ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/367253493

A Review of the fish oil extraction methods and omega 3 concentration technologies

Article · July 2022

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20004.1700

CITATIONS
4

READS
2,918

4 authors, including:

Fatemeh Eshari
University of Tehran
10 PUBLICATIONS **10** CITATIONS

SEE PROFILE

Mehran Habibi-Rezaei
University of Tehran
199 PUBLICATIONS **3,523** CITATIONS

SEE PROFILE

All content following this page was uploaded by Fatemeh Eshari on 19 January 2023.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

A Review of the fish oil extraction methods and omega 3 concentration technologies

Fatemeh Eshari[1], Mehdi Taati Keley[2*], Mehran Habibi-Rezaei[3], Sajjad Tajeddini[4]

[1]Researcher in the field of biotechnology, University of Tehran, Email: Katherine.eshari@gmail.com, fatemeh.eshari@guest.ut.ac.ir
[2]PhD graduate of sea food science and fish processing, Protein Biotechnology Laboratory, Faculty of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, Email: Taatikeley.mehdi@gmail.com
[3]Full Professor of Biochemistry, University of Tehran, Email: mhabibi@ut.ac.ir
[4]Chemical engineering student, University of Tehran, Email: sajadtajedini@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2022-04-01
Revised: 2022-06-29
Accepted: 2022-07-31

Keywords:
PUFA, Fish oil
Omega 3 fatty acids
Wet pressing
Molecular distillation

ABSTRACT

Background and objectives: Eicosapentaenoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA) are omega-3 fatty acids that play a remarkable role in the prevention and treatment of diseases. Various reports have noted the preventive and therapeutic effects of omega-3 fatty acids on inflammatory diseases such as asthma, cardiovascular diseases, oxidative stress-related diseases including Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), together with rheumatoid arthritis, and mental and psychiatric disorders. Moreover, these fatty acids have revealed some preventive effects against cancer and fatty liver disease. Since polyunsaturated fatty acids are not capable of being synthesized in the human body, also, the human diet is mainly provided by vegetable oils that contain a high level of omega-6 fatty acids, accordingly, they should be supplied by food sources. Globally, marine resources, especially fish oil, are widely used, as the main providers of these fatty acids. Additionally, the amount of polyunsaturated fatty acids, EPA, and DHA differ based on the species of the fish. Moreover, the main sources of fish oil are pelagic species, namely salmon, tuna, anchovies, herring, and caplin, which have fatty meat and are suitable to be used for the production of fish feed and fish oil. Alternatively, fish waste can be used to supply fish oil.

Methods: The first and most important step for the purification of omega-3 fatty acids is the extraction of fish oil. In the following, the concentration of omega-3 fatty acids can be done in the extracted fish oil. So far, various methods such as alkaline digestion, Bligh and Dyer method, extraction with isopropyl solvent of alcohol, and... have been reported. Nevertheless, in this review article, different methods of fish oil extraction including Wet pressing (WP), Cold extraction, enzymatic extraction, and Supercritical fluid extraction (SFE), also miscellaneous technologies of omega 3 concentration including Urea complexation (UC), Supercritical Fluid Chromatography (SFC), molecular distillation (MD), and Enzymatic extraction has been investigated.

Conclusion: Due to the growing consumption of omega-3 fatty acids as one of the most important dietaries and pharmaceutical supplements, more research and production are needed in this area. Among the methods mentioned above, the wet pressing (WP) method is used as an industrial method for fish fishing oil production. Also, molecular distillation (MD) is a more common and industrial method for the production of omega-3 fatty acids in the world. The concentrated omega-3 fatty acids are mainly in two

forms, namely, ethyl esters (mostly in molecular distillation, SFE, and SFC methods) and Triacylglycerols (TAG), the latter have more bioavailability.

Cite this article: Eshari, F., Taati Keley, M., Habibi-Rezaei, M., Tajeddini, S. 2022. A Review of the fish oil extraction methods and omega 3 concentration technologies. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (3), 101-124.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20004.1700
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

مروری بر روش‌های تولید روغن ماهی و فن شناسی تغلیظ امگا ۳

فاطمه اشعاری[۱]، مهدی طاعتی‌کلی[۲*]، مهران حبیبی رضائی[۳]، سجاد تاجدینی[٤]

۱.پژوهشگر رشته بیوتکنولوژی دانشگاه تهران، رایانامه: Katherine.eshari@gmail.com; fatemeh.eshari@guest.ut.ac.ir

۲.دانش‌آموخته رشته عمل آوری فرآورده های دریایی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین، دانشکده زیست، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، رایانامه: Taatikeley.mehdi@gmail.com

۳.استاد تمام رشته بیوشیمی دانشگاه تهران، رایانامه: mhabibi@ut.ac.ir

٤.دانشجو رشته مهندسی شیمی دانشگاه تهران، رایانامه: sajadtajedini@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/٤/۸
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۵/۹

واژه‌های کلیدی:
PUFA
روغن ماهی
اسیدهای چرب امگا ۳
پرس مرطوب
تقطیر مولکولی

چکیده

سابقه و هدف: اسید ایکوزاپنتانوئیک (EPA) و اسید دکوزاهگزانوئیک (DHA) از اسیدهای چرب امگا ۳ هستند که نقش قابل توجهی را در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها ایفا می کنند. گزارشات متنوعی، اثرات پیشگیرانه و درمانی آنها بر بیماری‌های التهابی از جمله آسم، همچنین بر بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های وابسته به استرس اکسایشی مانند بیماری کبد چرب غیر الکلی، علاه برآن بر روماتوئید و بیماری‌های روحی و روانی را اشاره داشته‌اند. علاوه بر موارد فوق، این اسیدهای چرب اثرات پیشگیرانه بر سرطان و کبد چرب دارا می باشند. با توجه به آنکه اسیدهای چرب بس غیر اشباع (چند غیر اشباع) در بدن انسان سنتز نمی‌شوند و همچنین رژیم غذایی انسان ها به صورت عمده از روغن‌های گیاهی تامین می شود که حاوی اسید های چرب امگا ٦ می باشند، بدین سبب لازم است اسیدهای چرب امگا ۳ از منابع غذایی تأمین شوند، که منابع دریایی و به وبژه روغن ماهی (بسته به گونه) دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) و نیز EPA و DHA می باشد. از منابع اصلی روغن ماهی می‌توان به گونه‌های پلاژیک صید شده اشاره داشت، مانند ماهی آزاد، تون ماهیان، آنچوی، شاه ماهی و کاپلین که دارای گوشت چرب هستند. همچنین، میتوان از گوشت چرب آنها جهت تولید خوراک ماهی و روغن ماهی استفاده کرد. علاوه بر آن به منظور استخراج روغن ماهی می توان از زایدات ماهی که امکان مصرف مستقیم توسط انسان را ندارند، استفاده نمود.

مواد و روش‌ها: اولین و مهم‌ترین گام جهت تخلیص اسیدهای چرب امگا ۳، استخراج روغن ماهی و در ادامه، تغلیظ اسیدهای چرب امگا۳ می‌باشد. تاکنون روش‌های متنوعی از جمله هضم قلیایی، روش بلای و دایر، استخراج با حلال ایزوپروپیل الکل و غیره گزارش شده‌اند. اما در این مقاله مروری، روش‌های مختلف استخراج روغن ماهی شامل پرس مرطوب، استخراج سرد، استخراج با استفاده از آنزیم و استخراج با سیال فوق بحرانی و همچنین فناوری‌های گوناگون تخلیص امگا ۳، از جمله روش‌های کمپلکس اوره، کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی، تقطیر مولکولی و استخراج آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری: با توجه به مصرف رو به رشد اسیدهای چرب امگا ۳ به عنوان یکی از مهم‌ترین مکمل‌های دارویی و غذایی نیاز به تحقیقات و تولید بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. از بین روش‌های ذکر شده در فوق، روش پرس مرطوب به عنوان روش صنعتی برای تولید روغن ماهی استفاده می‌شود. همچنین

تقطیر مولکولی روش متداول و صنعتی جهت تغلیظ اسیدهای چرب امگا ۳ در جهان می‌باشد. اسیدهای چرب امگا۳ تغلیظ یافته در روش‌های مختلف به دو صورت اتیل‌استر (در روش‌های تقطیر مولکولی، SFE و SFC) و تری آسیل گلیسرول می‌باشند که قابلیت جذب مورد دوم بالاتر است.

استناد: اشعاری، ف.، طاعتی‌کلی، م.، حبیبی رضائی، م.، تاجدینی، س. (۱٤۰۱). مروری بر روش‌های تولید روغن ماهی و فن شناسی تغلیظ امگا ۳. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٤ (۳)، ۱۲٤-۱۰۱.

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20004.1700

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

بیشتر اسیدهای چرب امگا ۳ جزء اسیدهای چرب چند غیر اشباع[1] (PUFA) هستند، که زنجیر کربنی ۱۸ تا ۲۲ کربنه و ۳ تا ٦ پیوند دوگانه دارند و در شماره‌گذاری از انتهای گروه کربوکسیل، پیوند دوگانه بین کربن‌های شماره ۳ و ٤ قرار دارد. آلفالینولنیک اسید[2] (ALA) با ۱۸ کربن و سه پیوند دوگانه در برخی از موجودات به‌ویژه در ماهیان آب سرد از طریق طویل شدن و غیراشباع شدن، پیش‌ساز بیوسنتزِ دو اسید چرب امگا ۳ بلند زنجیر، شامل اسید ایکوزاپنتانوئیک[3] (EPA) با ۲۰ کربن و پنج پیوند دو گانه و اسید دوکوزاهگزانوئیک[4] (DHA) با ۲۲ کربن و شش پیوند دوگانه می باشد (۱).

PUFA ها در بدن انسان سنتز نمی‌شوند و لازم است که از طریق مکمل‌ها و یا منابع غذایی مناسب تأمین شوند (۲). اسیدهای چرب امگا ۳ نقش مهمی در حفظ و تامین سلامت انسان ایفا می‌کنند. در مطالعات بسیاری، اثرات درمانی یا پیشگیری آن‌ها بر بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های التهابی مانند آسم و بیماری‌های وابسته به استرس اکسیداتیو انجام شده است. همچنین اثرات پیشگیرانه آن‌ها بر علیه سرطان و کبد چرب بررسی و به اثبات رسیده است. اثرات مزبور، از طریق مکانیسم‌های متنوعی از جمله تأثیر بر بیان ژن، متابولیسم سلولی، تولید متابولیت‌ها و غیره صورت می‌پذیرد (۳–۷).

رژیم غذایی انسان عموما غنی از اسیدهای‌چرب امگا ٦ می‌باشد که به‌طور عمده از روغن‌های گیاهی تامین می‌شوند. منابع دریایی به خصوص ماهیان از منابع بالقوه تامین امگا ۳ می‌باشند. روغن ماهی حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر می‌باشد، که به صورت تری آسیل گلیسرول (TAG) هستند و مقدار آن در روغن انواع ماهی‌ها در گستره ۱۰ تا ۲۵درصد متغیر است (۸).

برای تغلیظ اسیدهای چرب امگا ۳، ابتدا لازم است روغن استخراج شود، که مبتنی بر روش‌های متنوع شامل؛ پرس مرطوب، استخراج با حلال آلی با استفاده از سوکسله[5]، استخراج آنزیمی، استخراج سرد، استخراج توسط سیال فوق بحرانی[6] (SFE) و غیره می‌باشد (۹). همچنین به منظور استخراج امگا۳، روش‌ها و فرآیندهای متنوعی تاکنون بررسی و مورد آزمون قرار گرفته است، که از جمله آن‌ها می توان به استفاده از کمپلکس اوره، هیدرولیز آنزیمی، تقطیر مولکولی[7]، تفکیک با سیال فوق بحرانی (SFF) و کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی[8] اشاره داشت. حال با توجه به شناسایی فزاینده تاثیرات امگا ۳ بر سلامت، هدف از این مقاله مروری بررسی شیوه‌های استخراج روغن ماهی و نیز تغلیظ اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا ۳ (EPA+DHA) می‌باشد.

مروری بر فناوری‌های تولید روغن ماهی و استخراج امگا ۳: نخستین گام جهت استخراج امگا ۳، تولید روغن‌های دریایی از منبع ماهی، جلبک[9] و کریل[10]، با تاکید بر روغن ماهی[11] است.

1. Polyunsaturated fatty acid
2. Alpha-Linolenic acid
3. Eicosapentaenoic acid
4. Docosahexaenoic acid

5. Soxhlet
6. Supercritical fluid extraction
7. Molecular Distillation
8. Supercritical fluid chromatography
9. Algae
10. Krill
11. Fish oil

جدول ۱- مقدار اسید های چرب موجود در روغن انواع ماهیان (٪)

Table 1. Fatty acids content in various fish oils

اسید چرب (٪) / گونه ماهی	کیلکا	تن	مارماهی	ماهی بیگ هد	خال‌دار	شاه ماهی	کاپلین	ساردین	ماهی سایه	کولی
C14:0 (اسید تترادکانوئیک)	3	3	7	5	8	7	7	8	9	9
C15:0 (اسید پنتادکانوئیک)	0.68	1	1	-	-	-	-	1	1	1
C16:0 (اسید پالمیتیک)	19.5	22	13	12	14	17	10	18	19	17
C16:1 (اسید هگزادکانوئیک)	5.7	3	5	4	7	6	10	10	12	13
C17:0 (اسید هپتادکانوئیک)	0.46	1	-	-	-	-	-	1	1	1
C18:0 (اسید استئاریک)	4.42	6	2	3	2	2	1	3	3	3
C18:1 (اسید اولئیک)	30.7	21	7	10	13	14	14	13	11	10
C18:2 (اسید لینولئیک)	1.68	1	2	1	1	1	1	1	1	1
C18:3 (اسید لینولنیک)	2.19	1	1	1	1	2	1	1	1	1
C18:4 (اسید استاریدونیک)	-	1	5	3	4	3	3	3	3	2
C20:1 (اسید ایکوزنوئیک)	-	1	12	13	12	15	17	4	1	1
C22:1 (اسید ایکوزنوئیک)	-	3	18	17	15	19	15	3	-	1
C20:5 n3 (اسید ایکوزاپنتانوئیک)	7.04	6	11	9	7	6	8	16	14	22
C22:5 n3 (اسید دکوزاپنتانوئیک)	-	2	1	1	1	1	-	2	2	2
C22:6 n3 (اسید دکوزاهگزانوئیک)	17.05	22	11	14	8	6	6	9	8	9
Other (دیگر اسیدهای چرب)	7.58	6	4	7	7	1	7	7	14	7

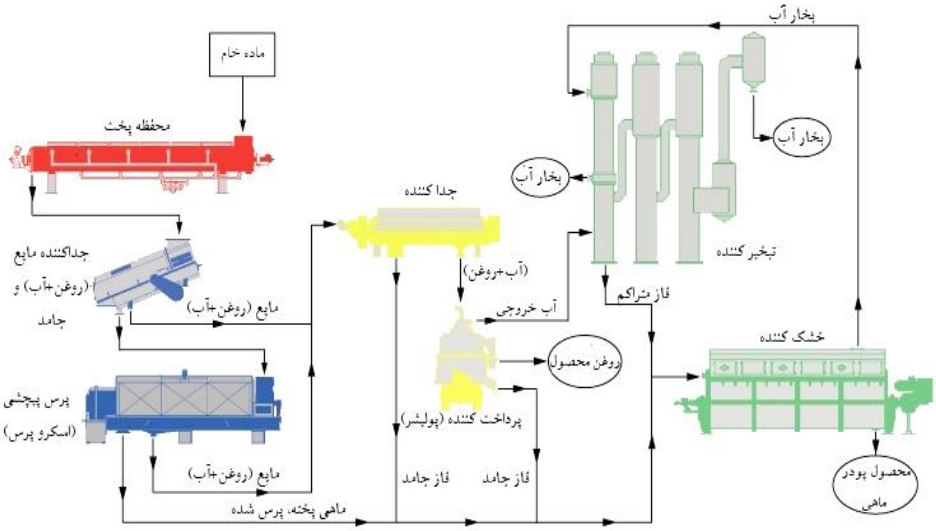
روغن‌های دریایی منبع غنی از اسیدهای چرب چند غیراشباع بلند زنجیر امگا ۳ هستند که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. منابع اصلی روغن ماهی، گونه‌های لُجه‌زی[1] (پلاژیک) صید شده در مقادیر زیاد به‌خصوص انواع دارای گوشت چرب هستند، که از جمله آن‌ها می‌توان به ماهی آزاد[2]، تون ماهیان[3]، شاه ماهی[4] و یا ماهیان کوچکی مانند آنچوی[5] و کاپلین[6] اشاره نمود (۱۰). گوشت چرب، اغلب برای تهیه خوراک ماهی و تولید روغن به‌کار می‌رود، اما روغن ماهی را می‌توان از زایدات ماهی‌ها و نیز ماهیان هرز[7] که ارزش خوراکی مستقیم برای انسان ندارند تولید نمود (۱۱). همچنین مقدار اسیدهای چرب موجود در روغن انواع ماهیان در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای روغن‌گیری از بافت‌های مختلف ماهیان، تا کنون روش‌های گوناگونی مانند روش بلای و دایر (۱۲)، هضم قلیایی (۱۳)، استخراج با حلال ایزوپروپیل الکل (۱۴)، استخراج با سوکسله (۱۵)، استخراج آنزیمی[8] (۱۶، ۱۷)، استخراج سرد[9] (۱۸) و غیره گزارش شده است. روشی که امروزه در جهان در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرد روش پرس مرطوب[10] است (۱۹). این روش مبتنی بر پخت، پرس مکانیکی و در نهایت فیلتراسیون و سانتریفیوژ کردن در جهت بازیابی روغن از بافت است (۲۰, ۲۱). در ادامه به روش پرس مرطوب و چند روش دیگر

1. Pelagic fish
2. Salmon
3. Scombridae
4. Herring
5. Anchovy
6. Capelin
7. Weed fish
8. Enzyme Extraction (EE)
9. Cold Extraction (CE)
10. Wet pressing

استخراج روغن ماهی به صورت کلی و مختصر پرداخته می‌شود (۲۲).

روش پرس مرطوب: در این فرآیند، طبق شکل ۱، ابتدا ماهی به قطعات کوچک تقسیم و به محفظه پخت وارد می‌شود. پس از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه پخت با بخار، سوپ حاصل‌شده متشکل از آب، روغن و تکه‌های بافت ماهی است. برای استخراج باقیمانده روغن از ماهی و کاهش میزان رطوبت موجود در بافت ماهی پخت شده، این توده پرس‌شده و آب و روغن از آن جدا می‌شود. توده جامد باقی مانده وارد خشک کن شده و به صورت پودر ماهی خارج می‌شود (۱۹). آب و روغن خارج شده با استفاده از سانتریفیوژ یا دکانتور دو فاز گردیده و جدا می‌شوند (۲۳). در برخی از فرآیندهای صنعتی، آب و روغن وارد حوضچه‌هایی شده و پس از دو فاز شدن، روغن قرار گرفته در فاز بالایی با سیفون کشی و یا توسط کف‌کش خارج می‌شود. در پایان این مرحله رطوبت موجود در روغن باید کمتر از ۵درصد باشد. روغن ماهی خام، بسته به نوع گونه و توده روغن‌کشی شده به‌دلیل حضور رنگدانه‌ها به رنگ نارنجی و یا گاهی متمایل به سرخ و بنفش و در مواردی کاملا تیره و دارای بوی تند است (۲۳). در مطالعه انجام شده توسط طاعتی و همکاران، (۲۰۱۸) استخراج روغن ماهی تن با استفاده از روش پرس مرطوب صورت گرفت و مقدار اسیدهای چرب و فلزات سنگین موجود در روغن گزارش شد (جدول ۲ و ۳) (۲٤).



شکل ۱. فلوچارت صنعتی تولید روغن و پودر ماهی توسط روش پرس مرطوب (بر اساس فرآیند (۱۹))

روش آنزیمی: در سال‌های اخیر کاربرد آنزیم در صنایع روغن‌گیری به دلیل مزایایی که این کاتالیزورهای زیستی دارند، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از آنزیم برای استخراج روغن از بافت ماهی نسبت به روش پرس مرطوب، ساده‌تر و سازگارتر با محیط زیست بوده و مستلزم مصرف انرژی کمتری است (۱٦). همچنین، این روش به‌علت عدم استفاده از انواع حلال‌های شیمیایی و مشکلات ناشی از حذف آن‌ها از روغن تولیدی و بهره گیری از درجه حرارت بالا، به لحاظ زیست محیطی بسیار مورد توجه است (۲٦). آنزیم‌های مورد استفاده در این زمینه اختصاصی بوده و در درجه حرارت‌های نسبتاً پایین واکنش‌های مربوطه را کاتالیز می‌نمایند. در نتیجه شکسته شدن آنزیمی غشا سلولی و لیپوپروتئین-

های بافت ماهی با استفاده از لیپازها و پپتیدازها محتوای روغن سلولی به فاز آبی منتقل و از آنجا توسط سانتریفیوژ تفکیک می‌شوند. آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین موجود در بافت ماهی را هضم کرده و سبب آزاد شدن گلبول‌های چربی متصل به آن‌ها و افزایش سیالیت روغن می‌گردند (۲۷). طاعتی و همکاران، (۲۰۱۸) با استفاده از آنزیم پروتئاز استخراج روغن از ضایعات تن‌ماهیان را بررسی نموده‌اند (جدول ۲ و۳) (۲٤).

عملیات آنزیمی و فرآیند استخراج آنزیمی روغن از بافت ماهی، به‌دلیل مصرف انرژی و حرارت کمتر و عدم استفاده از ادوات و تجهیزات بزرگ؛ اقتصادی بوده و به لحاظ عدم استفاده از مواد اشتعال‌زا و در نتیجه عدم احتمال اشتعال و انفجار؛ ایمن می‌باشد و موارد زیست محیطی را نیز مد نظر دارد. همچنین، به دلیل درجه حرارت بسیار پایین‌تر نسبت به روش پرس مرطوب، احتمال اکسیداسیون روغن استحصالی کمتر و در نتیجه معیارهای کیفی لازم در آن می‌تواند بالاتر باشد (۲۸). اما از معایب این روش می‌توان به هزینه بالای آن اشاره داشت.

جدول ۲. مقدار اسید های چرب موجود در روغن استخراج با ٤ روش از ماهی تن (٪) (۲٤،۲۵)

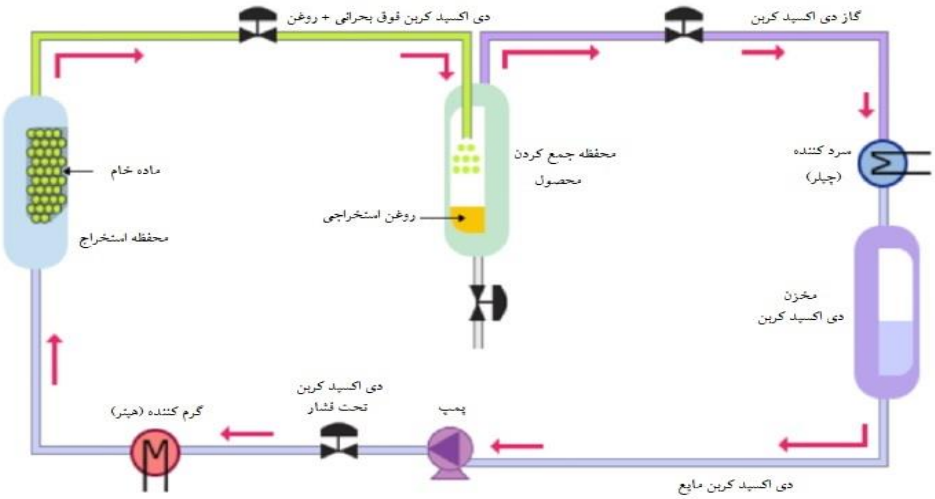
روش استخراج / اسید چرب (٪)	روش آنزیمی (Enzymatic Extraction)	استخراج سیال فوق بحرانی (Supercritical Fluid Extraction)	استخراج سرد (Cold Extraction)	پرس مرطوب (Wet Pressing)
(اسید دودکانوئیک) C12:0	0.05±0.03	0.05±0.02	0.08±0.04	0.07±0.02
(اسید تترادکانوئیک) C14:0	2.08±1.93	2.98±1.23	4.16±1.40	4.11±1.06
(اسید پنتادکانوئیک) C15:0	0.76±0.36	0.81±0.42	0.69±0.51	0.73±0.20
(اسید پالمیتیک) C16:0	16.20±7.24	12.54±5.63	16.70±6.19	15.83±4.92
(اسید هگزادکانوئیک) C16:1	6.53±4.62	5.67±3.1	7.10±4.83	6.28±2.80
(اسید هپتادکانوئیک) C17:0	1.80±0.52	1.09±0.48	2.41±0.85	1.67±0.70
(اسید استئاریک) C18:0	3.41±2.06	3.26±1.24	3.87±2.53	4.95±1.7
(اسید اولئیک) C18:1	16.35±6.02	14.09±4.7	15.62±5.40	16.56±3.89
(اسید لینولئیک) C18:2	2.14±1.03	1.93±0.41	2.08±0.90	1.35±0.60
(اسید گاما لینولنیک) C18:3 n6	1.58±0.69	0.81±0.2	0.84±0.49	1.03±0.05
(اسید آلفا لینولنیک) C18:3 n3	2.18±0.96	2.3±1.54	2.17±1.06	1.96±0.80
(اسید آراشیدیک) C20:0	0.83±0.25	1.95±0.67	1.03±0.92	0.18±0.10
(اسید ایکوزنوئیک) C20:1	0.76±0.48	0.61±0.4	0.58±0.31	0.42±0.29
(اسید ایکوزا تترا انوئیک) C20:4 n3	1.42±0.53	1.18±0.9	1.53±0.84	1.74±0.60
(اسید آراشیدونیک) C20:4 n6	1.78±0.40	1.24±0.82	1.5±0.84	1.90±0.76
(اسید ایکوزاپنتانوئیک) C20:5 n3	6.72±2.94	7.94±1.05	5.83±2.19	6.05±2.19
(اسید دکازنوئیک) C22:0	0.59±0.47	0.65±0.29	0.53±0.38	0.44±0.30
(اسید دکوزاپنتانوئیک) C22:5 n3	3.60±2.81	3.82±2.4	1.76±1.02	2.01±1.09
(اسید دکوزاهگزانوئیک) C22:6 n3	22.60±5.37	28.05±3.57	20.9±4.8	21.25±4.84
اسید دکوزاهگزانوئیک+ اسید ایکوزاپنتانوئیک	29.32	35.99	26.73	27.3

جدول ۳. مقدار فلزات سنگین موجود در روغن استخراج شده با استفاده از ٤ روش از ماهی تن (۲٤, ۲۵)

روش / عنوان	روش آنزیمی (Enzymatic Extraction (ppm))	استخراج سیال فوق بحرانی (Supercritical Fluid Extraction (ppm))	استخراج سرد (Cold Extraction (ppm))	پرس مرطوب (Wet Pressing (ppm))
جیوه (Hg)	5.00±1.61	3.00±1.54	8.00±2.49	12.00±4.63
آرسنیک (As)	2.08±0.70	1.02±0.38	2.14±0.40	5.74±3.20
کادمیوم (Cd)	Trace	Trace	Trace	0.25±0.09
سرب (Pb)	1.05±0.84	0.8±0.15	1.43±1.06	2.12±2.70

روش استخراج سرد: استخراج سرد یکی از روش‌های استخراج روغن ماهی می‌باشد که جز موارد استثنا فاقد قابلیت تعمیم به مقیاس صنعتی در سطح گسترده است. در این روش استحصال تنها با کمک هموژن و سپس پرس نمودن انجام می‌شود (۱۸). بازدهی این روش پایین بوده و بیشتر به‌عنوان روش مقایسه‌ای با پرس مرطوب در جهت مشاهده و مطالعه تاثیر درجه حرارت بر میزان روغن استحصالی و شاخص‌های شیمیایی و فیزیکی محصول به‌دست آمده مورد استفاده قرار می‌گیرد. طاعتی و همکاران (۲۰۱۸) مقادیر اسیدهای چرب و فلزات سنگین روغن استخراج شده با استفاده از استخراج سرد را گزارش کرده اند (جدول ۲ و ۳) (۲٤).

روش سیال فوق بحرانی (SFE): با توجه به استفاده از موادشیمیایی در برخی از روش‌ها، وجود حرارت بالا و امکان ایجاد اکسیداسیون در بعضی دیگر و هزینه بالای برخی روش‌ها، امروزه روش‌های نوین دیگری نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند که تولید و کیفیت را به شکل توام مورد توجه قرار داده و از خطر آسیب‌رسانی به محیط زیست نیز مبری هستند. جدیدترین فرآیندی که اکنون در جهان در جهت تولید روغن ماهی مورد توجه و استفاده قرار گرفته است، فرآیند استخراج با سیال فوق بحرانی می‌باشد. نتایج مطالعه طاعتی و همکاران (۲۰۱۷) در مورد مقادیر اسید های چرب و فلزات سنگین موجود در روغن استخراج شده با استفاده از روش SFE به ترتیب در جدول ۲ و ۳ گزارش شد. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، در این روش، نمونه تحت شرایط دمایی و فشار تعیین شده در مدت زمان مشخص با سیال فوق بحرانی (عمدتاً دی اکسید کربن) در تماس بوده و ماده مورد نظر از آن استخراج می‌گردد (۳۰).



شکل ۲. دیاگرام شماتیک استخراج روغن ماهی با استفاده از سیال فوق بحرانی (SFE) (۲۹)

نقطه بحرانی به درجه حرارت و فشاری گفته می‌شود که در آن مرزی بین دو فاز مایع وگاز ماده وجود ندارد. یک سیال فوق بحرانی خالص ماده‌ای است که بالاتر از دما و فشار بحرانی خودش قرار دارد. ماده در بالاتر از دمای بحرانی تبخیر یا کندانسه نمی‌شود و یک مایع یا گاز را به وجود نمی‌آورد (٣١). سیال‌های فوق بحرانی از نظر خواص انتقالی مانند گازها از نفوذپذیری بالا و گرانروی کم برخوردارند و از نظر قدرت حلالیت، شبیه حلال‌های مایع هستند. یک سیال فوق بحرانی خواصی بین حالت گاز و مایع دارد و این خواص با فشار قابل کنترل است (٣٢). چگالی، گرانروی و ضریب انتشار سیال فوق بحرانی بینابین مایع و گاز است. در واقع معایب مایع و گاز را نداشته ولی مزایای آن‌ها را برای استخراج دارد (٣٣). چگالی مسئول قدرت حل کنندگی سیال است که در مایع زیاد و در گاز کم است. اما، در سیال فوق بحرانی در حالت مطلوب و خیلی بالاتر از گاز است. گرانروی سیال در صورت زیاد بودن موجب افت فشار جریان شده و حرکت سیال را کند می‌کند. گرانروی در مایع زیاد و در گازها کم است، اما در سیال فوق بحرانی خیلی نزدیک به گاز است، و این باعث می‌شود که افت جریان سیال در دستگاه استخراج با سیال فوق بحرانی بسیار کمتر از زمانی باشد که از مایع استفاده می‌شود (٣٤). ضریب انتشار هرچه بالاتر باشد برای استخراج و انتقال جرم مناسب‌تر است. ضریب انتشار در گازها زیاد و در مایعات کم است اما در سیال فوق بحرانی بیشتر از مایع بوده و برای استخراج مطلوب است. ضریب انتشار تقریباً با چگالی نسبت معکوس دارد. سیال فوق بحرانی نسبت به حالت مایع تعداد مولکول‌های کمتری دارد و این باعث انتقال سریع در سیال می‌شود (٣٥). با توجه به این خواص، سیالات فوق بحرانی برای گستره وسیعی از مواد در خالص‌سازی، استخراج و تفکیک استفاده می‌شوند.

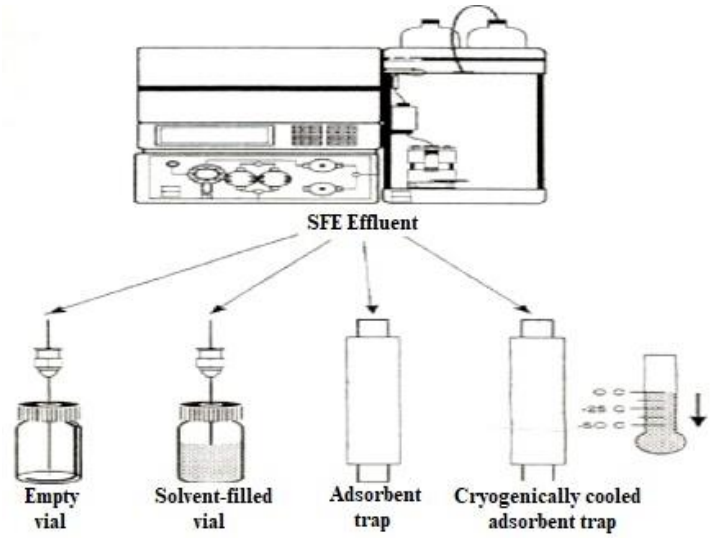
چگالی سیال فوق بحرانی تقریباً ١٠٠٠ برابر چگالی حالت گازی می‌باشد، که همین دلیل قدرت حل‌کنندگی سیال فوق بحرانی را بیشتر از گازها و مشابه مایعات می‌نماید. سیال فوق بحرانی دارای نفوذ پذیری زیادتر و گرانروی کمتری نسبت به حلال‌های مایع است. از این‌رو، این دو عامل انتقال جرم را کنترل کرده و باعث می‌شود که سیال فوق بحرانی بسیار سریع عمل نماید (٣٦).

مزایای استفاده از سیال فوق بحرانی عبارتند از:

١. معمولاً زمان استخراج با آن بسیار کمتر از روش‌های دیگر است.
٢. حلال راحت‌تر خارج یا جدا خواهد شد.
٣. فشار، دما و نوع حلال برای انتخاب نوع ترکیبی که باید استخراج شود قابل تغییر و استفاده هستند.
٤. دی اکسید کربن به‌عنوان یک حلال خالص به راحتی مورد استفاده قرار می‌گیرد، چون دما و فشار بحرانی آن بسیار مطلوب است. دی اکسید کربن ارزان قیمت است، مسمومیت‌زا نبوده و تأثیر منفی بر طبیعت ندارد و از سیستم‌های بیولوژیکی نیز قابل جمع‌آوری است.
٥. انتقال جرم در سیال استخراج کننده به دلیل ضریب انتشار بالاتر، در مقایسه با مایعات مشابه راحت‌تر است (٣٣ و ٣٦).

جمع‌آوری نمونه استحصالی در روش استخراج با سیال فوق بحرانی: بعد از استخراج ماده مورد نظر، جمع آوری آن بسیار اهمیت دارد. در فرآیند استخراج با سیال فوق بحرانی، اساس جمع‌آوری تغییر شرایط سیال با استفاده از تغییر حرارت، فشار یا هر دو (پایین‌تر از حد بحرانی) به منظور تغییر در تعادل ماده حل شونده و در نهایت ترسیب ماده جمع آوری کننده است. همان‌گونه که در شکل ٣ مشاهده می‌شود بسته به نوع ماده استخراجی (محلول گشته در سیال فوق بحرانی) شکل‌های متفاوتی جهت جمع‌آوری محصول

تولیدی وجود دارد. مواد فرار و نیمه فرار با وزن مولکولی پایین مانند مواد طعم دهنده، اسیدهای چرب و غیره با تله فاز جامد بهتر جمع آوری می‌شوند (۳٤). به عنوان مثال برای جمع آوری کافئین از ویال معمولی (empty vial)، برای جمع آوری اسیدهای چرب از فاز جامدی مانند سیلیکا ژل (adsorbent trap) و غیره استفاده می‌گردد. نوع شکل جمع‌آوری محصول در روش SFE بستگی به نوع ماده مورد نظر جهت استخراج دارد، ولی به طور کلی مبنای جمع آوری نمونه به اشکال مختلف افت فشار و کاهش درجه حرارت می‌باشد. به تله انداختن مواد استخراج شونده، با کاهش فشار سیال فوق بحرانی (قبل از ورود به تله و ظرف جمع آوری) صورت گرفته و ماده استخراج شونده از فاز گازی به مواد جذب کننده مانند سیلیکاژل، فلوریسیل و غیره یا صفحات خنثی خنک مانند گلوله‌ها یا ساچمه‌های شیشه‌ای یا فولاد ضد زنگ انتقال می‌یابد. در خصوص تخلیص اسیدهای چرب از روغن، عموماً از سیلیکاژل به‌عنوان فاز جامد جهت جمع‌آوری نمونه استفاده می‌شود (۳۰).



شکل ۳- روش‌های مختلف جمع آوری نمونه استحصالی از فرآیند استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE)
اقتباس از کاتالوگ دستگاه SFE مدل i-2000 کمپانی APEKS

دی‌اکسید کربن به‌عنوان سیال فوق بحرانی:
دی‌اکسید کربن یک سیال فوق بحرانی بسیار مناسب است، زیرا نسبت به مواد مشابه دارای دما و فشار بحرانی کمتری می‌باشد. از آن‌جا که این ماده غیرقطبی است به عنوان یک حلال غیرقطبی تلقی می‌گردد (۳۷). با توجه به آنکه دی‌اکسیدکربن تمایل کمی به مواد قطبی دارد، می‌توان از آن برای استخراج ملکول‌های آلی بزرگ استفاده کرد، حتی برای آن‌هایی که کمی قطبی هستند (۳۸). دی‌اکسید کربن فوق بحرانی، حلال بسیار خوبی برای چربی‌ها و روغن‌ها است و بسیاری از پژوهش‌ها حلالیت انواع ترکیبات روغنی به‌ویژه روغن ماهی و ترکیبات مرتبط با آن را تایید نموده‌اند (۳۹، ٤۰). روغن ماهی ترکیبی طبیعی از انواع چربی-های گوناگون می‌باشد که در دمای محیط به صورت مایع بوده و در حلال‌های غیرقطبی (مانند دی اکسید کربن، هگزان، اتر و غیره) محلول و در حلال‌های قطبی (مانند آب) نامحلول است. از این‌رو، استفاده از دی اکسید کربن فوق بحرانی برای استخراج آن کاملاً امکان‌پذیر است.

اسیدهای چرب امگا ٣ و روش‌های تولید آن‌ها: رژیم غذایی انسان عمدتاً غنی از اسیدهای چرب امگا ٦ است، که به‌طور عمده از روغن‌های گیاهی غنی از اسید لینولئیک (C18:2 n-6) تهیه می‌شود. با این حال، در بدن انسان آنزیم‌های ضروری برای تبدیل اسیدهای چرب امگا ٦ به اسیدهای چرب امگا ٣ به اندازه کافی وجود ندارد و انواع امگا ٣ باید از منابع غذایی مناسب تامین شوند (٤١). در زمینه استخراج و خالص‌سازی امگا ٣ فرآیندهای مختلفی تاکنون مورد آزمون قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان استفاده از کمپلکس اوره[1] (٤٢)، هیدرولیز آنزیمی (٤٢) و تقطیر مولکولی[2] (٤٣) را نام برد (٤٤). روش صنعتی مورد استفاده در استخراج اسیدهای چرب امگا ٣ تقطیر مولکولی می‌باشد. علاوه بر این روش، در زمینه خالص‌سازی اسیدهای چرب امگا ٣ نیز فرآیندهای نوینی ابداع شده است، که کیفیت، بازدهی و زمان کوتاه استخراج را در بر داشته باشند. این روش‌ها تفکیک با سیال فوق بحرانی[3] (٤٥) و کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی[4] هستند (٤٦). اساس کار این دو فرآیند نیز بر مبنای ویژگی‌های فیزیکی سیال فوق‌بحرانی است که می‌توان آن را به‌عنوان فاز متحرک در ستون حاوی فاز ساکن در نظر گرفت (١٨). در ادامه، به‌طورکلی و مختصر به چهار روش استخراج امگا٣ مبتنی بر استفاده از کمپلکس اوره، تقطیر مولکولی، کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی و استخراج آنزیمی می‌پردازیم.

تغلیظ اسیدهای چرب امگا ٣ با استفاده از روش کمپلکس اوره: غالباً منظور از تغلیظ اسیدهای چرب امگا ٣، دو اسید چرب بلند زنجیر EPA و DHA هستند، که بسته به اینکه روغن خام اولیه کدامیک از این اسیدهای چرب را در خود بیشتر دارد، فرآیندهایی جهت تغلیظ بیشتر آن‌ها صورت می‌پذیرد. در این حالت، محصول مورد نظر به‌صورت روغن ماهی غنی (یا دارای دوز بالا) از EPA و یا DHA معرفی می‌گردد. یکی از فرآیندهایی که جهت تغلیظ اسیدهای چرب مزبور به کار می‌رود، روش کمپلکس اوره است. این روش در اکثر مراحل خود شیمیایی می‌باشد. به صورتی که، کمپلکس اوره بین ملکول‌های اوره و ملکول‌های مورد نظر (جهت تغلیظ) که مهمان نامیده می‌شود، تحت شرایط خاص دمایی و رطوبت شکل می‌گیرد. مولکول‌های اوره به وسیله پیوند هیدروژنی با یکدیگر پیوند دارند، درحالی‌که بین مولکول‌های اوره و مهمان، جاذبه واندروالسی وجود دارد که به صورت کانال‌های حلقوی با قطر ٠/٦-٠/٤ نانومتر با یکدیگر برهم‌کنش دارند (٤٧). اکثر کمپلکس‌های اوره دارای ساختار بلوری شش ضلعی می‌باشند، در حالی‌که ساختار کریستال اوره خالص چهار وجهی است (٤٨، ٤٩). کمپلکس اوره تا حدی قادر به حفاظت از ملکول‌های مهمان در برابر اکسیداسیون می‌باشد و می‌تواند برای خالص‌سازی اسیدهای چرب آزاد و مشتقات حاصل از آن‌ها مانند استرهای حاصل از روغن‌های نباتی، روغن ماهی و سایر روغن‌ها استفاده شود. ملکول‌هایی که برای تغلیظ با این روش مناسب هستند، دارای زنجیره طولانی از هیدروکربن‌ها می‌باشند. در مقابل، ملکول‌های حلقوی و شاخه‌دار و نیز هیدروکربن‌هایی که دارای کمتر از ٦ تا ٨ اتم کربن در شاخه مرکزی خود هستند برای تغلیظ با کمپلکس اوره مناسب نیستند (٥٠).

1. Urea complexation
2. Molecular Distillation (MD)
3. Supercritical fluid fractionation (SFF)
4. Supercritical Fluid Chromatography (SFC)

جدول ٤. مقدار اسیدهای چرب موجود در روغن تغلیظ شده از طریق ۲ روش از روغن ماهی تن (٪) (۵۲)

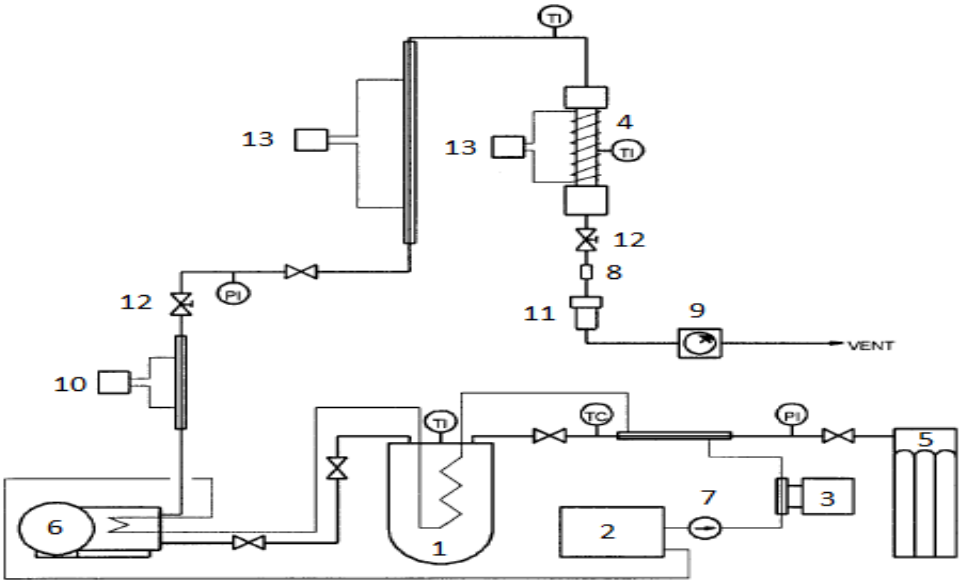
روش استخراج / اسید چرب (٪)	استخراج سیال فوق بحرانی (Supercritical Fluid Chromatography)	کمپلکس اوره (Urea complexation)
(اسید دودکانوئیک) C12:0	0.04±0.03	0.05±0.03
(اسید تترادکانوئیک) C14:0	1.02±0.74	1.25±0.56
(اسید پنتادکانوئیک) C15:0	0.63±0.39	0.69±0.48
(اسید پالمیتیک) C16:0	11.45±7.23	12.46±6.82
(اسید هگزادکانوئیک) C16:1	6.21±3.54	7.54±4.29
(اسید هپتادکانوئیک) C17:0	0.69±0.27	0.81±0.42
(اسید استئاریک) C18:0	1.23±0.95	1.93±0.89
(اسید اولئیک) C18:1	9.84±4.28	11.24±5.76
(اسید لینولئیک) C18:2	0.92±0.71	1.37±0.82
(اسید گاما لینولنیک) C18:3 n6	0.59±0.4	0.93±0.51
(اسید آلفا لینولنیک) C18:3 n3	1.25±0.84	1.83±0.75
(اسید آراشیدیک) C20:0	1.04±0.78	1.36±0.64
(اسید ایکوزنوئیک) C20:1	0.51±0.29	0.64±0.38
(اسید ایکوزا ترا انوئیک) C20:4 n3	0.78±0.26	1.23±0.64
(اسید آراشیدونیک) C20:4 n6	1.92±0.96	2.17±1.05
(اسید ایکوزاپنتانوئیک) C20:5 n3	4.87±2.25	3.69±2.14
(اسید دکازنوئیک) C22:0	0.63±0.39	0.84±0.41
(اسید دکوزاپنتانوئیک) C22:5 n3	1.94±0.69	1.42±0.88
(اسید دکوزاهگزانوئیک) C22:6 n3	45.23±7.92	36.72±5.14
اسید ایکوزاپنتانوئیک+ اسید دکوزاهگزانوئیک	50.1	40.41

روش کمپلکس اوره می‌تواند به‌صورت یگانه جهت تغلیظ به کار رفته و یا می‌تواند به‌صورت فرآیند قبل از سایر فرآیندهای تغلیظ EPA و DHA مانند روش تقطیر مولکولی و یا تقطیر مسیر کوتاه[1] به کار گرفته شود. در حالت دوم، کمپلکس اوره میزان اسیدهای چرب غیراشباع را در واحد حجم ارتقا داده، و این امر سبب سهولت اجرای روش‌های دیگر برای تغلیظ بیشتر می‌شود (۸، ۵۱). عدم به کارگیری حلال‌های آلی و ارزان بودن مواد مصرفی در این فرآیند از دلایل عمده انتخاب روش کمپلکس اوره می‌باشد. در این روش، اوره با اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب تک اشباع نشده[2] که به صورت آزاد و یا تری آسیل گلیسرول هستند تشکیل کمپلکس می‌دهد. کمپلکس‌های تشکیل شده به‌علت اختلاف چگالی رسوب نموده و با سانتریفیوژ و یا فیلتراسیون قابل جداسازی می‌باشند. این امر سبب تغلیظ اسیدهای چرب بلند زنجیر می‌شود، زیرا اسیدهای چرب کوتاه زنجیر از محیط روغن خارج می‌گردند (۵۰). بر اساس یکی از گزارشات ارائه شده، مقدار اسیدهای چرب تغلیظ شده در روغن ماهی تن با استفاده از روش کمپلکس اوره در جدول ٤ قرار دارد. لازم به ذکر است که مقادیر فلرات سنگین پس از تغلیظ نیز در جدول ۵ قرار داد (۵۲).

1.Short path distillation
2.Monounsaturated fatty acids (MUFA)

جدول ٥. مقدار فلزات سنگین موجود در روغن تغلیظ شده از طریق دو روش از روغن ماهی تن (٥٢)

عنوان / روش	استخراج سیال فوق بحرانی (Supercritical Fluid Extraction (ppm))	کمپلکس اوره (Urea complexation (ppm))
جیوه (Hg)	2.09±1.04	6.24±2.51
آرسنیک (As)	0.68±0.29	1.56±0.71
کادمیوم (Cd)	Trace	Trace
سرب (Pb)	Trace	Trace



شکل ٤. دیاگرام شماتیک فرآیند SFC جهت تغلیظ EPA و DHA از روغن ماهی اتیل استر شده (٥٦)

١. تانک CO_2
٢. وان خنک کننده
٣. سیستم خنک کننده
٤. ستون استخراج
٥. تغذیه کننده CO_2
٦. پمپ CO_2
٧. پمپ حجمی
٨. اتصالات
٩. روتامتر
١٠. ترایاک
١١. سیستم ترپینگ
١٢. دریچه (Valve)
١٣. واریاک

تغلیظ اسیدهای چرب امگا ٣ با استفاده از روش کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی (SFC):

به‌علت ویژگی‌های فیزیکی سیال فوق بحرانی، آن‌ها می‌توانند به عنوان فاز متحرک[1] در یک ستون پر شده و یا لوله موین حاوی فاز ثابت مناسب به کار گرفته شوند (٤٦، ٥٣). این تکنیک تحت عنوان کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی (SFC) نامیده می‌شود، که می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکنیک‌های معمولی کروماتوگرافی (مانند کروماتوگرافی گازی[2] یا کروماتوگرافی مایع با فشار بالا[3]) باشد و یا همچنین، برای اهداف تولیدی به کار

1.Mobile phase

2.Gas Chromatography (GC)

3.High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

گرفته شود (٥٤ و ٥٥). بخش‌های مختلف این سامانه در شکل ٤ نشان داده شده است (٥٦).

فرآیند SFC از آنجا که دارای حساسیت بالا در جداسازی بوده، می‌تواند به‌عنوان فاز متحرک نیز ایفای نقش کند و گزینه مناسبی برای جداسازی اسیدهای چرب امگا ۳ باشد (٥٣). بهترین حالت برای نتیجه‌گیری از فرآیند SFC این است که ابتدا اسیدهای چرب موجود در روغن ماهی از طریق واکنش استرفیکاسیون به اتیل‌استر اسیدچرب تبدیل شده و سپس توسط فرآیند SFC تغلیظ گردند (٥٧). همچنین، بهترین ماده جهت جمع آوری نمونه‌های حاصل از این فرآیند سیلیکاژل می باشد (٥٤ و ٥٨). آنالیز مقادیر اسیدهای چرب تغلیظ شده با استفاده از روش SFC و فلزات سنگین موجود در آن به ترتیب در جدول ٤ و ٥ قرار دارد که بر اساس یکی از مطالعات انجام شده در این زمینه گزارش شده است.

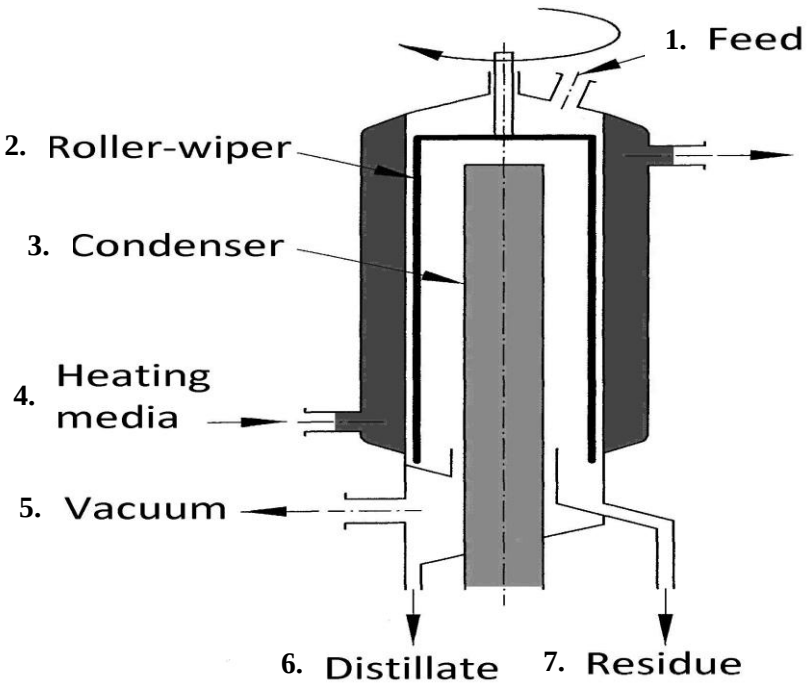
تغلیظ اسیدهای چرب امگا ۳ با استفاده از روش تقطیر مولکولی (MD): تقطیر مولکولی نوع ویژه‌ای از تقطیر تحت فشار خیلی پایین، در صنعت است و برای مواد حساس به درجه حرارت مناسب می‌باشد. این فناوری برای جداسازی، تخلیص و تغلیظ مواد ناپایدار در برابر گرما با فشار بخار کم و بر اساس اختلاف در فراریت است. به‌علت بالا بودن درجه حرارت تبخیر اسیدهای چرب به فرم تری‌گلیسرید و تجزیه آن‌ها در درجه حرارت‌های بالا، لازم است تا با اعمال فرآیندی خاص درجه حرارت تبخیر استرهای اسید چرب را کاهش داد. بهترین راهکار جهت حصول این نتیجه فرآیند استریفیکاسیون با اتانول می باشد. از آنجا که اتیل‌استرهای اسیدهای چرب نقطه جوش کمتری نسبت به اسیدهای چرب آزاد و تری-گلیسریدها دارند، در شرایط معین از فراریت بیشتری برخوردار هستند (٥٩). بدین سبب، روغن ماهی قبل از مرحله تقطیر مولکولی باید تحت واکنش استریفیکاسیون با اتانول قرار گیرد تا اسیدهای چرب موجود در آن به اتیل استرهای اسیدهای چرب مربوطه تبدیل شده و راندمان جداسازی در مرحله تقطیر مولکولی را به این صورت افزایش دهند (٤٣). در حقیقت این واکنش به منظور شکستن پیوندهای میان اسیدهای چرب و گلیسرول انجام می‌شود، سپس گروه اتیل با اسیدهای چرب پیوند برقرار می‌کند. در شکل ٥ دستگاه تقطیر مولکولی مورد نیاز جهت استخراج و تولید امگا ۳ نشان داده شده است (٦٠، ٦١).

میزان جداسازی در فرایند تقطیر مولکولی، تنها وابسته به فراریت نسبی اجزا نمی‌باشد، بلکه با تبخیر اجزای فرار از روی سطح مایع، علاوه بر کاهش درصد اجزا فرار، دمای سطح مایع نیز کم می‌شود. این پدیده موجب ایجاد نیرو محرکه‌ای شده که بحث انتقال جرم و حرارت را پیش می‌برد. سرعت تبخیر در این شرایط و تحت خلا از معادله لانگموییر- نادسن[1] محاسبه می‌شود (٦٢). اتیل استر ترکیبات امگا ۳، فراریت متوسطی نسبت به سایر اجزا موجود در ترکیب دارند به همین دلیل از دو مرحله تقطیر مولکولی متوالی استفاده می‌شود که در مرحله اول اجزا سبک‌تر از آنها و در مرحله دوم اجزا سنگین‌تر جدا می‌شوند.

ماگالانس و همکاران، (۲۰۱۹) (٤٣) تخلیص اسیدهای چرب EPA و DHA را با ۲ روش کمپلکس اوره و تقطیر مولکولی به صورت جداگانه و توام با هم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان EPA و DHA استحصالی در روش تقطیر مولکولی بیش از روش کمپلکس اوره و میزان این ۲ اسید چرب در ترکیب دو روش بیشتر از هر یک از روش‌ها به‌صورت جداگانه بود. میزان اسیدهای چرب آزاد

1. Langmuir- Knudsen Equation

(FFA)، شاخص پروکسید (PV) و نیز شاخص انیزیدین (AnV) در تیمار ترکیبی ٢ روش کمتر از هر یک از روش‌ها به صورت جداگانه بود.



شکل ٥. تقطیر مولکولی (٦٠، ٦١)

١. خوراک ورودی
٢. مالنده چرخان (وایپر)
٣. مبرد (کندانسور)
٤. محفظه داغ
٥. خلاء
٦. محصول تقطیر شده
٧. باقی مانده تقطیر

تغلیظ اسیدهای چرب امگا ٣ با استفاده از آنزیم: جهت تغلیظ امگا ٣، آنزیم‌ها به صورت یگانه و یا همراه با دیگر روش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات اخیر استفاده از آنزیم‌های متنوع را به منظور هیدرولیز، استریفیکاسیون، جداسازی الکلی[1] و غیره را نشان می‌دهند (٥٣). اما به‌طورعمده از آنزیم لیپاز جهت هیدرولیز انتخابی[2] اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب تک اشباع نشده[3] تری آسیل گلیسرول به منظور ایجاد گلیسریدهای غنی از امگا ٣ استفاده می‌شود.

لیپازها هیدرولازهایی هستند که به‌صورت طبیعی در محیط آبی پیوند استر کربوکسیل موجود در آسیل‌گلیسرول‌ها را شکسته و اسیدهای‌چرب را آزاد می‌کنند. علاوه بر هیدرولیز آنزیمی، در محیط آلی یا ریزآبی (Micro-aqueous)، لیپازها قادرند واکنش معکوس، یعنی سنتز را انجام دهند و پیوندهای استری را ایجاد کنند (٦٣). بعضی لیپازها نسبت به

1. Alcoholysis
2. Structured hydrolysis
3. Monounsaturated fatty acids (MUFA)

SFA/MUFA یا PUFA گزینش‌گری دارند. به همین دلیل، یکی از این دو دسته را بیشتر هیدرولیز یا استری می‌کنند. از ویژگی اختصاصیت نسبی سوبسترای لیپازها برای تغلیظ اسیدهای چرب امگا۳ استفاده می‌شود. پس از واکنش آنزیم و جداسازی‌های مناسب، در یک جزء محصول غلظت PUFA افزایش می‌یابد (٦٤).

بسیاری از لیپازها هیدرولیز پیوندهای استری n-3 PUFA بلندزنجیر را بسیار آهسته‌تر از SFAs وMUFAs انجام می‌دهند. این گزینش‌گری لیپاز را می‌توان برای غنی‌سازی جزء گلیسریدی از EPA و DHA به کار گرفت. علاوه بر این، بسیاری از لیپازها بین EPA و DHA نیز می‌توانند تمایز قائل شوند. این قابلیت امکان تولید کنسانتره‌هایی با غلظت بالای یکی از این دو اسید چرب را فراهم می‌کند (٦٥).

لازم به ذکر است که انتخاب نوع آنزیم لیپاز، مرتبط با اسید چرب و یا موقعیت آن در تری آسیل گلیسرول در بهبود واکنش و محصول نهایی نقش به سزایی دارد (٦٦ و ٦٧). از آنزیم جهت انجام مرحله استریفیکاسیون و ترنس استریفیکاسیون نیز استفاده می‌شود، تا اتیل استرهای امگا ۳ تشکیل شود و از طریق جداسازی با سیال فوق بحرانی یا تقطیر مولکولی جداسازی انجام شود. قابل توجه است که در مطالعه‌ای دیگر پیش از مرحله تقطیر مولکولی از استریفیکاسیون شیمیائی و آنزیمی استفاده شده است و محصولی با DHA معادل ۹۰ درصد و EPA بسیار ناچیز معادل ۲ درصد به دست آمده است (٥٣).

همچنین، بسیاری از مطالعات استفاده از آنزیم‌ها را مبتنی بر روش‌های دیگری مانند، سیال فوق بحرانی، تقطیر مولکولی، فیلتراسیون غشائی و غیره انجام می‌دهند. به‌طور مثال از آنزیم در حضور سیال فوق بحرانی دی کربن اکسید استفاده شده است (٦٩)، که از مزایای قابل توجه آن می‌توان به غیر سمی بودن و جداسازی راحت آن از محصولات واکنش اشاره داشت. در نهایت می‌توان از مزایای استفاده از آنزیم، به کاهش تشکیل محصولات جانبی از پی عملکرد منحصر به فرد آنزیم، دمای پائین‌تر واکنش‌ها، کاهش اثرات زیست محیطی و هزینه‌های مراحل اشاره داشت. علاوه بر آن، می‌توان محصولی با غلظتی بالا و به تقریب خالص از اسید چرب مورد نظر را بدست آورد (٧٠).

مطالعات متنوعی در زمینه استخراج با استفاده از آنزیم گزارش شده است. یکی از مطالعات انجام شده توسط هوشینو و همکاران (۱۹۹۰) بررسی هیدرولیز انتخابی با شش لیپاز می‌باشد که لیپاز حاصل از *Candida Cylindracea* و *Aspergillus niger* به ترتیب بیشترین تغلیظ n-3 PUFA را در گلیسریدها، با بیش از دو برابر افزایش غلظت فراهم کردند (٧١). یکی دیگر از گزارشات مربوط به ولورده و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد، که از آنزیم لیپاز QLG (*Alcaligenes* sp.) برای انجام اتانولایزیس (ethanolysis) روغن ساردین با EPA %19 استفاده کردند. با توجه به آنکه آنزیم، اسید چرب EPA را کمتر برای واکنش ترانس استریفیکاسیون (trans esterification) انتخاب می‌کند، غلظت EPA در آسیل‌گلیسرول‌های محصول به ٣٤-٣٩درصد افزایش یافت (٧٢). همچنین بهانداری و همکاران (۲۰۱۳) استریفیکاسیون انتخابی با استفاده از لیپاز (حاصل از *Rhizopus oryzae*) را در سیستم دو فازی آب-حلال آلی را جهت افزایش غلظت DHA بررسی کردند. از نتایج این مطالعه می‌توان به بازیابی ۸۰ درصد از اسید چرب DHA اشاره داشت. لازم به ذکر است در ابتدا FFA های به‌دست آمده از هیدرولیز روغن تن دارای ٢٦درصد اسید چرب DHA بود، با توجه به آنکه آنزیم لیپاز DHA را به نسبت سایر FFA ها کمتر استری می‌کند، مقدار DHA در جزء

FFA باقی مانده افزایش می‌یابد (٧٣). یکی از تحقیقات صورت گرفته توسط سولاسا و همکاران (٢٠١٦) می‌باشد که گلیسرولیز آنزیمی روغن ساردین را مورد بررسی قرار دادند و از آنزیم لیپاز Lipozyme 435 (CALB) استفاده شد، که پس از انجام این واکنش مخلوطی از آسیل‌گلیسرول‌ها با ٦٧٪ مونوگلیسیرید بدست آمد، که در ادامه با استفاده از تقطیر مولکولی محصولی شامل MAG غنی از امگا٣ حاصل شد (٧٤).

شاخص‌های کیفی روغن و امگا ٣ تخلیص شده و اهمیت آن‌ها: از جمله مواردی که هم در زمینه تصفیه روغن ماهیان و هم خالص‌سازی امگا ٣ باید مورد توجه ویژه قرار گیرد، میزان بوی نامطبوع ماهی (عموماً متاثر از میزان و تنوع مواد فرار)، شاخص‌های مرتبط با اکسیداسیون (اولیه و ثانویه)، فلزات سنگین منتقل شده از بافت به روغن و یا از روغن به امگا ٣ تخلیص یافته و غیره است (٧٥). به‌طورکلی، رادیکال‌های آزاد در روغن سبب ایجاد اکسیداسیون شده و این اکسیداسیون موجب تولید هیدروپروکسیدها و به دنبال آن ترکیبات فرار[1] کوچک مانند آلکان‌ها، آلکن‌های کوچک، آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک و غیره می‌شود (٧٦ و ٧٧). بنابراین، آنالیز این عوامل به عنوان شاخص‌های اکسیداسیونی در روغن ماهی و امگا ٣ تخلیص شده ضروری است. همچنین، میزان اسیدهای چرب آزاد[2] و نرخ اسیدیته[3] از مهمترین شاخص‌های کیفی روغن ماهی و امگا ٣ هستند که همواره مورد توجه می‌باشند (٧٨ و٤٣). در جدول ٦، مقادیر مجاز و تایید شده توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) و فارماکوپه اروپا (EP) اشاره شده است. میزان دو شاخص (اسیدهای چرب آزاد و نرخ اسیدیته) از اولین عامل‌های ضروری جهت انتخاب روغن ماهی مناسب برای تولید امگا ٣ از آن است. ترکیب اسیدهای چرب روغن ماهی و یا امگا ٣ استحصالی از آن نیز از شاخص‌های ثابت کنترل کیفی روغن ماهی و امگا ٣ است، که به ویژه به واسطه دو اسیدچرب غیر اشباع بلند زنجیر یعنی EPA و DHA بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد. لازم به ذکر است اسیدهای چرب امگا٣ می‌توانند به دو صورت تری‌آسیل‌گلیسرول و اتیل استر اسیدچرب (FAEE[4]) توسط انسان مصرف شوند و نوع فرآیند تغلیظ در قالب محصول نهایی موثر می‌باشد. FAEE ها محصولات خروجی روش‌های MD، SFE و SFC بوده و تری آسیل گلیسرول‌ها محصول خروجی روش‌های آنزیمی و کمپلکس اوره می‌باشند. البته، فرم FAEEها با افزودن گلیسرول و اعمال شرایط فرآیندی خاص امکان تبدیل شدن به تری آسیل گلیسرول‌ها را دارند. به‌طورکلی امکان جذب تری آسیل گلیسرول‌ها توسط بدن بالاتر از FAEEها می‌باشد. از سوی‌دیگر، با توجه با استحصال نفت در بسیاری از مناطق آبی جهان، میزان فلزات سنگین در بافت آبزیان به‌شدت افزایش یافته است که این مورد به‌ویژه در مصرف آبزیان و نیز روغن‌های استحصالی از آنان باید لحاظ گردیده و فرآیند استخراج یا تخلیص با استفاده از روش‌هایی صورت پذیرند که امکان انتقال فلزات به محصول بعدی را کاهش دهند (٧٩).

1.Volatile component
2.Free Fatty Acids (FFA)
3.Acid Value
4.Fatty Acid Ethyl Ester

جدول ٦. مقادیر مجاز اسیدهای چرب امگا۳ بر اساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی (WHO) و فارماکوپه اروپا (EP)

شاخص	استاندارد	
	EP	WHO
Peroxide Value (mEq/kg)	< 10	< 5
Acid Value (mgKOH/g)	< 3	< 3
Heavy and toxic metals		
Mercury (ppm)	0.1	N/A
Lead (ppm)	3	< 0.1
Arsenic (ppm)	N/A	< 0.1
Cadmium (ppm)	1	N/A

نتیجه‌گیری

اسیدهای چرب امگا ۳ جزء اسید چرب‌های ضروری می‌باشند که لازم است توسط منابع غذایی تأمین شوند. با توجه به تأثیرات قابل توجه امگا ۳ بر سلامت انسان و نقش پیشگیرانه نسبت به بسیاری از بیماری‌ها، تهیه آن به‌صورت طبیعی و یا به صورت مکمل دارویی بسیار ضرورت دارد. اصلی‌ترین منبع اسیدهای چرب امگا ۳، منابع دریایی به‌خصوص ماهیان می‌باشند و امگا ۳ در قالب TAG به تقریب بین ۲۵-۱۰درصد روغن ماهی را به خود اختصاص داده است. بدین سبب اولین گام در تولید امگا ۳ استخراج روغن ماهی با کیفیت می‌باشد که روش‌های گوناگونی برای آن در جهان وجود دارد که شکل صنعتی آن روش پرس مرطوب است. پس از استخراج روغن نیز فرآیندهایی چون تصفیه، پولیش روغن، استریفیکاسیون و تغلیظ باید صورت پذیرند تا محصول قابل ارائه به مصرف کنندگان تهیه گردد. امگا ۳ یکی از معدود مکمل‌هایی است که توسط FDA مصرف آن به صورت روزانه توصیه شده است. لذا، مصرف این نوع مکمل به میزان یک عدد کپسول با حداقل ۳۰درصد (EPA+DHA) ماده موثره در صورت عدم مصرف ماهی در هفته مناسب می‌باشد.

References

1. Petrovic, S., and Arsic, A. 2016. Fatty Acids: Fatty Acids. Encyclopedia of Food and Health, 623–631.
2. Gerling, C. J., Mukai, K., Chabowski, A., Heigenhauser, G. J. F., Holloway, G. P., Spriet, L. L., and Jannas-Vela, S. 2019. Incorporation of omega-3 fatty acids into human skeletal muscle sarcolemmal and mitochondrial membranes following 12 weeks of fish oil supplementation. Frontiers in Physiology, 10(MAR), 348.
3. Calder, P.C. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? British Journal of Clinical Pharmacology, 75(3), 645–662.
4. Ishihara, T., Yoshida, M., and Arita, M. 2019. Omega-3 fatty acid-derived mediators that control inflammation and tissue homeostasis. International Immunology, 31(9), 559–567.
5. Meital, L.T., Windsor, M.T., Perissiou, M., Schulze, K., Magee, R., Kuballa, A., Golledge, J., Bailey, T.G., Askew, C.D., and Russell, F.D. 2019. Omega-3 fatty acids decrease oxidative stress and inflammation in macrophages from patients with small abdominal aortic aneurysm. Scientific Reports, 9(1).
6. Heshmati, J. 2021. Effect of omega-3 fatty acid supplementation on gene expression of inflammation, oxidative stress and cardiometabolic parameters: Systematic review and meta-analysis. Journal of Functional Foods, 85.
7. Miralles-Pérez, B., Méndez, L., Nogués, M.R., Sánchez-Martos, V., Fortuño-Mar, À., Ramos-Romero, S., Hereu, M., Medina, I., and Romeu, M. 2021.

Effects of a Fish Oil Rich in Docosahexaenoic Acid on Cardiometabolic Risk Factors and Oxidative Stress in Healthy Rats. Marine Drugs, 19(10).

8. Haq, M., Park, S.K., Kim, M.J., Cho, Y. J., and Chun, B.S. 2018. Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different ω-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 26(2), 545–556.
9. Šimat, V., Vlahovic, J., Soldo, B., Skroza, D., Ljubenkov, I., and Mekinic, I. G. 2019. Production and Refinement of Omega-3 Rich Oils from Processing By-Products of Farmed Fish Species. Foods 2019, Vol. 8, Page 125, 8(4), 125.
10. Ghaly, R.V. 2013. Extraction of Oil from Mackerel Fish Processing Waste using Alcalase Enzyme. Enzyme Engineering, 02(02).
11. Li, Z., and Srigley, C.T. 2017. A novel method for the quantification of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in gummy dietary supplements. Journal of Food Composition and Analysis, 56.
12. BLIGH, E.G., and DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37(8), 911–917.
13. Li, X., Cao, J., Bai, X., and Zhang, F. 2018. Chemical composition and thermal properties of Tilapia oil extracted by different methods. International Journal of Food Properties, 21(1), 1575–1585.
14. Fiori, L., Volpe, M., Lucian, M., Anesi, A., Manfrini, M., and Guella, G. 2017. From Fish Waste to Omega-3 Concentrates in a Biorefinery Concept. Waste and Biomass Valorization, 8(8), 2609–2620.
15. Abdulkadir, M., Abubakar, G.I., and Mohammed, a. 2010. Production and characterization of oil from fishes. Journal of Engineering and Applied Sciences, 5(7).
16. Fu, H., Li, M., Ni, R., and Lo, Y.M. 2018. Enzymatic catalysis for sustainable production of high omega-3 triglyceride oil using imidazolium-based ionic liquids. Food Science and Nutrition, 6(8), 2020–2027.
17. Taati, M.M., Shabanpour, B., and Ojagh, M. 2018. Investigation on fish oil extraction by enzyme extraction and wet reduction methods and quality analysis. AACL Bioflux, 11(1).
18. Rubio-Rodríguez, N., de Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M.T., and Rovira, J. 2012. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: a1 comparison with other extraction methods. Journal of Food Engineering, 109(2), 238–248.
19. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fishery Industries Division. 1986. The production of fish meal and oil. 63.
20. Adeniyi, O.D., and Bawa, A.A. 2006. Mackerel (Scomber Scrombrus) Oil Extraction and Evaluation as Raw Materials for Industrial Utilization. Leonardo Journal of Sciences Issue, 8.
21. Taati, M.M., Shabanpour, B., and Ojagh, M. 2017. Extraction of oil from tuna by-product by supercritical fluid extraction (SFE) and comparison with wet reduction method. AACL Bioflux, 10(6).
22. Alfio, V.G., Manzo, C., and Micillo, R. 2021. From Fish Waste to Value: An Overview of the Sustainable Recovery of Omega-3 for Food Supplements. Molecules 2021, Vol. 26, Page 1002, 26(4), 1002.
23. Sayyad, R., and Ghomi, M. 2017. Evaluation of fatty acid profile, color characteristics, oxidative quality and stability of common Kilka (Clupeonella cultriventris caspia) oil obtained by various extraction techniques. Journal of Food Science and Technology, 54(6), 1377.
24. Taati, M.M., Shabanpour, B., and Ojagh, M. 2018. Influence of Different Extraction Methods on Chemical Components of Oil Obtained from By-products of Tuna Canning Factories.

Journal of Fisheries Science and Technology. 7(1):157-165. (In Persian)
25. Taati, M.M., Shabanpour, B., and Ojagh, M. 2017. Assessment the Potential of Supercritical Carbon Dioxide on Extraction of Oil from Tuna By-products and Comparison with Wet Pressing Method. Journal of Fisheries Science and Technology. 70(1):70-84. (In Persian)
26. Liaset, B., Julshamn, K., and Espe, M. 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex^{TM}. Process Biochemistry, 38(12), 1747–1759.
27. Castejón, N., and Señoráns, F. J. 2020. Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil, algae and other new omega-3 sources: A review. New Biotechnology, 57, 45–54.
28. Qi-yuan, Jun-qing, and Xiao-ge. 2016. Optimization of enzymatic fish oil extraction from mackerel viscera by response surface methodology. International Food Research Journal, 23(3), 992–997.
29. Taati Keley, M.M., Shabanpour, B., and Ojagh, S.M. 2017. Assessment the Potential of Supercritical Carbon Dioxide on Extraction of Oil from Tuna By-products and Comparison with Wet Pressing Method. Journal of Fisheries, 70(1), 70–84.
30. Margotta, M., and Guida, D. 2020. Supercritical Fluid Extraction of Lycopene and Omega-3. Wseas Transactions On Biology And Biomedicine, 17.
31. Fiori, L., Solana, M., Tosi, P., Manfrini, M., Strim, C., and Guella, G. 2012. Lipid profiles of oil from trout (Oncorhynchus mykiss) heads, spines and viscera: trout by-products as a possible source of omega-3 lipids? Food Chemistry, 134(2), 1088–1095.
32. Parisotto, E.B., Michielin, E.M.Z., Biscaro, F., Ferreira, S.R.S., Filho, D. W., and Pedrosa, R.C. 2012. The antitumor activity of extracts from Cordia verbenacea D.C. obtained by supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids, 61, 101–107.
33. Santos, D.N.E, Takahashi, E.H., Verde, A.B., and Oliveira, A.L. de. 2016. Supercritical Extraction of Cobia (Rachycentron canadum) Liver Oil as a New Source of Squalene. Food and Public Health, 6(6), 157–164.
34. Prieto, C., and Calvo, L. 2017. The encapsulation of low viscosity omega-3 rich fish oil in polycaprolactone by supercritical fluid extraction of emulsions. The Journal of Supercritical Fluids, 128, 227–234.
35. Belayneh, H.D., Wehling, R.L., Cahoon, E., and Ciftci, O. N. 2015. Extraction of omega-3-rich oil from Camelina sativa seed using supercritical carbon dioxide. Journal of Supercritical Fluids, 104.
36. Triana-Maldonado, D.M., Torijano-Gutiérrez, S.A., and Giraldo-Estrada, C. 2017. Supercritical CO2 extraction of oil and omega-3 concentrate from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from Antioquia, Colombia. Grasas y Aceites, 68(1).
37. Chen, C.R., Lin, D.M., Chang, C.M.J., Chou, H.N., and Wu, J.J. 2017. Supercritical carbon dioxide anti-solvent crystallization of fucoxanthin chromatographically purified from Hincksia mitchellae P.C. Silva. The Journal of Supercritical Fluids, 119, 1–8.
38. Passos, C.P., Silva, R.M., da Silva, F.A., Coimbra, M.A., and Silva, C.M. 2009. Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. Journal of Supercritical Fluids, 48(3), 225–229.
39. Knez, Markočič, E., Leitgeb, M., Primožič, M., Knez Hrnčič, M., and Škerget, M. 2014. Industrial applications of supercritical fluids: A review. Energy, 77, 235–243.
40. Gandhi, K., Arora, S., and Kumar, A. 2017. Industrial applications of supercritical fluid extraction: a review. International Journal of Chemical Studies, 5(3).
41. Siscovick, D.S., Barringer, T. A., Fretts, A.M., Wu, J.H.Y., Lichtenstein, A.H., Costello, R.B., Kris-Etherton, P.M., Jacobson, T.A., Engler, M. B., Alger, H.

M., Appel, L.J., and Mozaffarian, D. 2017. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory from the American Heart Association. Circulation, 135(15), e867–e884.

42. Haq, M., Park, S.K., Kim, M.J., Cho, Y.J., and Chun, B.S. 2018. Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different ω-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis. Journal of Food and Drug Analysis, 26(2), 545–556.
43. Magallanes, L.M., Tarditto, L.V., Grosso, N.R., Pramparo, M.C., and Gayol, M.F. 2019. Highly concentrated omega-3 fatty acid ethyl esters by urea complexation and molecular distillation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(2), 877–884. https://doi.org/10.1002/JSFA.9258
44. Pateiro, M., Domínguez, R., Varzakas, T., Munekata, P. E. S., Movilla Fierro, E., and Lorenzo, J. M. 2021. Omega-3-Rich Oils from Marine Side Streams and Their Potential Application in Food. Marine Drugs, 19(5).
45. Pieck, C.A., Crampon, C., Charton, F., and Badens, E. 2017. A new model for the fractionation of fish oil FAEEs. The Journal of Supercritical Fluids, 120, 258–265.
46. Taati Keley, M., Shabanpour, B., and Ojagh, M. 2018. Production of DHA-High Dosage Fish Oil from Tuna by-Products by Coupling of Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Supercritical Fluid Chromatography (SFC). Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 13(2), 31–40. (In Persian)
47. Hwang, L.S., and Liang, J.H. 2001. Fractionation of urea-pretreated squid visceral oil ethyl esters. Journal of the American Oil Chemists' Society 2001 78:5, 78(5), 473–476.
48. Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthews, D., and Ackman, R.G. 1988. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. Fett Wissenschaft Technologie/Fat Science Technology, 90(10), 381–386.
49. Smith, A.E. 1952. The crystal structure of the urea–hydrocarbon complexes. Acta Crystallographica, 5(2).
50. Liu, S., Zhang, C., Hong, P., and Ji, H. 2006. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. Journal of Food Engineering, 73(3), 203–209.
51. Arabian, D., and Amiri, P. 2020. Improving Recovery Process of Omega-3 Fatty Acids from a Native Species of Chlorella vulgaris Using Integrated Method. Applied Food Biotechnology, 7(4).
52. Taati, M.M. 2018. Comparison of the effect of different methods of production on efficiency and quality of the fish oil and then EPA, DHA from by-products of tuna canning factories. Ph.D. thesis. (In Persian)
53. Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S. M., Sanz, M. T., and Carballido, J. R. 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(1), 1–12.
54. Dołowy, M., and Pyka, A. 2015. Chromatographic methods in the separation of long-chain mono- and polyunsaturated fatty acids. Journal of Chemistry, 2015.
55. Melgosa, R., Sanz, M.T., and Beltrán, S. 2021. Supercritical CO2 processing of omega-3 polyunsaturated fatty acids – Towards a biorefinery for fish waste valorization. The Journal of Supercritical Fluids, 169, 105121.
56. Pettinello, G., Bertucco, A., Pallado, P., and Stassi, A. 2000. Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: from the laboratory scale to the pilot plant. The Journal of Supercritical Fluids, 19(1), 51–60.
57. Espinosa, S., Diaz, M.S., and Brignole, E.A. 2008. Food additives obtained by supercritical extraction from natural sources. Journal of Supercritical Fluids, 45(2), 213–219.

58. Montañés, F., and Tallon, S. 2018. Supercritical fluid chromatography as a technique to fractionate high-valued compounds from lipids. Separations, 5(3).
59. Rossi, P., Gayol, M. F., Renaudo, C., Pramparo, M.C., Nepote, V., and Grosso, N.R. 2014. The use of artificial neural network modeling to represent the process of concentration by molecular distillation of omega-3 from squid oil. Grasas y Aceites, 65(4).
60. Rossi, P., Grosso, N.R., Pramparo, M. del C., and Nepote, V. 2012. Fractionation and concentration of omega-3 by molecular distillation. In Eicosapentaenoic Acid: Sources, Health Effects and Role in Disease Prevention.
61. Cvengroš, J., Pollák, S., Micov, M., and Lutišan, J. 2001. Film wiping in the molecular evaporator. Chemical Engineering Journal, 81(1–3), 9–14.
62. Zhang, G., Liu, J., and Liu, Y. 2013. Concentration of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Oil of Schizochytrium limacinum by Molecular Distillation: Optimization of Technological Conditions. Industrial and Engineering Chemistry Research, 52(10), 3918–3925.
63. Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(6), 763–781.
64. Namal Senanayake, S.P.J. 2010. Methods of concentration and purification of omega-3 fatty acids. Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries, 483–505.
65. Shahidi, F., and Wanasundara, U. N. 1998. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. Trends in Food Science and Technology, 9(6), 230–240.
66. Aarthy, M., Saravanan, P., Ayyadurai, N., Gowthaman, M. K., and Kamini, N. R. 2016. A two step process for production of omega 3-polyunsaturated fatty acid concentrates from sardine oil using Cryptococcus sp. MTCC 5455 lipase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 125, 25–33.
67. Valverde, L.M., Moreno, P.A.G., Cerdán, L. E., López, E.N., López, B.C., and Medina, A.R. 2014. Concentration of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids by enzymatic alcoholysis with different acyl-acceptors. Biochemical Engineering Journal, 91, 163–173.
68. Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., de Diego, S.M., Sanz, M.T., and Carballido, J.R. 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(1), 1–12.
69. Lin, T.J., Chen, S.W., and Chang, A.C. 2006. Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase-catalyzed trans-esterification under supercritical conditions. Biochemical Engineering Journal, 29(1–2), 27–34.
70. De Meester, F., Watson, R.R., and Zibadi, S. 2013. Omega-6/3 fatty acids: Functions, sustainability strategies and perspectives. Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives, 1–427.
71. Hoshino, T., Yamane, T., and Shimizu, S. 1990. Selective Hydrolysis of Fish Oil by Lipase to Concentrate n-3 Polyunsaturated Fatty Acids1. Biol. Chem, 54(6), 1459–1467.
72. Valverde, L.M., Moreno, P.A.G., Callejón, M.J.J., Cerdán, L.E., and Medina, A.R. 2013. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. European Journal of Lipid Science and Technology, 115(9), 990–1004.
73. Bhandari, K., Chaurasia, S. P., Dalai, A. K., and Gupta, A. 2013. Purification of Free DHA by Selective Esterification of Fatty Acids from Tuna Oil Catalyzed by Rhizopus oryzae Lipase. Journal of the American Oil Chemists' Society, 90(11), 1637–1644.
74. Solaesa, Á.G., Sanz, M.T., Falkeborg, M., Beltrán, S., and Guo, Z. 2016. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3

polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. Food Chemistry, 190, 960–967.

75. Nevigato, T., Masci, M., and Caproni, R. 2021. Quality of fish-oil-based dietary supplements available on the italian market: A preliminary study. Molecules, 26(16).

76. Sottero, B., Leonarduzzi, G., Testa, G., Gargiulo, S., Poli, G., and Biasi, F. 2019. Lipid Oxidation Derived Aldehydes and Oxysterols Between Health and Disease. In European Journal of Lipid Science and Technology (Vol. 121, Issue 1).

77. Heller, M., Gemming, L., Tung, C., and Grant, R. 2019. Oxidation of fish oil supplements in Australia. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 70(5), 540–550.

78. Rizliya, V., and Mendis, E. 2013. Biological, physical, and chemical properties of fish oil and industrial applications. Seafood Processing By-Products: Trends and Applications, 9781461495901, 285–313.

79. Chmeisser, E., Goessler, W., Kienzl, N., and Francesconi, K.A. 2005. Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICPMS. The Analyst, 130(6), 948–955.

View publication stats