

MODIFIKASI ENZIMATIK PADA CRUDE PALM OIL (CPO): INKORPORASI ASAM LEMAK OMEGA-3

Jenny Elisabeth¹⁾, F.G. Winarno²⁾, Maggy T. Suhartono²⁾,
Anton Apriyantono²⁾, Slamet Budiyo²⁾, dan Suparno³⁾

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk menginkorporasi asam lemak omega-3(n-3), EPA dan DHA, pada CPO dengan tek-nik asidolisis enzimatis menggunakan lipase *Rhizomucor miehei* (Lipozyme-IM) dan lipase *Candida antarctica* (Novozym-435). Produk hasil modifikasi ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan nutrisi produk pangan, terutama pada susu dan makanan bayi serta ibu hamil dan menyusui.

Reaksi asidolisis dilakukan antara CPO dengan konsentrat asam lemak n-3, dimana konsentrat asam lemak n-3 di-preparasi dengan metode kristalisasi urea. Reaksi dilakukan dengan menggunakan 5% enzim lipase, suhu 40°C dan pengadukan orbital 200 rpm. Untuk menghilangkan asam lemak bebas dari produk asidolisis dilakukan netralisasi dengan NaOH.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lipase *R. miehei* lebih baik digunakan sebagai biokatalisator untuk inkorporasi asam lemak n-3 pada CPO. Dengan lipase *R. miehei* tingkat inkorporasi asam lemak n-3 optimum telah tercapai pada penggunaan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1, sedangkan dengan penggunaan lipase *C. antarctica* dibutuhkan tingkat rasio 3:1. Jenis enzim lipase dan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO juga berpengaruh terhadap komposisi gliserida dalam produk CPO termodifikasi.

PENDAHULUAN

Peranan asam lemak omega-3(n-3), yakni EPA (*Eicosapentaenoic acid*) dan DHA (*Docosahexaenoic acid*) terhadap kesehatan telah banyak diketahui. Banyak hasil penelitian telah membuktikan adanya pengaruh EPA dan DHA dalam mencegah penyakit kardiovaskuler (aterosklerosis dan jantung koroner), kanker dan tumor, serta pengaruhnya pada fungsi kekebalan tubuh, inflamasi dan kadar lipid darah (Hunter, 1987; Simopoulos, 1989 dan 1991)).

Beberapa penelitian terakhir juga menunjukkan bahwa asam lemak DHA terdapat dalam jumlah yang tinggi dalam jaringan otak dan retina manusia (Connor et al., 1992; Nettleton, 1993). Karena tumbuh kembang otak dan retina manusia terjadi selama dalam kandungan (periode fetal akhir) dan pada saat bayi (periode neonatal awal), maka dapat dikatakan bahwa DHA merupakan nutrisi esensial pada pertumbuhan awal manusia.

¹⁾ Jurusan Teknologi Pertanian - Unika St. Thomas Sumut, Medan

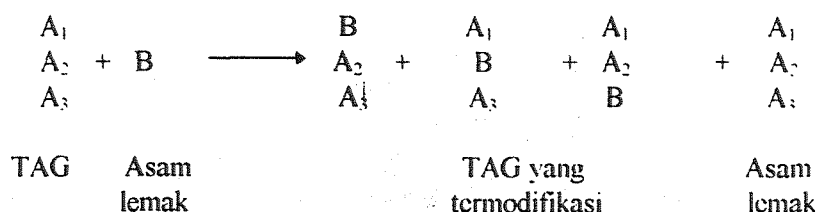
²⁾ Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi - Institut Pertanian Bogor

³⁾ Instansi Penelitian Perikanan Laut Slipi, Jakarta

Sampai sejauh ini, sumber asam lemak EPA dan DHA yang potensial dan ekonomis adalah minyak ikan. Salah satu kendala penggunaan minyak ikan sebagai sumber asam lemak n-3 adalah *flavornya yang amis*. Dalam bentuk konsentrat asam lemak n-3, kendala ini dapat sedikit teratasi karena jumlah minyak ikan yang dikonsumsi akan lebih sedikit.

Lawson dan Hughes (1988) melaporkan bahwa ketersediaan hayati asam lemak n-3 yang terbaik adalah dalam bentuk asam lemak, diikuti dengan bentuk trigliserida (TAG) dan hanya sedikit yang dapat diserap dalam bentuk ester etil. Disisi lain, asam lemak n-3 sangat mudah rusak oleh oksidasi sehingga kurang baik untuk diformulasikan dalam produk pangan. Dengan demikian perlu dikembangkan konsentrat EPA dan DHA dalam bentuk TAG sehingga asam lemak n-3 tidak hanya dikonsumsi sebagai suplemen makanan tetapi juga dapat digunakan sebagai bahan nutrifikasi produk pangan.

Preparasi TAG kaya asam lemak n-3 umumnya dikembangkan dari teknik esterifikasi dengan lipase sebagai biokatalisator. Dari semua metode yang telah dikenal, metode transesterifikasi asidolisis merupakan teknik yang lebih menjanjikan untuk diterapkan secara industrial karena separasi dan pemurnian produk gliserida kaya asam lemak n-3 dari campuran reaksi yang lebih mudah dilakukan (Yamane et al., 1992). Secara skematik reaksi asidolisis dapat dijelaskan sebagai berikut :



Tujuan penelitian ini adalah untuk menginkorporasi EPA dan DHA pada minyak kelapa sawit kasar (CPO) dengan metode asidolisis enzimatis. Dalam hal ini CPO digunakan sebagai sumber TAG, sedangkan donor asam lemak digunakan konsentrat asam lemak n-3, yang dipreparasi dengan metode kristalisasi urea (Elisabeth, 1992). Dengan enzim lipase sebagai biokatalisator diharapkan molekul EPA dan DHA pada konsentrat asam lemak n-3 akan ditransfer ke molekul TAG pada CPO dan menggantikan asam-asam lemak jenuh dan mono-enoat.

Dengan menggunakan CPO sebagai sumber molekul TAG, maka tidak hanya dapat dihasilkan suatu produk CPO yang kaya EPA dan DHA tetapi juga kaya akan vitamin A dan E. Hal ini disebabkan karena kedua jenis komponen minor ini terdapat dalam jumlah yang relatif tinggi dalam CPO.

BAHAN DAN METODE

BAHAN

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian adalah CPO, yang diperoleh dari PT Sawit Malinda/PTP I, Lubuk Pakam - Sumut, dan minyak ikan tuna (*tuna precook oil*) yang diperoleh dari PT Aneka Tuna, Gempol-Jatim. Pada minyak ikan tuna ditambahkan formula antioksidan α -tokoferol 0.1%, asam askorbat 0.02%, asam sitrat 0.02% dan lesitin kedelai 0.2% (b/b minyak ikan) (Wu, 1991).

Enzim lipase yang digunakan adalah lipase mikrobial komersial, yakni lipase *Rhizomucor miehei* amobil (Lipozyme-IM) dan lipase *Candida antarctica* amobil (Novozym-435), keduanya merupakan sumbangan dari Novo Nordisk Bioindustry Ltd. (Denmark).

METODE

Preparasi CPO kaya EPA dan DHA.

Reaksi asidolisis enzimatik dilakukan dengan campuran 5.0 gr CPO dan konsentrat asam lemak n-3 (0.5:1 hingga 3:1 b/b) serta enzim lipase 5%(b/b substrat campuran). Reaksi dilakukan pada suhu 40°C dan kecepatan pengadukan 200 rpm dalam *orbital shaker water bath*. Reaksi asidolisis dihentikan dengan penambahan 10 ml campuran aseton/etanol (1:1 v/v) dan pemisahan enzim imobil dari campuran reaksi dilakukan dengan penyaringan. Penghilangan asam lemak bebas dari campuran reaksi dilakukan dengan titrasi menggunakan NaOH metanolik 0.5 N.

Analisis konsentrasi asam lemak.

Analisis asam lemak pada sampel menggunakan kromatograf gas GC-9AM (Shimadzu, Jepang) yang dilengkapi dengan detektor FID, integrator Chromatopac C-R6A dan kolom kapiler DB-23 (30m x 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA). Preparasi sampel ester metil menggunakan metode AOCS Official Method Cc 1-62(1990). Penyuntikan sampel sebanyak 1 μ l menggunakan sistem langsung (*splitless mode*) dengan suhu injektor 250°C, suhu detektor 260°C, suhu kolom awal 140°C yang dipertahankan selama 6 menit, peningkatan suhu kolom kemudian adalah 3°C per menit hingga suhu akhir 230°C dan dipertahankan selama 20 menit. Gas Helium digunakan sebagai gas pembawa dengan tekanan 1 kg/cm², sedangkan tekanan gas Hidrogen dan udara untuk FID masing-masing adalah 0.5 kg/cm². Identifikasi dilakukan dengan menggunakan standar ester metil asam

lemak dan kuantifikasi masing-masing jenis asam lemak dilakukan dengan perbandingan terhadap standar internal C17:0.

Analisis jenis gliserida

Pemisahan gliserida dilakukan dengan teknik kromatografi lapis tipis (*Thin Layer Chromatography*) menggunakan *plate* TLC 5721 (Merck, Darmstadt, Germany). Pengembangan *plate* menggunakan eluen petroleum eter: dietil eter:asam asetat (90:10:1 v/v/v). Spot dari masing-masing sampel divisualisasi dengan penyemprotan 0.2%(b/v) larutan 2',7'-*dichlorofluorescein* dalam etanol. Spot-spot yang terbentuk diidentifikasi di bawah sinar ultraviolet, kemudian dikerok. Fraksi TAG diekstrak dengan pelarut heksana, fraksi DAG dengan campuran heksana : dietil eter (1:1 v/v) dan fraksi MAG dengan dietil eter. Setelah disaring, pelarut dari masing-masing fraksi diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 30°C hingga beratnya konstan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi asam lemak pada CPO dan konsentrat asam lemak n-3 yang digunakan sebagai substrat tertera pada Tabel 1 di bawah.

Tabel 1. Komposisi asam lemak (% b/b)¹⁾ dalam CPO dan konsentrat asam lemak n-3

Jenis asam lemak	CPO	Konsentrat asam lemak n-3
C14:0	1.19	tr ²⁾
C16:0	28.93	tr
C16:1	0.43	0.16
C18:0	3.30	tr
C18:1	23.00	tr
C18:2	8.69	0.89
C18:3	nd ³⁾	0.46
C20:4	nd	2.23
C20:5	nd	7.79
C22:5	nd	3.05
C22:6	nd	47.45
Total n-3 ⁴⁾	nd	58.74

1) Nilai merupakan rata-rata dari 2 ulangan
 2) tr = jumlah yang sangat sedikit (< 0.10%)
 3) nd = tidak terdeteksi
 4) Total asam lemak n-3 merupakan jumlah dari asam-

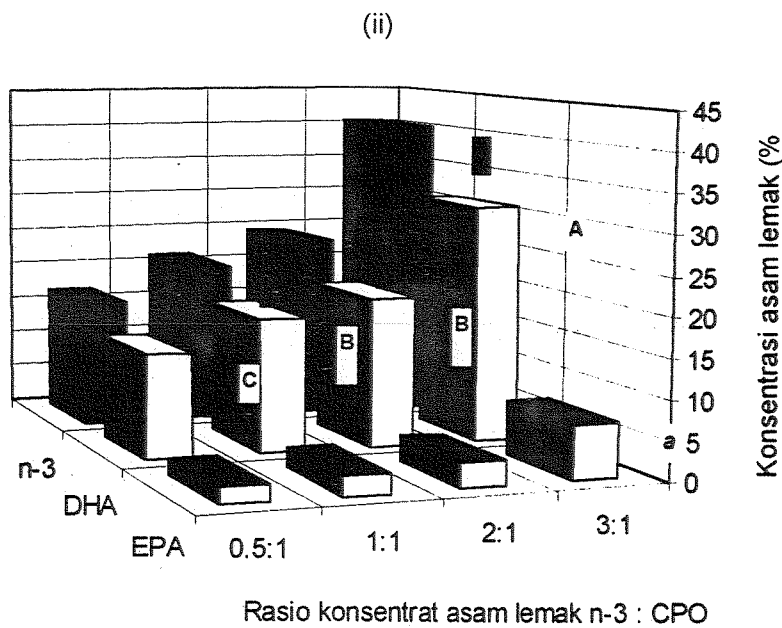
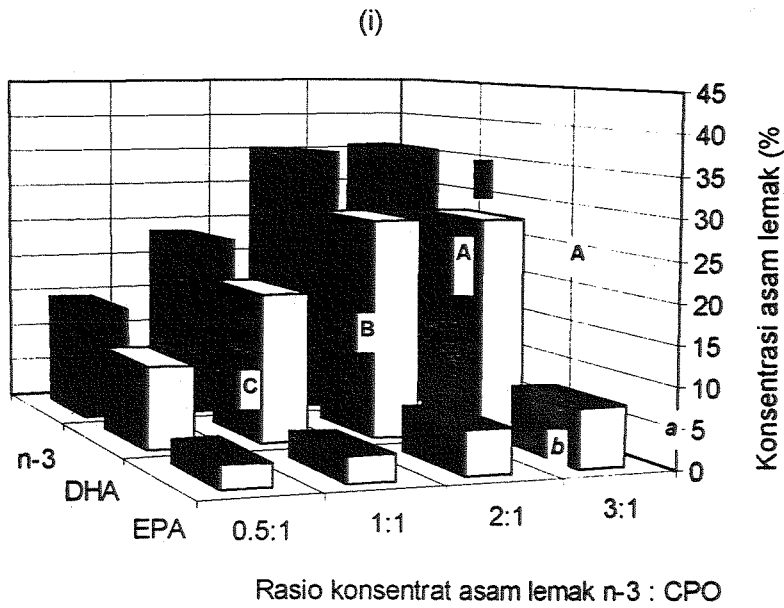
asam lemak C18:3, C20:5, C22:5 dan C22:6.

Komposisi asam lemak pada CPO sangat berubah setelah 24 jam inkubasi dengan konsentrat asam lemak n-3 dan li-pase, dimana jenis enzim lipase serta rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang digunakan berpengaruh sangat nyata terhadap konsentrasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 dalam produk CPO termodifikasi. Pengaruh rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO pada masing-masing penggunaan lipase ditampilkan pada Gambar 1.

Peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO dapat meningkatkan inkorporasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 pada CPO, baik pada penggunaan lipase *R. miehei* maupun lipase *C. antartica*. Peningkatan inkorporasi terbesar pada penggunaan lipase *R. miehei* terjadi ketika rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO ditingkatkan dari 1:1 ke 2:1, sedangkan pada penggunaan lipase *C. antartica* adalah dari 2:1 ke 3:1.

Konsentrasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 dalam produk CPO termodifikasi pada penggunaan lipase *R. miehei* serta rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 1:1 masing-masing adalah 3.05%, 18.91% dan 23.41%, sedangkan pada rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 konsentrasinya masing-masing adalah 5.49%, 27.87% dan 35.22%. Pada penggunaan lipase *C. antartica* serta rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 konsentrasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 dalam produk CPO termodifikasi masing-masing adalah 3.16%, 19.44% dan 24.25%, sedangkan pada rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 3:1 konsentrasinya masing-masing adalah 6.93%, 30.97% dan 40.30%.

Dengan demikian dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa lipase *R. miehei* merupakan biokatalisator yang lebih baik untuk produksi CPO kaya EPA dan DHA dibandingkan dengan lipase *C. antartica*, karena membutuhkan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang lebih rendah. Mengingat harga konsentrat asam lemak n-3 yang relatif mahal maka penggunaan tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang lebih rendah tentu lebih ekonomis. Studi Huang et al. (1994) juga menunjukkan hasil yang sama, di mana pada rasio molar EPA dan TAG 2:1 lipase *R. miehei* (IM60) menginkorporasi EPA dengan tingkat yang lebih tinggi dibandingkan dengan lipase *C. antartica* (SP435) pada minyak nabati



Gambar 1. Pengaruh rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO terhadap inkorporasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 pada CPO menggunakan lipase (i) *R. miehei* dan (ii) *C. antarctica*.

- Notasi huruf yang berbeda pada masing-masing jenis asam lemak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) dengan uji Duncan.
- Substrat campuran 5.0 gr, konsentrasi lipase 5% (b/b substrat), suhu 40°C, adukan orbital 200 rpm dan waktu inkubasi 24 jam.

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO dari 0.5:1 ke 1:1 tidak meningkatkan inkorporasi EPA, tetapi meningkatkan inkorporasi DHA pada CPO, baik pada penggunaan lipase *R. miehei* maupun lipase *C. antartica*. Tetapi pada peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang lebih lanjut, inkorporasi EPA mengalami peningkatan sedangkan DHA tidak. Hal ini terlihat dari tingkat inkorporasi DHA yang tidak berbeda nyata antara perlakuan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 dan 3:1 pada penggunaan *R. miehei*, serta antara perlakuan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 1:1 dan 2:1 pada penggunaan lipase *C. antartica*. Fenomena ini mungkin berhubungan dengan sifat spesifisitas enzim lipase serta tingkat kompetisi antara EPA dan DHA dalam mencapai sisi aktif enzim.

Rasio DHA dan EPA pada konsentrat asam lemak n-3 mencapai 7.5:1. Jumlah molekul DHA yang jauh lebih banyak daripada EPA ini sudah tentu berpengaruh dalam tingkat peluang keduanya untuk diinkorporasi ke dalam CPO oleh lipase. Diduga pada awalnya terjadi inkorporasi DHA pada CPO yang lebih banyak daripada EPA, yang terjadi pada penggunaan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang lebih rendah (0.5:1 dan 1:1). Tetapi setelah inkorporasi DHA terjadi pada sebagian besar molekul gliserida CPO, maka akan terjadi inkorporasi EPA yang lebih tinggi daripada DHA. Pendugaan ini dilakukan dengan asumsi bahwa lipase *R. miehei* tidak memiliki kemampuan untuk menginkorporasi DHA pada molekul gliserida yang telah memiliki DHA, sedangkan lipase *C. antartica* juga memiliki kemampuan yang rendah untuk itu pada tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO dibawah 2:1.

Pengaruh rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO terhadap tingkat inkorporasi asam lemak n-3 tampak berbeda untuk masing-masing jenis lipase, terutama untuk inkorporasi DHA.

Tingkat inkorporasi DHA dan total asam lemak n-3 telah mencapai maksimum pada rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 pada penggunaan lipase *R. miehei*. Atau dengan perkataan lain, peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO dari 2:1 menjadi 3:1 tidak meningkatkan inkorporasi DHA pada CPO. Hal ini mungkin berkaitan dengan adanya *substrate inhibition* pada tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang tinggi, serta tingkat kompetisi dan peluang antara molekul asam lemak dan molekul gliserida untuk mencapai sisi aktif enzim. Dengan jumlah molekul asam lemak yang lebih tinggi pada tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang tinggi, maka molekul gliserida kalah bersaing dengan molekul asam lemak dalam akses ke sisi aktif enzim.

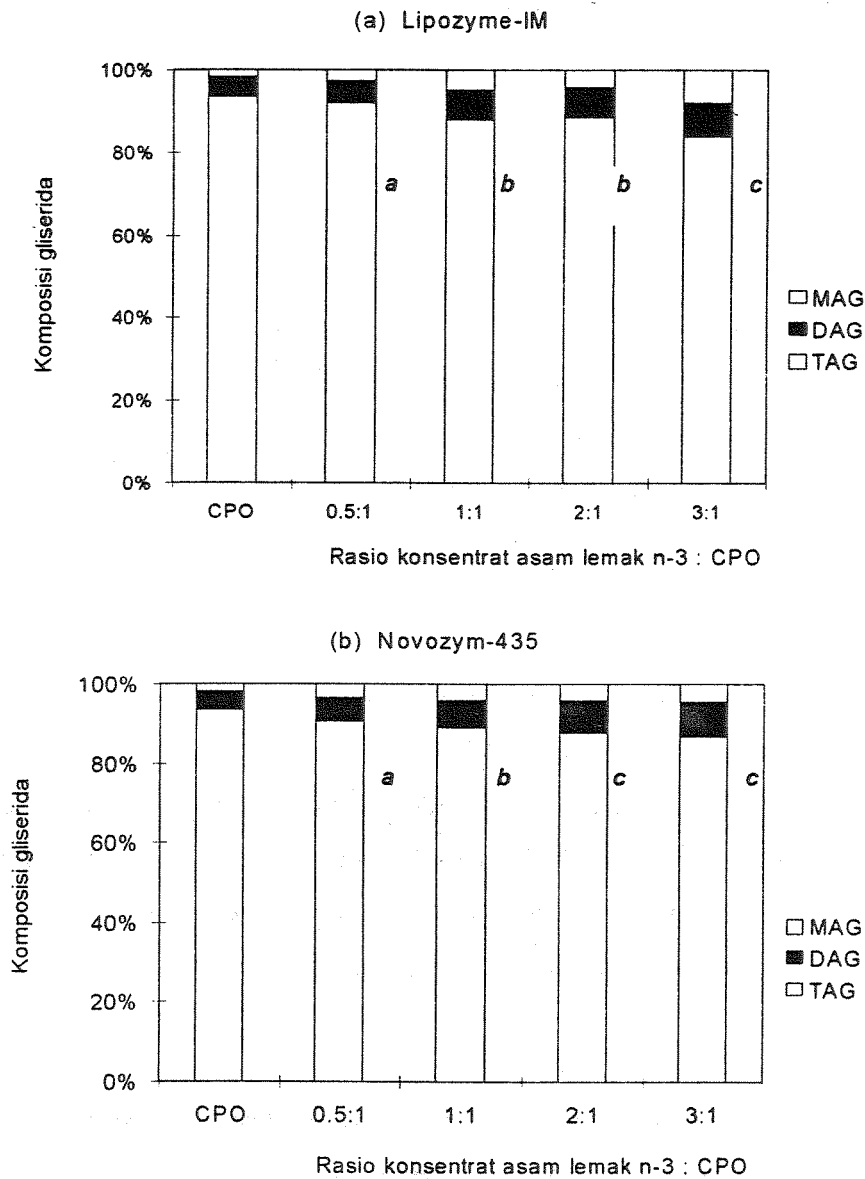
Sebaliknya pada penggunaan lipase *C. antartica* tidak tampak adanya peningkatan inkorporasi DHA dengan peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO dari 1:1 ke 2:1. Tetapi dengan peningkatan rasio ini dari 2:1 ke 3:1 terjadi lonjakan peningkatan konsentrasi DHA yang tinggi. Fenomena ini belum dapat dijelaskan dengan pasti, namun diduga berkaitan dengan sifat spesifisitas lipase terhadap jenis molekul gliserida, yang berhubungan dengan jenis asam lemak, posisi dan distribusi asam lemak serta jenis molekul gliserida (TAG atau gliserida parsial).

Dengan proses asidolisis enzimatik maka rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO mempengaruhi komposisi gliserida dalam produk CPO termodifikasi. Adapun jenis dan jumlah gliserida dalam CPO sebelum dan sesudah proses modifikasi dengan beberapa tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO ditampilkan pada Gambar 2.

Terjadi perubahan komposisi gliserida pada produk CPO setelah proses modifikasi dengan teknik asidolisis enzimatik ini, baik pada penggunaan lipase *R. miehei* maupun lipase *C. antartica*.

Kandungan MAG dan DAG dalam produk CPO termodifikasi cenderung meningkat dan kandungan TAGnya menurun dibandingkan dengan komposisi awal CPO sebelum modifikasi. Rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO pada penggunaan lipase *R. miehei* berpengaruh terhadap kandungan MAG dan TAG ($p < 0.01$) serta DAG ($p < 0.05$), sedangkan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO pada penggunaan lipase *C. antartica* tidak berpengaruh terhadap kandungan MAG tetapi berpengaruh sangat nyata ($p < 0.01$) terhadap kandungan DAG dan TAG.

Peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO pada penggunaan lipase *R. miehei* cenderung meningkatkan kandungan MAG dan DAG dalam produk CPO termodifikasi. Dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 0.5:1 diperoleh produk dengan kandungan MAG, DAG dan TAG masing-masing 2.8%, 5.3% dan 91.9%, yang komposisinya hampir sama dengan komposisi gliserida awal pada CPO. Dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 kandungan MAG, DAG dan TAG dalam produk CPO termodifikasi masing-masing adalah 4.4%, 7.2% dan 88.5%, yang tidak berbeda nyata dengan komposisi gliserida dalam produk dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 1:1. Peningkatan rasio konsentrat



Gambar 2. Komposisi gliserida pada CPO sebelum dan sesudah modifikasi enzimatik dengan beberapa tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO menggunakan lipase(i) *R. miehei* dan (ii) *C. antarctica*.

- Notasi huruf yang sama pada masing-masing gliserida menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) dengan uji Duncan.
- Substrat campuran 5.0 gr, konsentrasi lipase 5% (b/b substrat), suhu 40°C pengadukan orbital 200 rpm dan waktu inkubasi 24 jam.

asam lemak n-3 dan CPO menjadi 3:1 juga meningkatkan kandungan MAG dan DAG dalam produk sehingga kandungannya masing-masing adalah 7.8 dan 8.0% serta kandungan TAG nya 84.1%.

Demikian juga halnya pada penggunaan lipase *C. antarctica*, peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO cenderung meningkatkan kandungan DAG dan menurunkan kandungan TAG. Dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 0.5:1, komposisi gliserida dalam produk CPO termodifikasi sama dengan komposisi awal pada CPO, yakni MAG 3.6%, DAG 5.7% dan TAG 90.8%. sedangkan komposisi gliserida pada CPO termodifikasi dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 tidak berbeda dengan rasio 3:1. Kandungan MAG, DAG dan TAG dalam produk CPO termodifikasi pada penggunaan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 3:1 masing-masing adalah 4.5%, 8.8% dan 86.8%.

Perbedaan komposisi gliserida dalam masing-masing produk CPO termodifikasi ini mungkin berhubungan dengan kesetimbangan reaksi yang dipengaruhi oleh rasio konsentrat asam lemak n-3 sebagai donor EPA dan DHA serta CPO sebagai sumber molekul gliserida. Dengan tingkat rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang tinggi maka asam lemak terdapat dalam jumlah yang lebih banyak dibagian interfisial dan menghambat akses molekul gliserida kesisi aktif enzim. Akibatnya terdapat kemungkinan tidak terjadinya proses esterifikasi pada molekul-molekul gliserida parsial, sehingga peningkatan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO menurunkan kandungan TAG dalam produk CPO termodifikasi.

KESIMPULAN

Minyak kelapa sawit kasar (CPO) merupakan alternatif sumber TAG yang potensial untuk memproduksi TAG kaya asam lemak EPA dan DHA dengan teknik asidolisis enzimatik. Semakin tinggi rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang digunakan maka semakin tinggi tingkat inkorporasi asam lemak EPA dan DHA pada CPO. Sebaliknya semakin tinggi rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO yang digunakan maka semakin rendah kandungan TAGnya.

Lipase *R. miehei* lebih baik digunakan sebagai bio-katalisator dalam inkorporasi asam lemak EPA dan DHA pada CPO dengan rasio konsentrat asam lemak n-3 dan CPO 2:1 dibandingkan dengan lipase *C. antarctica*. Tingkat inkorporasi asam lemak n-3 yang dihasilkan

adalah yang tertinggi serta produk CPO termodifikasi memiliki konsen-trasi EPA, DHA dan total asam lemak n-3 masing-masing se-besar 5.5%, 27.9% dan 35.2% (b/b).

DAFTAR PUSTAKA

- American Oil Chemists` Society. 1990. Official Methods and Recommended Practises of the American Oil Chemists` Society. 4th edn. AOCS. Champaign, Illinois, USA.
- Connor, W.E., M. Neuringer and S. Reischick. 1992. Essential fatty acid: the importance of n-3 fatty acid in the retina and brain. *Nutr. Rev.* 50(4): 21-29.
- Elisabeth, J. 1992. Isolasi Asam Lemak Tak Jenuh Omega-3 Dari Hasil Limbah Pengolahan Ikan Tuna. Tesis. Program Pas-casarjana, IPB.
- Huang, K.H., C.C. Akoh and M.C. Erickson. 1994. Enzymatic modification of melon seed oil : Incorporation of eicosa-pentaenoic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 42(11): 2646-2648.
- Huang, K.H. and C.C Akoh. 1994. Lipase-catalyzed incorpo-ration of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71 (11): 1277-1280.
- Hunter, J.E. 1987. PUFAs and eicosanoid research. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64(8): 1088-1092.
- Lawson, L.D. and B.G. Hughes. 1988. Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152(1): 328-335.
- Li, Z.Y. and O.P. Ward. 1993. Lipase-catalyzed esterifi-cation of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate in organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70(8): 745-748.
- Lie, E. and G. Molin. 1992. Esterification of polyunsa-turated fatty acids with lipases from different sources. *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 27(1):73-76.
- Nettleton, J.A. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J. Am. Diet. Assoc.* 93(1): 59-64.
- Simopoulos, A.P. 1989. Summary of the NATO advanced research workshop on dietary ω -3 dan ω -6 fatty acids : Biological effects and nutritional sssentially. *Am. Inst. of Nutr.* 22: 521-527.
- _____. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 438-463.
- Wu, Kejian. 1991. Autooxidation and stabilization of polyunsatutated oils. *Disertation Abstracts International*. Vol. 54(8). 1994. Rutgers the State University of New Jersey - New Brunswick.
- Yamane, T., T. Suzuki, Y. Sahashi, L. Vikersveen, and T. Hoshino. 1992. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched fish oil by lipase-catalyzed acidolysis without solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69(11):1104-1107.

