarını katalizlemektedir. Bu tür reaksiyonlar ile elde edilen ürünler kimyasal katalizörlerle elde edilemez. Son yıllarda bazı tropikal bitkilerin yağları ile yapılan çalışmalarda, hurma yağı veya fraksiyonları ile makine yağları, hindistan cevizi, soya fasulyesi yağının arasındaki 1,3 spesifik iç esterifikasyon reaksiyonları ilgi çekmektedir MACRAE (1983, 1984, 1985).

SONUÇ

Endüstriyel ölçekte kullanılacak özel reaksiyonların katalizi için gerekli lipazların maliyetinin çok yüksek olması, bu maddelerin tekrar kullanımına olanak sağlayacak teknolojilerin araştırılmasına neden olmaktadır. Mühendislik tasarımı da gerektiren bu işlemler, öncelikle bu enzimlerin çeşitli destek maddelerine immobilizasyonunu ve daha sonra elde edilen immobilize lipazın kesikli veya sürekli reaktörlerde kullanılabilmesini içermektedir. Bu amaçla günümüzde teknoloji açısından oldukça yeni ve maliyeti oldukça pahalı olan lipaz enzimlerinin immobilizasyonu ve reaktör tasarımları ile ilgili çalışmalar dikkat çekmektedir. Lipazların maliyeti çok yüksek olduğundan günümüzde bu maddeler ancak çok pahalı özel maddelerin üretiminde kullanılabilir. Lipaz enzimlerinin immobilizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, diatome toprağı, seramik, kalsiyum alginat, iyon değiştirici resin, hidrofilik zarlara ve polietilen glikol gibi organik ve inorganik desteklere immobilizasyon en fazla rastlanan yöntemi oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar immobilizasyon ile enzimin yarılanma ömrünün 72 saatten 1200 saatin üzerine çıkarılabileceğini göstermektedir FUKUI ve TANAKA (1982), TANAKA ve SONOMOTO (1990).

Lipazların endüstriyel ölçekte yenilebilir katı ve sıvı yağların modifikasyonunda kullanımı seksenli yılların sonlarında başlamıştır. Günümüzde geleneksel kimyasal yöntemlerle yapılan işlemlerin maliyeti, enzimatik işlemlere göre oldukça düşüktür. Çok daha nitelikli ve seçilmiş ürünlerin elde edilebilmesine rağmen enzimin maliyetinin yüksekliği enzimatik uygulamaların yaygınlaşmasını engellemektedir. Ancak biyoteknolojideki gelişmeler ile yakın bir gelecekte; daha spesifik lipazların elde edilebilmesi, daha ucuz immobilizasyon yöntemlerinin geliştirilebilmesi, tekrar kullanım olanaklarının artırılabilmesi ve immobilize enzimin yarılanma ömrünün uzatılması ile, enzimatik ve geleneksel yöntemlerin maliyetlerinin eşitleneceği beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- BUENROSTO, M. and LOPEZ, M.C.A. 1986. Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnol. Lett.* 8 505-506.
- BÜHLER, M., WANDREY, C. 1992. Oleochemicals by biochemical reactions. *Fett Sci. Technol.* 94(3)82-94.
- CHOO, C.S., ONG, A.S.H. 1987. Application of enzyme reactions to oils and fats with special reference to palm oil (T 10). International oil palm/palm oil conferences-progress and prospects. Conference II: *Technology* 29/6-1/7/1987.
- CINTRA Mc, G.O., LOPEZ, M.C.A. and VERNON, C.J. 1985. Coconut oil extraction by anew enzymatic process. *J.Food Sci.* 51 695-697.
- FUKUI, S. and TANAKA, A. 1982. Immobilized microbial cells. *Ann. Rev. Microbiol.* 36 145-172.
- FUKUMOTO, J., IWAI, M. and TSUJISAKA, Y. 1963. Studies on lipase, purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. *J. General and Applied Microbiology.* 9 353-60.
- FULLBROOK, P.D. 1983. Use of enzymes in the processing of oil seeds. *J.Am. Oil. Chem. Soc.* 60 428-430.
- GRAILLE, J., PINA, M. and MONTET, D. 1988. Biotechnology of lipids. *Oleagineux.* 43(4) 181-190.
- GROSSKOPF, J.F.W. 1965. Salivary lipase in young ruminants. *J.Vet.Res.* 32(1) 153-79.
- HALLING, P.J. 1989. Lipase-catalysed reactions in low-water organic media: effects of water activity and chemical modification. *Chem. Soc. Transact.* 17 1142-1146.
- HENSEN, T.T., EIGTVED, P. 1985. World conference on emerging technologies in the fats and oils industry. *Congres AOCS/AFECG Cannes 3-8/11/1985. Acte edites par. Baldwin, A.R. (A new immobilized lipase for interesterification and ester synthesis).* 365-569.
- HOLMBERG, K., OSTERBERG, E. 1988. Enzymic preparation of monoglycerides in microemulsion. *J. Ame. Oil Chem. Soc.* 65(9) 1544-48.
- ISHIDA, S. 1984. Hydrolysis of fats and oils by lipases. *YUSHI.* 37(8) 47-52.
- IWAI, M. 1988. Lipases. *YUSHI,* 41 (2) 80-8.
- JEFFCOAT, R. 1988. Biotechnology aspects of lipids. *Biochem. Soc. Transact.* 17 1137 1138.
- JUNEJA, L.R., YAMANE, T. and SHIMIZU, S. 1989. Enzymic method of increasing phosphatidylcholine content of lecithin. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 66(5) 714-17.
- KILARA, A. 1985. Enzyme-modified lipid food ingredients. *Process Biochemistry.* 20 35-45.
- KLIBANOV, A. 1987. Enzymatic conversions in organic solvent. *Phar. Technol.* 34-35.
- KOETTING, J., EIBL, H. and FEHRENBACH, F.J. 1988. Substrate specificity of *staphylococcus aureus* (TENS) lipases with isomeric oleoyl-Sn-glycerol ethers as substrates. *Chem. Phys. Lipids.* 47(2) 117-22.
- KURASHIGE, J., MATSUZAKI, N. and MAKABE, K. 1989. Modification of fats and oils by lipases. *J.Dispersion Science and Technology.* 10(5&5) 531-559.
- LARZANI, A., PETRINI, M.C., COZZOLI, O., GALLAVRESI, P., CAROLA, C. and JACINI, G. 1975. On the use of enzymes for vegetable-oil extraction. Preliminary Note. *Riv. Ital. Sost. gr.* 52 226-229.
- LATTMANN, R., GHISALBA, O., GYGAX, D., SCHAR, H.P. and SCHMIDT, E. 1990. Screening and application of microbial esterases for the enantioselective synthesis of chiral glycerol derivatives. *Biocatalysis.* 3(1-2) 137-44.
- LAZAR, G., SEIFEN, F. 1985. Synthesis of esters by lipases. *Anstrichmittel.* 87(10) 394-400.
- MACRAE, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Ame. Oil Chem. Soc.* 60(2) 291-4.
- MACRAE, A.R. 1984. Microbial lipases as catalyssts for interesterification of oils and fats. *Biotechnol oils fats ind.* 11 189-98.
- MACRAE, A.R. 1985. Interesterification of oils and fats. *Biocatal Org. Synth.* 22 195-208.
- MACRAE, A.R. 1989. Tailored triglycerides and esters. *Biochem. Soc. Trans.* 17(6) 1146-1148.
- MUTAKATA, S., KOBAYASHI, T., SATO, S. and TAKAHSHI, J. 1987. Enzymic hydrolysis of fats at high substrate concentrations in biphasic organic aqueous systems. *J. Ferment. Technol.* 65(1) 23-9.
- NELSON, J.H., JENSEN, R.G. and PITAS, R.E. 1977. Pregastric esterase and other oral lipases-areview. *J.Dairy Soc.*60(3) 327-62.
- POSORSKE, L., LEFEBRURE, G.K., MILLER, C.A., HANSEN, T.T. and GLENNING, B.L. 1988. Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. *J. Ame. Oil Chem. Soc.* 65(6) 922-26.
- SAVARY, P., DENSNUELLE, P. 1956. Specificity in the enzymic hydrolysis of triglycerides. *Biochem. et Biophys. Acta.* 21 349-60.
- SHAHANI, K.M., in REED, G.R. (Ed.), 1975. Lipases and esterases. *Enzymes in Food Processing.* 181-217.
- TANAKA, A., SOHOMOTO, K. 1990. Immobilized biocatalysts in organic solvents. *Chem. Tech.* 20(2) 112-17.
- YAMANE, T. 1988. Synthesis and conversion of fats and esters by lipase-catalysed reactions. *J. Agr. Chem.* 62(4) 783-6.
- YAMANE, T., RHEE, J.S., OHTA, Y. and SHIMIZU, S. 1987. Some characteristics of continuous glycerolysis of fat by lipase with microporus membrane bioreactor. *Yukagaku.* 36(7) 474-79.