การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสสำหรับการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว
Application of lipase for preparation of polyunsaturated fatty acids

วีระ ปิยธีรวงศ์*
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Weera Piyatheerawong*
Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University

บทคัดย่อ

การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวให้คงคุณสมบัติทางชีวภาพเป็นกรดไขมันที่จำเป็น ซึ่งมีส่วนช่วยเสริมสุขภาพ ส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเตรียมกรดไขมันดังกล่าว โดยเฉพาะการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสมีข้อดีคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาหลายประเภท เอนไซม์มีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ และมีความจำเพาะสูง ดังนั้นนอกจากใช้เอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันให้เป็นกรดไขมันในขั้นตอนแรกแล้ว ยังใช้เอนไซม์ไลเปสในการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวอย่างมีประสิทธิภาพในขั้นตอนที่สอง ด้วยการเร่งปฏิกิริยา selective esterification กับแอลกอฮอล์ เพื่อลดสัดส่วนของกรดไขมันอื่นๆ อีกด้วย

คำสำคัญ : กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ไลเปส กรดไขมันเข้มข้น

Abstract

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are recognized as essential fatty acids, which have beneficial effects on human health. Preparation of bioactive PUFAs is usually performed by biocatalysis. The advantages of using lipase for fatty acid production are enabling catalysis of several reactions, consistent activity under various conditions and high specificity. Enrichment of PUFAs could not achieve by selective hydrolysis of oil. On the other hand, selective esterification is an effective route for increasing the content of fatty acid. Thus, a two-step enzymatic method is frequently performed. Initially, the preparation of fatty acid is accomplished by enzymatic hydrolysis. Then, the concentration of PUFAs in the fraction is done by reducing portion of other fatty acids using selective esterification with alcohol.

Keywords : Polyunsaturated fatty acids, lipase, concentrated fatty acid

***Corresponding author.** E-mail: weera@kku.ac.th

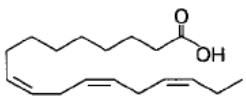
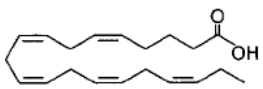
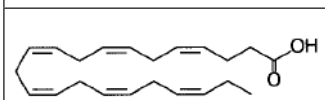
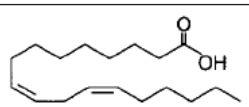
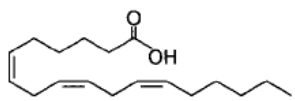
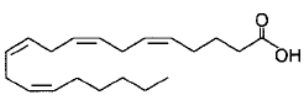
บทนำ

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) เป็นกรดไขมันชนิดที่พบพันธะคู่ภายในโครงสร้างมากกว่า 2 ตำแหน่ง และมีความยาวของคาร์บอนอะตอมมากกว่า 18 อะตอม สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามตำแหน่งที่ 1 ของพันธะคู่ที่นับจากปลายด้านเมธิล ได้แก่ ω-3 PUFAs, ω-6 PUFAs และ ω-9 PUFAs หรือ *n*-3 PUFAs, *n*-6 PUFAs และ *n*-9 PUFAs อย่างไรก็ตาม การแบ่งกลุ่มของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวยังสามารถแบ่งตามตำแหน่งที่ 1 ของพันธะคู่ที่นับจากปลายด้านคาร์บอกซิลิกได้เช่นกัน โดยจะใช้ Δ หรือ Z แทนพันธะคู่ แบบ *cis* – configuration ดังตารางที่ 1 (Scrimgeour & Harwood, 2007) กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวกลุ่มที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ คือ ω-3 PUFAs และ ω-6 PUFAs ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้เองในร่างกาย แต่จำเป็นต้องได้รับจากการบริโภค เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ และ organelle membrane มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน และระบบควบคุมปริมาณคลอเรสเตอรอล เช่น fatty acid syntase และ cholesterol-7-α-hydroxylase เป็นต้น จึงมีส่วนช่วยป้องกันโรคต่างๆ เช่น ป้องกันโรคหัวใจ และหลอดเลือด อาการอักเสบต่างๆ รวมทั้งมีบทบาทช่วยเพิ่มพัฒนาการของสมอง และระบบประสาท (Rubio-Rodríguez *et al*., 2010) ดังนั้นจึงมีความต้องการกรดไขมันในกลุ่มนี้อย่างมากในอุตสาหกรรมยา และอาหารเสริมสุขภาพ วัตถุดิบที่นำมาผลิตควรคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัย มีคุณภาพดี และเป็นวัตถุดิบจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ น้ำมันพืชที่ขายในตลาดทั่วไป เช่น น้ำมันจากถั่วเหลือง และทานตะวัน ถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับผลิต ω-6 PUFAs ส่วนน้ำมันจากปลา และสัตว์ทะเลใช้ผลิต ω-3 PUFAs (Ward & Singh, 2005) การผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเข้มข้น นอกจากใช้การย่อยสลายน้ำมันด้วยปฏิกิริยาทางเคมีแล้ว การเลือกใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปสมีข้อดีคือ มีความจำเพาะสูงต่อซับสเตรต และปฏิกิริยาเกิดในสภาวะไม่รุนแรง ทำให้ผลิตภัณฑ์กรดไขมันที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น และยังคงคุณสมบัติช่วยเสริมสุขภาพ

ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

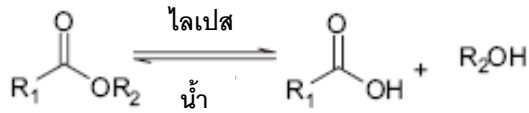
ไลเปสจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมัน และไขมันให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาผันกลับได้คือ การสังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) ระหว่างกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นได้ด้วยการปรับสมดุลย์

ตารางที่ 1 กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวกลุ่มต่างๆ (ดัดแปลงจาก Scrimgeour & Harwood, 2007)

สูตรโครงสร้าง	ชื่อสามัญ	ชื่อทางการค้า (คำย่อ)	ชื่อย่อ	กลุ่ม ω-
	Z, Z, Z- 9, 12, 15-Octadecatrienoic acid	α-Linolenic acid (ALA)	18:3 9*c*, 12*c*, 15*c*	3
	Z, Z, Z, Z, Z- 5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid	Eicosapentaenoic acid (EPA)	20:5 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*, 17*c*	3
	Z, Z, Z, Z, Z, Z- 4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic acid	Docosahexaenoic acid (DHA)	22:6 4*c*, 7*c*, *10c, 13c, 16c, 19c*	3
	Z, Z- 9, 12-Octadecadienoic acid	Linoleic acid (LA)	18:2 9*c*, 12*c*	6
	Z, Z, Z- 6, 9, 12-Octadecatrienoic acid	γ-linolenic acid (GLA)	18:3 6*c*, 9*c*, 12*c*	6
	Z, Z, Z, Z- 5, 8, 11, 14-Eicosatetraenoic acid	Arachidonic acid (ARA)	20:4 5c, 8*c*, 11*c*, 14*c*	6

โดยการลดปริมาณน้ำในระบบ และการเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ (transesterification) สามารถแบ่งออก เป็น 3 กลุ่มคือ การเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ระหว่างเอสเทอร์ – แอลกอฮอล์ (alcoholysis) เอสเทอร์ – กรดไขมัน (acidolysis) และระหว่างเอสเทอร์ต่างๆ (interesterification) (ภาพที่ 1) เอนไซม์กลุ่มนี้พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีศักยภาพสูงในการผลิตเชิงการค้า จากการศึกษาอย่างกว้างขวาง พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวต่อสภาพความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิสูง ตัวทำละลายอินทรีย์ และมีความจำเพาะในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ regio-selectivity, stereo-selectivity และ fatty acid specificity ตัวอย่างความจำเพาะแบบ regio-selectivity หมายถึงเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ในน้ำมันไตรกลีเซอไรด์ที่แตกต่างกัน เช่น 1,3-specific lipase คือเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 มากกว่าตำแหน่งที่ 2 ของพันธะเอสเทอร์ในน้ำมันไตรกลีเซอไรด์ หรือ non-specific lipase คือเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่งใดของพันธะเอสเทอร์ในน้ำมันไตรกลีเซอไรด์ ส่วนความจำเพาะแบบ stereo-selectivity หมายถึงเอนไซม์มีความจำเพาะในการเข้าทำปฏิกิริยากับ

1) Hydrolysis



2) Esterification

3) Transesterification

a) Alcoholysis

b) Acidolysis

c) Interesterification

ภาพที่ 1 การเร่งปฏิกิริยาชนิดต่างๆ โดยเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Ghanem, 2007)

สารที่เป็น enantiomer ชนิดใดชนิดหนึ่ง เช่น *R* – configuration หรือ *S* – configuration หรือ *L* – configuration หรือ D – configuration เป็นต้น ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยากับสารที่เป็น enantiomer นั้นมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสบางชนิดจะมีความจำเพาะแบบ fatty acid specificity หมายถึงเอนไซม์มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับชนิดของกรด เช่น ไลเปสบางชนิดจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดไขมันสายสั้นเป็นองค์ประกอบได้ดี (จำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่า 6 อะตอม) หรือเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดไขมันสายกลางเป็นองค์ประกอบได้ดี (จำนวนคาร์บอนอะตอมระหว่าง 6 – 12 อะตอม) หรือเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันที่มีกรดไขมันสายยาวเป็นองค์ประกอบได้ดี (จำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่า 12 อะตอม) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 (Schmid & Verger, 1998; Reetz, 2002; Hayes, 2004; Ghanem, 2007)

ตารางที่ 2 เอนไซม์ไลเปสทางการค้าที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการเตรียมกรดไขมัน (ดัดแปลงจาก Hayes, 2004)

ชื่อทางการค้า	บริษัทที่ทำการผลิตเอนไซม์	แหล่งของเอนไซม์	ความจำเพาะของเอนไซม์
Lipase A “Amano” 12	Amano Enzyme Inc.	*Aspergillus niger*	1,3-specific lipase และมีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายสั้น
Lipase AK 20 “Amano”	Amano Enzyme Inc.	*Pseudomonas fluorescens*	non-specific lipase
Lipase AYS “Amano”	Amano Enzyme Inc.	*Candida rugosa*	non-specific lipase และมีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายกลาง
Lipase F-AP 15 “Amano” 15	Amano Enzyme Inc.	*Rhizopus oryzae*	1,3-specific lipase และมีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายสั้น และกรดไขมันสายกลาง
Lipase M “Amano” 10	Amano Enzyme Inc.	*R. javanicus*	1,3-specific lipase
Lipase PS-C-II	Amano Enzyme Inc.	*Burkholderia cepacia*	non-specific และ stereo-selective lipase
Lipase R “Amano” G	Amano Enzyme Inc.	*Penicillium roquefortii*	1,3-specific lipase และมีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายสั้น และกรดไขมันสายกลาง
Lipozyme RM IM	Novozyme Inc.	*Rhizomucor miehei*	1,3-specific lipase และมีประสิทธิภาพสูงต่อการเร่งปฏิกิริยา interesterification
Lipozyme TL IM	Novozyme Inc.	*Thermomyces lanuginosa*	non-specific lipase และมีประสิทธิภาพสูงต่อการเร่งปฏิกิริยา interesterification
Novozym 435	Novozyme Inc.	*C. antarctica*	non-specific และ stereo-selective lipase

การเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

การนำเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะสูงต่อชนิดของกรดไขมันเป้าหมายมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันเพื่อเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวให้มีความเข้มข้นสูงนั้น น่าจะเป็นวิธีการที่ดำเนินการได้ง่าย อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะสูงดังกล่าว ซึ่งวิธีการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวนั้น ส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์ช่วยเร่งปฏิกิริยาสองขั้นตอน คือ การเตรียมกรดไขมันอิสระโดยการย่อยสลายน้ำมัน หลังจากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวด้วยปฏิกิริยา selective esterification กับแอลกอฮอล์ (Shimada *et al*., 2001; Hayes, 2004; Piazza *et al*., 2007)

ขั้นตอนที่ 1: การเตรียมกรดไขมันโดยการย่อยสลายน้ำมัน

โดยทั่วไปการเตรียมกรดไขมันในอุตสาหกรรมจะใช้กระบวนการ Colgate–Emery process ซึ่งทำปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำมันในสภาวะรุนแรงที่อุณหภูมิ 250 °C และความดัน 5 MPa

ถ้านำมาเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจะทำให้กรดไขมันที่ได้ถูกย่อยสลาย และสูญเสียสมบัติทางชีวภาพ รวมทั้งมีต้นทุนการผลิตสูงจากการใช้พลังงาน 800 kJ ต่อกิโลกรัมของน้ำมัน (Hayes, 2004) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันชนิดต่างๆ เพื่อพัฒนาการผลิตกรดไขมันที่มีคุณภาพใช้ต้นทุนต่ำ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ชนิด *Candida rugosa* และจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสม เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันได้ดี (Shimada *et al*., 2001)

ขั้นตอนที่ 2 : การเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวโดยทำให้เกิดปฏิกิริยา esterification กับแอลกอฮอล์ด้วยการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายยาว แต่มีความจำเพาะต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันสายสั้น หรือกรดไขมันสายกลาง ซึ่งการควบคุมปฏิกิริยาให้ดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพนั้น ต้องลดปริมาณน้ำในระบบให้เหลือน้อยสุด โดยใช้ซับสเตรตที่มีความชื้นต่ำ และปริมาณน้ำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาถูกควบคุมโดยใช้ถังปฏิกรณ์ที่มีระบบปรับลดความดัน หรือการเติมตัวกรองระดับโมเลกุล (molecular sieve) ในระบบมีรายงานพบว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพทำให้เกิดปฏิกิริยา esterification สำหรับปัญหาน้ำที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาสามารถกำจัดออกได้โดยใช้ปั๊มสูญญากาศ (Shimada *et al*., 2001) ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่สำคัญบางชนิด โดยเฉพาะชนิดของกรดไขมันที่มีส่วนช่วยป้องกันโรคต่างๆ เช่น arachidonic acid เตรียมได้ด้วยการย่อยสลายน้ำมันจากรา *Mortierella* sp. โดยใช้ *Burkholderia cepacia* lipase, 1,600 Unit ต่อน้ำมัน 1 กรัม เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ pH 7.0, อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง พบว่า arachidonic acid มีความเข้มข้นเพียงร้อยละ 25 และสามารถเพิ่มความเข้มข้นถึงร้อยละ 75 ด้วยการใช้ปฏิกิริยา selective esterification 2 ขั้นตอน ระหว่างกรดไขมันอิสระและ lauryl alcohol โดยใช้เอนไซม์ *Candida rugosa* lipase, 1,000 Unit ต่อน้ำมัน และแอลกอฮอล์ (3.5 : 1 กรัม) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Shimada, *et al*., 1998) ส่วน docosahexaenoic acid มีความเข้มข้นร้อยละ 78 เตรียมได้ด้วยปฏิกิริยา selective esterification ระหว่างกรดไขมันจากน้ำมันปลาทูน่า และกลีเซอรอลโดยใช้เอนไซม์ตรึง *Rhizomucor miehei* lipase ร้อยละ 10 ต่อน้ำหนักของกรดไขมันเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Halldorsson *et al*., 2003) เป็นต้น

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเตรียมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่สำคัญบางชนิด (ดัดแปลงจาก Piazza *et al*., 2007)

ชนิดของกรดไขมัน	ขั้นตอนการเตรียมกรดไขมัน	ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	ร้อยละความเข้มข้นของกรดไขมัน
Arachidonic acid (ARA)	i) Fungal oil + H_2O ==> fatty acid ii) Fatty acid + $CH_3(CH_2)_{11}OH$ ==> ARA + fatty acid lauryl ester (two-step esterification)	*Pseudomonas* sp. *Candida rugosa*	25 75
Docosahexaenoic acid (DHA)	i) Tuna oil + CH_3CH_2OH ==> fatty acid ethyl ester (FAEE) ii) FAEE + $CH_3(CH_2)_{11}OH$ ==> DHAEE + Fatty acid lauryl ester	*Candida antarctica*	57 87
	i) Fatty acid (Tuna oil) + glycerol ==> glycerides + DHA	*Rhizomucor miehei*	78
Eicosapentaenoic acid (EPA) + DHA	i) Salmon oil + H_2O ==> Fatty acid + glycerides	*Candida rugosa*	27
	i) Tuna oil + CH_3CH_2OH ==> FAEE + glycerides	*Pseudomonas fluorescens*	74

บทสรุป

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวนับเป็นกรดไขมันที่จำเป็นสำหรับร่างกาย มีบทบาทช่วยป้องกันโรคต่างๆ และส่งเสริมพัฒนาการของระบบประสาทและสมอง วิธีการเตรียมกรดไขมันกลุ่มนี้ให้เข้มข้น และยังคงคุณสมบัติทางชีวภาพนั้น ส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมน้ำมัน โดยเอนไซม์ไลเปสมีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ สามารถเร่งปฏิกิริยาหลายประเภทและมีความจำเพาะในหลายระดับ โดยเฉพาะความจำเพาะ regio-selectivity และ fatty acid specificity ทำให้สามารถนำเอนไซม์ชนิดนี้มาประยุกต์ใช้ในการเตรียมกรดไขมันเข้มข้น ซึ่งวิธีการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวจะใช้ไลเปสช่วยเร่งปฏิกิริยาสองขั้นตอนคือ การเตรียมกรดไขมันโดยการย่อยสลายน้ำมัน หลังจากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันเป้าหมายด้วยการลดสัดส่วนของกรดไขมันชนิดอื่นๆ โดยใช้ปฏิกิริยา selective esterification อย่างไรก็ตาม การเตรียมกรดไขมันให้มีความบริสุทธิ์สูง มักจะประยุกต์ใช้วิธีการทำให้บริสุทธิ์ร่วมด้วย เช่น molecular distillation คือกระบวนการแยกสารที่ไม่คงตัวต่ออุณหภูมิสูง หรือสารที่มีจุดเดือดสูง โดยการกลั่นช่วงเวลาสั้นๆ ภายใต้ความดันต่ำมาก จึงเหมาะสมกับการแยกกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และ urea complexation คือการแยกกรดไขมันไม่อิ่มตัวด้วยกระบวนการตกผลึกกรดไขมันอิ่มตัว โดยการเตรียมสารละลายกรดไขมันด้วยการเติมยูเรียและเอทานอล หลังจากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงในช่วง 0 – 4 °C เพื่อให้เกิดผลึกของกรดไขมันอิ่มตัวกับยูเรีย แล้วจึงทำการแยกสกัดกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Ghanem, A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/ enriched compounds. *Tetrahedron, 63*, 1721-1754.

Halldorsson, A., Kristinsson, B., Glynn, C. & Haraldsson, G.G. 2003. Separation of EPA and DHA in fish oil by lipase-catalyzed esterification with glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 80*, 915-921.

Hayes, D.G. (2004). Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 81*, 1077-1103.

Piazza, G.J., Foglia, T.A. & Xu, X. (2007). Lipase-catalyzed harvesting and/or enrichment of industrially and nutritionally important fatty acids. In R. Rastall (Ed.). *Novel enzyme technology for food application*. (pp. 285 – 313). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Reetz, M.T. (2002). Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology, 6*, 145-150.

Rubio-Rodríguez, N., Beltran, S., Jaime, I., de Diego, S.M., Sanz, M.T. & Carballido, J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11*, 1-12.

Schmid, R.D. & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition, 37*, 1608-1633.

Scrimgeour, C.M. & Harwood, J.L. (2007). Fatty acid and lipid structure. In F.D. Gunstone, J.L. Hardwood & A.J. Dijkstra (Eds). *The lipid handbook*. (pp. 1 – 36). New York: CRC Press.

Shimada, Y., Sugihara, A., Minamigawa, Y., Higashiyama, K., Akimoto, K., Fujikawa, S., Komemushi, S., & Tominaga, Y. (1998). Enzymatic enrichment of arachidonic acid from *Mortierella* single-cell oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 75*, 1213-1217.

Shimada, Y., Sugihara, A. & Tominaga, Y. (2001). Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 91*, 529-538.

Ward, O.P. & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry, 40*, 3627-3652.