وزارت جهاد کشاورزی
سازمان شیلات ایران

عنوان طرح:

تولید پایلوت اسیدهای چرب امگا–۳ تغلیظ‌شده روغن ماهی کیلکا

مجری:

دکتر سید فخرالدین حسینی

همکار:

دکتر مسعود رضائی

کد طرح:

۹۴

گزارش نهایی

درصد پیشرفت: ۱۰۰٪

سال انتشار

۱۴۰۱

چکیده

اسیدهای چرب امگا-۳ علاقه‌مندی فزآینده‌ای را طی سال‌های اخیر به واسطه اثرات مفید در حفظ سلامت قلب و تنظیم فشار خون، بهبود عملکرد مغز، تقویت حافظه وکاهش افسردگی به دست آورده است. در پروژه حاضر، ابتدا استخراج روغن از ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) دریای خزر با روش هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم آلکالاز (۱ ٪، وزنی/وزنی) انجام پذیرفت. میزان بازده استخراج روغن طی ۴ ساعت زمان هیدرولیز، ۵/۹۷٪ بود که موید آن است ماهی کیلکا جزء ماهیان متوسط‌چرب طبقه بندی می‌شود. در ادامه پروژه، تغلیظ اسیدهای چرب چندغیراشباعی امگا-۳ (EPA و DHA) با استفاده از فرآیند کمپلکس اوره در نسبت‌های مختلف اوره:اسید چرب (۴:۱؛ ۳:۱؛ ۲:۱) و دماهای مختلف تبلور (۰ و ۸- درجه سانتی‌گراد) طی ۲۴ ساعت انجام گردید. با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی (GC)، ۱۸ اسید چرب در روغن ماهی مورد شناسایی قرار گرفتند که بیشترین مقادیر به ترتیب برای اسید لینولئیک (C18:2n-6) به مقدار ۳۵/۹۸٪، به دنبال آن دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) (C22:6n-3) به میزان ۱۷/۰۱٪ و سپس ایکوزاپنتانوییک اسید (EPA) (C20:5n-3) به میزان ۷/۵۷٪ به دست آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده، میانگین میزان اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA+DHA) ۲۴/۵۸٪ بوده است. خوشبختانه پس از انجام تیمارهای مختلف، میزان اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA+DHA) از مقدار اولیه ۲۴/۵۸٪ در روغن خام به حداکثر میزان تغلیظ ۶۸/۱٪ طی شرایط بهینه فرآیند کمپلکس اوره (نسبت اوره:اسید چرب ۲:۱، دمای تبلور ۸- درجه سانتی‌گراد) در روغن تغلیظ شده افزایش یافت. بطوریکه میزان EPA از ۷/۵۷٪ اولیه در روغن خام به ۱۷/۳٪ در روغن تغلیظ شده و میزان DHA نیز از ۱۷/۰۱٪ به ۵۰/۸٪ در روغن تغلیظ شده افزایش یافت. بنابراین، فرآیند ترکیبی هیدرولیز آنزیمی و کمپلکس اوره می‌تواند به عنوان یک شیوه کارآمد به منظور تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA و DHA) روغن ماهی کیلکای معمولی جهت مصارف غذادارویی مورد استفاده صنایع و محققان قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ماهی کیلکای معمولی؛ روغن ماهی؛ اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA و DHA)؛ استخراج آنزیمی؛ کمپلکس اوره

فهرست مطالب

فصل اول ۸
مقدمه ۸
۱- مقدمه ۹
فصل دوم ۱۶
کلیات و مروری بر منابع ۱۶
۲- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۱۷
فصل سوم ۲۳
مواد و روش‌ها ۲۳
۳-۱ مواد و تجهیزات پژوهش ۲۴
۳-۱-۱ مواد آزمایشگاهی مصرفی مورد نیاز ۲۴
۳-۱-۲ تجهیزات و ظروف آزمایشگاهی ۲۴
۳-۲ دریافت نمونه‌های ماهی ۲۵
۳-۳ سنجش تقریبی نمونه‌ها ۲۵
۳-۴- ترکیب اسیدهای آمینه ۲۵
۳-۵- استخراج روغن ماهی با روش آنزیمی در مقیاس پایلوت ۲۶
۳-۶- مشتق‌سازی به متیل استر اسید چرب ۲۷
۳-۷- آنالیز کروماتوگرافی گازی (GC) ۲۷
۳-۸- تغلیظ ا با روش کمپلکس اوره در مقیاس پایلوت ۲۸
۳-۸-۱- تهیه اسیدهای چرب آزاد (FFA) روغن ماهی ۲۸
۳-۸-۲- تغلیظ ω-3PUFA با روش کمپلکس اوره ۲۸
۳-۹ تجزیه و تحلیل آماری ۲۹
فصل چهارم ۳۰
نتایج و بحث ۳۰
۴-۱ ترکیب تقریبی نمونه‌ها ۳۱
۴-۲ ترکیب اسیدهای آمینه ۳۱
۴-۳ استخراج روغن با کیفیت بالا از ماهی کیلکا با شیوه آنزیمی در مقیاس پایلوت ۳۳
۳-۴-۱ بازده استخراج ۳۳
۳-۴-۲ ترکیب اسیدهای چرب روغن خام استخراج شده ماهی کیلکای معمولی ۳۳

۴-۴ تولید اسیدهای چرب امگا-۳ (EPA و DHA) تغلیظ شده با روش کمپلکس اوره در مقیاس پایلوت ۳۸
۴-۴-۱ تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ در دمای ۰ درجه سانتیگراد و سطح اوره ۲۰٪ (نسبت اوره: اسید چرب ۴:۱) ۳۸
۴-۴-۲ تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ در دمای ۸- درجه سانتیگراد و سطح اوره ۲۰٪ (نسبت اوره: اسید چرب ۴:۱)..... ۴۲
۴-۴-۳ تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ در دمای ۸- درجه سانتیگراد و سطح اوره ۱۰٪ (نسبت اوره: اسید چرب ۲:۱)..... ۴۵
۴-۴-۴ تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ در دمای ۸- درجه سانتیگراد و سطح اوره ۱۵٪ (نسبت اوره: اسید چرب ۳:۱)..... ۴۸
۴-۴-۵ تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ در دمای ۸- درجه سانتیگراد و سطح اوره ۱۰٪ (نسبت اوره: اسید چرب ۲:۱)..... ۵۱
نتیجه‌گیری کلی ۵۶
امکان‌سنجی تولید اسیدهای چرب امگا-۳ در مقیاس صنعتی ۵۸
تشکر و قدردانی ۶۰
منابع ۶۱

فهرست جداول

جدول ۳-۱. تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده در طرح..... ۲۴

جدول ۴-۱. آنالیز تقریبی ترکیبات ماهی کیلکای معمولی..... ۳۱

جدول ۴-۲. ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی..... ۳۲

جدول ۴-۳. پروفایل اسیدهای چرب روغن خام ماهی کیلکا..... ۳۴

جدول ۴-۴. نوع، درصد و زمان ظهور اسیدهای چرب شناسایی شده روغن خام ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۰۲/۱۱)..... ۳۶

جدول ۴-۵. نوع و مقدار اسیدهای چرب شناسایی شده روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۰۲/۱۱)..... ۳۹

جدول ۴-۶. نوع و مقدار اسیدهای چرب شناسایی شده روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۱۱/۲۵)..... ۴۳

جدول ۴-۷. نوع و مقدار اسیدهای چرب شناسایی شده روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۱۱/۲۵)..... ۴۶

جدول ۴-۸. نوع، درصد و زمان ظهور اسیدهای چرب شناسایی شده روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۰۸)..... ۴۹

جدول ۴-۹. نوع، درصد و زمان ظهور اسیدهای چرب شناسایی شده روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۲۰)..... ۵۳

فهرست اشکال

شکل ۳-۱. فرآیند استخراج آنزیمی روغن ماهی کیلکا..... ۲۶

شکل ۴-۱. نمودار تزریق GC روغن خام ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۰۲/۱۱)..... ۳۷

شکل ۴-۲. نمودار تزریق GC روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا (تاریخ ۱۴۰۱/۰۲/۱۱)..... ۴۱

شکل ۴-۳. نمودار تزریق GC روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا با روش کمپلکس اوره (تاریخ ۱۴۰۱/۱۱/۲۵)..... ۴۴

شکل ۴-۴. نمودار تزریق GC روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا با روش کمپلکس اوره (تاریخ ۱۴۰۱/۱۱/۲۵)..... ۴۷

شکل ۴-۵. نمودار تزریق GC روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا با روش کمپلکس اوره (تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۰۸)..... ۵۰

شکل ۴-۶. نمودار تزریق GC روغن تغلیظ شده ماهی کیلکا با روش کمپلکس اوره (تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۲۰)..... ۵۵

فصل اول

مقدمه

۱– مقدمه

غذاهای دریایی یکی از اصلی‌ترین محصولات غذایی مورد استفاده توسط انسان می‌باشند و به‌عنوان بخش مهمی از جیره غذایی در بسیاری از کشورها شناخته می شوند. امروزه تخمین زده می شود که حدود ۱۶-۱۴٪ از پروتئین حیوانی مصرفی توسط انسان بواسطه آبزیان دریایی تامین می شود. غذاهای دریایی علاوه بر این که منبع پروتئینی مهمی برای انسان محسوب می شوند، بواسطه دارا بودن ترکیباتی با خواص عملکردی مناسب، نقش بسزایی در تامین سلامت انسان دارند. بخش زیادی از غذاهای دریایی که به مصرف انسان می رسند در مسیر فرآوری یک یا چند مرحله ای قرار می گیرند. فرآوری صنعتی غذاهای دریایی منجر به تولید حجم عظیمی از ضایعات می شود که یا به محصولات کم ارزشی نظیر پودر و روغن ماهی و کودهای طبیعی تبدیل و یا بطور کل دور ریخته می شود. در کل این ضایعات منبع غنی از ترکیبات با ارزش و جدید نظیر پروتئین، روغن و پپتیدهای زیست فعال، رنگدانه ها، طعم ها، آنزیم ها، کیتین، کلاژن و ژلاتین، ویتامین های مختلف، مواد معدنی و غیره می باشد. از اینرو دورریز این ضایعات شیلاتی به محیط، جدا از آلودگی های زیست محیطی جدی، سبب از دست رفتن منبعی غنی از پروتئین و سایر ترکیبات زیست فعال که قابلیت استفاده در غذای انسان، جیره حیوانات، صنایع دارویی و سایر صنایع کوچک شیمیایی را دارند، می شود. در کنار ضایعات حاصل از صنایع عمل‌آوری آبزیان، امروزه گونه‌های آبزیان کمتر بهره‌برداری شده به ویژه ماهیان سطح‌زی کوچک (همانند آنچوی، ساردین و ...) که عمدتا جهت مصارف غیرغذایی به کار برده می‌شوند، نیز مورد توجه سازمان خواروبار جهانی (FAO) می‌باشند. بر طبق آمار FAO در سال ۲۰۱۶ بیش از ۱۷۴ میلیون تن غذای دریایی اعم از ماهی و سخت پوست از طریق صید و آبزی‌پروری تولید گردید. از این میزان ۱۵۲/۸ میلیون تن به مصرف انسان رسیده و باقی مانده یعنی ۲۱/۳ میلیون تن نیز صرف تولید پودر، روغن ماهی و غیره گردید.

در سال‌های اخیر، علاقه‌مندی به اسیدهای چرب چندغیراشباع امگا-۳ (ω-3PUFAs) به دلیل نقش‌های مختلف آنها در ارتقای سلامت و کاهش خطر بیماری افزایش یافته است. ω-3PUFAs شامل آلفا-لینولنیک اسید (ALA; 18:3 ω-3)، استاریدونیک اسید (SDA; 18:4 ω-3)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA; 20:5 ω-3)، دکوزاپنتانوئیک اسید (DPA;

22:5 ω-3) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA; 22:6 ω-3) می‌باشد. روغن‌های حاوی این اسیدهای چرب یا برخی از این اسیدهای چرب عمدتاً از منابع گیاهی خاصی منشاء می‌گیرند یا به شکل اصلاح‌شده در گیاهان و همچنین منابع دریایی، جلبکی و تک سلولی وجود دارند. به دلیل توانایی محدود بدن انسان جهت سنتز EPA و DHA از مسیر *de novo*، دریافت مستقیم اسیدهای چرب امگا-۳ به منظور تعادل متابولیسم بدن ضروری می‌باشد (Lei و همکاران، ۲۰۱۶). در همین رابطه، متوسط جذب EPA به همراه DHA در بزرگسالان در برخی از کشورهای اروپایی بین ۸۰ و ۴۲۰ میلی گرم بر روز (mg/d) متغیر است. سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا نیز جذب روزانه ۲۵۰ میلی‌گرم اسیدهای چرب بلندزنجیره EPA به همراه DHA را پیشنهاد داد که در توافق با جدیدترین رابطه بین مصرف این اسید چرب و سلامت قلب و عروق در جمعیت‌های سالم می باشد (Kris-Etherton و همکاران، ۲۰۰۹).

روغن ماهی به دلیل دارا بودن ω-3PUFAs نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای زیستی بدن انسان دارد و کمبود آن در تغذیه سبب بیماری‌های مختلف قلبی و عروقی، فشار خون بالا، خودایمنی، افسردگی و برخی اختلالات عصبی می-شود (Shahidi و Wanasundara، ۱۹۹۸). در سال ۲۰۲۰، کمیته ملی سلامت جمهوری خلق چین پیشنهاد داد که ω-3PUFAs می‌تواند جهت درمان موارد حاد بیماری کرونا مورد استفاده قرار گیرد (National Health Commission of the People's Republic of China، ۲۰۲۰). تجویز درون وریدی یا خوراکی ω-3PUFAs می‌تواند دوره بازیابی از COVID-19 را تسریع نماید (Das، ۲۰۲۰). در انسان، EPA و DHA را می توان از اسید α-linolenic سنتز کرد، اما این فرآیند ناکافی است و تنها ۰/۲ تا ۳٪ از اسید α-linolenic اولیه به EPA و DHA تبدیل می‌شود (Gibson و همکاران، ۲۰۱۳). مشخص شده است که کمبود EPA و DHA با بیماری‌های قلبی‌عروقی و نورودژنراتیو مرتبط است. در رحم و در سالهای اولیه زندگی کودک، DHA برای تشکیل مغز و سیستم بینایی ضروری است. مغز انسان شامل ۶۰ درصد لیپید است که DHA جزء اصلی اسید چرب آن است (Kinsella و همکاران، ۱۹۹۱). DHA و اسید آراشیدونیک به سرعت در مغز انسان در دوران رشد قبل از تولد و پس از تولد انباشته می‌شوند. در گزارش انسان‌هایی که با کمبود

ω-3 PUFA مواجه بودند، تاری دید و سایر علائم عصبی ثبت شده است. امروزه منابع EPA و DHA برای مصرف انسانی عمدتا از ماهیان چرب مانند ساردین، آنچووی، ماکرل، منهادن و تن تامین می‌گردد.

بیشترین مصرف روغن ماهی در آبزی پروری (۷۲٪) متمرکز شده است، در حالی که، مصرف مستقیم انسانی (۱۹٪)، استفاده‌های صنعت و داروسازی (۵٪) و دیگر موارد (۴٪) را بخود اختصاص داده است. بنابراین، با توجه به درک رو به رشد خواص تغذیه‌ای و سلامتی روغن ماهی، نیاز به تولید روغن با کیفیت بالا در حال افزایش است. علاوه بر این، با توجه به افزایش ارزش اقتصادی روغن ماهی در چند سال اخیر، به دلیل مسائل مربوط به عرضه و تقاضا، انتظار می‌رود این روند در آینده نزدیک هم ادامه داشته باشد. در این راستا، استخراج روغن ماهی و بویژه تخلیص/تغلیظ اسیدهای چرب امگا۳ از گونه‌های آبزیان کمتر بهره برداری شده، می‌تواند راهی جهت استفاده حداکثری از این آبزیان باشد.

در این رابطه، برخی از گونه‌های دریایی به‌علت اندازه کوچک، بافت، طعم و رنگ غیرجذاب و میزان چربی زیاد توسط انسان مصرف نمی‌شوند. بسیاری از این ماهیان کم‌مصرف متعلق به گونه‌های سطح‌زی (Pelagic) می‌باشند که درصد زیادی را در صید ضمنی به خود اختصاص می‌دهند. این سطح زیان ریز حدود ۲۳٪ از کل صید دنیا را به خود اختصاص می‌دهند که تنها ٪۴۲ آن‌ها به مصرف انسانی می‌رسد (FAO،۲۰۱۶). میزان زیادی از این ماهیان کم ارزش به‌علت اندازه کوچک و ارزش خوراکی کم، سالانه در سراسر جهان صید شده و دور ریخته می‌شوند و یا به‌عنوان کودهای گیاهی و غذای دام استفاده می‌شوند. این منابع دریایی کم‌ارزش منابع زیستی طبیعی هستند که می‌توانند به‌عنوان غذاداروها و غذاهای کارکردی استفاده شوند. با این‌حال تلاش زیادی برای بازیابی مواد مغذی ضروری از این ماهیان صورت نگرفته است (Hosseini و همکاران، ۲۰۲۰)؛ بنابراین پیدا کردن راه جایگزین برای تولید با کیفیت بالاتر محصولات با ارزش افزوده که تحقق خواسته های بازار، افزایش بهره برداری و افزایش ارزش هر ماهی در زمان برداشت بسیارحائز اهمیت می‌باشد.

دریای خزر بزرگ‌ترین پهنه آبی (بدون ارتباط با اقیانوس‌های جهان) در جهان است که یک مرز گسترده آبی را در اروپا و آسیا با سطح آب تقریباً ۲۷ متر زیر سطح اقیانوس‌های جهان تشکیل می‌دهد و دارای گونه های متعدد آبزیان و بویژه

ماهیان سطح زی کوچک می باشد (CEP، ۲۰۰۲). یکی از منابع بسیار خوب اسیدهای چرب امگا-۳ ماهیان سطح‌زی پرچرب هستند. در همین راستا، کیلکا ماهیان دریای خزر متعلق به جنس *Clupeonella* بوده و شامل سه گونه کیلکای معمولی (*C.cultriventris caspia*)، کیلکای آنچوی (*C.engrauliformis*) و کیلکای چشم‌درشت (*C.grimmi*) می-باشند. در سال ۱۳۹۱ میزان صید کیلکا ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر بیش از ۲۴ هزار تن بوده است (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۳).

کیلکای معمولی زیرگونه‌ای از شگ‌ماهی دریای سیاه-آزوف بنام *Clupeonella cultriventris* است که ساکن مناطق کم‌عمق و نزدیک به ساحل دریای خزر می‌باشد، که تغییر صیدگاه‌ها موجب افزایش برداشت این ذخیره نسبت به سال های گذشته شده است (مطلبی و پرافکنده، ۱۳۸۸). ذخیره این‌گونه در دریای خزر طبق ارزیابی انجام‌شده توسط روسیه در سال ۲۰۰۸، ۴۹/۶ هزار تن برآورد شده است که بیش از ۷۶ درصد از ذخایر کیلکا ماهیان را شامل می‌شود (پرافکنده و همکاران، ۱۳۹۱). بر اساس گزارش گروه منابع زنده دریای خزر (۱۳۸۷)، این‌گونه با اختصاص ٪۹۷ از میزان صید - کیلکا ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر را شامل شده و به‌عنوان گونه غالب صید شناخته می‌شود (Fazli، ۲۰۱۱). صید کیلکا یک منبع مهم درآمد برای ماهیگیران مناطق شمالی ایران می‌باشد؛ متأسفانه، به دلیل اندازه کوچک و فسادپذیری بالا، این ماهیان برای تولید روغن ماهی، پودر و سس ماهی یا به‌طور مستقیم برای مصرف انسانی (۴٪) بهره‌برداری می‌شوند (Ovissipour و همکاران،۲۰۱۳). همانندی کیلکا ماهیان با سایر گونه‌ها ازنظر ارزش غذائی که به‌طور متوسط دارای ۱۸-۲۰٪ پروتئین، ۱/۵-۵/۲٪ چربی (اسیدهای چرب غیراشباع امگا-۳ و ۶)، مواد معدنی، فسفر، کلسیم، ید، فلوئور، ویتامین‌های محلول در آب و اسیدهای آمینه می‌باشد (سلمانی، ۱۳۷۹) حاکی از ارزش تغذیه‌ای بالای این گونه می‌باشد؛ بنابراین، با توجه به مزایا و روند نسبتاً پایدار تولید روغن ماهی در دنیا و موفقیت صید این ماهی در دریای خزر، این‌گونه یکی از منابع بالقوه برای استخراج روغن‌های دریایی است (Jorjani و همکاران، ۲۰۱۴). روغن ماهی کیلکای معمولی نسبت به روغن سایر ماهیان دریای خزر دارای نسبت امگا-۳ به امگا ۶ بیشتری است و به‌این‌ترتیب از ارزش غذایی بالاتری نیز برخوردار می‌باشد (Pirestani و همکاران، ۲۰۱۰). مقادیر نسبت اسیدهای چرب

امگا-۳ به امگا ۶ روغن‌های ماهی به‌عنوان شاخصی مناسب برای مقایسه ارزش تغذیه‌ای آن‌ها در نظر گرفته‌شده است (Piggott و Tucker، ۱۹۹۰)، به‌طوری‌که نسبتی معادل حداقل ۱ تا ۵ نشان‌دهنده بالا بودن کیفیت تغذیه‌ای این روغن-هاست (Osman و همکاران، ۲۰۰۱). با توجه به درک رو به رشد خواص تغذیه‌ای و سلامتی روغن ماهی، نیاز به تولید روغن با کیفیت امروزه در حال رشد است؛ همچنین با توجه به افزایش ارزش اقتصادی روغن ماهی، مسائل مربوط به عرضه و تقاضا، انتظار می‌رود این شیوه در آینده نیز ادامه داشته باشد.

بطور کلی امروزه تولیدکنندگان روغن ماهی روش‌های متعددی جهت استخراج روغن به کار می‌برند از جمله استخراج با حلال، استخراج آنزیمی، استخراج با امواج فراصوت، استخراج با روش کاهش رطوبت، استخراج با روش بلای و دایر و استخراج روغن با روش سوکسله (Gulzar و همکاران، ۲۰۲۰). هرچند متداول‌ترین و پرکاربردترین روش برای استخراج لیپیدها، روش معمول با استفاده از حلال‌های غیر قطبی است، با این‌حال جداسازی حلال از روغن فرآیندی انرژی بر می باشد و منجر به رهایش مواد خطرناک به محیط زیست می گردد. همچنین، در حال حاضر، مرسوم‌ترین روش مورد استفاده جهت استخراج روغن ماهی در صنعت، استخراج با حرارت است که طی آن مواد اولیه پخته و برای بازیافت روغن تحت فشار قرار می گیرد. در این فرآیند، معمولاً به دمای بالا نیاز است و در نتیجه باعث مصرف زیاد انرژی و تجزیه برخی از اجزای غذایی در روغن می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۲۱). هیدرولیز آنزیمی به طور گسترده‌ای طی دهه‌های گذشته جهت به‌دست آوردن پروتئین هیدرولیزشده که حاوی پپتیدها و اسیدهای آمینه کوچکتر و در نتیجه حلالیت بالاتر است، مورد استفاده قرار گرفته است. هیدرولیز آنزیمی را می‌توان توسط آنزیم‌های درونی یا آنزیم‌های تجاری انجام داد. آنزیم‌های تجاری که به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند، پروتئازهایی مانند آلکالاز، فلاورزیم، نئوتراز، پروتامکس، پاپائین، بروملین و پروتکس هستند. طی هیدرولیز آنزیمی، پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها توسط آنزیم شکافته شده و روغن موجود در شبکه پروتئین آزاد می‌شود (Gbogouri و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، این فرآیند همچنین به عنوان یک روش سبز جایگزین به منظور استخراج روغن ماهی مورد توجه قرار گرفته است. در طول هیدرولیز آنزیمی، فقط دمای متوسط مورد نیاز است، بنابراین می‌توان در مصرف انرژی صرفه جویی کرد و اجزای

تغذیه‌ای روغن که در معرض دمای بالا قرار دارند، حفظ می‌گردند. علاوه بر این، از استفاده از حلال‌های آلی در هیدرولیز آنزیمی جلوگیری می‌شود، در نتیجه باعث کاهش انتشار آلاینده‌های محیطی می‌شود (Liu و همکاران، ۲۰۲۱). تغلیظ اسیدهای چرب امگا۳ (DHA + EPA) با روش‌های مختلفی از جمله تخلیص آنزیمی، کریستالیزاسیون با دمای پایین، استخراج سیال فوق بحرانی و کمپلکس اوره به دست می‌آید. در مقیاس آزمایشگاهی، انواع فن‌آوری‌ها برای تغلیظ و جداسازی ω-3 PUFA استفاده می‌شود، اما تنها برخی از آنها می‌توانند در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این روش‌ها می توان به تبلور در دمای پایین، تشکیل کمپلکس اوره یا ته نشینی اسیدهای چرب به شکل نمک‌های لیتیوم، تقطیر مولکولی، روش‌های آنزیمی، استخراج سیال فوق بحرانی و انواع روش‌های کروماتوگرافی اشاره کرد (Latyshev و همکاران، ۲۰۱۴). هر یک از روش‌های فوق مزایا و معایب خود را دارد. به عنوان مثال، تبلور در دمای پایین نمی‌تواند ω-3 PUFA با غنای بالا تولید کند، اما اغلب برای حذف اولیه و جزئی FA اشباع شده استفاده می‌شود. روش‌های شیمیایی جداسازیPUFA کمیاب و مبتنی بر اتصال خاص به پیوندهای دوگانه، به عنوان مثال، با جیوه یا استات مس است. اما استفاده از این فلزات در فرآیند جداسازی، استفاده از فرآورده‌های به دست آمده را در رژیم غذایی با مشکل مواجه می‌نماید.

در این میان، روش کمپلکس با اوره به عنوان کارآمدترین و ساده‌ترین روش دست یابی ω-3 PUFAs مدنظر قرار داده می‌شود (Shahidi و Wanasundara، ۱۹۹۸). اوره به‌تنهایی ماده‌ای شفاف است که ساختمان چهاروجهی را تشکیل می‌دهد؛ بااین‌حال، در حضور اسیدچرب، بلورهای آن، یک ساختمان شش‌ضلعی را تشکیل می‌دهد. این درواقع تشکیل یک کریستال وابسته میان اوره و اسیدهای چرب است. تنها مولکول خطی اسیدچرب قادر به تشکیل کریستال به‌عنوان میزبان با اوره می‌باشد و به‌عنوان روشی برای جداسازی اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب غیراشباع از اسیدهای چرب چند غیراشباع مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hamam و Shahidi، ۲۰۰۸). روش کمپلکس اوره به‌منظور استخراج و تغلیظ اسیدهای چرب امگا-۳ یکی از بهترین روش‌هایی است که با حداقل امکانات و بدون استفاده از هیچ حلالی به‌جز اتانول انجام می‌شود. دلیل توجه به این روش این است که تشکیل کمپلکس بستگی به جهت‌گیری فضایی

اسیدهای چرب درنتیجه حضور پیوندهای دوگانه داشته و ویژگی‌های فیزیکی اسیدهای چرب از قبیل نقطه ذوب و حلالیت نقشی در تشکیل کمپلکس با اوره ندارند (Wanasundara و Shahidi، ۱۹۹۸). این روش امکان فرآوری حجم زیادی از مواد را با تجهیزات ساده و در دمای پایین فراهم می‌کند. این فرآیند از حلال‌های ارزان قیمت، متانول یا اتانول، با راندمان بالاتر غلظت ω-3 PUFA در مقایسه با تبلور در دمای پایین که از حلال‌های آلی استفاده می‌کند، می‌باشد. تغلیظ با اوره یک فرآیند جهانی است که شرایط جزءبندی آن (نسبت اوره/اسید چرب، اوره/حلال، دما و زمان تبلور) در محدوده وسیعی متفاوت است. نشان داده شده است که بازده EPA در دماهای ۲۰ تا ۲۸ درجه سانتیگراد با نسبت اوره:اسید چرب ۳:۱ تا ۴:۱ افزایش می‌یابد، در حالی‌که بازده DHA در دماهای پایین تر از ۴ تا ۱۰- درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد.

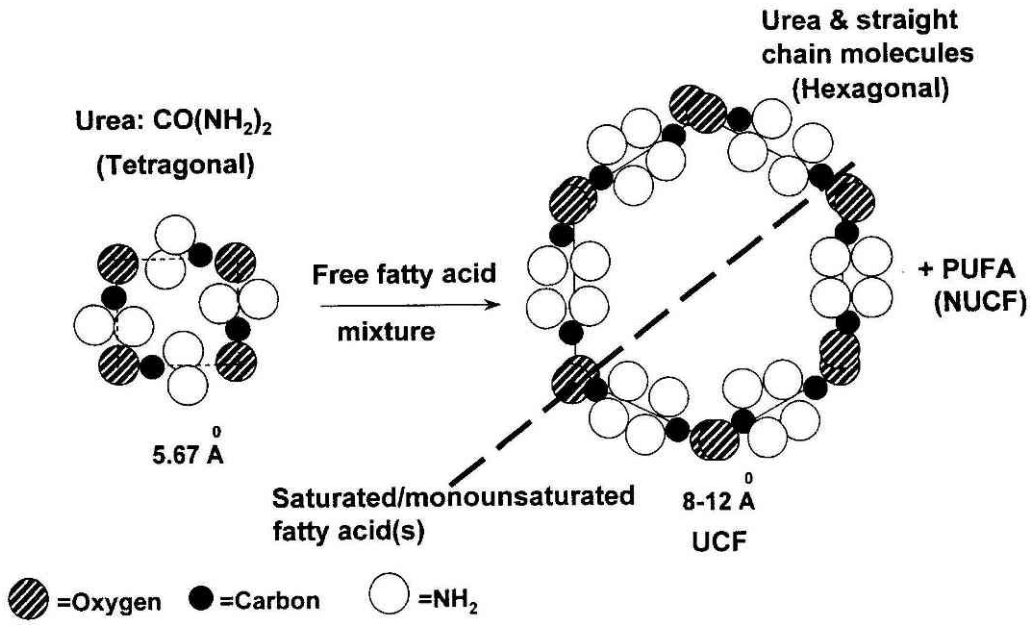

FIG. 4. FORMATION OF UREA CRYSTALS IN THE PRESENCE OF LONG-CHAIN FATTY ACIDS

شکل ۱-۱. تشکیل بلورهای اوره در حضور اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع (Senanayake و Shahidi، ۲۰۰۰)

لذا در پروژه حاضر، ابتدا روغن ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris* caspia) به عنوان گونه غالب صید کیلکاماهیان در دریای خزر با استفاده از روش آنزیمی، استخراج و سپس با روش کمپلکس اوره تغلیظ شد.