

بهینه‌سازی استفاده از عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis sp.* بر ماندگاری فیله میگوی سفید سر تیز (*Metapenaeus affinis*)

آتنا هودجی^۱، لاله رومیانی^{۲*}

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۲ DOI:10.22124/japb.2023.25333.1508 تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

آریان پس از صید دستخوش تغییرات شیمیایی، میکروبی و حسی می‌شوند که این تغییرات سبب فاسد شدن آنها و کاهش ماندگاری محصول می‌شود. هدف از این مطالعه استفاده از پوشش خوراکی کیتوزان حاوی عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis sp.* بر ماندگاری میگو سفید سر تیز (*Metapenaeus affinis*) بود. برای بهینه‌سازی، غلظت‌های متفاوت عصاره جلبک (۰، ۱/۵، ۳ درصد)، دما (۱۰-، ۳- و ۴ درجه سانتی‌گراد) و زمان نگهداری (۰، ۷ و ۱۵ روز) به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. بر اساس خروجی نرم‌افزار RSM، ۱۵ تیمار انتخاب و از روش تجزیه و تحلیل واریانس برای تعیین مطلوبیت مدل‌های به دست آمده استفاده شد. شاخص‌های پراکسید (PV)، اسید تیوباربیتوریک (TBA)، کل بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)، اسیدهای چرب آزاد (FFA)، میزان باکتری‌های هوازی کل (TVC) و تغییرات رنگ (a^* و b^*) مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، میزان شاخص‌های میکروبی، شیمیایی و رنگ فیله میگو، با افزایش غلظت عصاره جلبک کاهش معنی‌داری با گروه شاهد داشتند ($P < 0.05$). در روز هفتم و پانزدهم نگهداری، به ترتیب تیمار نهم و دوازدهم با غلظت عصاره و دما سبب افزایش شاخص‌های a^* و b^* و کاهش شاخص رنگ L^* شد. درصد چربی و بازده وزن فیله میگو با افزایش غلظت عصاره افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.05$). فیله میگو در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد و غلظت عصاره ۳ درصد بر اساس نتایج شاخص‌های کیفی تا روز پانزدهم نگهداری برای مصرف انسان مطلوب بود. با توجه به F-value، در تمامی شاخص‌ها، دما در مقایسه با زمان، شاخص تاثیرگذارتری بود. فرمول‌های پیشنهادی برای هر شاخص، قادر به بررسی پیشگویی تغییرات کیفی فیله میگوی سفید سر تیز بودند.

واژگان کلیدی: جلبک، ماندگاری، آزمون سطح پاسخ، میگو.

۱- دانشجوی کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

۲- دانشیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: laleh.roomiani@iau.ac.ir

مقدمه

فزاینده‌ای به افزایش ماندگاری غذاهای دریایی با استفاده از عصاره‌های طبیعی با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی به جای افزودنی‌های شیمیایی صورت گرفته است (Sharifi and Roomiani, 2022).

استفاده از پوشش‌های خوراکی به دلیل ایمنی و کارایی بالا و هزینه کم، توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده و ثابت شده است که به کارگیری آنها برای حفظ کیفیت غذاهای دریایی موثر است. مواد پوششی مورد استفاده برای نگهداری غذاهای دریایی محدود هستند. علاوه بر ایمنی، آنها باید بتوانند به عنوان حامل مواد نگهدارنده در غذاهای دریایی باشند و به عنوان عامل آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب عمل کنند. کیتوزان و کاراجینان دو پلی‌ساکارید رایج مورد استفاده در صنعت غذا به عنوان پوشش هستند. پوشش‌های خوراکی به راحتی قابل مصرف هستند و به عنوان مانعی در برابر رطوبت، انتقال اکسیژن و مواد حل کننده، از کاهش کیفیت غذا جلوگیری می‌کنند. بنابراین، پوشش‌های خوراکی ماندگاری غذاهای حاوی چربی را افزایش می‌دهند و مانع واکنش‌های مرتبط با فساد می‌شوند. پوشش‌های خوراکی بر پایه کیتوزان اثرات هم‌افزایی

میگو به دلیل ارزش غذایی و اقتصادی بالا یکی از تجاری‌ترین محصولات دریایی است. میگو یک ماده غذایی کم‌چرب و دارای پروتئین بالا است که در طول زمان نگهداری پس از صید، به دلیل فعالیت آنزیمی و میکروبی ماندگاری آن کاهش می‌یابد (Kim et al., 2018). امروزه افزایش تمایل مردم برای مصرف فرآورده‌های غذایی سالم با ماندگاری زیاد و بالا رفتن سطح آگاهی آنها در مورد مسائل مرتبط با سلامتی و بیماری‌های غذازاد، باعث شده تا پژوهشگران روی تولید محصولات سالم و افزایش زمان ماندگاری آنها تمرکز بیشتری داشته باشند (Shafiei and Mostaghimi, 2022).

برای جلوگیری از فساد میگو روش‌های مختلفی برای کاهش دما به کار گرفته می‌شود و از ترکیبات فنلی مصنوعی نیز به عنوان آنتی‌اکسیدان و عوامل ضد میکروبی برای افزایش ماندگاری و کیفیت آن استفاده می‌شود. نگهدارنده‌های شیمیایی یکی از روش‌های موثر برای حفظ کیفیت، کاهش ملانوزیز (Melanosis) و افزایش ماندگاری میگو در طول زمان نگهداری است. با این حال، به دلیل عدم علاقه مصرف‌کنندگان به مواد شیمیایی مصنوعی، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که توجه

(Synergistic) در ترکیب با مواد نگهدارنده طبیعی دیگر مثل عصاره‌های جلبک دارند (Carissimi et al., 2018; Albertos et al., 2019; Carpintero et al., 2023).

یکی از ترکیبات فعال زیستی که اخیراً توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است، پلی‌ساکاریدهای سولفات موجود در دیواره سلولی جلبک‌ها است. این ترکیبات دارای گروه‌های سطحی آبدوست مانند ترکیبات کربوکسیل، هیدروکسیل و سولفات هستند که به سرعت با بافت‌های زیستی واکنش نشان می‌دهند (Albertos et al., 2019). مطالعاتی در زمینه استفاده از عصاره جلبک‌ها به همراه پلیمرهای زیستی مانند کیتوزان برای کنترل کیفیت مواد غذایی صورت گرفته است. تاثیر پوشش کیتوزان محتوی ترکیبات فعال جلبک *Ulva intestinalis* میگوی وانامی مطالعه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از کیتوزان به همراه جلبک توانست مانع اکسیداسیون چربی، تخریب (Denaturation) پروتئین و کاهش میزان باکتری‌های هوازی در مقایسه با استفاده آنها به تنهایی شود (Alishahi and Aider, 2012). بهبود ماندگاری گوشت چرخ شده فیله ماهی (*Huso huso*) با استفاده از عصاره هیدروالکلی جلبک *Ulva intestinalis* مطالعه شد و نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از کیتوزان همراه با جلبک میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) برای کنترل کیفیت و ویژگی‌های (Daneshvar Ghorbani et al., 2018) است. استفاده از ترکیبات فعال جلبک *Porphyra yezoensis* برای کنترل کیفیت ویژگی‌های میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) بررسی شد (Kamali et al., 2023). استفاده از پوشش کیتوزان همراه با عصاره جلبک اسپرولینا برای نگهداری فیله فیل ماهی به کار گرفته شد. این بررسی نشان داد که با استفاده از پوشش کیتوزان حاوی عصاره جلبک می‌توان از رشد باکتری‌ها در فیله‌های تازه ماهی جلوگیری کرده و ویژگی‌های حسی آن شامل بافت، بو، رنگ و پذیرش کلی را نیز تا حدود زیادی حفظ کرد و موجب افزایش دوره نگهداری ماهی در یخچال شد (Abdolahi - Chelehbari et al., 2022).

با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت این موضوع در ارتباط با سلامت انسان، هدف از این مطالعه، برای اولین بار، بهینه‌سازی استفاده از عصاره جلبک *Nannochloropsis* sp. همراه با کیتوزان بر افزایش ماندگاری فیله میگو سفید سرتیز (*Metapenaeus affinis*) بود.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis* sp.

برای تهیه عصاره، پودر خشک شده جلبک *Nannochloropsis* sp. از پژوهشکده تحقیقات شیلات بندرلنگه تهیه و تحت شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل شد. عصاره‌گیری از پودر جلبک توسط روش پرکولاسیون با حلال اتانول ۷۰ درصد (نسبت پودر به حلال ۵:۱) به مدت ۷۲ ساعت به کمک شیکر صورت گرفت. عصاره به دست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۸ صاف و به کمک دستگاه تبخیرکننده دوار (LabTech، EV 311VC، ایتالیا) تحت شرایط خلا تغلیظ شد تا تمام حلال از عصاره جدا شود (Sharifi and Roomiani, 2022).

تهیه کیتوزان

میگوهای سفید سرتیز (*Metapenaeus affinis*) از صیدگاه منطقه چوئیده آبادان به صورت تازه تهیه و همراه با یخ (۱:۲ حجم/حجم) طی ۱ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، میگوها با آب سرد (۳-۱ درجه سانتی‌گراد) شسته و در ۲۲- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. برای استخراج کیتین از پوست میگو ابتدا جداسازی مواد

پروتئینی از پوسته با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم (سود) ۱ نرمال در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت انجام شد. نسبت وزنی پودر پوسته میگو به محلول سود ۱ به ۲۰ بود. سپس بقایای پوسته صاف و مواد باقی‌مانده روی صافی با آب مقطر تا رسیدن به pH خنثی شستشو شدند. بقایای پوسته به دست آمده از مرحله قبل به مدت ۱ ساعت در محلول اسید کلریدریک ۱/۴ نرمال قرار داده شد. نسبت وزنی پوسته به اسید، ۱ به ۱۰ بود. سپس بقایای پوسته صاف شده و مواد باقی‌مانده روی صافی تا رسیدن به pH خنثی شستشو داده شد. کیتین به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. برای استیل‌زدایی کیتین و تبدیل آن به کیتوزان، ۱۰ گرم از پودر کیتین خشک شده به یک بالن ۲/۵ لیتری منتقل شد. سپس روی آن محلول ۵۰ درصد (وزنی-وزنی) هیدروکسید سدیم اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۴ ساعت روی اجاق الکتریکی جوشانده و پس از خشک شدن، با آب شستشو و سپس صاف و توزین شد. کیتوزان به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد (Moazzeni Jola and Roomiani, 2018).

آماده‌سازی فیله میگو

رنگ زرد در ازلن مایر حرارت داده شد. در این زمان محلول با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال تا ایجاد رنگ ارغوانی تیترا شد. در نهایت مقدار TVB-N از رابطه ۱ محاسبه شد (AOAC, 2002).

رابطه ۱:

$$\text{TVB-N (mg/100g)} = (\text{Ts} - \text{Tc}) \times 1.4 \times 100$$

Ts: میزان تیترازول نمونه مصرفی (میلی‌لیتر)؛ Tc: میزان تیترازول نمونه شاهد (میلی‌لیتر).

اندازه‌گیری اسید تیوباربتوریک

این آزمون بر اساس مقادیر اسپکتروفوتومتری کمپلکس صورتی رنگ به دست آمده از واکنش یک مولکول مالون دی‌آلدئید به دست آمده از تقطیر با دو مولکول اسید تیوباربتوریک (TBA) اضافه شده به محلول به دست آمده از تقطیر صورت گرفت و نتایج بر اساس میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در کیلوگرم نمونه بیان شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم گوشت میگو به بالن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و با ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از مخلوط فوق به لوله‌های خشک درب‌دار وارد و به آن ۵ میلی‌لیتر از معرف TBA افزوده شد. لوله‌های درب‌دار در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند و پس از آن در دمای

فیله‌های میگو به صورت پوشش در محلول ۱ درصد کیتوزان غوطه‌ور شده، سپس از محلول خارج و بعد از آب‌جک، فیله‌ها از صفحات مشبک استریل آویزان و تحت جریان ملایم هوا قرار گرفتند. سپس میگوها با روش غوطه‌وری به ظروف مجزای عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis sp.* در سه سطح ۰ (شاهد): غوطه‌ور شدن در آب مقطر به مدت ۲۵ دقیقه، ۱/۵ و ۳ درصد آغشته شدند و پس از آن برای حذف مایع اضافی روی صافی‌های فلزی سترون قرار گرفتند. سپس در بسته‌های پلی‌اتیلنی استریل بسته‌بندی شدند. در این مطالعه سه دمای ۱۰-، ۳- و ۴ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. مدت زمان نگهداری ۱۵ روز بود و نمونه‌ها در روزهای ۰، ۷ و ۱۵ بررسی شدند.

اندازه‌گیری بازهای نیتروژنی فرار

اندازه‌گیری بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) با دستگاه کجلدال اتوماتیک انجام شد. ابتدا ۱۰ گرم نمونه به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری تقطیر شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید بوریک ۲ درصد حاوی متیل‌رد نرمال به آن افزوده و نمونه به مدت ۴۵ دقیقه تا ایجاد

رابطه ۳:

$$PV \text{ (mEq/kg)} = (V \times N \times 100) / W$$

V: حجم تیوسولفات سدیم مصرفی (میلی لیتر)؛ N: نرمالیه تیوسولفات سدیم (اکی والان در لیتر)؛ W: وزن نمونه روغن (گرم).

اندازه گیری اسیدهای چرب آزاد

برای اندازه گیری اسیدهای چرب آزاد (FFA)، ۲۵ میلی لیتر اتانول خنثی شده به وسیله سود نرمال به نمونه روغن میگو (بر اساس روش درج شده در اندازه گیری پراکسید تهیه شد) اضافه شد. در مرحله بعدی با کمک ۲ تا ۳ قطره معرف فنل فتالین و میزان مصرفی سود نرمال، مقدار اسیدیته برحسب درصد اسید اولئیک (OA) بر طبق رابطه ۴ مشخص شد (Rukunudin et al., 1998).

رابطه ۴:

$$FAA \text{ (\%OA)} = [V_{NaOH} \times (28/2) \times (N/10)] / W$$

OA: اسید اولئیک؛ V_{NaOH} : حجم سود (میلی لیتر)؛ N: نرمالیه سود (اکی والان در لیتر)؛ W: وزن نمونه روغن (گرم).

تعیین باکتری های هوازی کل

برای بررسی تغییرات باکتری های هوازی کل (Total Viable Count: TVC)، ۵ گرم عضله میگو با ۴۵ میلی لیتر آب مقطر به کیسه استریل استومیکر منتقل شد و به صورت هموزن درآمد.

محیط سرد شدند. مقدار جذب (A_S) در ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل شاهد آب مقطر (A_B) خوانده شد و مقدار TBA از رابطه ۲ به دست آمد (Pearson, 1976).

رابطه ۲:

$$TBA \text{ (mg/kg)} = [(A_S - A_B) \times 50] / 200$$

اندازه گیری پراکسید

برای اندازه گیری پراکسید (PV)، به ۱۵ گرم گوشت میگو، ۶۰ میلی لیتر متانول و ۶۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت، برای جداسازی فازها، ۳۶ میلی لیتر آب مقطر اضافه و بعد از ۲ ساعت روغن با استفاده از دکانتور جدا شد. ۲۵۰ میلی لیتر نمونه روغن به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری سرسمباده ای منتقل و حدود ۲۵ میلی لیتر از محلول اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسیداستیک ۳:۲) به محتویات ارلن اضافه شد. ۰/۵ میلی لیتر از محلول یدید پتاسیم اشباع، ۳۰ میلی لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته یک درصد به مجموعه اضافه و مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیترا شد. در نهایت مقدار PV از رابطه ۳ محاسبه شد (AOAC, 2002).

رابطه ۵: سپس نمونه تا رقت ۱۰^۵ میلی‌لیتر رقیق شد.

$$WL (\%) = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100$$

W_i : وزن اولیه فیله میگو در روز تولید (گرم)؛ W_f : وزن نهایی در روزهای ۰، ۷ و ۱۵ (گرم).

اندازه‌گیری میزان چربی

اندازه‌گیری چربی به روش سوکسله با استفاده از حلال پترولیوم اتر صورت گرفت (Firestone, 1998).

۱ میلی‌لیتر از هر رقت در پلیت حاوی محیط کشت کانت آگار قرار داده شد. بعد از چند دقیقه همه پلیت‌ها وارونه و در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. شمارش باکتری‌ها بر اساس روش استاندارد شماره ۲۳۲۵ (۱۳۸۰) انجام شد (National Standard of Iran- Microbiology, 2008).

تجزیه و تحلیل داده‌ها و بهینه‌سازی

طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (ورژن ۱۱) از طریق روش سطح پاسخ (Response Surface Method) انجام شد. برای بهینه‌سازی تاثیر عصاره الکلی جلیک *Nannochloropsis sp.* زمان و دما بر شاخص‌های کیفی فیله میگوی سفید سرتیز با توجه به طراحی فاکتوریل در آنالیز سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی با ۳ سطح و ۵ تکرار در نظر گرفته شد (+۱، ۰، -۱). بعد از بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون آماری دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رنگ

شاخص‌های رنگ شامل شفافیت (L^*) (سیاه = ۰ و سفید = ۱۰۰)، قرمز (a^*) (سبز = -۶۰ و قرمز = +۶۰) و زرد (b^*) (آبی = -۶۰ و زرد = +۶۰) با استفاده از دستگاه رنگ‌سنجی (Lovibond CAM-System 500، انگلستان) تعیین شد.

اندازه‌گیری کاهش وزن فیله

میزان کاهش وزن فیله (WL) برابر با وزن از دست رفته در روزهای مورد بررسی به صورت نسبتی بین وزن اولیه و نهایی و براساس رابطه ۵ محاسبه شد (Charoenphun et al., 2023).

نتایج

در جدول ۱، با توجه به متغیرهای تعریف شده، ۱۵ تیمار تعیین شد. متغیرهای مورد بررسی شامل دما (۱۰-، ۳- و ۴ درجه سانتی‌گراد)، غلظت عصاره (۰، ۱/۵ و ۳ درصد) و مدت زمان نگهداری (۰، ۷ و ۱۵) بود. نتایج آزمایش متغیرهای مورد بررسی در تیمارهای طراحی شده برای ارزیابی اثر عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis* sp. بر شاخص‌های کیفی ماندگاری میگوی سفید سرتیز در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: تیمارهای طراحی شده با روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی استفاده از عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis* sp. حاوی کیتوزان در ماندگاری فیله میگوی سفید سرتیز

تیمار	روز	دما (درجه سانتی‌گراد)	عصاره (درصد)
۱	۰	-۱۰	۰
۲	۰	-۱۰	۳
۳	۰	-۳	۱/۵
۴	۰	۴	۰
۵	۰	۴	۳
۶	۷	-۱۰	۱/۵
۷	۷	-۳	۰
۸	۷	-۳	۱/۵
۹	۷	-۳	۳
۱۰	۷	۴	۱/۵
۱۱	۱۵	-۱۰	۰
۱۲	۱۵	-۱۰	۳
۱۳	۱۵	-۳	۱/۵
۱۴	۱۵	۴	۰
۱۵	۱۵	۴	۳

جدول ۲: اثر عصاره الکلی جلبک *Nannochloropsis sp.* بر شاخص‌های کیفی ماندگاری فیله میگوی سفید سرتیز پوشش داده شده با کیتوزان (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمار	TBA (mgMDA/kg)	TVB-N (mgN/100g)	PV (mEq/kg)	FFA (%OA)	TVC (Log CFU/g)	چربی (g/kg)	بازده (%)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
۱	۰/۵۰±	۷/۲۸±	۰/۶۹±	۰/۴۸±	۱/۹۳±	۱۲/۵۸±	۹۶/۱۵±	۶۰/۲۵±	۱/۷۲±	۵/۵۶±
	۰/۰۳ ^d	۰/۱۹ ^d	۰/۰۳ ^c	۰/۰۱ ^f	۰/۱۲ ^c	۲/۶۴ ^a	۴/۵۵ ^a	۳/۲۸ ^a	۰/۰۹ ^b	۰/۱۶ ^a
۲	۰/۴۳±	۷/۵۰±	۰/۵۱±	۰/۵۲±	۱/۱۰±	۱۲/۸۹±	۹۶/۰۷±	۶۰/۷۵±	۱/۹۸±	۵/۷۳±
	۰/۰۲ ^c	۰/۵۶ ^d	۰/۰۲ ^c	۰/۰۲ ^f	۰/۲۰ ^c	۱/۱۵ ^a	۳/۶۹ ^a	۳/۱۹ ^a	۰/۰۴ ^b	۰/۴۳ ^a
۳	۰/۶۱±	۷/۴۶±	۰/۶۲±	۰/۴۸±	۱/۴۷±	۱۲/۱۹±	۹۴/۵۴±	۶۰/۴۶±	۱/۶۶±	۴/۶۵±
	۰/۰۱ ^d	۰/۳۳ ^d	۰/۰۳ ^c	۰/۰۳ ^f	۰/۳۳ ^c	۱/۲۰ ^a	۳/۱۹ ^a	۱/۰۴ ^a	۰/۰۶ ^b	۰/۱۹ ^a
۴	۰/۷۲±	۷/۱۱±	۰/۸۳±	۰/۶۲±	۱/۹۲±	۱۲/۴۶±	۹۵/۲۱±	۶۰/۸۲±	۱/۷۲±	۵/۵۹±
	۰/۰۲ ^d	۰/۹۸ ^d	۰/۰۲ ^c	۰/۰۴ ^f	۰/۴۶ ^c	۱/۳۶ ^a	۳/۲۱ ^a	۲/۰۳ ^a	۰/۰۲ ^b	۰/۸۶ ^a
۵	۰/۵۵±	۸/۳۴±	۰/۷۵±	۰/۴۷±	۱/۴۶±	۱۲/۷۰±	۹۵/۱۴±	۵۹/۱۸±	۱/۷۰±	۵/۶۵±
	۰/۰۱ ^d	۰/۷۴ ^d	۰/۰۴ ^c	۰/۰۲ ^f	۰/۲۵ ^c	۱/۵۶ ^a	۲/۷۸ ^a	۳/۹۱ ^a	۰/۰۲ ^b	۰/۳۵ ^a
۶	۰/۹۹±	۱۶/۱۰±	۲/۱۱±	۱/۰۱±	۴/۴۰±	۱۱/۹۰±	۹۱/۵۵±	۳۲/۱۸±	۲/۳۲±	۲/۶۷±
	۰/۰۳ ^d	۰/۲۵ ^c	۰/۰۳ ^d	۰/۰۳ ^c	۰/۳۱ ^b	۰/۷۹ ^a	۱/۲۳ ^a	۹/۴۰ ^c	۰/۰۱ ^a	۰/۲۲ ^b
۷	۱/۶۹±	۲۴/۲۵±	۳/۲۱±	۲/۹۱±	۵/۶۰±	۷/۲۱±	۸۰/۹۰±	۴۸/۱۱±	۱/۰۲±	۳/۷۰±
	۰/۱۱ ^c	۱/۱۷ ^b	۰/۰۲ ^b	۰/۰۴ ^b	۰/۱۲ ^b	۰/۲۳ ^b	۲/۹۸ ^a	۱/۶۰ ^b	۰/۰۴ ^c	۰/۸۳ ^b
۸	۱/۴۹±	۲۰/۹۸±	۳/۰۲±	۱/۸۸±	۴/۹۸±	۱۰/۰۲±	۹۳/۲۳±	۴۱/۱۰±	۱/۹۸±	۲/۹۱±
	۰/۰۴ ^c	۱/۶۵ ^b	۰/۰۴ ^c	۰/۰۳ ^d	۰/۵۸ ^b	۰/۱۴ ^b	۲/۳۶ ^a	۱/۱۲ ^b	۰/۰۴ ^a	۰/۰۳ ^c
۹	۱/۰۲±	۱۹/۶۱±	۲/۹۱±	۱/۶۹±	۳/۲۲±	۹/۱۰±	۸۹/۳۹±	۴۵/۲۰±	۲/۱۲±	۳/۱۱±
	۰/۰۲ ^d	۱/۴۴ ^b	۰/۰۶ ^c	۰/۰۱ ^d	۰/۶۴ ^b	۰/۳۳ ^b	۱/۴۷ ^a	۲/۶۰ ^b	۰/۰۷ ^a	۰/۱۹ ^c
۱۰	۲/۰۴±	۳۲/۰۱±	۴/۱۱±	۲/۱۶±	۶/۵۵±	۸/۰۳±	۸۴/۳۹±	۵۲/۱۷±	۱/۱۹±	۴/۳۰±
	۰/۰۲ ^b	۱/۷۱ ^b	۰/۰۲ ^b	۰/۰۲ ^c	۰/۱۳ ^a	۰/۷۰ ^b	۱/۰۹ ^a	۲/۱۱ ^b	۰/۰۵ ^c	۰/۴۴ ^a
۱۱	۲/۷۹±	۲۴/۱۶±	۳/۲۹±	۳/۴۴±	۶/۸۶±	۶/۲۳±	۶۲/۱۵±	۲۷/۱۰±	۰/۷۸±	۳/۴۰±
	۰/۰۱ ^b	۱/۴۴ ^b	۰/۰۳ ^b	۰/۰۳ ^b	۰/۱۸ ^a	۰/۲۳ ^c	۰/۶۵ ^b	۱/۳۳ ^c	۰/۰۱ ^d	۰/۷۲ ^b
۱۲	۱/۸۰±	۲۲/۱۸±	۲/۳۱±	۲/۸۸±	۴/۶۰±	۸/۸۶±	۷۲/۸۶±	۱۷/۱۱±	۱/۲۷±	۱/۱۷±
	۰/۰۳ ^c	۱/۷۰ ^b	۰/۰۴ ^c	۰/۰۱ ^b	۰/۶۵ ^b	۰/۱۹ ^b	۲/۱۳ ^b	۰/۰۴ ^d	۰/۰۵ ^c	۰/۶۲ ^d
۱۳	۲/۱۱±	۴۸/۳۶±	۳/۰۵±	۳/۱۶±	۶/۲۳±	۷/۱۰±	۶۹/۱۴±	۲۳/۸۵±	۱/۰۱±	۲/۱۳±
	۰/۰۵ ^b	۲/۲۳ ^a	۰/۰۶ ^b	۰/۰۲ ^b	۰/۱۳ ^a	۰/۱۶ ^b	۰/۶۶ ^b	۰/۸۴ ^c	۰/۰۹ ^d	۰/۱۵ ^c
۱۴	۵/۱۳±	۶۴/۱۴±	۷/۳۲±	۵/۴۰±	۸/۸۱±	۵/۹۰±	۵۴/۱۵±	۳۲/۱۱±	۰/۲۷±	۲/۹۸±
	۰/۱۳ ^a	۱/۸۷ ^a	۰/۰۴ ^a	۰/۰۳ ^a	۰/۱۱ ^a	۰/۲۱ ^c	۳/۴۴ ^c	۰/۶۳ ^c	۰/۰۶ ^d	۰/۰۵ ^c
۱۵	۴/۵۴±	۵۱/۵۲±	۴/۹۲±	۴/۲۸±	۷/۰۸±	۶/۱۱±	۵۷/۱۶±	۲۲/۱۷±	۰/۵۷±	۳/۲۰±
	۰/۰۳ ^a	۳/۱۱ ^a	۰/۰۳ ^b	۰/۰۴ ^a	۰/۰۹ ^a	۰/۱۹ ^c	۱/۷۰ ^c	۱/۶۰ ^c	۰/۰۷ ^d	۰/۰۹ ^b

TBA: اسید تیوباربیئتوریک؛ MDA: مالون دی‌آلدئید؛ TVB-N: بازهای نیتروژنی فرار؛ mgN: میلی‌گرم نیتروژن؛ PV: پراکسید؛ FFA: اسیدهای چرب آزاد؛ OA: اسید اولئیک؛ TVC: باکتری‌های هوازی کل؛ *L**: شفافیت؛ *a**: قرمز؛ *b**: زرد. در هر ستون، حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.05$).

تغییرات TBA موثر بودند ($P < 0/01$ ؛ شکل ۲) که بر این اساس در مدل پیشنهادی به عنوان عوامل موثر ذکر شده‌اند. با توجه به F-Value (۹۱/۵۵) غلظت عصاره در مقایسه با F-Value (۷/۳۵) زمان و F-Value (۷۶/۶۴) دما، غلظت عصاره در تغییرات TBA موثرتر بود. همچنین دما عامل موثرتری در مقایسه با زمان بود. شکل ۲ نشان از کاهش این شاخص با کاهش زمان و دما داشت ($P < 0/05$).

طبق نتایج آزمون تحلیل واریانس، مدل آزمون به شکل معنی‌داری تولید PV و FFA را در میگوی سفید سرتیز توجیه می‌کند ($P < 0/01$). بر اساس جدول ۳، اثر خطی دما، غلظت عصاره و زمان در سطح اطمینان ۹۹ درصد بر تولید PV و FFA موثر بود. شاخص خطی دما با شیب انحنای کمتری نسبت به زمان، بر میزان این دو شاخص موثر بود ($P < 0/01$ ؛ شکل ۳). با توجه به مقادیر P-value اثر متقابل دما و زمان (۰/۱۲) و غلظت عصاره (۰/۵۳) در سطح ۹۵ درصد بر تولید PV موثر نبود، از این رو در مدل پیشنهادی حذف شد. در مورد زمان هیچ یک از اثرات متقابل غلظت و دما بر روی میزان اسیدهای چرب تاثیر معنی‌داری نداشت.

نتایج آزمون تحلیل واریانس مدل پیشنهادی مربوط به مقادیر TVB-N و TVC در فیله میگو، در جدول ۳ نشان داده شده است. در این آزمون شاخص‌های خطی دما، غلظت عصاره جلبک و زمان در تولید میزان باکتری‌های هوازی کل در میگوی سفید سرتیز معنی‌دار بود ($P < 0/01$). دما اثر توانی و موثرتری در افزایش بار باکتریایی در میگوی سفید در مقایسه با زمان داشت و غلظت عصاره با F-Value برابر با ۱۰۷/۳۲ بیشترین تاثیر را در میزان باکتری داشت. در مورد شاخص TVB-N دما، عصاره و زمان موثر بودند ($P < 0/01$) و با توجه به F-Value، غلظت عصاره (۴۳۳/۸۳) در مقایسه با زمان (۱۰۵/۹۵) و دما (۲۳۱/۲۹) عامل مهم‌تری بر شاخص TVB-N در فیله میگو بود. اما اثر هم‌افزایی زمان و دما (AB) ($P < 0/15$) و زمان و غلظت عصاره مورد استفاده (BC) ($P < 0/64$) بر میزان TVB-N موثر نبود. بر اساس نمودارهای سه بعدی، با افزایش دما و زمان نگهداری میزان TVB-N روند افزایشی را نشان داد (شکل ۱).

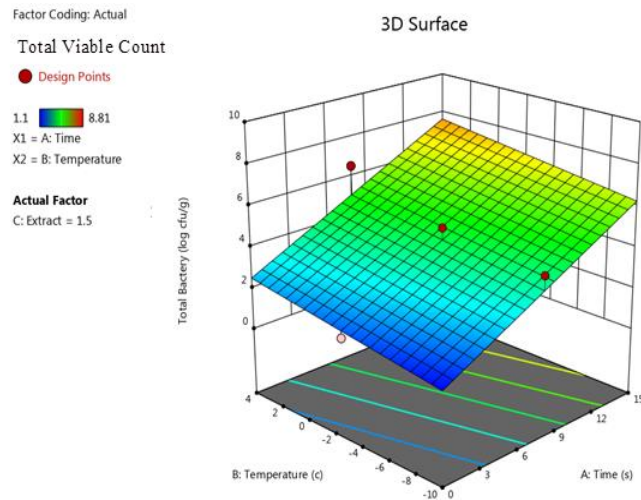
با توجه به مدل پیشنهادی جدول تحلیل واریانس (جدول ۳) شاخص‌های خطی دما، زمان و غلظت عصاره، همچنین اثر متقابل زمان و غلظت عصاره و اثر متقابل دما و غلظت عصاره بر

جدول ۳: نتایج آزمون تحلیل واریانس

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		p-value TVC	p-value FFA	p-value PV	p-value TBA	p-value TVB-N			
مدل	۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
دما-A	۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
زمان-B	۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۷	۰/۰۲۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
غلظت C- عصاره	۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
AB	۱	۰/۰۰۶۵	۰/۰۱۶	۰/۱۲	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵
AC	۱	۰/۰۲۰۶	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴
BC	۱	۰/۵۵۸۵	۰/۱۲	۰/۵۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳
باقیمانده	۶	۷/۲۱	۲/۹۲	۳/۰۲	۳/۲۸	۱۰۲/۱۷	۱۰۲/۱۷	۱۰۲/۱۷	۱۰۲/۱۷
مجموع	۶	۸۴/۲۳	۳۳/۸۳	۵۰/۰۵	۳۴/۶۰	۴۵۳/۷۶	۴۵۳/۷۶	۴۵۳/۷۶	۴۵۳/۷۶

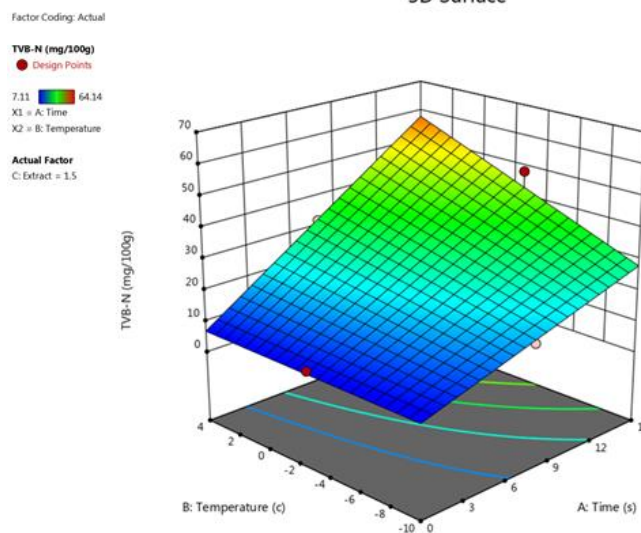
منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		p-value میزان چربی	p-value بازده وزن	p-value b*	p-value a*	p-value L*			
مدل	۲	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۷	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
دما-A	۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
زمان-B	۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۳۶	۰/۰۳	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۹
غلظت C- عصاره	۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
AB	۱	۰/۰۰۰۶	۰/۲۷۴	۰/۵۰۲۱	۰/۳۲۵	۰/۱۷۸۸	۰/۱۷۸۸	۰/۱۷۸۸	۰/۱۷۸۸
AC	۱	۰/۰۰۰۴	۰/۹۰	۰/۰۶۹۸	۰/۴۰۴۱	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۱۳
BC	۱	۰/۸۵	۰/۸۱	۰/۳۳۶۹	۰/۰۸	۰/۵۲۱۰	۰/۵۲۱۰	۰/۵۲۱۰	۰/۵۲۱۰
باقیمانده	۶	۱۰/۲۹	۳۱۸/۴۷	۳/۱۷	۱/۳۷	۲۲۷/۹۶	۲۲۷/۹۶	۲۲۷/۹۶	۲۲۷/۹۶
مجموع	۶	۱۱۵/۷۷	۳۲۱۶/۷۷	۲۷/۸۷	۵/۱۰	۳۵۹۴/۰۵	۳۵۹۴/۰۵	۳۵۹۴/۰۵	۳۵۹۴/۰۵

الف



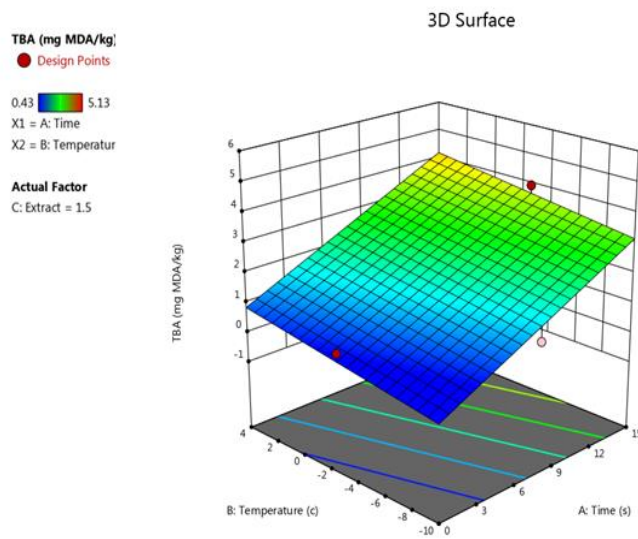
$$\text{TVC} = 2.88 + 0.34A + 0.09B - 0.51C - 1.13AC$$

ب

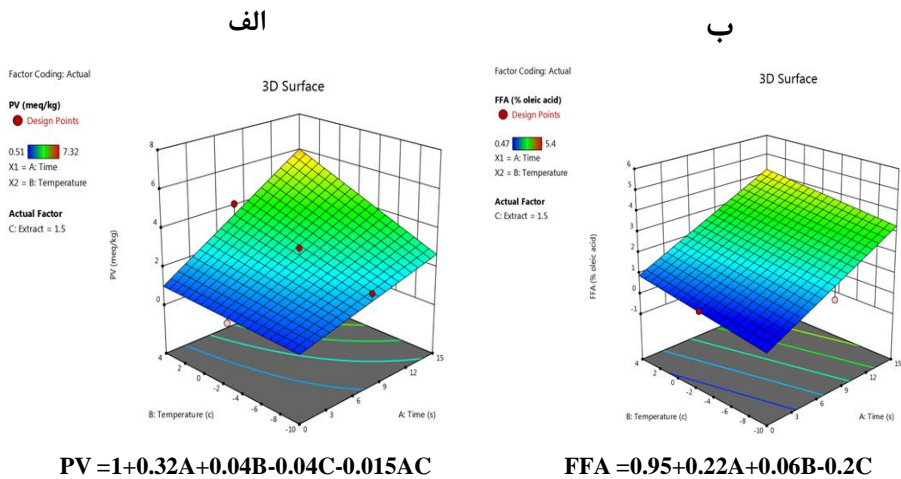


$$\text{TVB-N} = 7 + 2.53A - 0.06B - 0.23C + 0.066AC$$

شکل ۱: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی غلظت عصاره، دما و زمان بر فیله میگوی سفید سرتیز. الف) تغییرات مقدار TVC. ب) تغییرات مقدار TVB-N.



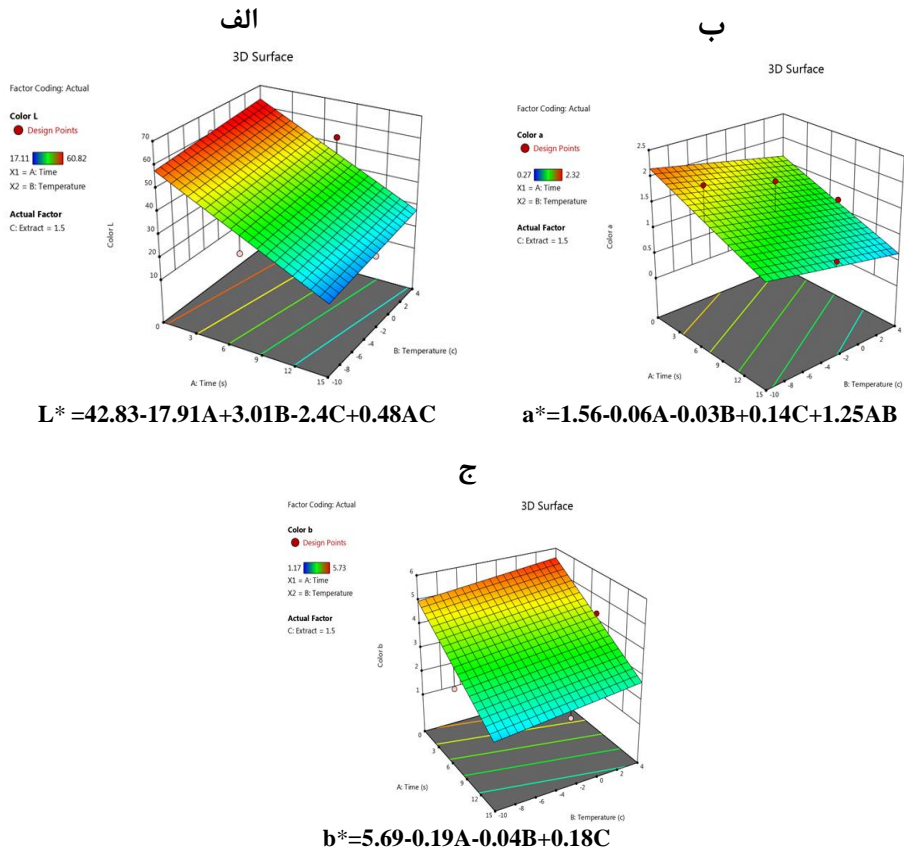
شکل ۲: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی غلظت عصاره، دما و زمان بر تغییرات TBA فیله میگوی سفید سر تیز



شکل ۳: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی غلظت عصاره، دما و زمان بر فیله میگوی سفید سر تیز. الف) تغییرات مقدار PV، ب) تغییرات مقدار FFA.

قرار داشت. اما در مورد شاخص‌های رنگ a^* و b^* با توجه به شیب خط کاهش دما، زمان و افزایش غلظت عصاره شاخص‌های a^* و b^* افزایش نشان دادند. با توجه به F -Value، غلظت عصاره بالاترین تاثیر را بر میزان a^* میگو داشت.

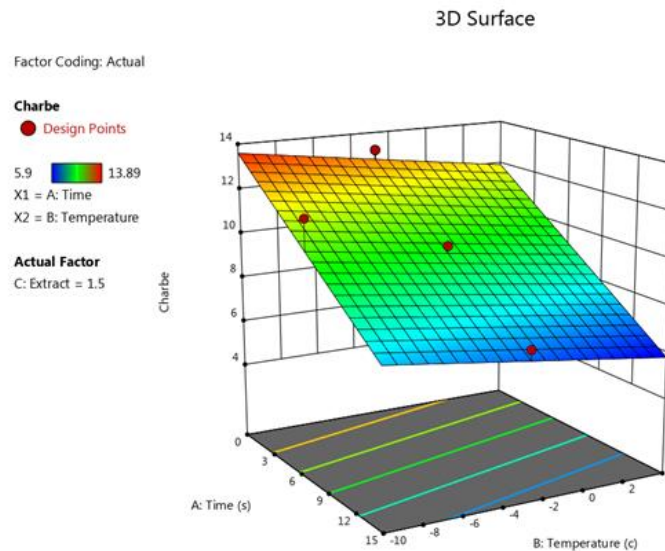
با توجه به میزان F -Value، غلظت عصاره جلبک *Nannochloropsis sp.* در مقایسه با دما و زمان عامل موثرتری بر میزان شاخص‌های رنگ (L^* ، a^* و b^*) بود ($P < 0.01$ ؛ شکل ۴). با توجه به شکل ۴، در دماهای بالاتر و غلظت بیشتر عصاره، میزان L^* در کمترین مقدار خود



شکل ۴: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی بر تغییرات شاخص‌های رنگ میگو سفید سر تیز. (الف) L^* (ب) a^* (ج) b^*

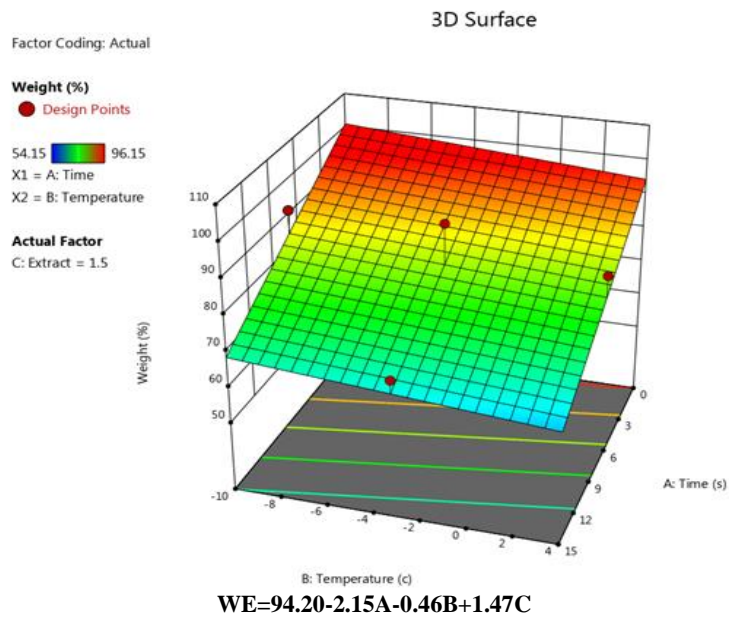
نتایج آزمون تحلیل واریانس مدل پیشنهادی مربوط به مقادیر بازده وزن میگوی سفید سرتیز، در شکل ۶ نشان داده شده است. شاخص‌های خطی دما، زمان و غلظت عصاره در سطح ۹۹ درصد ($P < 0.01$) بر روی بازده وزن میگو موثر بودند و با توجه به *F-Value*، غلظت عصاره (۱۱۱/۳۸) در مقایسه با زمان (۵۵/۰۳) و دما (۷۳/۸۴) عامل مهم‌تری بر روی بازده وزن میگو بود و با کاهش دما و زمان نگهداری، بازده وزن میگو روند افزایشی را نشان داد (شکل ۶).

با توجه به مدل پیشنهادی جدول تحلیل واریانس (جدول ۳) شاخص‌های خطی دما، غلظت عصاره و زمان، همچنین اثر متقابل دما و زمان و اثر متقابل دما و غلظت عصاره بر تغییرات میزان چربی فیله میگو موثر بودند ($P < 0.01$) که بر این اساس در مدل پیشنهادی به عنوان عوامل موثر ذکر شده‌اند. با توجه به مقادیر *F-Value* (۳۱۹/۴۵) غلظت عصاره در مقایسه با *F-Value* (۵۶/۹۶) زمان و *F-Value* (۸۱/۹۷) دما، غلظت عصاره در تغییرات میزان چربی موثرتر بود (شکل ۵).



$$F = 11.78 - 0.40A - 0.11B + 0.41C + 1.14AB - 5.69AC$$

شکل ۵: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی غلظت عصاره، دما و زمان بر تغییرات میزان چربی (F) میگوی سفید سرتیز



شکل ۶: اثر سه بعدی متغیرهای ورودی بر تغییرات بازده وزن (WE) میگوی سفید سرتیز

کیفی میگوی سفید سرتیز از طریق روش سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی مورد بررسی قرار گرفت. در طراحی آزمایش‌ها، هدف شناسایی و تحلیل متغیرهای موثر بر خروجی‌ها با کمترین تعداد آزمایش بود. روش سطح پاسخ روشی ریاضی-آماري برای بهینه‌سازی خروجی‌های آزمایش‌ها است. این روش با کشف میزان بهینه هر یک از متغیرهای طراحی، به بهترین سطح پاسخ دست می‌یابد.

مقادیر R^2 بهینه پیش‌بینی شده و واقعی برای متغیرهای مستقل و پاسخ‌های وابسته بر اساس خروجی جدول ۴، از مقبولیت بالایی برخوردار بودند، به این معنی که مقادیر پیش‌بینی شده به مقادیر واقعی نزدیک بود و اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P < 0.05$).

بحث

در مطالعه حاضر بهینه‌سازی عصاره جلبک *Nannochloropsis* sp. بر روی ویژگی‌های

جدول ۴: مدل‌های برازش داده شده برای شاخص‌های کیفی میگوی سفید سرتیز تحت تاثیر عصاره جلبک *Nannochloropsis* sp.

متغیر	R ²	R ² -adj
بار باکتریایی	۰/۹۱	۰/۸۸
<i>L</i> *	۰/۹۳	۰/۹۱
<i>a</i> *	۰/۹۲	۰/۹۲
<i>b</i> *	۰/۸۷	۰/۸۳
FFA	۰/۹۱	۰/۸۸
TVB-N	۰/۹۷	۰/۹۵
TBA	۰/۹۰	۰/۸۷
PV	۰/۹۳	۰/۸۷
بازده وزن	۰/۸۹	۰/۸۶
چربی	۰/۹۱	۰/۸۸

تحلیل خروجی نرم‌افزار نشان داد که در شاخص‌های شیمیایی و میکروبی سه عامل دما، زمان نگهداری و غلظت عصاره جلبک جز عوامل تاثیرگذار بر روی فعالیت باکتری‌های عامل فساد و کاهش اکسیداسیون فیله میگو بودند و غلظت عصاره و دما در مقابل زمان نگهداری عوامل مهم‌تری بودند.

در مطالعات متعدد وجود مواد فعال زیستی در جلبک‌ها مانند پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، ترپن‌ها، اسید اسکوربیک، آلکالوئیدها و نیز رنگدانه کاروتنوئید به اثبات رسیده است. این ترکیبات به سرعت با انواع اکسیژن فعال مانند آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن که در افزایش مقادیر شاخص‌های TBA، PV، FFA (شاخص‌های وابسته به فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها) موثر هستند واکنش می‌دهند و با کاهش یا تاخیر اکسیداسیون چربی، فساد میگو را به تاخیر می‌اندازند (Kazemi et al., 2023). پلی‌ساکاریدهای موجود در جلبک به دلیل داشتن فعالیت بالای آنتی‌تیروزیناز، سبب کاهش فعالیت اکسیداسیون می‌شوند (Pratoomthai et al., 2018).

نقش حفاظتی پوشش جلبک در برابر اکسیداسیون چربی‌ها ممکن است ناشی از اثر هم‌افزایی بین پوشش جلبک (مانع از نفوذ

کند (Pabast et al., 2018). وجود ترکیبات زیست‌فعال کاروتنوئیدی، پلی‌ساکاریدی و رنگدانه‌ها در ماکرو جلبک سبز *Ulva intestinalis* عامل مهم در مهار رادیکال‌های آزاد در فرآیند اکسیداسیون اولیه و ثانویه در فیله فیله ماهی گزارش شد (Kamali et al., 2023). با توجه به فرمول پیش‌بینی شده با روش سطح پاسخ ($TBA=0.55+0.22A+0.07B-0.23C-0.36AC-1.69BC$) افزایش دما و زمان نگهداری سبب افزایش TBA و افزایش غلظت عصاره سبب کاهش میزان TBA شد.

اسیدهای چرب آزاد نتیجه هیدرولیز گلیسریدها، گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها و تری‌گلیسریدها توسط آنزیم‌های لیپاز و فسفولیپاز هستند که در نهایت منجر به تولید آلدئیدها و کتون‌ها می‌شوند که عامل بو و طعم بد گوشت هستند. از این رو میزان اسیدهای چرب آزاد شاخصی برای اندازه‌گیری فساد میگو است و افزایش آن نشان دهنده فساد هیدرولیتیک چربی است (Arancibia et al., 2015). در مطالعه حاضر، تیمار ۳ درصد عصاره جلبک کمترین میزان اسیدهای چرب آزاد را داشت که دلیل این موضوع می‌تواند وجود ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره جلبک *Nannochloropsis sp.* باشد. این ترکیبات به

اکسیژن) و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در کیتوزان باشد (Asik and Candogan, 2014). حد مجاز TBA ۱۰-۴ میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در کیلوگرم گوشت است (Patsias et al., 2006) که ناشی از واکنش مالون آلدئید با دیگر ترکیبات اکسیداسیون مانند آمین‌ها، نوکلئوتیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، فسفولیپیدها است که در تیمار ۱۴ و ۱۵ از حد مجاز عبور کرد. پوشش کیتوزان می‌تواند اکسیداسیون لیپید را به دلیل وجود گروه‌های آمین با آلدئیدهای فرار مانند مالون دی‌آلدئید که فلوروسفرهای پایدار را تشکیل می‌دهند، مهار کند. از طرف دیگر، پوشش کیتوزان می‌تواند به عنوان یک مانع بین گوشت و محیط اطراف آن عمل کند و باعث کاهش انتشار اکسیژن به سطح گوشت و در نتیجه اکسیداسیون لیپیدها شود (Pratoomthai et al., 2018).

در مطالعه‌ای، میزان TBA گوشت بره محتوی اسانس *Satureja khuzestanica* و پوشش کیتوزان طی ۲۰ روز نگهداری در دمای یخچال با اختلاف معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر بود. کیتوزان می‌تواند از مواد زیست‌فعال موجود در عصاره و اسانس‌های گیاهی در برابر تخریب و تبخیر در طول نگهداری محافظت

با توجه به حد مجاز پراکسید ۵ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم گوشت (Maghami et al., 2019) از بین تیمارها، فقط تیمار چهاردهم (روز پانزدهم، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۰ درصد عصاره) خارج از محدوده مجاز بود.

بازهای نیتروژنی فرار مجموعه‌ای از ترکیبات شامل تری‌متیل‌آمین، دی‌متیل‌آمین، آمونیاک و بازهای نیتروژنی هستند که توسط باکتری‌های مولد فساد تولید می‌شوند و بوی نامطبوعی دارند. از این رو افزایش میزان باکتری در طول دوره سبب افزایش TVB-N می‌شود (Amin, 2012). حد مجاز TVB-N در غذاهای دریایی ۳۵-۳۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم گوشت است (Alparslan and Baygar, 2017) که در تیمارهای ۱۰، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ از حد مجاز برای مصرف انسان گذشت. مطالعات نشان داده‌اند که پوشش کیتوزان نقش مهمی در کاهش این ترکیبات دارد که از طریق کاهش میکروارگانیزم‌ها و فعالیت آنزیم‌ها اتفاق می‌افتد (Maghami et al., 2019). این مطالعه رابطه مستقیمی را بین میزان TVB-N و رشد میکروارگانیزم‌ها نشان داد. در مطالعات دیگری نیز نشان داده شد که استفاده از عصاره جلبک توانست سبب کاهش ترکیبات TVB-N شد (Rukunudin et al., 1998; Pabast et al.,

همراه کیتوزان به عنوان سدی در برابر تبخیر آب و کاهش میزان اسیدیته هیدرولیتیک هستند (Jannat-Alipour et al., 2019). چنین نتیجه‌ای در بررسی تاثیر عصاره جلبک قهوه‌ای بر ماندگاری ناگت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) نیز گزارش شده است (Asadi Farsani et al., 2018). پراکسید، بیان‌کننده میزان محصولات اولیه اکسیداسیون (هیدروپراکسیدها) است. در مراحل اولیه اکسیداسیون به دلیل اتصال اکسیژن به پیوند دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع، پراکسیدها تشکیل می‌شوند. مکانیسم کاهش ترکیبات اکسیداسیون به بخش محلول در چربی عصاره و وجود ترکیبات فنلی به بخش محلول در آب عصاره مرتبط است. پلی‌فنول‌ها توانایی به دام انداختن رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های پروکسی (واکنش دهنده‌های زنجیره میانی اکسیداسیون) را دارند که این عمل سبب توقف یا کاهش تولید ترکیبات اولیه و در نتیجه ترکیبات ثانویه اکسیداسیون می‌شود (Kamali et al., 2023). در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت عصاره، میزان PV کاهش پیدا کرد. همچنین کاهش دما و زمان نگهداری نیز در کاهش اکسیداسیون موثر بود ($PV=1+0.32A+0.04B-0.04C-0.015AC$).

است (Kim et al., 2018). گزارش شد که رنگ فیله آبزیان به ساختار فیزیکی ماهیچه، وجود رنگدانه‌ها بر پایه آهن و مقدار آب غیرمتصل وابسته است که بر روی روشنایی ظاهری فیله تاثیر می‌گذارد (Mancini and Hunt, 2005). در مطالعه حاضر، عامل زمان بر شاخص L یا روشنایی تاثیر معنی‌داری نداشت ($P < 0.09$) و فقط دما و غلظت عصاره عوامل تاثیرگذار بودند ($P < 0.0001$). به این ترتیب با افزایش دما و غلظت عصاره میزان روشنایی بافت میگوی سفید سرتیز کاهش پیدا کرد. فیلم‌های خوراکی مانند پوشش کیتوزان سبب تیرگی فیله می‌شوند. همچنین فعالیت‌های اکسیداسیون و میکروبی بافت میگو سبب بروز واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌شود و نتیجه آن کاهش و تخریب پروتئین میوفیبریل و بروز رنگ سبز و یا قهوه‌ای است که در مطالعه Miraglia و همکاران (۲۰۲۱) نیز دیده شد. این موضوع در افزایش شاخص‌های رنگ a^* (قرمزی) $a^* = 1.56 - 0.06A - 0.03B + 0.14C$ (+) و b^* (زردی) $b^* = 5.69 - 0.19A - 0.04B + 0.18C$ نیز قرار داشتند. یکی از ویژگی‌های بارز ریز جلبک *Nannochloropsis* sp. غنی بودن آن از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی است که علاوه بر

ترکیبات فنلی موجود در عصاره جلبک نقش مهمی در کاهش ترکیبات بازهای نیتروژنی فرار دارد (Li et al., 2017). نتایج مربوط به فعالیت باکتری‌ها ($+2.88$ TVB-N و $0.34A + 0.09B - 0.51C - 1.13AC$)، $(7 + 2.53A - 0.06B - 0.23C + 0.066AC)$ کاهش میزان تاثیرگذاری زمان و دما را با افزایش غلظت عصاره جلبکی نشان داد. افزایش میزان بازهای نیتروژنی فرار بستگی به فعالیت باکتری‌های مولد فساد و آنزیم‌های داخل بافت دارد (Balti et al., 2020). زمانی که تعداد باکتری‌ها از 10^7 Log CFU/g عبور کند فساد شروع خواهد شد (Arancibia et al., 2015). در بین میگوهای مورد بررسی، تیمارهای ۱۴ و ۱۵ با ۱۵ روز نگهداری، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و غلظت عصاره به ترتیب ۰ و ۳ درصد از حد مجاز عبور کردند و برای مصرف مناسب نبودند. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان را می‌توان به وجود گروه‌های آمین با بار مثبت کیتوزان نسبت داد که با غشای سلولی با بار منفی، تعامل دارند و منجر به نشت اجزای درون سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (Alishahi and Aider, 2012). اولین عامل کیفی که توسط مصرف‌کنندگان مورد توجه واقع می‌شود رنگ و ظاهر محصول

غلظت عصاره سبب بهبود بازده وزن میگو شد. اما افزایش مدت زمان و دمای نگهداری بازده وزن میگو را کاهش داد. در مطالعه حاضر، غلظت ۳ درصد عصاره جلبک بهترین کارایی را در حفظ بازده محصول داشت، اما در مطالعه Asadi Farsan و همکاران (۲۰۱۸) افزایش سطح عصاره جلبک قهوه‌ای در سطح ۱ درصد مناسب‌تر بود و افزایش بیشتر کاهش بازده محصول را به دنبال داشت. علت این مغایرت را می‌توان به حضور کیتوزان مربوط دانست، زیرا با حفظ ظرفیت نگهداری آب، مانع از تغییرات عمده در میزان بازده محصول می‌شود. هرچه کاهش وزن کمتر باشد، آب بیشتری در محصول باقی می‌ماند. به عبارت دیگر ظرفیت نگهداری آب بیشتر و بافت محصول بهبود می‌یابد. همچنین ممکن است پوشش کیتوزان یا عصاره جلبک یک لایه نیمه‌تراوا در اطراف سطح فیله میگو ایجاد کند و بنابراین از هدررفت رطوبت میگوها در سطح جلوگیری شود (Aaslyng et al., 2003). مقادیر R^2 بهینه‌سازی شده برای متغیرهای مورد آزمایش و پیش‌بینی شده نشان داد که نتایج هر دو به یکدیگر نزدیک بود و اختلاف معنی‌داری نداشتند. به این ترتیب روش سطح پاسخ با کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی به

خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سبب رنگ قرمز بافت و به دنبال آن کاهش سفیدی نیز می‌شود (Paterson et al., 2023). افزایش رنگ قرمز گوشت چرخ شده فیل ماهی را نیز ناشی از حضور کاروتنوئید در ماکروجلبک سبز گزارش کردند (Daneshvar Ghorbani et al., 2018) که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. تغییرات میوگلوبین و اکسیداسیون نیز در تغییر رنگ موثر هستند (Chaijan et al., 2005).

میزان چربی عاملی موثر بر روی روشنایی بافت میگو است (Li et al., 2017). این شاخص علاوه بر دما و زمان، به غلظت عصاره جلبک وابسته است، به طوری که با افزایش غلظت عصاره میزان چربی بافت میگو کاهش و با کاهش زمان و دما میزان آن افزایش یافت. مکانیسم عصاره جلبک در کاهش بازده چربی به مکانیسم آنتی‌اکسیدانی چلاته‌کنندگی فلز آهن برمی‌گردد که باعث کاهش فعل و انفعالات فلز در پراکسیداسیون چربی می‌شود (Paterson et al., 2023).

مقدار بازده محصول شاخص مهمی برای مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان مواد غذایی محسوب می‌شود (Aaslyng et al., 2003). بازده وزن در میگو بالاترین تاثیر را از غلظت عصاره پذیرفت ($F\text{-Value}=111/38$) و افزایش

جلبک *Nannochloropsis* sp. سبب افزایش ماندگاری میگوی سفید سرتیز حاوی کیتوزان شد. همچنین نتایج نشان داد که روش سطح پاسخ با کاهش تعداد آزمایش‌های طراحی شده، هزینه انجام مطالعه را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز که در انجام مراحل مختلف این پژوهش ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

خوبی توانست قادر به پیش‌بینی نتایج آزمایش‌ها باشد.

در مجموع، در این پژوهش بهینه‌سازی غلظت عصاره جلبک *Nannochloropsis* sp.، دما و زمان نگهداری بر ماندگاری میگوی سفید سرتیز (*Metapenaeus affinis*) حاوی کیتوزان مطالعه و با استفاده از روش سطح پاسخ مشخص شد. تیمار ۳ درصد عصاره جلبک همراه با کیتوزان در دمای ۱۰- درجه سانتی‌گراد و ۷ روز نگهداری، بهترین شرایط را برای افزایش ماندگاری میگو فراهم آورد. به این ترتیب کاهش دما و افزایش غلظت عصاره

منابع

- Aaslyng D.M., Bejerholm C., Erthbjerg P., Bertram C.H. and Anderson J.H. 2003.** Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking produce. *Food Quality and Preference*, 14: 277–288. doi: 10.1016/S0950-293(02)00086-1
- Abdolahi-Chelehbari Z., Latifi Y., Mooraki N. and Khoshkhoo Z. 2022.** *Huso huso* fillet preservation with coating contained Spirulina algae extract at $4\pm 1^\circ\text{C}$. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 18 (121): 335–348. doi: 10.52547/fsc.18.121.27
- Albertos I., Martin-Diana A.B., Buron M. and Rico D. 2019.** Development of functional bio-based seaweed (*Himanthalia elongate* and *Palmaria palmata*) edible films for extending the shelf-life of fresh fish burgers. *Food Packaging and Shelf Life*, 22: 1–9 (100382). doi: 10.1016/j.fpsl.2019.100382
- Alishahi A. and Aider M. 2012.** Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. *Food Bioprocess Technology*, 5: 817–830. doi: 10.1007/s11947-011-0664-x
- Alparslan Y. and Baygar T. 2017.** Effect of chitosan film coating combined with orange peel essential oil on the shelf life of deep-water pink shrimp. *Food Bioprocess Technology*, 10: 842–853. doi: 10.1007/s11947-017-1862-y
- Amin R.A. 2012.** Effect of bio preservation as a modern technology on quality aspects and microbial safety of minced beef. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7: 38–49. doi: 10.5829/idosi.gjbb.2012.7.2.64154
- AOAC. 2002.** Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, USA.
- Arancibia M.Y., Lopez-Caballero M.E., Gomez-Guillen M.C. and Montero P. 2015.** Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. *Food Control*, 54: 259–266. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.004
- Asadi Farsani O., Kordjazi M., Shabanpour B., Ojagh S.M. and Jamshidi A. 2018.** The effect of antioxidant properties of brown algae (*Iyengaria stellata*) extract on the shelf-life and sensory properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet nugget during frozen storage (-18°C). *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 7(2): 149–166. doi: 10.22101/JRIF ST.2018.07.17.723
- Asik E. and Candogan K. 2014.** Effects of chitosan coatings incorporated with garlic oil on

- quality characteristics of shrimp. *Food Quality*, 37: 237–246. doi: 10.1111/jfq.12088
- Balti R., Ben M., Mansour N., Zayoud R., Le Balch N., Brodu A., Arhaliass A. and Masse A. 2020.** Active exopolysaccharides based edible coatings enriched with red seaweed (*Gracilaria gracilis*) extract to improve shrimp preservation during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 34: 1–17 (100522). doi: 10.1016/j.fbio.2019.100522
- Carissimi M., Hickmann Flores S. and Rech R. 2018.** Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. *Algal Research*, 32: 201–209. doi: 10.1016/j.algal.2018.04.001
- Carpintero M., Marcet I., Rendueles M. and Diaz M. 2023.** Algae as an additive to improve the functional and mechanical properties of protein and polysaccharide-based films and coatings. A review of recent studies. *Food Packaging and Shelf life*, 38: 1–17 (101128). doi: 10.1016/j.fpsl.2023.101128
- Chaijan M., Benjakul S., Visessanguan W. and Faustman C. 2005.** Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93: 607–617. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.035
- Charoenphun N., Rajasekaran B., Palanisamy S. and Venkatachalam K. 2023.** Impact of longkong pericarp extract on the physicochemical properties of alginate-based edible nanoparticle coatings and quality maintenance of shrimp (*Penaeus monodon*) during Refrigerated Storage. *Foods*, 12: 1–19 (1103). doi: 10.3390/foods12051103
- Daneshvar Ghorbani M., Hosseini Shekarabi S.P. and Hosseini S.E. 2018.** Antimicrobial activity of grass kelp macroalgae (*Ulva intestinalis*) hydroalcoholic extract on cultured beluga (*Huso huso*) minced fish during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 1(6): 27–38.
- Firestone D. 1998.** Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: American Oil Chemist Society Press, USA. 1200P.
- Jannat-Alipour H., Rezaei M., Shabanpour B., Tabarsa M. and Rafipour F. 2019.** Addition of seaweed powder and sulphated polysaccharide on shelf-life extension of functional fish surimi restructured product. *Journal of Food Science and Technology*, 56: 3777–3789. doi: 10.1007/s13197-019-03846-y
- Kamali M., Shabanpour B., Pourashouri P. and Kordjazi M. 2023.** Effect of chitosan-coated *Ulva intestinalis* sulfated poly-

- saccharide nanoliposome on melanosis and quality of Pacific white shrimp during ice storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230: 1–21 (123275). doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123275
- Kazemi M., Jahanbin K., Ojagh S.M. and Abdollahi M. 2023.** Development of antimicrobial gelatin-ulvan-beeswax composite films: Optimization of formulation using mixture design methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231: 1–18 (123384). doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123384
- Kim J.H., Hong W. and Oh S.W. 2018.** Effect of layer-by-layer antimicrobial edible coating of alginate and chitosan with grapefruit seed extract for shelf-life extension of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) stored at 4 °C. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120: 1468–1473. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.160
- Li Y., Yang Z. and Li J. 2017.** Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 97: 291–298. doi: 10.1002/jsfa.7730
- Maghami M., Motalebi A.A. and Anvar S.A.A. 2019.** Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of *Huso huso* fish fillets during the storage. *Food Science and Nutrition*, 7: 3030–3041. doi: 10.1002/fsn3.1161
- Mancini R. and Hunt M. 2005.** Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1): 100–121. doi: 10.1016/j.meatsci.2005.03.003
- Miraglia D., Castrica M., Esposito S., Roila R., Selvaggini R., Urbani S., Taticchi A., Sordini B., Veneziani G. and Servili M. 2021.** Quality evaluation of shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with phenolic extract from olive vegetation water during shelf-life, before and after cooking. *Foods*, 10: 1–15 (2116). doi: 10.3390/foods10092116
- Moazzeni Jola B. and Roomiani L. 2018.** Effect of chitosan extracted from shrimp (*Metopenaus affinis*) on the shelf-life of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fillet in vacuum packaging. *Fisheries*, 70(3): 295–308. doi: 10.22059/jfisheries.2018.247778.1007
- National standard of Iran-Microbiology. 2008.** The practice of using general methods of microbiology experiments (In Persian). Iran Standard and Industrial Research Institute, Iran. Number: 2325.17.
- Pabast M., Shariatifar N., Beikzadeh S. and Jahed G. 2018.** Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated *Satureja* plant essential oil on quality characteristics of lamb meat. *Food*

- Control, 91: 85–192. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.03.047
- Paterson S., Gomez-Cortes P., Fuente M.A. and Hernandez-Ledesma B. 2023.** Bioactivity and digestibility of microalgae *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. as basis of their potential as novel functional foods. *Nutrients*, 15(2): 1–23 (477). doi: 10.3390/nu15020477
- Patsias A., Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N. and Kontominas M.G. 2006.** Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: Microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, 23: 423–429. doi: 10.1016/j.fm.2005.08.004
- Pearson D. 1976.** The Chemical Analysis of Foods. Longman Group Ltd, USA. 575P.
- Pratoomthai B., Songtavisin T., Gangnonngiw W. and Wongprasert K. 2018.** In vitro inhibitory effect of sulfated galactans isolated from red alga *Gracilaria fisheri* on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Applied Phycology*, 30: 2611–2618. doi: 10.1007/s10811-018-1469-3
- Rukunudin H.I., White P.J., Bern C.J. and Bailey T.B. 1998.** A modified method for determining free fatty acids from small soybean sample sizes. *American Oil Chemists Society*, 75: 563–568. doi: 10.1007/s11746-998-0066-z
- Shafiei R. and Mostaghim T. 2022.** Improving shelf life of calf fillet in refrigerated storage using edible coating based on chitosan/natamycin containing *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* microalgae. *Food Measurement and Characterization*. 16: 145–161. doi: 10.1007/s11694-021-01153-9
- Sharifi M. and Roomiani L. 2022.** Oxidation control of tuna (*Thunnus albacares*) liver oil using *Nannochloropsis oculata* extract by a response surface analysis. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 31(2): 63–81.



Optimizing the use of the alcoholic extract of *Nannochloropsis* sp. on the shelf life of *Metapenaeus affinis* fillets

Atena Hoodaji¹, Laleh Roomiani^{2*}

Received: August 2023 DOI:10.22124/japb.2023.25333.1508 Accepted: December 2023

Abstract

After catching, aquatic animals undergo chemical, microbial and sensory changes, which cause them to spoil and reduce the shelf life of the product. The purpose of this study was to use edible chitosan coating containing the alcoholic extract of *Nannochloropsis* sp. on the shelf life of *Metapenaeus affinis*. For optimization, different concentrations of algae extract (0, 1.5 and 3%), temperature (-10, -3 and 4°C) and storage time (0, 7 and 15 days) were considered as independent variables. Based on the output of RSM software, 15 treatments were selected, and variance analysis was used to determine the suitability of the obtained models. Peroxide value (PV), thiobarbituric acid (TBA), total volatile nitrogen bases (TVB-N), free fatty acids (FFA), total aerobic bacteria (TVC) and color changes (L^* , a^* and b^*) were investigated. Based on the results, the amount of microbial, chemical and indicators of shrimp fillet decreased significantly with the increase in the concentration of algae extract compared to the control group ($P < 0.05$). On the seventh and fifteenth days of storage, the ninth and twelfth treatments showed the lowest bacterial load with 3.22 ± 0.64 Log CFU/g and 4.60 ± 0.65 Log CFU/g ($P < 0.05$). The increase in extract concentration and temperature caused the increase of a^* and b^* indices and the decrease of L^* color index. The percentage of fat and weight yield of shrimp fillet increased significantly with the increase in extract concentration ($P < 0.05$). Based on the results of quality indicators, shrimp fillet at -10°C and 3% extract concentration was favorable for human consumption. According to F-value, in all indicators, temperature was more influential compared to time. The proposed formulas for each index were able to predict the quality changes of shrimp fillet.

Key words: *Alga, Shelf Life, Response Surface Method, Shrimp.*

1- M.Sc. in Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

2- Associate Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

*Corresponding Author: laleh.roomiani@iau.ac.ir