

Amélioration de la qualité nutritionnelle des huiles de poissons

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 11, Numéro 2, 146-9, MARS/AVRIL 2004, Formulations et applications

Auteur(s) : Fabrice TURON¹, Pierre VILLENEUVE², Michel PINA²

¹ BERTIN, route de Mareuil, BP 51, 60330 Lagny-le-Sec

Fax : (+ 33) 3 44 60 80 76

<huiles-michelbertin@wanadoo.fr>

² CIRAD, Laboratoire de Lipotechnie, TA 40/16, 34398 Montpellier cedex

Résumé : Il a été démontré ces dernières années que les deux acides gras essentiels eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA), ont des propriétés physiologiques intéressantes chez l'homme. Ces effets bénéfiques ont accru l'intérêt de pouvoir disposer de préparations « ciblées », c'est-à-dire enrichies soit en EPA soit en DHA, les premières visant des applications en prophylaxie des maladies cardiovasculaires, les secondes visant à compléter l'alimentation de sujets risquant de présenter un déficit (prématurité et sénescence). Dans cette mise au point sur le biofaçonnement des huiles de poissons, nous nous attacherons à comprendre les avantages et les limites des méthodes mises en œuvre pour différencier l'EPA du DHA des huiles de poissons.

Summary : During the last few years, the physiological properties of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids have been investigated and beneficial effects can be attributed. EPA has been associated with a reduced risk of cardiovascular disease in adult, by altering platelet function towards a more anti-atherogenic state. DHA is a major constituent of the neuronal structures including retina cell membranes. For populations at high risk of deficiency like new-born babies and the elderly, diet must be supplemented with DHA. Therefore, these beneficial effects have promoted the development of dedicated preparations enriched either with EPA or DHA as long as bioavailability is needed in our diet. In this survey, the enzymatic methods to discriminate between EPA and DHA are reviewed.

Mots-clés : huile de poisson, acide eicosapentaénoïque, acide docosahexaénoïque, biofaçonnement

Keywords : fish oil, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, enzyme

ARTICLE

Longtemps, la place des huiles de poisson dans l'alimentation de l'homme s'est limitée à la seule utilisation de l'huile de foie de morue. Scientifiquement, sa consommation se justifiait par la concentration importante en vitamine D qu'elle contient. D'autres vertus thérapeutiques des huiles de poisson ont été plus récemment mises en évidence. Au début des années 1970, une étude danoise a montré la faible incidence des maladies cardiovasculaires chez les esquimaux du

Groenland, grands consommateurs de poissons [1]. Une étude hollandaise publiée en 1985 [2] a montré que la consommation quotidienne de 30 g de poisson (l'équivalent de deux repas de poisson hebdomadaires) diminue par deux la mortalité par accident coronarien. Depuis, de nombreux travaux ont bien mis en évidence l'effet hypolipémiant et antiagrégant [3] des huiles de poisson, lié à leur contenu en acides eicosapentaénoïque 20:5n-3 (EPA) et docosahexaénoïque 22:6n-3 (DHA). Par ailleurs, des effets anti-inflammatoires ont été démontrés chez l'animal [4-5], et l'intérêt thérapeutique des acides gras (AG) marins a été avancé dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques, tant chez l'animal pour le lupus [6], que chez l'homme pour le psoriasis [7] ou la polyarthrite rhumatoïde [8].

L'intérêt de la consommation d'extraits de poisson ayant été mis en évidence et confirmé, les huiles trouvées aujourd'hui en pharmacie et dans les magasins spécialisés en diététique ne sont plus l'huile de foie de morue, elle-même présentée en flacon, mais plutôt des huiles nobles sous forme de capsules molles d'huiles naturelles, parfois concentrées en AG polyinsaturés (AGPI) d'un mélange de différents poissons gras et/ou de saumon seul. L'enrichissement en AGPI ou leur présentation sous forme d'esters éthyliques, et même méthyliques, est pratiqué aux USA [9], quoique l'image de « produit naturel » soit préférée. Ces produits sont supplémentés systématiquement en tocophérols, et parfois même en carotène, afin de prévenir une éventuelle carence par surconsommation. Un seul produit d'origine marine, le MaxEPA, a obtenu en 1987 une AMM (il a depuis été radié en août 1998) dans l'indication des traitements des hypertriglycéridémies endogènes, en complément d'une diététique adaptée et assidue. Ce produit, présenté en capsules molles, est une huile de chair de poissons à forte concentration d'AGPI n-3 sous leur forme naturelle de TAG comprenant 18 % d'EPA et 12 % de DHA. L'avantage d'un tel produit soumis à l'AMM est important pour le consommateur : le dosage et la formulation sont précisés, la cible thérapeutique est claire, et les limitations de type contre-indications éventuelles sont clairement énoncées. Ce label de « qualité » est d'autant plus important pour une huile de poisson : il faut considérer que d'une part, les AGPI étant très sensibles à l'oxydation, la préparation de ce complément alimentaire nécessite un raffinage doux et contrôlé et que, d'autre part, se pose le problème de la variabilité de la composition en AGPI des huiles marines, entre différentes espèces ainsi qu'à l'intérieur d'une seule espèce. De plus, il n'est pas rare de trouver dans le commerce des formules enrichies en AGPI n-3 qui soient un mélange de glycérides partiels, alors que la forme naturelle d'une huile est un mélange de triacylglycérols (TAG) ; ceci le plus légalement possible dans la mesure où le législateur ne tient pas compte de la structure glycéridique dans sa définition d'un corps gras.

Propriétés nutritionnelles des huiles de poissons

Les poissons gras sont les espèces généralement utilisées pour préparer les huiles alimentaires. Ce sont principalement le hareng, le maquereau, la sardine, le saumon et l'anchois. Cette catégorie contient en général de 5 % à 25 % de matière grasse. Les graisses de ces poissons sont essentiellement constituées de TAG auxquels il convient d'ajouter l'insaponifiable, dont le constituant principal est le cholestérol. Cet insaponifiable contient également des alcools gras et des hydrocarbures, dont certains, comme les alkylglycérols et le squalène, sont doués de propriétés physiologiques intéressantes [10]. Parmi les AG constitutifs, ce sont les AG saturés et insaturés qui représentent pondéralement la fraction la plus importante puisqu'on estime qu'ils constituent 90 %

des lipides saponifiables. Les deux principaux AG de ces poissons, l'EPA et le DHA, représentent à eux deux de 20 à près de 40 % des AG totaux [11]. Plusieurs vertus nutritionnelles sont reconnus à ces deux AG.

Développement du nouveau-né

Il est bien connu que des quantités importantes d'AGPI en n-6 et n-3 sont nécessaires au développement du nouveau-né, car ils participent activement à la construction des membranes cellulaires, au développement rapide du cerveau et du système nerveux central. Cet aspect concerne principalement l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6) et le DHA [12]. *In vivo*, l'activité de biosynthèse de ces AG essentiels étant trop faible si l'on prend en compte les besoins, il est nécessaire de compléter l'alimentation du nouveau-né en ces AG particuliers. À cet effet, une approche envisagée a été d'utiliser des huiles de poisson dans des laits pour prématurés. Avec ce type de supplémentation, les taux de DHA dans le plasma et dans les phospholipides membranaires des globules rouges sont proches de ceux observés avec du lait maternel [13]. Toutefois, du fait du contenu en EPA des huiles de poisson, on assiste à une réduction de la synthèse endogène de l'AA et à une altération de nombreuses réactions physiologiques secondaires au cours du métabolisme des leucotriènes et des prostaglandines [14, 15].

Prévention des maladies coronariennes

Plusieurs facteurs concourent à définir le rôle protecteur des huiles de poisson contre la maladie coronarienne. D'abord, les huiles de poisson font baisser le taux de TAG dans le sang, sans doute en réduisant leur synthèse dans le foie [16] et en accélérant la β -oxydation mitochondriale ou peroxysomale [17]. Ensuite, l'EPA a un effet anti-agrégant plaquettaire en modérant la synthèse de thromboxane A₂ (TXA₂) agrégante : il intervient soit en limitant le substrat arachidonate de TXA₂ [18], soit en inhibant, de manière compétitive, la conversion de l'AA en TXA₂ par la cyclooxygénase [19]. Enfin, le DHA diminuerait la pression sanguine et la tension artérielle systolique et diastolique [20, 21].

Prévention du risque de cancer

Une étude menée chez l'homme a constaté que le risque de cancer de la prostate est diminué par une alimentation riche en huiles de poisson [22] sans toutefois en donner l'explication. À l'inverse, il n'a pas été trouvé d'association significative entre un apport alimentaire riche en AGPI à longue chaîne et le risque de cancer du sein [23].

Répartition de l'EPA et du DHA sur les triacylglycérols de poissons

Compte tenu d'une part de l'incidence nutritionnelle de l'EPA et du DHA et, d'autre part, de l'importance de la biodisponibilité des AGPI, il convient de connaître parfaitement la répartition de ces AG sur les TAG de poisson. Pour étudier cette répartition, on rappelle que la méthode enzymatique développée par Luddy *et al.* [24] ne peut pas être utilisée de façon valable. En effet, la lipase pancréatique hydrolyse plus lentement les liaisons esters primaires dans lesquelles on trouve des AG hautement insaturés (plus de 20 carbones et 3 insaturations) que les esters primaires d'AG en 16 et 18 carbones, peu ou pas insaturés [25]. Du fait que des AG en 20:5 et 22:6 sont présents en positions externes des huiles de poissons, les β -MAG obtenus par action de la lipase ne sont pas représentatifs de l'ensemble des AG en position interne. Par contre la méthode chimique, qui utilise

les réactifs de Grignard, a été utilisée avec succès pour étudier différentes huiles de poissons et de mammifères marins [26-28]. Il ressort de ces études que l'EPA et le DHA, lorsqu'ils proviennent de mammifères marins, sont le plus souvent situés en positions externes sur les molécules de TAG, alors que ces deux AG sont situés préférentiellement en position interne chez le poisson. Cette différence de structure chimique est à rapprocher d'une observation physiologique, et confirme une fois de plus l'importance de la distribution des AG alimentaires sur les trois positions du glycérol. En effet, la composition en AG des globules rouges des Inuits, qui dans le Nord-Ouest canadien se nourrissent principalement de mammifères marins, est très différente de celle de personnes se nourrissant de poissons. Comme ce sont les seuls AG situés en position interne qui sont utilisés pour s'accumuler dans les membranes, les différences des régiocompositions en AG dans les globules rouges s'expliqueraient alors par leur alimentation différente [1].

Pour préciser la stéréodistribution des huiles de poisson, Gunstone [29] a utilisé la spectroscopie RMN du C¹³ en montrant que le DHA est préférentiellement situé en position interne (59 à 87 %) alors que l'EPA présente une distribution randomisée sur les trois positions de la molécule.

Enrichissement des huiles de poissons

En prenant en compte tout l'intérêt que représentent l'EPA et le DHA pour la santé humaine, de nombreux procédés de concentration et de séparation de ces deux AG ont été testés. Compte tenu de la structure chimique voisine de ces deux AG, aucune méthode physique ne semble cependant satisfaisante pour séparer l'EPA du DHA. Ainsi la distillation moléculaire, la cristallisation à basse température, l'extraction assistée par fluide supercritique, et même la complexation à l'urée ne permettent au mieux que de concentrer ces deux AG, sans toutefois les séparer. D'autant plus que ces procédés, le plus souvent mis en œuvre dans des conditions contraignantes de température et de milieux réactionnels, peuvent conduire à une détérioration des TAG par oxydation, isomérisation de position et/ou de configuration. C'est pourquoi ces procédés ne seront pas davantage développés dans cet article.

Par contre, le fait que ces deux AG ne soient pas répartis de la même manière sur les trois positions des molécules de TAG est un élément majeur pour les différencier en utilisant soit des lipases *sn*-1,3 régiosélectives, soit des lipases DHA « typosélectives », c'est-à-dire typosélectives d'un AG différent de l'AG que l'on veut concentrer.

Intérêt des lipases microbiennes à faible activité vis-à-vis du DHA

L'intérêt des lipases microbiennes à faible activité vis-à-vis du DHA a été mis en exergue par Tanaka [30] lors d'études conduites sur l'huile de thon. Les auteurs ont doublé la concentration de DHA initiale dans la fraction acylglycérol par une hydrolyse catalysée par une lipase typosélective de l'acide oléique extraite de *Candida rugosa*. Des observations similaires ont été faites avec les lipases extraites de *Mucor miehei* [31], et *Geotrichum candidum* [32-34]. Comment rendre compte du comportement de ces enzymes vis-à-vis du DHA ? En considérant le fait que les AGPI à longue chaîne montrent une résistance à l'hydrolyse catalysée par ces lipases. Une explication possible est donnée par la géométrie de ces AG [35]. Dans leur configuration naturelle, les molécules sont coudées au

niveau de chacune de leurs doubles liaisons. Du fait de cette géométrie spatiale, ils présentent un trop fort encombrement stérique pour atteindre le site actif de l'enzyme, et en conséquence, l'enzyme catalyse moins efficacement l'hydrolyse de ces AGPI ; dans ces conditions, la fraction acylglycérol résiduelle se trouve fortement enrichie de ces mêmes AGPI.

Utilisation de lipases régiosélectives

L'EPA étant généralement plus concentré sur les positions externes des TAG de poisson que ne l'est le DHA, l'intérêt d'utiliser une lipase 1-3 sélective pour différencier le DHA aux dépens de l'EPA semble évident. Une telle enzyme peut être utilisée soit en hydrolyse, soit en acidolyse. Mise en œuvre pour hydrolyser des TAG de poisson, une lipase 1-3 sélective conduit à un enrichissement de la teneur en DHA, qui s'accompagne *de facto* d'une diminution de la teneur en EPA dans les acylglycérols néoformés. En comparant l'activité en hydrolyse de plusieurs enzymes, Nieto [36] a constaté que la lipase d'*Aspergillus niger* a le rendement le plus faible alors que des essais menés avec le lipozyme IM 20 extrait de *Rhizomucor miehei* suggèrent que l'hydrolyse est rapide et quasi totale en 40 heures. Dans tous les cas, l'hydrolyse conduisant à des fractions de glycérides partiels ($\alpha\beta$ -DAG et β -MAG) riches en DHA, une étape supplémentaire d'estérification est nécessaire pour re-synthétiser des TAG. À titre d'exemple, cette estérification a été menée avec succès par Moore [37] en utilisant la lipase de *Rhizomucor miehei* sous pression réduite pour éliminer l'eau produite par la réaction.

En outre, des études en acidolyse des TAG de poisson contre des AG particuliers ont conduit à une incorporation élevée de ces AG dans les huiles. D'abord, en utilisant du DHA sous forme d'AG libre en présence d'une lipase *sn*-1,3 sélective extraite de *Pseudomonas* sp., on enrichit une huile de sardine en DHA, sa teneur passant de 29 % à 44,5 % [38] ; ensuite, en utilisant de l'acide caprique et le lipozyme comme biocatalyseur, on incorpore l'AG court sur les positions externes des TAG de poisson tout en conservant le DHA et l'EPA au centre de la molécule de glycérol [39] ; enfin, en utilisant de la tricapriline et des esters éthyliques d'EPA et de DHA comme substrats du lipozyme, on synthétise des TAG contenant un AGPI sur les positions externes et un AG énergétique au centre de la molécule [40]. Cependant, toutes ces réactions d'interestérification synthétisent des TAG qui contiennent encore de l'EPA en position interne.

Pour tenter d'éliminer complètement l'EPA, dont on sait qu'il n'est pas recommandé dans le cas de la nutrition infantile, il a été envisagé de biofaçonner des huiles végétales. Les travaux de Sridhar et Lakshminarayana [41] et ceux de Li et Ward [42] se sont intéressés à cette stratégie en incorporant du DHA sous forme libre dans des TAG végétaux. Ils ont ainsi synthétisé des TAG dont les positions externes contiennent 20 % de DHA. Seulement, en considérant que seule la position interne présente la meilleure biodisponibilité, l'intérêt d'un tel enrichissement est très relatif en regard au coût élevé du DHA sous forme libre.

Dans ce contexte, on comprend tout le problème que peut poser la restructuration d'une huile de poisson qui dans certains cas n'apporte aucune amélioration, voire même déprécie la qualité nutritionnelle de l'huile native. De ce point de vue, il est bien admis qu'une réaction d'acidolyse orientée par une lipase *sn*-1,3 sélective permet à la fois de concentrer le DHA de l'huile native aux dépens des autres AGPI (en particulier l'EPA) et de modifier la composition en AG sur les positions externes des TAG. Cependant, peut se poser le problème de la séparation des AG libres et des TAG interestérifiés après réaction. Une distillation moléculaire semble *a priori* la solution idoine, même si,

paradoxalement, un auteur a présenté cette technique comme un risque d'oxydation des AGPI très thermosensibles [43].

Enfin, on se rend compte que les applications industrielles du biofaçonnement des huiles de poissons sont limitées par le prix des lipases microbiennes et leur durée de vie. Toutefois à l'avenir, on peut penser que, compte tenu de leur disponibilité et de leur faible coût, l'utilisation des lipases végétales (en fait des extraits végétaux en poudre pouvant exprimer des activités biocatalytiques) vienne concurrencer celle des lipases microbiennes pour améliorer la qualité nutritionnelle des huiles de poissons. N

RÉFÉRENCES

1. BANG H, DYERBERG J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West Coast Eskimos. *Acta Med Scand* 1972 ; 192 : 85-94.
2. KROMHOUT D, BOSSCHIETER E, DE LEZENNE COULANDER C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985 ; 312 : 1205-9.
3. NORDOY A, DAVENAS E, CIAVATTI M, RENAUD S. Effect of dietary (n-3) fatty acids on platelet function and lipid metabolism in rats. *Biochim Biophys Acta* 1985 ; 835 : 491-500.
4. TERANO T, SALMON J, HIGGS G, MONCADA S. Eicosapentaenoic acid as a modulator of inflammation. *Biochem Pharmacol* 1986 ; 35 : 779-85.
5. ROBINSON D, PRICKETT J, MAKOUL G, STEINBERG A, COLVIN R. Dietary fish oil reduces progression of established renal disease in mice and delays renal disease in BXSD and MRL/1 strains. *Arthritis Rheum* 1986 ; 29 : 539-46.
6. KELLEY V, FERETTI A, IZUI A, STROM T. Fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid reduces cyclooxygenase metabolites, and suppresses lupus in MRL-lpr mice. *J Immunol* 1985 ; 134 : 1914-9.
7. BITTNER S, TUCKER W, CARTWRIGHT I, BLEEHEN S. A double blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1988 ; I : 378-80.
8. KREMER JM, JUBIZ W, MICHALEK A, RYNES RI, BARTHOLOMEW LE, BIGAOUETTE J. Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double blind, controlled, crossover study. *Ann Intern Med* 1987 ; 106 : 497-503.
9. ACKMAN RG. The year of fish oil. *Chem Ind* 1988 ; 5 : 139-45.
10. PUGLIESE PT, JORDAN K, CEDERBERG H, BROHULT J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *J Altern Complement Med* 1998 ; 4 : 87-99.
11. TSUCHIYA T. Biochemistry of fish oils. In : *Fish as Food*, Academic Press, New York, 1961 ; pp. 211-58.
12. MENDYF. Acides gras polyinsaturés (AGPI) et premières années. *OCL* 1995 ; 2 : 36-45.

13. CARLSON SE, COOKE RJ, WERKMAN SH. First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids* 1992 ; 27 : 901-7.
14. NEDDLEMAN P, RAZ A, MINKES MS. Triene prostaglandins : protacylin and thromboxane synthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 944-8.
15. LEE TH, HOOVER RL, WILLIAMS JD. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med* 1985 ; 312 : 1217-24.
16. WILLIAMS MA, TINOCO J, HINCENBERGS I, THOMAS B. Increased plasma triglyceride secretion in EFA-deficient rats fed diets with or without saturated fat. *Lipids* 1989 ; 24 : 448-53.
17. YAMAZAHI RK, SHEN T, SCHADE GB. A diet rich in (n-3) fatty acids increases peroxisomal beta-oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxication activities in the rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1987 ; 920 : 62-7.
18. NORDOY A, LYNGMO V, VARTUN A, SVENSSON B. Docosapolyenoic fatty acids and human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1986 ; 11 : 31-6.
19. CROSET M, GUICHARDANT M, LAGARDE M. Different metabolic behavior of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 961 : 262-9.
20. KNAPP HR, FITZGERALD GA. The antihypertensive effects of fish oil. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 1037-43.
21. MORI TA, BAO DQ, BURKE V. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 1999 ; 34 : 253-60.
22. NORRISH AE, SKEAFF CM, ARRIBAS GLB, SHARPE SJ, JACKSON RT. Prostate cancer risk and consumption of fish oils : a dietary biomarker-based case-control study. *Br J Cancer* 1999 ; 81 : 1238-42.
23. WILLETT WC. Specific fatty acids and risks of breast and prostate cancer : dietary intake. *Am J Clin Nutr* 1997 ; 66 : S1557-1563.
24. LUDDY FE, BARFIELD RA, HERB SF, MAGIDMAN P, RIEMENSCHNEIDIER RW. Pancreatic Lipase Hydrolysis of Triglycerides by a Semimicro Technique. *J Am Oil Chem Soc* 1963 ; 41 : 693-6.
25. ENTRESSANGLES B, PASERO L, SAVARY P, SARDA L, DESNUELLE P. Influence de la nature des chaînes sur la vitesse de leur hydrolyse par la lipase pancréatique. *Bull Soc Chim Biol* 1961 ; 43 : 581-5.
26. BROCKERHOFF H, ACKMAN RG, HOYLE RJ. Specific distribution of fatty acids in marine lipids. *Arch Biochem Biophys* 1963 ; 100 : 9-12.
27. ACKMAN RG. Some possible effects on lipid biochemistry of differences in the distribution on glycerol of long-chain n-3 fatty acids in the fats of marine fish and marine mammals. *Atherosclerosis* 1988 ; 70 : 171-3.

28. TURON F, BACHAIN P, CARO Y, PINA M, GRAILLE J. A direct method for regiospecific analysis of TAG using α -MAG. *Lipids* 2002 ; 37 : 817-21.
29. GUNSTONE FD, SETH S. A study of the distribution of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid between the α and β glycerol chains in fish oils by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 1994 ; 72 : 119-26.
30. TANAKA Y, HIRANO J, FUNADA T. Concentration of docosahexaenoic in glyceride by hydrolysis of fish oil with *Candida cylindracea* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1992 ; 69 : 1210-4.
31. HILLS MJ, KLEWITT I, MUKHERJEE KD. Enzymatic fractionation of fatty acids : enrichment of gamma-linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1990 ; 67 : 561-4.
32. SHIMADA Y, MARUYAMA K, OKAZAKI S, NAKAMURA M, SUGIHARA A, TOMINAGA Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum candidum* lipase. *J Am Oil Chem Soc* 1994 ; 71 : 951-4.
33. MC NEILL GP, ACKMAN RG, MOORE SR. Lipase catalysed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 1996 ; 73 : 1403-7.
34. WANASUNDARA UN, SHAHIDI F. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. *J Am Oil Chem Soc* 1998 ; 75 : 945-51.
35. HARALDSSON GG, GUDMUNSSON BO, ALMARSSON O. The preparation of homogenous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron Lett* 1993 ; 34 : 5791-4.
36. NIETO S, GUTIERREZ J, SANHUEZA J, VALENZUELA A. Preparation of *sn*-2 long chain polyunsaturated monoacylglycerols from fish oil by hydrolysis with a stereospecific lipase from *Mucor miehei*. *Grasas y Aceites* 1999 ; 50 : 111-3.
37. MOORE SR, MC NEILL GP. Production of triglycerides enriched in long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil. *J Am Oil Chem Soc* 1996 ; 73 : 1409-14.
38. ADACHI S, OKUMURA K, OTA V, MANKURA M. Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides. *J Ferment Bioeng* 1993 ; 75 : 259-64.
39. JENNINGS BH, AKOH CC. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 1999 ; 76 : 1133-7.
40. HAN JJ, YAMANE T. Enhancement of both reaction yield and rate of synthesis of structured triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid under vacuum with water activity control. *Lipids* 1999 ; 34 : 989-95.
41. SRIDHAR R, LAKSHMINARAYANA G. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into ground-oil by lipase-catalysed ester interchange. *J Am Oil Chem Soc* 1992 ; 69 : 1041-2.
42. LI ZY, WARD OP. Enzyme-catalyzed production of vegetable oils containing omega-3 polyunsaturated fatty acid. *Biotechnol Lett* 1993 ; 15 : 185-8.

43. XU X, BALCHEN S, HOY CE, ADLER-NIELSEN J. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalysed interesterification : preliminary study on incorporation and acyl migration. *J Am Oil Chem Soc* 1998 ; 75 : 301-8.