

KẾT TINH PHÂN ĐOẠN AXIT BÉO KHÔNG NO NHIỀU NỐI ĐÔI TỪ DẦU CÁ TRÍCH VÀ CÁ BASA

Đến Tòa soạn 3-11-2006

LẠI MAI HƯƠNG

Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Công nghệ Hoá học, Đại học Bách khoa Tp. HCM

SUMMARY

Low temperature fractionation was employed to obtain polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentrates from sardine and catfish oils. Different solutions of free fatty acids (FFAs) at various FFAs: solvent ratio (w/v) from these two oils were crystallized at -20°C and -70°C, respectively, using hexane and acetone as solvents. At the best crystallization condition, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) purities were reached 14.1% and 8.7% from sardine oil and linolenic acid (LA) purity was 31% from catfish oil.

Keywords: Crystalline fraction, fish oil, polyunsaturated fatty acid, EPA, DHA, LA.

I - GIỚI THIỆU

Dầu cá từ lâu đã được biết đến như một nguồn cung cấp axit béo không no nhiều nối đôi (PUFA), đóng vai trò quan trọng đối với sức khoẻ và dinh dưỡng con người. Trong dầu cá biển thường bao gồm một hàm lượng n-3PUFA lớn, đặc biệt là EPA và DHA. Hai axit béo này đã được chứng minh là có khả năng phòng chống nhiều loại bệnh khác nhau như các bệnh về tim mạch, bệnh viêm nhiễm, dị ứng hay tiểu đường (Minnis et al., 1998; Rambjor et al., 1996; Garcia, 1998). Ngoài ra, những axit béo không no này là phần không thể thiếu trong khẩu phần ăn của trẻ em vì chúng có khả năng tăng cường thị giác và sự phát triển của trí não (Ackman, 1999; Krawczyk, 2001). EPA và DHA thường có mặt trong một số dầu cá biển như dầu cá trích. Bên cạnh việc đánh bắt cá biển, ngành thuỷ sản nước ta hiện nay đang chú trọng phát triển việc nuôi trồng các loài cá nước ngọt, trong đó cá basa chiếm một sản lượng lớn. Phát triển song song với ngành khai thác thuỷ sản, ngành công nghiệp chế biến thuỷ sản thường làm phát sinh một lượng phế phụ phẩm

đáng kể trong đó có mỡ cá. Việc tận dụng những phế phụ phẩm này để sản xuất những chế phẩm giàu PUFA vừa góp phần nâng cao giá trị kinh tế của ngành chế biến thuỷ sản vừa giải quyết vấn đề về ô nhiễm môi trường.

Trong dầu cá, ngoài các PUFA còn có một hàm lượng axit béo no lớn có những tác dụng không có lợi về mặt dinh dưỡng. Để phục vụ cho nhu cầu nâng cao giá trị dinh dưỡng của dầu cá với mục đích sử dụng trong thực phẩm hoặc dược phẩm, nhất thiết cần có một quá trình phân tách, loại một phần axit béo no và làm tăng hàm lượng PUFA. Có nhiều phương pháp làm giàu PUFA khác nhau, tuy nhiên kết tinh phân đoạn là phương pháp đơn giản nhất.

Nhiệt độ đông đặc của các axit béo chênh lệch nhau một cách đáng kể khi có sự khác nhau về số nối đôi và chiều dài của mạch cacbon. Trong hai yếu tố ảnh hưởng trên thì số nối đôi trong mạch cacbon có ảnh hưởng lớn nhất tới nhiệt độ đông đặc của các axit béo. Khi nhiệt độ của một hỗn hợp các axit béo giảm xuống thì các axit béo no và các axit béo không no một nối đôi mạch dài sẽ kết tinh trước, còn lại các axit béo không no nhiều nối đôi sẽ vẫn ở trạng

thái lỏng. Nhờ nguyên lý trên mà người ta có thể phân tách các axit béo không no nhiều nối đôi (PUFA) ra khỏi phần no và MUFA bằng phương pháp kết tinh phân đoạn ở nhiệt độ thấp. Phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách kết tinh trực tiếp hỗn hợp các axit béo hay dầu nguyên liệu, kết tinh nguyên liệu với các chất hoạt động bề mặt hay thực hiện quá trình kết tinh khi nguyên liệu được hoà tan trong dung môi. Phương pháp kết tinh nguyên liệu trực tiếp thường cho hiệu suất thu hồi thấp do phần lỏng bị kẹt rất nhiều trong phần kết tinh do đó hiệu quả phân tách cũng như hiệu suất thu hồi không cao. Đối với mục đích làm tăng hàm lượng các axit béo không no thường phải sử dụng phương pháp kết tinh trong dung môi. Đây là phương pháp có hiệu quả phân tách cũng như hiệu suất thu hồi cao nhất do dung môi có tác dụng làm tăng sự khác biệt về nhiệt độ đông đặc của các axit béo ngoài ra còn có tác dụng rửa trôi pha lỏng ra khỏi hỗn hợp sau khi kết tinh.

Hỗn hợp axit béo đem kết tinh có thể ở dạng triglyxerit hay axit béo tự do. Tuy nhiên khi tồn tại ở dạng tryglyxerit, hiệu quả phân tách các PUFA không cao do chúng bị liên kết chặt chẽ với các axit béo no và MUFA khác trong phân tử của triglyxerit (Lopez-Martinez et al., 2004).

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục đích thu được chế phẩm PUFA có hàm lượng PUFA cao nhất đồng thời loại được nhiều axit béo no nhất. Những yếu tố ảnh hưởng chính trong phương pháp kết tinh phân đoạn trong dung môi bao gồm loại dung môi, lượng dung môi và nhiệt độ kết tinh sẽ được khảo sát trên nguyên liệu là hỗn hợp các axit béo tự do được lấy từ dầu cá trích và cá basa.

II - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Dầu cá trích và cá basa được thu nhận từ phế phụ phẩm cá trích và cá basa được lấy từ các nhà máy chế biến hải sản ở thành phố Hồ Chí Minh. Hỗn hợp các axit béo tự do (FFA) thu được bằng phương pháp thủy phân dầu cá trong môi trường kiềm theo tài liệu của Lopez-

Martinez và cộng sự (2004).

2. Phương pháp kết tinh

Hỗn hợp axit béo từ dầu cá trích và cá basa được hoà tan trong dung môi theo những tỷ lệ nhất định. Sau đó dung dịch thu được để kết tinh trong những điều kiện nhiệt độ khác nhau trong thời gian là 20 giờ. Sau quá trình kết tinh, hỗn hợp pha rắn và pha lỏng được lọc qua giấy lọc tại nhiệt độ kết tinh, rửa lại bằng dung môi có cùng nhiệt độ kết tinh, sau đó tách riêng pha rắn và pha lỏng. Khối lượng hai pha thu được xác định sau khi làm bay hơi dung môi. Thành phần axit béo của pha lỏng được phân tích trên máy sắc ký khí theo phương pháp của Lopez-Martinez và cộng sự (2004). Hiệu suất thu hồi PUFA, DHA, EPA: $H_i (\%) = (\text{khối lượng chất } i \text{ trong pha lỏng} / \text{khối lượng chất } i \text{ trong nguyên liệu trước khi kết tinh}) * 100$ với $i = \text{PUFA, DHA hay EPA}$

3. Điều kiện kết tinh

Đối với dầu cá trích: Loại dung môi được khảo sát bao gồm axeton và hexan. Tỷ lệ FFA: dung môi được thay đổi là 1:5, 1:10 và 1:20. Nhiệt độ kết tinh được khảo sát hai nhiệt độ là -20°C và -70°C . Các điều kiện thí nghiệm được bố trí theo mô hình yếu tố đầy đủ lặp lại toàn phần ngoại trừ yếu tố tỷ lệ FFA: dung môi ở nhiệt độ -70°C chỉ khảo sát 2 tỷ lệ 1:10 và 1:20.

Đối với dầu cá basa: Dung môi sử dụng là axeton với tỷ lệ FFA: dung môi = 1: 10 (w/v). Nhiệt độ kết tinh là -20°C và -70°C .

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết tinh phân đoạn PUFA từ dầu cá trích

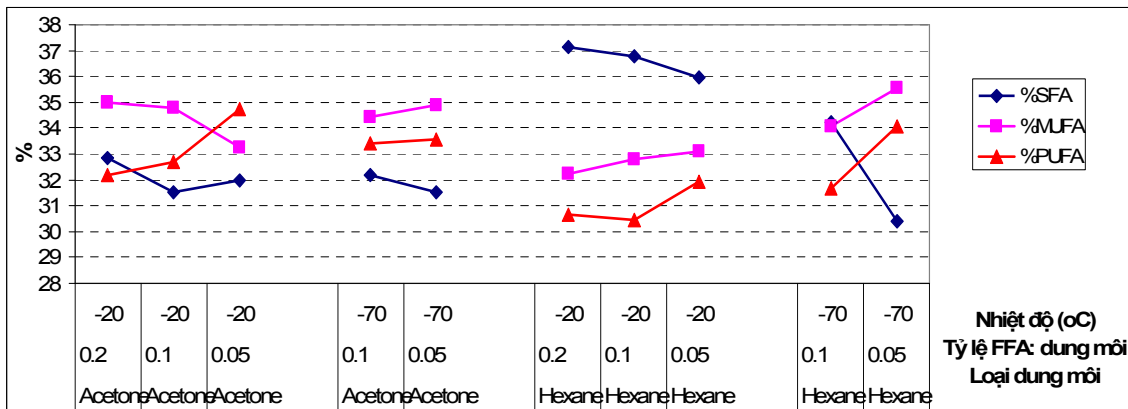
Thành phần FFA thu được từ dầu cá trích trước khi kết tinh bao gồm 50,8% tổng các axit béo no (SFA), 25,5% các axit béo có một nối đôi (MUFA) và 23,7% các axit béo có nhiều nối đôi (PUFA), trong đó chủ yếu là EPA (9,4%) và DHA (7,3%). Sau quá trình kết tinh ở những điều kiện khác nhau, kết quả thu được trình bày trên hình 1 và 2.

2. Ảnh hưởng của loại dung môi

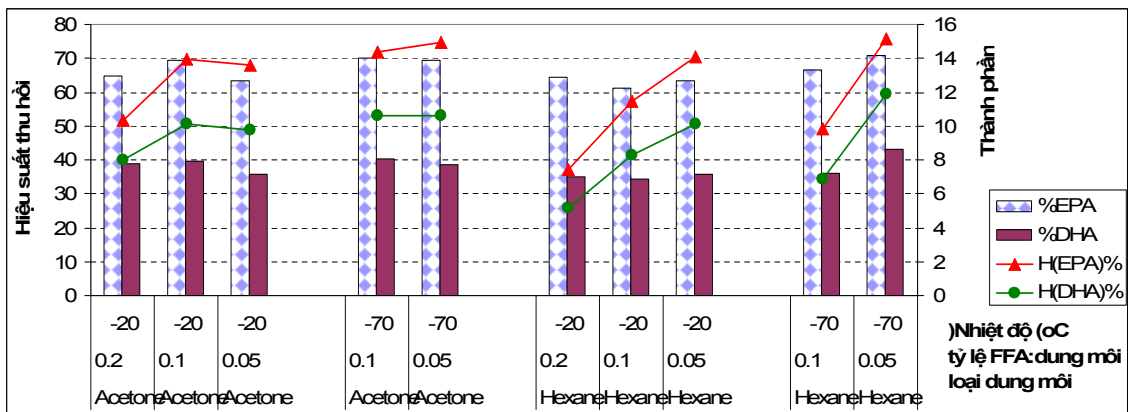
Dung môi hay sử dụng trong phương pháp

kết tinh phân đoạn các axit béo phải có một số đặc tính nhất định như: phải hoà tan tốt các axit béo, phải có hiệu quả phân tách PUFA tốt và phải không độc hại. Nhiều tác giả đã khảo sát nhiều loại dung môi khác nhau trong phương pháp này để phân tách axit linolenic từ dầu thực vật (Lopez-Martinez và cộng sự, 2004) hay EPA và DHA từ dầu cá (Wanasundara, 1996). Từ những dung môi khảo sát bao gồm hexan, axeton, dietylete, izobutanol và etanol, Lopez-

Martinez (2004) đã chọn được 2 dung môi là hexan và axeton có tác dụng phân tách tương tự nhau và được sử dụng trong những thí nghiệm tiếp theo. Tương tự như vậy, Wanasundara (1996) cũng khuyến cáo sử dụng hexan và axeton để kết tinh thu nhận EPA và DHA từ mỡ hải cẩu. Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của axeton và hexan đến thành phần % và hiệu suất thu hồi EPA và DHA trong hỗn hợp axit béo thu được từ cá trích cũng được khảo sát.



Hình 1: Thành phần % của pha lỏng thu được sau khi kết tinh ở các điều kiện khác nhau



Hình 2: Thành phần % và hiệu suất thu hồi EPA và DHA trong pha lỏng sau quá trình kết tinh

Kết quả thu được trong hình 2 cho thấy thành phần % EPA và DHA thu được khi kết tinh trong axeton và hexan là tương tự nhau. Tuy nhiên, khi so sánh về hiệu suất thu hồi EPA và DHA trong pha lỏng ở cùng điều kiện về nhiệt độ và tỷ lệ FFA:dung môi, kết tinh trong axeton đều cho kết quả có xu hướng cao hơn so với

trong hexan ngoại trừ điều kiện kết tinh trong hexan ở -70°C với tỷ lệ FFA:dung môi là 0,05. Khi đó có kết quả bằng với dung môi acetone. Kết quả ở hình 2 cũng cho thấy khả năng làm giảm thành phần % của các axit béo no (SFA) trong pha lỏng khi được kết tinh trong axeton cũng tốt hơn so với hexan ngoại trừ điều kiện

nhiệt độ -70°C và tỷ lệ FFA:dung môi = 0,05. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu của các tác giả khác. Wanasundara (1996) nhận thấy ở những nhiệt độ cao hơn -60°C , acetone có khả năng làm giàu PUFA từ mỡ hải cẩu tốt hơn hexan, nhưng ngược lại ở nhiệt độ -60°C đến -70°C , hexan phân tách PUFA tốt hơn acetone. Tương tự, Lopez-Martinez và cộng sự (2004) cũng cho rằng ở -70°C , hexan cho hiệu suất thu hồi và hàm lượng axit linolenic trong pha lỏng cao hơn so với acetone. Chưa có một tác giả nào đưa ra một lời giải thích chặt chẽ về sự khác nhau này, tuy nhiên có thể giả định là giữa hexan và acetone có sự khác nhau về tương tác của các dung môi này với các axit béo tự do trong hỗn hợp tại các nhiệt độ khác nhau. Với nguyên liệu là dầu cá trích, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy ở nhiệt độ -70°C , hexan có ưu thế hơn một chút so với acetone về thành phần % và hiệu suất thu hồi EPA và DHA thu được trong pha lỏng sau quá trình kết tinh, tuy nhiên, sự khác biệt này là không lớn. Mặt khác, acetone có giá thành và nhiệt độ bay hơi nhỏ hơn so với hexan, từ đó quá trình làm bay hơi dung môi từ các pha thu được sẽ dễ dàng hơn và có tính kinh tế cao hơn. Tóm lại, đối với nguyên liệu là dầu cá trích, acetone có nhiều ưu điểm hơn so với hexan.

3. Ảnh hưởng của tỷ lệ FFA:dung môi

Tỷ lệ FFA: dung môi là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới cả hiệu suất thu hồi và thành phần % của pha lỏng thu được sau quá trình kết tinh. Tỷ lệ dung môi lớn thường làm cho quá trình phân tách được thực hiện dễ dàng hơn tuy nhiên sẽ tốn chi phí nhiều hơn. Kết quả trên hình 2 cho thấy khi tỷ lệ FFA:dung môi giảm, thành phần % của SFA có xu thế giảm, ngược lại thành phần % của PUFA có xu thế tăng trong cả hai loại dung môi khảo sát và ở tất cả các nhiệt độ khảo sát, tuy nhiên sự khác biệt về thành phần % của các axit béo trong nhiều trường hợp là không lớn lắm. Kết quả ở hình 3 cho thấy khi thay đổi tỷ lệ FFA:dung môi, thành phần % của EPA và DHA trong pha lỏng thay đổi không đáng kể. Tuy nhiên, khi tỷ lệ FFA:dung môi giảm, hiệu suất thu hồi EPA và DHA đều tăng, chứng tỏ tỷ lệ dung môi lớn có tác dụng phân tách các axit béo có nhiệt độ

nóng chảy khác nhau tốt hơn. Lopez-Martinez J.C. và cộng sự (2004) cũng thu được kết quả tương tự khi khảo sát 3 tỷ lệ FFA:dung môi là 0,11; 0,25 và 0,8. Nhóm tác giả này nhận thấy rằng tỷ lệ FFA:dung môi thấp nhất là 0,11 có tác dụng làm tăng hàm lượng axit gamma - linolenic (GLA) trong pha lỏng tốt nhất với hiệu suất thu hồi đạt cao nhất, tuy nhiên chỉ có sự khác biệt về hiệu suất thu hồi của GLA là có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có thể được giải thích là do ở nồng độ thấp, các axit béo tự do có khả năng kết tinh một cách tự phát, các tinh thể tạo thành to và ít lẫn pha lỏng, do đó quá trình phân tách được thực hiện một cách triệt để hơn. Ngược lại, với nồng độ các axit béo tự do trong dung môi cao hơn có thể tạo thành những điểm quá bão hòa trong dung dịch (supersaturated solution), từ đó quá trình tạo mầm kết tinh xảy ra nhiều mà không làm tăng kích thước các tinh thể đã tạo thành. Kết quả là các tinh thể của pha rắn có kích thước bé và dễ bị tan chảy, gây khó khăn cho quá trình lọc và làm giảm hiệu quả của quá trình phân tách.

Kết quả ở hình 3 cũng cho thấy nếu sử dụng dung môi là acetone thì tỷ lệ FFA:dung môi = 0,1 cho kết quả về hiệu suất thu hồi EPA và DHA cao nhất. Ở tỷ lệ thấp hơn (0,05) cũng không đạt được hiệu suất thu hồi cao hơn. Đối với dung môi là hexan, tỷ lệ FFA:dung môi = 0,05 cho hiệu suất thu hồi EPA và DHA cao nhất ở cả 2 nhiệt độ kết tinh khác nhau là -20°C và -70°C .

4. Ảnh hưởng của nhiệt độ kết tinh

Nhiệt độ kết tinh là yếu tố quyết định tính chọn lọc của quá trình kết tinh. Đối với quy trình sản xuất dầu salad thường sử dụng nhiệt độ khoảng $4-5^{\circ}\text{C}$. Tuy nhiên ở nhiệt độ này thường chỉ loại được phần nào các axit béo no chứ chưa làm tăng đáng kể hàm lượng các axit béo không no đa nối đôi. Kết quả của Lopez-Martinez và cộng sự (2004) cũng cho thấy kết tinh ở 4°C không có hiệu quả tách PUFA cao. Bởi vậy, trong phần nghiên cứu này, chỉ có nhiệt độ -20°C và -70°C được khảo sát.

Khi so sánh hai nhiệt độ kết tinh là -20°C và -70°C , kết quả ở hình 2 và 3 cho thấy không có sự khác biệt lớn về thành phần % của các axit béo cũng như về hiệu suất thu hồi EPA và DHA khi sử dụng cùng một tỷ lệ FFA:dung môi đối

với acetone. Trong trường hợp sử dụng hexan làm dung môi, sự khác biệt đáng kể chỉ được nhận thấy ở tỷ lệ FFA:dung môi là 0,05. Ở tỷ lệ này, nhiệt độ -70°C cho hiệu suất thu hồi và thành phần % EPA và DHA cao hơn so với -20°C . Wanasundara (1996) khảo sát các nhiệt độ kết tinh mỡ hải cẩu khác nhau từ -10°C tới -70°C trong dung môi là hexan và acetone. Kết quả cho thấy nhiệt độ -70°C cho hàm lượng EPA và DHA cao nhất nhưng khối lượng pha lỏng thu được là ít nhất. Tác giả không tính hiệu suất thu hồi của EPA và DHA, do đó khó có thể nhận xét về chỉ tiêu này.

Kết quả được thể hiện trong hình 2 và 3 cho thấy đối với hexan, nhiệt độ -70°C là tối ưu hơn so với nhiệt độ -20°C . Trong trường hợp dùng acetone làm dung môi, có thể sử dụng nhiệt độ -20°C cũng vẫn đạt được hiệu quả phân tách DHA và EPA tương đương với nhiệt độ -70°C .

Tổng hợp tất cả các điều kiện đã khảo sát, điều kiện tối ưu để thu được hàm lượng và hiệu suất thu hồi EPA và DHA trong pha lỏng cao nhất là sử dụng dung môi hexan với tỷ lệ FFA:hexan (w/v) là 0,05 và nhiệt độ kết tinh là -70°C . Với điều kiện này có thể thu được pha lỏng có hàm lượng EPA là 14,1% và DHA là 8,7% với hiệu suất thu hồi EPA và DHA tương ứng là 75,7% và 59,4%. Tuy nhiên, để có thể giảm chi phí về dung môi cũng như lượng dung môi cần thiết với nhiệt độ kết tinh không quá thấp có thể sử dụng acetone với tỷ lệ FFA:dung môi là 0.1 và nhiệt độ kết tinh là -20°C . Ở điều kiện này có thể đạt được thành phần % EPA và DHA trong pha lỏng là 13,9% và 7,9% với hiệu suất thu hồi tương ứng là 70,0% và 50,7%. Nếu so sánh thành phần % của EPA và DHA cao nhất có thể đạt được sau quá trình kết tinh với thành phần % tương ứng của chúng trong mẫu nguyên liệu thì hàm lượng EPA và DHA chỉ tăng 1,5 và 1,2 lần. Kết quả này cho thấy đối với mẫu dầu cá trích, phương pháp kết tinh phân đoạn chỉ có thể làm tăng hàm lượng EPA nhưng hàm lượng DHA thì tăng không đáng kể. Có thể giải thích kết luận này là do hàm lượng của EPA và DHA trong mẫu ban đầu là tương đối nhỏ, nhỏ hơn so với các axit béo không no khác như axit palmitoleic và oleic là những axit béo tuy có số nối đôi ít hơn nhưng mạch cacbon lại ngắn hơn. Với cùng một điều kiện tối ưu của phương

pháp kết tinh phân đoạn, Lopez-Martinez và cộng sự (2004) có khả năng làm tăng được hàm lượng axit GLA trong *Borago officinalis* lên 2,5 lần trong khi với nguyên liệu là *Echium fastuosum* thì phương pháp này hoàn toàn không có hiệu quả. Kết quả này cũng được các tác giả nêu trên giải thích là do trong nguyên liệu *Echium fastuosum* có lẫn nhiều axit béo không no khác, với hàm lượng tương đương với GLA.

5. Kết tinh phân đoạn PUFA từ dầu cá basa

Kết quả ở phần trên cho thấy có khả năng sử dụng acetone ở nhiệt độ -20°C với tỷ lệ FFA:dung môi (w/v) là 0,1 mà vẫn đạt được kết quả phân tách tương đương với điều kiện sử dụng hexan ở nhiệt độ -70°C và tỷ lệ FFA:dung môi là 0,05. Acetone có giá thành rẻ hơn và nhiệt độ bay hơi thấp hơn hexan do đó sẽ có khả năng ứng dụng nhiều hơn. Trong phần áp dụng phương pháp kết tinh phân đoạn với nguyên liệu là dầu cá basa dưới đây, chỉ có acetone với tỷ lệ FFA:acetone = 1:10 được khảo sát. Tuy vậy, nhiệt độ kết tinh được chọn khảo sát cả hai nhiệt độ là -20 và -70°C . Kết quả được thể hiện trong hình 3.

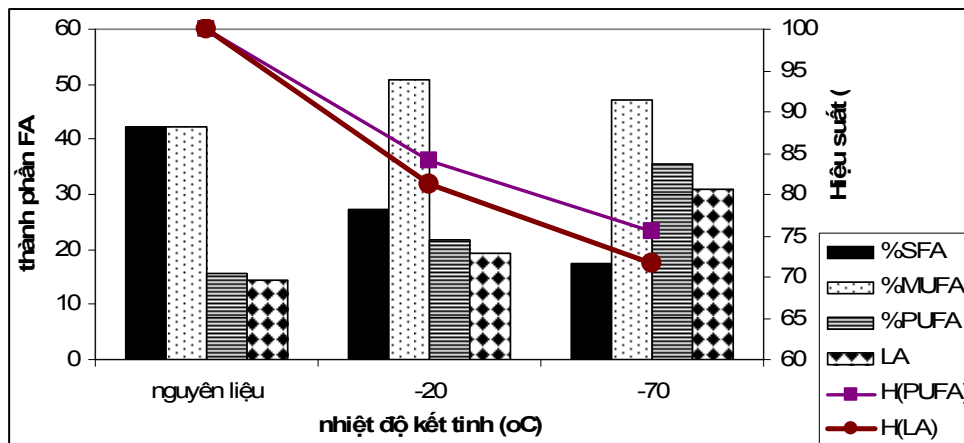
Dầu cá basa nguyên liệu bao gồm chủ yếu là SFA và MUFA chiếm hàm lượng tương đương nhau (42,2%). PUFA trong dầu cá basa chỉ chiếm khoảng 15,5%, trong đó axit linoleic (LA) chiếm hàm lượng lớn nhất (14,3%). Những PUFA còn lại bao gồm axit linolenic, axit arachidonic và DHA chiếm hàm lượng không đáng kể. Nhiệt độ kết tinh càng thấp, hàm lượng SFA trong pha lỏng càng giảm đồng thời hàm lượng PUFA càng tăng. Ở nhiệt độ -70°C , trong pha lỏng chỉ còn 17,3% SFA và có tới 35,5% PUFA, trong đó hàm lượng LA là 31,0%. Ở nhiệt độ này, độ tinh sạch của LA đã tăng được 2,2 lần so với mẫu chưa kết tinh. Cá basa chứa một hàm lượng MUFA rất lớn trong đó chủ yếu là axit oleic. Khi kết tinh ở -20°C , hàm lượng MUFA tăng từ 42,2% lên 50,9%. Nếu giảm nhiệt độ kết tinh xuống -70°C , hàm lượng này giảm xuống chỉ còn 47,2%, tuy nhiên vẫn cao hơn so với nguyên liệu không kết tinh.

Hiệu suất thu hồi PUFA cũng như LA giảm theo nhiệt độ kết tinh không giống như trong trường hợp cá trích. Có thể thấy sự khác biệt đáng kể trong thành phần PUFA của cá basa và

cá trích. PUFA của cá basa chỉ bao gồm chủ yếu là axit linoleic, chỉ có hai nối đôi, trong khi PUFA của cá trích bao gồm chủ yếu là EPA và DHA là những axit béo có số nối đôi rất lớn. Từ đó có thể thấy, khi giảm nhiệt độ kết tinh xuống -70°C đã xảy ra quá trình kết tinh một cách chọn lọc những axit béo SFA và MUFA trong khi EPA và DHA hầu như không kết tinh dẫn tới hiệu suất thu hồi của chúng trong pha lỏng không giảm, thậm chí còn tăng so với -20°C .

Đối với cá basa, do LA có thể cũng bị kết tinh một phần ở -70°C , do đó hiệu suất thu hồi của nó giảm hơn so với -20°C . Tuy nhiên, từ thành phần % của các axit béo thu được cũng có thể thấy, % LA ở -70°C tăng đáng kể do %SFA giảm đáng kể so với nhiệt độ kết tinh là -20°C .

Với mục đích làm tăng tối đa hàm lượng PUFA trong dầu cá basa, điều kiện tối ưu để kết tinh phân đoạn PUFA từ dầu cá basa là -70°C .



Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ kết tinh đến thành phần axit béo và hiệu suất thu hồi PUFA và LA trong pha lỏng

Lời cảm ơn: Cảm ơn KS. Trần Thanh Bình đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện các thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. R. G. Ackman. *Lipids*, 34, 125 - 128 (1999).
2. D. J. Garcia. *Food Technol.*, 52, 44 - 49 (1998).
3. T. Krawczyk. *Inform*, 12, 1064 - 1074 (2001).
4. J. C. López-Martínez, P. Campra-Madrid P. and J. L. Guil-Guerrero. *J. Biosci. Bioengin.*, 97, 294 - 298 (2004).
5. R. C. Minnis, I. U. Haq, P. R. Jackson, W. W. Yeo, L. E. Ramsay. *Dietetics*, 11, 13 - 19 (1998).
6. G. S. Rambjor, A. I. Walen, S. L. Windsor, W. S. Harris. *Lipids*, 31, S. 45 - 49 (1996).
7. U. N. Wanasundara. Marine oil: stabilization, structural characterization and n-3 fatty acid concentration. PhD. Thesis. Memorial University of Newfoundland, Canada (1996).