مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سیزدهم، شماره 2، تابستان 1397، صفحات 40-31

تولید روغن ماهی غنی از DHA از ضایعات تن ماهیان با استفاده از ترکیب روش‌های استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE) و کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی (SFC)

محمد مهدی طاعتی کلی[1]، بهاره شعبانپور[2]، سید مهدی اجاق[3]

1- دانشجوی مقطع دکتری، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

2- نویسنده مسئول: استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
پست الکترونیکی: bshabanpour@yahoo.com

3- استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: 96/2/17 تاریخ پذیرش: 96/5/23

چکیده

سابقه و هدف: ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از اسیدهای چرب ضروری می‌باشند که پتانسیل ویژه‌ای در سلامتی انسان دارند. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف تولید روغن حاوی مقادیر بالا از DHA از ضایعات تن ماهیان توسط کوپل‌کردن روش‌های استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE) و کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی (SFC) انجام شد.

مواد و روش‌ها: ضایعات تن‌ماهیان پس از آنالیز ترکیبات، با استفاده از روش SFE روغن‌گیری شدند. سپس، سطوح DHA توسط روش SFC تغلیظ گردید. روغن‌های خروجی هر دو فرآیند با ارزیابی میزان رطوبت و پارامترهای شیمیایی چون ترکیبات فرار، لیپیدهای خنثی، پروفایل اسیدهای چرب و نرخ اسیدیته کیفی سنجی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که ترکیبات فراری چون آلکان‌ها غالباً در روغن‌های خروجی هر 2 فرآیند وجود داشت. آلدهیدها در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردیدند و اسید استیک تنها در روغن‌های حاصل از SFE تشخیص داده شد. دی‌متیل‌آمین در روغن خروجی هر 2 فرآیند مشاهده گردید. در لیپیدهای خنثی، سطوح TAG و FFA در روغن‌های خروجی SFC بیش از SFE بود. از سوی‌دیگر، میزان استرهای واکسی و کلسترول در روغن خروجی فرآیند SFE بیش از SFC بود. در اسیدهای چرب، میزان DHA در روغن بدست آمده از SFC به‌طور معنی‌داری بیشتر از SFE بود. نرخ اسیدیته در روغن‌های حاصل از هر 2 فرآیند اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: ضایعات تن‌ماهیان دارای پتانسیل مناسبی برای تولید امگا 3 با کیفیت بوده و کوپلینگ فرآیندهای SFE و SFC روشی مناسب برای تولید روغن ماهی با دوزهای بالای DHA است.

واژگان کلیدی: امگا 3، ضایعات تن ماهیان، سیال فوق بحرانی، ترکیبات فرار

• مقدمه

امگا 3 (به‌ویژه EPA و DHA) از اسیدهای چرب ضروری (اسیدهای چربی که در بدن سنتز نمی‌شوند) برای بدن انسان می‌باشند که منبع اصلی تامین آن‌ها محصولات دریایی خصوصاً ماهیان هستند. اهمیت استفاده از امگا 3 به‌ویژه در مطالعاتی که از سال 2000 به بعد انجام شده‌اند مورد تاکید و توجه قرار گرفته است (1). تحقیقات بسیار زیادی تأثیرات مثبت اسیدهای چرب امگا 3 را بر بیماری‌های قلبی و عروقی به ویژه تصلب شرایین (Athrosclerosis) (2)، التهابات شدید مانند آسم (3)، پسوریازیس (بیماری پوستی مزمن ناشی از خود ایمنی) (4)، بیماری‌های روده (5)، بیماری‌های روانی (7، 6)، جلوگیری از چندین نوع از انواع سرطان (9، 8)، آرتریت روماتوئید (روماتیسم) (10)، پیشگیری از ابتلا به کبد چرب (NAFLD) (9) و کاستن از بروز عوارض بیماری آلزایمر (11)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

گزارش کرده‌اند. بنابراین، می‌توان امگا 3 را محصول بسیار مهم خوراکی و دارویی با منشأ دریایی دانست.

گام اول در خالص‌سازی امگا 3 استحصال روغن می‌باشد. تاکنون روش‌ها و شیوه‌های گوناگونی چون پرس مرطوب (12)، بلای و دایر (13)، هضم قلیایی (14)، استخراج با حلال ایزوپروپیل الکل (14)، استخراج با سوکسله (15)، استخراج آنزیمی (16)، استخراج سرد (17) و ... در جهت روغن‌کشی از بافت‌های مختلف ماهیان آزموده شده است. جدیدترین فرآیندی که اکنون در جهان در جهت تولید روغن ماهی مورد توجه و استفاده قرار گرفته است، فرآیند استخراج با سیال فوق بحرانی SFE (Supercritical Fluid Extraction) می‌باشد. در این روش، نمونه تحت شرایط دمایی و فشار تعیین شده در مدت زمان مشخص با سیال فوق بحرانی (دی اکسید کربن) در تماس بوده و ماده مورد نظر از آن استخراج می‌گردد (18).

در زمینه استخراج امگا 3 نیز فرآیندهای مختلفی تاکنون مورد آزمون قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان کمپلکس اوره (Urea complexation) (19)، هیدرولیز آنزیمی (20) و تقطیر مولکولی (21) را نام برد. در زمینه تخلیص اسیدهای چرب امگا 3 نیز فرآیندهای نوینی ابداع شده‌اند که کیفیت، بازدهی و زمان کوتاه را در بر داشته باشند. این روش‌ها شکنش با سیال فوق بحرانی SFF (Supercritical fluid fractionation) (22) و کروماتوگرافی با سیال فوق بحرانی SFC (Supercritical Fluid Chromatography) هستند (23). اساس کار این دو فرآیند نیز بر مبنای ویژگی‌های فیزیکی سیال فوق‌بحرانی است که می‌توان آن را به عنوان فاز متحرک در ستون حاوی فاز ساکن در نظر گرفت (24).

از جمله مواردی که هم در زمینه تصفیه روغن ماهیان و هم خالص‌سازی امگا 3 باید مورد توجه ویژه قرار گیرد، میزان بوی نامطبوع ماهی (عموماً متاثر از میزان و تنوع مواد فرار)، وجود ترکیبات لیپیدی گوناگون روغن و نیز فلزات سنگین منتقل شده از بافت به روغن و یا از روغن به امگا 3 تخلیص یافته است (25). بنابراین، با توجه به کلیه موارد ذکر شده و نیز میزان بالای ضایعات ماهی در ایران و ارزش افزوده بالقوه آن‌ها، نیاز به انجام پژوهشی در این زمینه را آشکار کرد.

از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف استفاده بهینه از محصولات جانبی کارخانه‌های کنسرو تن‌ماهیان در جهت استحصال روغن ماهی و امگا 3 از دو دیدگاه میزان کارآیی فرآیندها در تولید و کیفیت سنجی دقیق محصولات بدست آمده با استفاده از فرآیندهای SFE و SFC انجام شد.

• مواد و روش‌ها

تهیه مواد خام آزمایش و پیش تیمار: مواد خام مورد استفاده در این پژوهش محصولات جانبی کارخانه‌های کنسروسازی شامل سر، پوست، امعاء و احشاء، ستون فقرات و عضلات تیره سه گونه از تن‌ماهیان پرمصرف یعنی هوور (*Thunnus tonggol*)، هوور مسقطی (*Euthynnus pelamis*) و تن زرد باله (*Thunnus Albacares*) بودند، که با نسبت‌های مساوی (1:1:1) و ثابت از سه گونه منجمد گردیده و پس از انجماد به همراه یخ به محل انجام آزمایش حمل شدند و در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد تا شروع آزمایش قرار گرفتند.

آنالیز ترکیبات مغذی مواد خام اولیه: مواد خام اولیه (با نسبت‌های مساوی و ثابت از سه گونه) هموژن و خشک گردیده و ترکیبات مغذی آن‌ها شامل میزان رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر طبق روش‌های استاندارد AOAC (26) در ماده خشک اندازه‌گیری شد.

استخراج روغن ماهی توسط سیال فوق بحرانی (SFE): در این مطالعه، ابتدا تیمارهایی برای تعیین تیمار بهینه به لحاظ سطح تولید تعریف گردیدند. این تیماربندی بر اساس متغیرهای فشار سیال و درجه حرارت‌های مختلف انجام پذیرفت. هر یک از تیمارهای مذکور دارای 3 تکرار بود. بدین منظور، میزان 1000 گرم از نمونه‌های خام اولیه (با نسبت‌های مساوی و ثابت از سه گونه) برای هر یک از تکرارها به مدت 72 ساعت در فریزدرایر (به جهت کاهش دادن رطوبت نمونه‌ها به زیر 20 درصد) قرار داده شد و پس از آن به درون محفظه Extractor دستگاه SFE منتقل گردید (24). پس از اجرای این تیمارها (در مجموع 9 تیمار)، گروهی که دارای بالاترین نرخ بازدهی بود، جهت انجام آنالیز کیفی و سپس استخراج DHA از آن انتخاب گردید. فشارهای مورد بررسی بخش استخراج، 15، 20 و 25 MPa و درجه حرارت‌ها شامل 35، 40 و 45 درجه سانتی‌گراد بودند. میزان جریان حلال 10 گرم در دقیقه و مدت زمان استخراج 3 ساعت به طور ثابت در همه تیمارها در نظر گرفته شدند. 9 تیمار آزمایشی بخش مربوط به استخراج روغن توسط SFE و شرایط استخراج هر یک در جدول 1 آورده شده‌اند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

جدول 1. تیمارهای مربوط به استخراج روغن از ضایعات تن ماهیان و تخلیص روغن برای ارتقای سطح DHA توسط فرآیندهای SFE و SFC

	عنوان	فشار (MPa)	درجه حرارت (سانتی‌گراد)
تیمارهای مربوط به بخش استخراج روغن از ضایعات با فرآیند SFE	تیمار 1	15	35
	تیمار 2	15	40
	تیمار 3	15	45
	تیمار 4	20	35
	تیمار 5	20	40
	تیمار 6	20	45
	تیمار 7	25	35
	تیمار 8	25	40
	تیمار 9	25	45
تیمارهای مربوط به بخش تخلیص روغن برای ارتقای DHA توسط فرآیند SFC	تیمار 1	18	65
	تیمار 2	18	70
	تیمار 3	18	75
	تیمار 4	20	65
	تیمار 5	20	70
	تیمار 6	20	75
	تیمار 7	22	65
	تیمار 8	22	70
	تیمار 9	22	75

نرخ بازدهی روغن: پس از استحصال روغن در هر یک از تیمارها، نرخ بازدهی تولید بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{نرخ بازدهی (\%)} = \frac{\text{میزان روغن استحصال شده}}{\text{میزان موادخام اولیه}} \times 100$$

خالص‌سازی DHA به‌وسیله کروماتوگرافی با جریان فوق بحرانی (SFC): به منظور استخراج DHA، ابتدا روغن ماهی تهیه شده با روش SFE به صورت اتیل استر FAEEs (Fatty acid ethyl esters) درآمد. برای این امر از روش استاندارد ISO 15884, IDF 182 استفاده گردید. در این مرحله نیز ابتدا تیمارهایی برای تعیین تیمار بهینه به لحاظ سطح تولید تعریف گردیدند. این تیماربندی نیز بر اساس فشارها و درجه حرارت‌های مختلف سیال صورت پذیرفت. فشارهای مورد بررسی بخش خالص‌سازی، 18، 20 و 22 MPa و درجه حرارت‌ها شامل 65، 70 و 75 درجه سانتی‌گراد بودند. میزان جریان حلال 15 گرم در دقیقه و مدت زمان استخراج 5 ساعت به طور ثابت در همه تیمارها در نظر گرفته شدند. هر یک از تیمارهای (در مجموع 9 تیمار) مذکور دارای 3 تکرار بود (جدول 1).

در اجرای تیمارها، FAEEs به عنوان خوراک فرآیند SFC منظور گردید (27). پس از اجرای تیمارهای خالص سازی، گروهی که دارای بالاترین نرخ بازدهی بود، جهت انجام آنالیز کیفی انتخاب گردید.

نرخ بازدهی روغن تخلیص شده برای افزایش غلظت DHA: پس از اجرای فرآیند استخراج DHA در هر یک از تیمارها، نرخ بازدهی تولید بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{بازدهی تولید (\%)} = \frac{\text{میزان روغن خالص سازی شده}}{\text{میزان روغن اولیه}} \times 100$$

آنالیز کیفی روغن‌های استحصالی

اندازه‌گیری رطوبت روغن: میزان رطوبت روغن بر اساس روش استاندارد IUPAC (28) اندازه‌گیری شد.

سنجش میزان ترکیبات فرار: ترکیبات فرار از عوامل اصلی ایجاد بوی نامطبوع در روغن ماهی هستند. از این‌رو، جهت بررسی میزان تغییر سطوح آن‌ها در روغن، ترکیبات فرار شامل آلکان‌ها (از جمله: Decane، 2-Methyl-decane، 3-Methyl-decane، Undecane، Dodecane، Tridecane، Pentadecane، Cyclohexadecane، 2,6,10,14-Tetramethyl-pentadecane)، آلدهیدها (از جمله: Heptanal Waxy، Hexanal، Nonanal)، اسیدها (از جمله: Acetic acid) و آمین (از جمله: Dimethyl amine) سنجش گردیدند.

کلیه موارد فوق با استفاده از دستگاه GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) و پس از نمونه برداری SPED (Solid Phase Dynamic Extraction) سنجش شدند. سوزن دستگاه SPED (Chromtech, Idstein, Germany) توسط فیلم 50 میکرومتری غیرقطبی از جنس پلی دی‌متیل سیلوگزان با 10 درصد فاز کربن فعال کت شده بود (PDMS/AC). نمونه‌ها برای 1 دقیقه در درجه حرارت 70 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس متعادل سازی و استخراج صورت پذیرفت (50 سیکل آسپیراسیون، سرعت استخراج 40میکرومول در ثانیه). آنالیز کروماتوگرافی گازی نیز از طریق کوپل کردن آن با یک مس‌اسپکترومتر (Varian, CP-3800, Palo Alto, CA, USA) انجام شد. نمونه موجود در SPED پس از تزریق به صورت حرارتی در درجه حرارت 250 درجه سانتی گراد واجذب شد. ترکیبات در یک ستون مویرگی HP5 (50 متر طول×0/32 میلی متر قطر داخلی، ستون مویرگی کت شده با فیلم سیلیکای مذاب به ضخامت 1/05 میکرومتر، Quadrex Corporation, New Haven, USA)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

جداسازی شدند. درجه حرارت ستون با نواخت دمایی 3 درجه سانتی گراد افزایش درجه حرارت در هر دقیقه، از 40 درجه سانتی‌گراد به 240 درجه سانتی‌گراد رسید.

اندازه‌گیری میزان کل لیپیدهای خنثی: لیپیدهای خنثی اندازه‌گیری شده در این مطالعه موارد ذیل بودند:

استرهای واکسی WE (Wax esters)

تری اسیل گلیسرول‌ها TAG (Triacylglycerides)

اسیدهای چرب آزاد FFA (Free fatty acids)

کلسترول CHOL (Cholesterol)

ترکیبات فوق توسط دستگاه HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) کمپانی Wissenschaftliche Gerätebau مدل D-14163 آنالیز شدند. این دستگاه دارای پمپ کواترنری و یک اینجکتور خودکار بود. تفکیک‌ها در درجه حرات محیط و در یک ستون (Lichrospher Diol 5 میلی‌متر، 250×4 میلی‌متر) و تشخیص‌ها توسط دتکتور ELSD در درجه حرارت 45 درجه سانتی‌گراد و فشار 3/5 بار صورت پذیرفت (UNICAM 3800). فاز متحرک شامل مخلوطی از حلال‌های: (حلال A) هگزان/اسید استیک (به نسبت 99/5 به 0/5 درصد) و (حلال B) هگزان/1-پروپانول/اسید استیک/آب (به نسبت‌های 85 به 14/4 به 0/5 به 0/1 درصد) بود. گرادیان حلال‌ها بدین صورت مورد استفاده قرار گرفت: ابتدا، حلال A به مدت 1 دقیقه جریان پیدا کرده و پس از آن، حلال B در سه مرحله (بیش از 10 درصد در 9 دقیقه، 44 درصد در 12 دقیقه و 100 درصد در هشت دقیقه) اضافه شد. در نهایت، فاز ثابت با حلال A در مدت 5 دقیقه شسته شد. سرعت جریان کل محول‌ها 1 میلی‌لیتر در دقیقه در کل طول آنالیز بود. کالیبراسیون نیز با استفاده از استانداردهای پالمیتیل پالمیتات (99%)، تری‌پالمیتین (99%<)، دی‌پالمیتین (99%)، مونوپالمیتین (99%) و اسید پالمیتیک (99%) در هگزان انجام شد.

تعیین پروفایل اسیدهای چرب: پروفایل اسیدهای چرب بر اساس روش استاندارد AOAC (26) و توسط دستگاه GC (Gas Chromatography) کمپانی UNICAM مدل 3800 تعیین گردید.

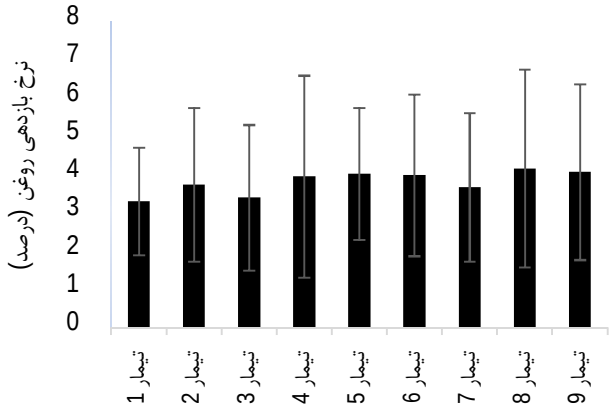
تعیین نرخ اسیدیته (AV): نرخ اسیدیته بر اساس روش‌های استاندارد مطرح شده در AOAC سنجیده شد و برحسب درصد اسید اولئیک گزارش گردید (29).

تجزیه و تحلیل آماری: طرح کلی این آزمایش به صورت کاملاً تصادفی بود و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط تست نرمالیته Kolmogrov-smirnov تعیین شد. برای مقایسه میانگین بین تیمارها نیز از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه One-Way ANOVA و برای جداسازی گروه‌های همگن از آزمون‌های دانکن در سطح احتمال 5 درصد استفاده گردید.

• یافته‌ها

آنالیز ترکیبات مغذی مواد خام اولیه: نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات مواد خام اولیه مورد آزمایش به صورت میزان رطوبت (%):59/7±2/3، پروتئین (%):20/9±1/96، چربی (%):6/7±0/41، خاکستر (%):3/4±1/97، جیوه (ppm): 31/8±0/4، آرسنیک (ppm): 12/4±7/2، کادیوم (ppm): 1/3±1/94 و سرب (ppm): 9/1±3/21 بود. نتایج به صورت انحراف معیار±میانگین ارائه شدند.

میزان نرخ بازدهی روغن اولیه و روغن تخلیصی: همان گونه که در شکل 1 مشاهده می‌گردد، میزان تولید روغن در تیمارهای بخش استخراج با روش SFE اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P<0/05$). اگرچه، نرخ بازدهی در تیمار 8 بالاتر از سایر تیمارها بود. بنابراین، روغن استحصالی در تیمار 8 (فشار 25 MPa و درجه حرارت 40 درجه سانتی‌گراد) به علت بالاتر بودن نرخ بازدهی آن به عنوان تیمار بهینه و مناسب انتخاب گردید و جهت استخراج DHA و آنالیز کیفی، در فرآیند SFC مورد خالص سازی قرار گرفت.

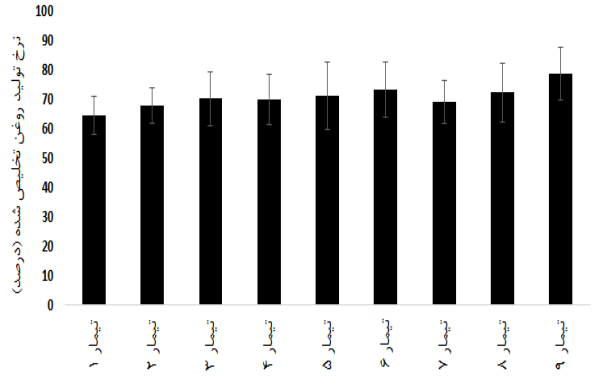


شکل 1. نرخ بازدهی روغن استحصالی از ضایعات کارخانه کنسرو تن ماهیان با روش SFE

از سوی دیگر، نرخ بازدهی روغن خالص‌سازی شده برای دست یابی به دوزهای بالای DHA نیز در شکل 2 نشان داده شده است. در تیمارهای خالص‌سازی (استخراج DHA)، تیمار 9 (فشار 22 MPa و درجه حرارت 75 درجه سانتی‌گراد) دارای نرخ بازدهی بالاتری نسبت به سایر تیمارها بود، و به این

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

علت به عنوان تیمار بهینه و مناسب انتخاب شـده و روغـن آن کیفی سنجی شد.



شکل 2. نرخ بازدهی تولید روغن تخلیص شده با روش SFC

نتایج آنالیز کیفی روغن‌های بدست آمده

نتایج حاصل از اندازه‌گیری رطوبت و بررسی آلکـان‌هـا: میزان رطوبت موجود در روغن‌های استحصالی با 2 روش و نیز نتایج حاصل از شناسایی ترکیبات فرار مانند آلکان‌ها (از جمله ترکیبات فرار مهـم ایجـاد شـده در اکسیداسـیون چربـی‌هـا)، آلدهیدها، اسیدها و آمین‌هـای موجـود در آن‌هـا در جـدول 2 نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌گـردد، فرآینـد SFC سبب کاهش رطوبت موجود در روغن و نیز حذف برخـی از آلکـــان‌هـــا ماننـــد 2-Methyl-Decane، Undecane، Cyclohexadecane و نیز اسید استیک شده است. آلدهیدهای مـورد توجـه در ایـن پـژوهش در هـیچ یـک از نمونـه‌هـای استحصالی یافت نگردیدند. از سوی دیگر، Dimethyl amin در نمونه‌های حاصل از هر 2 فرآیند شناسایی شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری لیپیدهای خنثی: همانگونه که در جـدول 3 ملاحظـه مـی‌گـردد، سـطوح اسـترهای واکسـی، اسیدهای چرب آزاد و کلسترول در روغن‌های تخلیص یافته بـا روش SFC کمتـر از روغـن‌هـای استحصـالی از ضـایعات تـن ماهیان با روش SFE بـود. از سـوی دیگـر، میـزان تـری‌آسـیل گلیسرول‌ها پس از فرآیند تخلیص افزایش یافتـه از 92 درصـد در روغن اولیه به بیش از 95 درصد رسیده است.

جدول 2. رطوبت و ترکیبات فرار (آلکان‌ها، آلدهیدها، اسیدها و آمین‌ها) یافت شده در روغن‌های ماهی استخراجی و تخلیص شده با روش‌های SFE و SFC

عنوان	نوع ترکیب	SFE	SFC
رطوبت		5/44±0/62	3/89±1/07
Decane	آلکان	✓	✓
2-Methyl-Decane	آلکان	✓	✓
3-Methyl-Decane	آلکان	-	-
Undecane	آلکان	✓	-
Dodecane	آلکان	✓	✓
Tridecane	آلکان	✓	✓
Pentadecane	آلکان	✓	✓
Cyclohexadecane	آلکان	✓	-
2,6,10,14-Tetramethyl-pentadecane	آلکان	✓	✓
Heptanal Waxy	آلدهید	-	-
Hexanal	آلدهید	-	-
Nonanal	آلدهید	-	-
Acetic acid	اسید	✓	-
Dimethyl amin	آمین	✓	✓

جدول 3. میزان لیپیدهای خنثی اندازه‌گیری شده در روغن‌های ماهی استخراجی و تخلیص شده با روش‌های SFE و SFC (انحراف معیار±میانگین)

عنوان	SFE	SFC
استرهای واکسی (WE)	1/44±0/56	0/84±0/59
تری اسیل گلیسرول‌ها (TAG)	92/58±0/5	94/43±5/16
اسیدهای چرب آزاد (FFA)	2/76±0/84	3/07±0/63
کلسترول (CHOL)	1/85±1/1	1/2±0/96

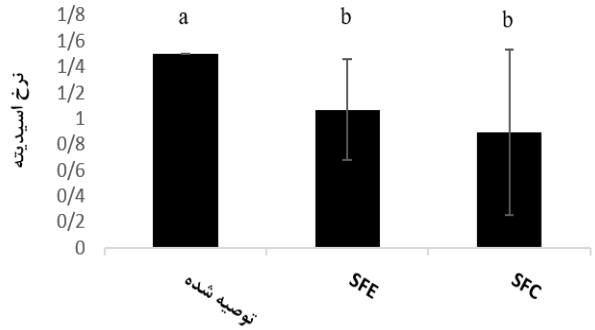
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

پروفایل اسیدهای چرب در نمونه‌های روغن استحصالی: نتایج حاصل از آنالیز اسیدهای چرب موجود در روغن ماهیان استحصال شده با روش SFE و نیز روغن‌های تخلیص یافته توسط فرآیند SFC در جدول 4 نشان داده شده است. همان گونه که داده‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهند، میزان DHA در روغن تخلیص یافته به طور معنی‌داری بیش از روغن اولیه بود و از 28/05 درصد به 47/93 درصد رسید. از سوی دیگر، میزان سایر اسیدهای چرب کاهش یافت.

جدول 4. پروفایل اسیدهای چرب در روغن‌های ماهی استخراجی و تخلیص شده با روش‌های SFE و SFC (انحراف معیار±میانگین)

اسید چرب (%)	SFE	SFC
C12:0 (دودکانوئیک اسید)	0/05±0/02	0/03±0/02
C14:0 (تترادکانوئیک اسید)	2/98±1/23	1/72±1/06
C15:0 (پنتادکانوئیک اسید)	0/81±0/42	0/54±0/09
C16:0 (پالمیتیک اسید)	12/54±5/63	9/76±3/2
C16:1 (هگزادکانوئیک اسید)	5/67±3/1	5/07±2/41
C17:0 (هپتادکانوئیک اسید)	1/09±0/48	0/87±0/26
C18:0 (استئاریک اسید)	3/26±1/24	1/9±1/02
C18:1 (اولئیک اسید)	14/09±4/7	11/52±5/28
C18:2 (لینولئیک اسید)	1/93±0/41	1/02±0/7
C18:3 n6 (گاما لینولنیک اسید)	0/81±0/2	0/49±0/1
C18:3 n3 (آلفا لینولنیک اسید)	2/3±1/54	1/74±0/48
C20:0 (آراشیدیک اسید)	1/95±0/67	1/3±0/84
C20:1 (ایکوزنوئیک اسید)	0/61±0/4	0/44±0/38
C20:4 n3 (ایکوزا تترا انوئیک اسید)	1/18±0/9	0/85±0/2
C20:4 n6 (آراشیدونیک اسید)	1/24±0/82	1/16±0/4
C20:5 n3 (EPA)	7/94±1/05	5/87±3/26
C22:0 (دکازنوئیک اسید)	0/65±0/29	0/49±0/31
C22:5 n3 (دکوزاپنتانوئیک اسید)	3/82±2/4	2/6±1/47
C22:6 n3 (DHA)	28/05±3/57 [b]	47/93±6/11 [a]
EPA+DHA	35/99	53/8

نرخ اسیدیته: نتایج حاصل از اندازه‌گیری نرخ اسیدیته نشان داد که این شاخص در روغن‌های تخلیصی با فرآیند SFC نسبت به روغن‌های استحصالی از ضایعات تن ماهیان توسط روش SFE کاهش یافته است. همچنین، نرخ اسیدیته هم در روغن‌های استحصالی گروه SFE و هم روغن‌های تخلیص یافته گروه SFC به طور معنی‌داری پایین‌تر از نرخ توصیه شده بود. حداکثر نرخ اسیدیته توصیه شده برای روغن ماهی با کیفیت مطلوب 1/5 می‌باشد.



شکل 3. نرخ اسیدیته (برحسب درصد اولئیک اسید) در روغن‌های ماهی استخراجی و تخلیص شده با روش‌های SFE و SFC

• بحث

نرخ بازدهی: نتایج حاصل از نرخ بازدهی روغن در روش‌های SFE و SFC نشان داد که عمدتاً افزایش درجه حرارت و فشار می‌تواند تأثیر مثبتی بر رشد نرخ بازدهی داشته باشد. علت این امر را در تیمارهای فرآیند SFE ابتدا می‌توان به تأثیر فشار بیشتر مرتبط داشت که این امر سبب خروج روغن بیشتری از ضایعات می‌گردد. همچنین، وجود درجه حرارت بالاتر را می‌توان عامل دیگر در این امر دانست. گرما سبب دناتوره شدن ماتریکس‌های پروتئینی بافت ماهی می‌گردد که روغن به شدت با آن‌ها باند شده است. همچنین، گرما سبب باز شدن گلبول‌ها و سلول‌های چربی و در نتیجه رهایش و سیال شدن روغن می‌گردد که این امر می‌تواند افزایش بازدهی را موجب شود (12). درفرآیند SFC نیز احتمالاً افزایش فشار و درجه حرارت سبب انحلال بیشتر اسیدهای چرب گردیده و در نتیجه میزان تولید روغن تخلیص شده افزایش یافته است. Pettinello و همکاران (27) نشان دادند که با افزایش فشار تا 24 MPa و درجه حرارت تا 70 درجه سانتی‌گراد در فرآیند SFC، میزان تولید روغن تخلیصی از روغن استری شده به طور معنی‌داری نسبت به فشار و درجه حرارت‌های پایین‌تر افزایش یافت.

رطوبت، آلکان‌ها، آلدهیدها، اسیدها و آمین‌ها: با توجه به پایین‌تر بودن میزان رطوبت (کمتر از 20%) در مواد خام به کار رفته در روش SFE (به علت انجام فریز درایر قبل از تغذیه دستگاه) و نیز عدم تماس مواد خام با آب به منظور پخت، میزان پایین رطوبت در روغن خروجی از دستگاه SFE و به تبع آن SFC مورد انتظار بود. همچنین، سانتریفیوژ انجام شده پس از استحصال روغن سبب جدا شدن ناخالصی‌ها و فاز آبی از روغن می‌گردد (25)، که مجموعه این موارد پایین بودن میزان رطوبت در 2 فرآیند را موجب شده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

یکی از شاخص‌های سنجش کمی پراکسیداسیون لیپیدها که به ویژه با پراکسید شدن اسیدهای چرب چند غیر اشباع تولید می‌شوند آلکان‌ها هستند. آلکان‌ها حاصل از شکست امگا 6 و امگا 3 (به ترتیب) در روغن هستند که می‌توانند به عنوان شاخصی ایده‌آل برای تشخیص پراکسیداسیون لیپیدها در نظر گرفته شوند (30).

میزان اکسیژن یکی از عوامل مهمی است که سبب افزایش یا کاهش تشکیل آلکان‌ها در پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. نتایج تحقیقات Kostrucha and Kappus (31) نشان داد که میان تشکیل آلکان‌ها و سطح اکسیژن رابطه معکوسی وجود دارد، بدان صورت که با کاهش میزان اکسیژن، میزان تشکیل آلکان‌های مختلف افزایش می‌یابد. در پژوهش حاضر نیز در روش‌های SFE و SFC، به دلیل وجود دی‌اکسید کربن به عنوان سیال و نیز وجود شرایط خلأ در سیستم، اکسیژن در محیط وجود نداشته و بنابراین در طی فرآیند استخراج، احتمالاً میزان ایجاد آلکان‌ها افزایش یافته است، به گونه‌ای که عمده آلکان‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر در هر 2 فرآیند مشاهده گردیدند (جدول 2).

آلدهیدها، اسیدهای آلی و آمین‌ها از مهم‌ترین ترکیبات فرار هستند که ایجاد بو و طعم نامطلوب در روغن ماهی به شدت به حضور آن‌ها بستگی دارد. برخی از آلدهیدها مانند هگزانال یا نونانال در نتیجه فرآیند اتواکسیداسیون (خود اکسایشی) لیپیدها بوجود می‌آیند. بنابراین، حضور آن‌ها در روغن ماهی ذاتاً از روش‌های استخراج و پارامترهای دخیل در آن‌ها (به‌ویژه درجه حرارت، اکسیژن محیط، وجود نور و نیز فلزات) متأثر می‌گردد (1). در مقابل، برخی دیگر از ترکیبات فرار در طول دروه نگهداری ماهی و در اثر فعالیت‌های باکتریایی و آنزیمی بر پروتئین‌ها، آمینواسیدها و کربوهیدرات‌ها تشکیل می‌شوند. به‌عنوان مثال، دی متیل آمین اکساید بر اثر فعالیت‌های آنزیمی در طول دوره نگهداری و اسید استیک از طریق تجزیه غیرهوازی آمینواسیدها می‌توانند تشکیل شوند (32).

در پژوهش حاضر، آلدهیدهای هپتانال، هگزانال و نونانال در روغن‌های بدست آمده با هر 2 فرآیند SFE و SFC تشخیص داده نشدند. علت این امر می‌تواند احتمالاً به دلیل عدم وجود اکسیژن فضا در فرآیندها و نیز درجه حرارت نه چندان بالا در طی استخراج و خالص‌سازی باشد که احتمال خود اکسایشی (به عنوان عامل اصلی تشکیل آلدهیدها) را کاهش می‌دهد (33). از سوی دیگر، اسید استیک تنها در روغن‌استحصالی با روش SFE شناسایی شد. علت این امر را احتمالاً می‌توان به فرآیند تجزیه بی هوازی آمینواسیدها و تشکیل اسید استیک نسبت داد. در مورد دی متیل آمین (عامل ایجاد بوی خاص ماهیFishy odor) نیز، احتمالاً این ماده در اکسترکتور دستگاه SFE و SFC به علت فشار بالا و جریان مداوم سیال دی‌اکسید کربن، از بافت مواد اولیه جدا شده و بخشی از آن توسط روغن استحصالی جذب گردیده است (34)، از این‌رو، دی متیل آمین در نمونه‌های بدست آمده از هر 2 روش یافت شد.

لیپیدهای خنثی: نتایج حاصل از اندازه‌گیری لیپیدهای خنثی در این مطالعه اختلافی را در سطوح استرهای واکسی، تری‌آسیل گلیسرول‌ها، اسیدهای چرب آزاد و کلسترول روغن‌های استحصالی از ضایعات تن ماهیان در هر 2 فرآیند نشان نداد. پایین بودن میزان استرهای واکسی و بالا بودن تری‌آسیل گلیسرول‌ها در روغن‌های استخراجی از مواد خام اولیه توسط فرآیند SFE می‌تواند حاکی از پایین بودن میزان چربی درون سلولی و بالا بودن چربی خارج سلولی باند شده با پروتئین‌ها در مواد خام اولیه باشد. همچنین، بالا بودن میزان تری آسیل گلیسرول‌ها می‌تواند نشان دهنده بالا بودن PUFAها (Poly Unsaturated Fatty Acid) در روغن باشد (35).

از سوی‌دیگر، هیدرولیز تری آسیل گلیسرول‌ها سبب ایجاد اسیدهای چرب آزاد می‌گردد. بنابراین، هرچه میزان تری آسیل گلیسرول‌ها و PUFAها بالاتر باشد، تولید اسیدهای چرب آزاد نیز محتمل‌تر می‌گردد. در پژوهش حاضر، میزان تری آسیل گلیسرول‌ها در روغن‌های تخلیص یافته از روش SFC بالاتر از SFE بود و احتمالاً به تبع آن میزان اسیدهای چرب آزاد نیز بالاتر مشاهده شد.

پروفایل اسیدهای چرب: Rubio-Rodriguez و همکاران (2008) استخراج روغن از ضایعات گونه *Merluccius capensis* با روش‌های SFE و سوکسله با هگزان را مورد ارزیابی قرار داده و بیان کردند که اختلاف معنی‌داری میان سطوح اسیدهای چرب مختلف مشاهده نشد. در پژوهش حاضر، پس از اجرای فرآیند SFC میزان DHA افزایش چشمگیری داشت. این موضوع احتمالاً به دلیل نزدیک‌تر بودن شرایط سیال مانند نوع سیال، درجه حرارت، فشار، مدت زمان تماس و میزان ورود و مصرف سیال برای انحلال DHA بوده است. همانطور که در ابتدا نیز ذکر گردید، دستکاری پارامترهای ذکر شده می‌تواند استخراج را انتخابی نماید و سبب خروج مولکول‌هایی با ویژگی‌ها و وزن‌های مولکولی مخصوصی گردد. Pettinello و همکاران (2010) بیان نمودند که انتخابی بودن انحلال اسیدهای چرب در فرآیند SFC

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

می‌تواند به واسطه تعداد کربن‌های مولکول و بـه تبـع آن وزن مولکولی باشد. لذا، با تغییر شرایط سیال، به‌ویژه درجه حـرارت و فشار آن می‌توان تولید بیشتر را به سمت اسید چربی خـاص سوق داد.

نرخ اسیدیته: اسـیدیته روغـن یکـی از پارامترهـای مهـم در بحث کیفیت روغن می‌باشد که متأثر از میزان اسیدهای چـرب آزاد و سایر اسیدهای غیرلیپیدی مانند اسید استیک است. این امر نشانگر آن است که اسیدیته روغن در اثر عـواملی همچـون ترکیبات روغن و نیز روش‌های استخراج می‌تواند متغیـر باشـد (16). به‌طور کلی، روغن‌های حاوی مقادیر بیشـتر تـری‌آسـیل گلیسرول و PUFA دارای سطوح بـالاتری از اسـیدهای چـرب آزاد هستند، که به تبع آن نرخ اسیدیته می‌تواند افـزایش یابـد (34). در پژوهش حاضـر، میـزان تـری آسـیل گلیسـرول‌هـا و اسیدهای چرب آزاد در روغن‌های خروجی فرآیند SFC بـالاتر از فرآیند SFE بود. در مقابل، اسید استیک تنها در نمونه‌هـای استحصالی از روش SFE مشاهده گردید. بنابراین، با توجـه بـه بالاتر بودن نرخ اسیدیته در تیمار SFE، می‌تـوان بیـان داشـت که احتمالاً تـأثیر اسـیدهای چـرب آزاد بـر اسـیدیته کمتـر از اسیدهای غیرلیپیدی در این مطالعه بوده و همـین امـر سـبب کمی بالاتر بودن اسیدیته روغن‌هـای فرآینـد SFE نسـبت بـه SFC بوده است.

بنابر کلیه موارد یاد شده و با توجه به نتایج بدسـت آمـده، می‌توان در وهله نخست بیان داشت که ضـایعات تـن ماهیـان دارای پتانسیل مناسبی برای استخراج روغن با رویکرد مصـرف انسانی هستند. همچنین، با توجه به اختصاصـات فرآینـد SFE در اسـتخراج روغـن و نیـز SFC در تخلـیص روغـن و تولیـد محصولی با دوز بالای DHA، می‌تـوان آن‌هـا را روش مناسـبی برای تولید روغن ماهی برای مصارف انسانی در نظر گرفت.

سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله، مراتب سپاس و قـدردانی خود را از شرکت‌های ساحل صید کنارک و امـیکس بـه پـاس حمایت‌های مالی و معنوی بی دریغ در اجرای این پروژه اعـلام می‌دارند.

• References

1. Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, Diego S, Sanz M, Rovira Carballido J. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Inno Food Sci and Emer Tech 2010; 11: 1-12.
2. Ruxton C.H.S, Calder P.C, Reed P.C, Simpson M.J.A. The impact of long- hain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. Nut Res. Reviews 2005; 18: 113–129.
3. Reisman J, Schachter, H.M, Dales R.E, Tran K, Kourad K, Barnes D, et al. Treating asthma with omega-3 fatty acids: Where is the evidence? A systematic review. BMC Compl and Alte Med 2007; 6: 26–34.
4. Zulfakar M.H, Edwards M, Heard C.M. Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis? Euro J of Derma 2007; 17: 284–291.
5. Turner D, Zlotkin S.H, Shah P.S, Griffiths A.M. Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease. Coch data of sys rev 2008; (3) pp.
6. Ross B.M, Seguin J, Sieswerda L.E. Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: Which disorder and which fatty acid? Lip in Heal and Dis 2007; 6: 1–2.
7. Song C, Zhao S. Omega-3 fatty acid eicosapentaenoic acid. A new treatment for psychiatric and neurodegenerative diseases: A review of clinical investigations. Expert Opin on Inves Dru 2007; 16(10): 1627–1638.
8. Chen Y.Q, Edwards I.J, Kridel S.J, Thornburg T, Berquin I.M. Dietary fat -Gene interaction in cancer. Canc Metas Rev 2007; 26: 535–551.
9. Chen Y, Xu C, Yan T, Yu C, Li Y. ω-3 Fatty acids reverse lipotoxity through induction of autophagy in nonalcoholic fatty liver disease. Nut 2015; 31: 1423-1429.
10. Stancík R, Rovenský J, Stančíková M. Diet in the rheumatoid arthritis and the omega-3 fatty acids. Rheu 2006; 20: 159–166.
11. Belkouch M, Hachem M, Elgot A, Van A.L, Picq M, Guichardant M, Bernoud-Hubac N. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. The J of nut biochem 2016; 38: 1-11.
12. Chantachum S, Benjakul B, Sriwirat N. Separation and quality of fish oil from precooked and non-precooked tuna heads. Food Chemi 2000; 69: 289-294.
13. Bligh E.G, Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canad J of Biochem and Physio 1959; 37: 911-917.
14. Hole S, Hole M, Taylor K.D. Method of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dog fish (*aqualus acanthias*) liver oil. Food Chem 1990; 55: 215–20.
15. Jensen S, Haggberg L, Jorundottir H, Odham G. A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. J Agri Food Chem 2003; 51: 5607 -5611.
16. Gbogouri G.A, Linder M, Fanni J, Parmentier M. Analysis of lipids extracted from salmon (Salmo salar) heads by commercial proteolytic enzymes. Euro J of Lip Sci and Tech 2006; 108: 766–775.
17. Rubio-Rodriguez N, de-Diego-Rupérez S, Beltran S, Jaime I, Sanz M.T, Rovira J. 2008. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis–Merluccius paradoxus*) byproducts: study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. J of Supercritic Fluid 2008; 47: 215–226.
18. Eduardo B.P, Eliane M.Z.M, Fernanda B, Sandra R.S.F, Danilo W.F, Rozangela C.P. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. J of Supercritic Fluid 2012; 61: 101–107.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

19. Ratnayake W.M.N, Olsson B, Matthews D, Ackman R.G. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oil via urea complexation. Euro J of Lip Sci and Tech 2006; 90(10): 381-386.

20. Wong D.W.S. Lipase. Handbook of food enzymology New York: Marcel Dekker, cop 2003.

21. Oliveira-Carvalho P, Bueno-Campos P.R, D'Addio-Noffs M, Oliveira J.G, Tsunezi-Shimizu M, Silva D.M.d. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. Quimica Nova 2003; 26(1): 75−80. Abstract in English.

22. Davarnejad R, Kassim K.M, Zainal A, Sata S.A. Extraction of fish oil by fractionation through supercritical carbon dioxide. J of Chem and Engin Data 2008; 53(9): 2128−2132.

23. Yang Y.W, Wu C.J, Wang X.D, Huang M, Ren Q.L. Purification of EPA-EE and DHA-EE with supercritical fluid chromatography. J of Chem Engineer of Chinese Universities 2012; 18: 293−296.

24. Rubio-Rodriguez N, Diego S, Beltran S, Jaime I, Sanz M, Rovira J. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. J of Food Enginee 2012; 109: 238–248.

25. Fiori L, Solana M, Tosi P, Manfrini M, Strim C, Guella G. Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera: Trout by-products as a possible source of omega-3 lipids?. Food Chem 2012; 134: 1088–1095.

26. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis, Arlington, Virginia 2005.

27. Pettinello G, Bertucco A, Pallado P, Stassi A. Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: From the laboratory scale to the pilot plant. J of Supercritic Fluid 2010; 19: 51−60.

28. Paquot C, Hautfenne H. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and derivatives. 7th ed. Blackwell Science, 7th ed 1987. Section 2.601.

29. Perrin J.L, Karleskind, A., Wolff, J.-P. Determination of alteration. In: Oils and Fats, Manual vol. 2. Lavoisier Publishing, Paris (France) 1996. Abstract in English.

30. Burk F.B, Ludden T.M. Exhaled alkanes as indices of In Vivo lipid peroxidation. Biochrmic Pharma 1989; 38(7): 129-132.

31. Kostrucha J, Kappus H. Inverse relationship of ethane or n-pentane and malondialdehyde formed during lipid peroxidation in rat liver microsomes with different oxygen concentrations 1996; 14: 120-125.

32. Huss H.H. Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO, Fisheries and Aquaculture Department, Rome (Italy). 1995.

33. Roh H.S, Park J.Y, Park S.Y, Chun B.S. Isolation of off-flavors and odors from tuna fish oil using supercritical carbon dioxide. Biotech and biopro engineer 2006; 11: 496-502.

34. Chun B.S, Roh H.S, Kang K.Y, Kwon M.J, Weber A, Wilkinson G. Identification and removal of off flavors from sardine oil with supercritical fluid extraction. Food process and tech 2014; 5: 331-337.

35. Gupta R.B, Shim J.J. Solubility in Supercritical Carbon Dioxide. CRC Press, Boca Raton, Fl, USA. 2007.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]

Production of DHA- High Dosage Fish Oil from Tuna by-Products by Coupling of Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Supercritical Fluid Chromatography (SFC)

*Taati Keley MH[1], Shabanppour B[*2], Ojagh M [3]*

1- Ph.D student, Fish processing and technology department, Faculty of Fisheries and Natural resources, Gorgan University of agriculture sciences and natural resources, Gorgan, Iran

*2- *Corresponding author: Professor, Fish processing and technology department, Faculty of Fisheries and Natural resources, Gorgan University of agriculture sciences and natural resources, Gorgan, Iran. Email: bshabanpour@yahoo.com*

3- Assistant Professor, Fish processing and technology department, Faculty of Fisheries and Natural resources, Gorgan University of agriculture sciences and natural resources, Gorgan, Iran

Received 7 May, 2017 **Accepted 14 Aug, 2017**

Background and Objectives: Eicosapentaenoic acid (EPA) and Docosahexaenoic acid (DHA) are essential fatty acids that have the potential to be beneficial to human health. So, the purpose of this project was production of DHA- in high dosage from tuna wastes by coupling of supercritical fluid extraction (SFE) and supercritical fluid chromatography (SFC).

Materials & Methods: Tuna by-products after the analysis of compounds were extracted by SFE process to produce crude oil. Then, DHA level was concentrated by SFC process. Obtained oil in both process were evaluated for the chemical parameters such as moisture and volatile compounds, neutral lipids, fatty acids profile and acidic value.

Results: The results showed that volatile components such as alkanes were mostly detected in obtained oil by 2 methods. Aldehydes were not observed in any of the samples and acetic acid was diagnosed in outlet oil by SFE only. In Neutral lipids, the TAG and FFA levels in outlet oil by SFC were higher than SFE. On the other hand, levels of wax esters and cholesterol in obtained oil by SFE were higher than SFC process. In fatty acids, the amount of DHA in SFC was significantly higher than SFE. Acidic value did not have significant differences in the two processes.

Conclusion: Tuna by-products have the potential to produce high quality omega 3 fatty acids and coupling of SFE and SFC processes are good methods for production of DHA- high dosage fish oil.

Keywords: Omega 3, Tuna by-products, Supercritical Fluid, Volatile component

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-12-01]