



مطالعه فیلم دولایه زیست تخریب پذیر بر پایه پروتئین هیدرولیز شده و تاثیر آن در ماندگاری میگوی

ببری سبز

امیر قلندری^۱، لاله رومیانی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

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

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۹

کلمات کلیدی:

فیلم،

ماندگاری،

شاخص های میکروبی و

شیمیایی،

میگو

DOI: 10.22034/FSCT.22.166.75.

* مسئول مکاتبات:

laleh.roomiani@iau.ac.ir

l.roomiani@yahoo.com

در این مطالعه، هدف ما تولید فیلم دولایه سازگار با محیط زیست با پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از ضایعات هوورمسقطی فراوری شده و عصاره برگ گیاه نارنج به عنوان افزودنی بود. فیلم های دولایه بر پایه کربوکسی متیل سلولز و پروتئین هیدرولیز شده (لایه اول) و بکارگیری عصاره نارنج در سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۴۰ (وزنی / حجمی) (لایه دوم) بودند. ارزیابی تاثیر فیلم ها بر ماندگاری میگوی ببری سبز در طول ۱۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد، از طریق پارامترهای میکروبی، شیمیایی و رنگ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که نمونه های میگو بسته شده با فیلم های دولایه، سبب کاهش تعداد باکتری های هوازی کل، کپک و مخمر و باکتری های سرمادوست به میزان ۳، ۱ و ۳ لوگ نسبت به تیمار شاهد شد. فیلم دولایه حاوی ۴۰ درصد عصاره نارنج توانست نسبت به سایر تیمارها سبب کاهش H -value، K -value و TVB-N و TBARS در میگو شود. هیستامین، کاداورین، اسپرمیدین و اسپرمین با افزایش زمان نگهداری در تیمارها افزایش نشان داد. میزان a^* در نمونه های میگو دارای تفاوت معنی داری بین تیمارها نبود ($P > 0.05$) اما مقادیر b^* و L^* میگو اختلاف معنی دار آماری بین تیمارهای مطالعه نشان داد ($P < 0.05$). نتایج ضرایب همبستگی، تایید کننده و منطبق با نتایج حاصل از آنالیز مؤلفه های اصلی بود. نتایج این مطالعه نشان داد که فیلم های دولایه می تواند جایگزینی برای مواد پلاستیکی شوند.

۱- مقدمه

طبق گزارش خواروبار کشاورزی جهانی (۲۰۲۴)، باقی مانده موادخام بدست آمده از صنعت صید ماهی تا ۷۰ درصد وزن اولیه آن را تشکیل می دهد. بخش عمده موادخام باقی مانده در حال حاضر به آرد یا روغن تبدیل و یا برای تولید خوراک دام استفاده می شود، اما این فرآورده ها و محصولات سودآوری کمی دارند. بنابراین، ابداع راهکارهایی برای استفاده از ضایعات ماهی از طریق فرآوری آنها برای تولید مواد جدید برای مصرف انسان و دام اهمیت دارد [۱]. طبق گزارش سازمان خواروبار و کشاورزی جهانی (۲۰۲۲)، از کل منابع غذایی تولید شده برای مصرف انسان، سالانه در سراسر جهان حدود ۱/۳ بیلیون تن هدر می رود. ترکیب ضایعات غذایی بر اساس نوع و منبع غذا متفاوت است. ضایعات غذا ترجیحاً برای خوراک دام استفاده می شوند، اما می توانند منجر به بیماری های انتقال داده شده از طریق غذا شوند. بنابراین، محصولاتی که از طریق ضایعات مواد غذایی تولید می شوند، با ارزش گذاری درست، می توانند کاربردهای عملی و تجاری داشته باشند [۲]. صنعت فرآوری (بریدن سر، پوسته زدایی، جدا کردن باله ها، خارج کردن امعاء و احشاء، فلس ها، فیله کردن) ماهیان تجاری منجر به تولید ضایعات می شود. کنسرو کردن آبزیان، ۷۰ درصد مواد جامد زائد شامل گوشت تیره، سر، استخوان و پوست را بخود اختصاص می دهد. از طرف دیگر، فرآوری میگو تقریباً ۵۰ درصد ضایعات تولید می کند [۳]. مطالعات نشان داده اند ضایعات آبزیان سرشار از پروتئین ها، اسیدهای چرب غیر اشباع چنگانه، مواد معدنی، ویتامین ها و کاروتنوئیدها هستند که دارای خصوصیات کارکردی هستند [۴ و ۵ و ۶]. اما ضایعات صنعت شیلات می توانند حامل باکتری های بیماری زا باشند که در صورت نبود مدیریت صحیح، برای سلامت انسان و محیط زیست خطرناک هستند [۷]. از طرفی، در حال حاضر نگرانی هایی در مورد آلودگی محیط زیست به دلیل بسته بندی های پلاستیکی وجود دارد. این موضوع منجر به توسعه فیلم ها و بسته بندی های زیست تخریب پذیر شده است. فیلم ها را

می توان از کربوهیدرات ها، پروتئین ها و لیپیدهایی تهیه کرد که زیست تخریب پذیر، غیر سمی و مشتق از منابع تجدید پذیر هستند. فیلم های زیست تخریب پذیر ممکن است به صورت پوشش استفاده یا پیچیده شوند یا روی غذاها اسپری گردند، که به عنوان مانعی در برابر انتقال املاح، بخار و گازها عمل می کنند که کیفیت غذا را بهبود می بخشد [۸].

پروتئین های مواد غذایی مختلف مانند ذرت، شیر، سویا، گندم و آب پنیر برای تهیه فیلم زیست تخریب پذیر استفاده شده است. همچنین به دلیل استفاده اقتصادی از محصولات جانبی و ضایعات فرآوری آبزیان، علاقه به استفاده از پروتئین های میوفیبریلار وجود دارد [۲]. از طرف دیگر عصاره گیاهان به دلیل ایمنی، حفظ و پایداری مواد غذایی در غلظت های کم می توانند در فیلم های خوراکی بکار روند [۹]. عصاره های گیاهی با داشتن مقادیر بالایی از اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آنتوسیانین ها، تانن ها و سایر زیرگروه های پلی فنل، سرشار از آنتی اکسیدان ها هستند [۳ و ۱۰].

کارهای متعددی روی فیلم های مبتنی بر پروتئین های میوفیبریلار ماهی انجام شده است. لیما و همکاران (۲۰۲۴) به بررسی خصوصیات فیلم مبتنی بر پروتئین های میوفیبریلار بدست آمده از پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی تن پرداختند [۱۱]. مطالعه دیگر به بررسی تولید فیلم های خوراکی بر پایه پکتین، ژلاتین و هیدروکسی پروپیل متیل سلولز و ارزیابی کاربرد آنها به عنوان مواد بسته بندی زیست تخریب پذیر برای ماندگاری *Sparus aurata* بود. فیلم های تولید شده توانستند بین ۷-۸ روز ماندگاری فیله ماهیان را نسبت به فیلم شاهد افزایش دهند [۱۲]. لیت و همکاران (۲۰۲۴) از ضایعات ماهی تیلاپای نیل برای تولید فیلم پروتئین میوفیبریلار استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد ۱ درصد پروتئین هیدرولیز شده در تولید فیلم توانست بهترین نتیجه را ارائه دهد [۱۳]. پروتئین بدست آمده از ضایعات میگو برای تولید فیلم زیست تخریب پذیر استفاده گردید. نتایج نشان داد که غلظت های بالاتر پروتئین توانستند بر خصوصیات فیلم تاثیر بگذارند [۱۴]. محصولات جانبی

رسانیده شد. آنزیم پاپائین را با نسبت ۱ درصد به نمونه‌ها اضافه کرده و به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با دور ثابت ۲۰۰ دور بر دقیقه انتقال داده شدند. پس از طی مدت زمان‌های مذکور به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت $7000 \times g$ سانتریفوژ شدند. مایع رویی برای بررسی‌های بعدی جمع‌آوری و در دستگاه خشک‌کن انجمادی در دمای ۶۰- تا ۷۰- قرار داده شد تا به صورت پودر درآید [۱۷].

۲-۲- تهیه فیلم

برای آماده‌سازی فیلم، محلول ۱ درصد کربوکسی‌متیل سلولز (وزن/حجم) با ۱ درصد (wt%) گلیسرول (پلاستی‌سایزر) (همراه با توئین ۸۰ در حلال مناسب که مخلوط ۳۴ میلی‌لیتر اتانول و ۶۶ میلی‌لیتر آب مقطر بود) با هم مخلوط و سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق هم‌زده شدند. ۵ گرم پودر هیدرولیزشده ضایعات ماهی با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد. سپس به محلول حاوی کربوکسی‌متیل سلولز و گلیسرول اضافه گردید. سپس غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ درصد (حجمی/وزنی) عصاره برگ گیاه نارنج (*Citrus aurantium*) (CA) (تهیه شده از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد-دزفول) (مطالعات قبلی نویسنده مسئول نشان دادند که برگ گیاه نارنج خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارد و در این مطالعه انتخاب شد [۱۸ و ۱۹]) به صورت جداگانه به محلول نهایی اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه هم‌زده شدند. گروه کنترل بدون عصاره نارنج بود. سپس ۰/۲ درصد توئین ۸۰ (امولسیفایر) به نمونه‌ها اضافه و با استفاده از دستگاه هم‌زنایزر به مدت ۲۵ دقیقه مخلوط شدند. در مرحله آخر، محلول‌های حاصل به پتری‌دیش‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر ریخته شد تا حالت ژل تشکیل شود و سپس اجازه داده شد تا کاملاً خشک و شکل پلیت را بگیرند [۲۰].

تولیدشده از ضایعات آبزیان با محتوای پروتئین بالا (تقریباً ۱۷ درصد) [۱۵ و ۱۶] فرصت ارزشمندی برای تولید فیلم است که می‌تواند به عملکردهای اصلی بسته‌بندی مواد غذایی که مربوط به محافظت از محصول و یکپارچگی، حفاظت و کنترل بیرونی آن است، کمک کند. از این‌رو هدف از انجام این تحقیق، استخراج پروتئین میوفیبریلار هیدرولیزشده از ضایعات ماهی هوورمسقطی (*Katsuwonus pelamis*) و سپس تولید فیلم بر پایه پروتئین، عصاره برگ نارنج (*Citrus aurantium*) و کاربرد آن در افزایش ماندگاری میگوی ببری‌سبز (*Penaeus semisulcatus*) بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری ضایعات و انجام عمل هیدرولیز

ضایعات ماهی تن هوورمسقطی شامل سر و پوست، از کارخانجات تولید کنسرو ماهی در شهرک صنعتی استان سیستان و بلوچستان- شهرستان چابهار خریداری و سپس در کیسه‌های استریل بسته‌بندی و در جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه ارسال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس تا انجام مراحل آزمایشگاهی، پس از چندین بار شستشو، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. به منظور انجام عمل هیدرولیز از آنزیم پاپائین خریداری شده از شرکت نووزایم، کشور دانمارک، استفاده و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۵۰ گرم از نمونه ضایعات، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت ۲:۱ به آن اضافه و با هم‌زن دیجیتال به مدت ۲ دقیقه هم‌زنیزه و سپس ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. جهت انجام هیدرولیز نمونه‌های منجمد به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا انجمادزدایی صورت گیرد. سپس با نسبت ۱ به ۲ با محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار ($pH=8/5$) رقیق شدند. به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هم‌زنایزر به طور کامل هم‌زن شدند. سپس محلول همگن با استفاده از سود یک نرمال pH محلول را به $pH=8/5$ که بهینه آنزیم پاپائین است،

۲-۳- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری

طیف ATR-FTIR^۱ تمام فیلم‌های بدست آمده با استفاده از دستگاه طیف سنج مدل IFS-48 ساخت کشور آلمان، کمپانی سازنده Bruker، برای نشان دادن گروه‌های عاملی به دست آمد. ۱/۵ میلی گرم پودر فیلم به همراه پودر برمیدپتاسیم به نسبت ۱:۱۰۰ مخلوط و به شکل قرص ۱ میلی متری درآمد. سپس در دستگاه طیف سنج قرار گرفت. درصد نور عبور داده شده در محدوده فرکانس 4000 تا 450 cm^{-1} محاسبه و سپس نمودار حاصل از آن رسم گردید. وضوح دستگاه 0.9 cm^{-1} بود.

۲-۴- آماده سازی نمونه های میگو

میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*)، به عنوان یکی از مهم ترین گونه های بومی و تجاری ایران و با پراکنش وسیع در حوزه خلیج فارس و دریای عمان [۲۱]، از مراکز صید میگو در بوشهر خریداری و در جعبه های یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه فرستاده و تا زمان انجام مطالعه در دمای 20°C درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در شروع آزمایش، میگوها در دمای 4°C درجه سانتی گراد یخ زدایی شده و چندین بار شستشو داده و سپس سر و کاراپاس جدا و روده آنها خارج گردید. سپس میگوها به مدت ۳۵ دقیقه در محلول فیلم های آماده شده غوطه ور شده و ۴ تیمار بدست آمد. تیمار ۱: میگو بدون عصاره نارنج، تیمار ۲: میگوها در فیلم حاوی ۱۰ درصد عصاره نارنج، تیمار ۳: نمونه میگوها در فیلم حاوی ۲۰ درصد عصاره نارنج، تیمار ۴: نمونه میگوها در محلول فیلم ۴۰ درصد عصاره نارنج. پس از آبکشی میگوها به مدت ۳ دقیقه، در دمای 4°C درجه سانتی گراد برای ۱۵ روز قرار گرفتند و آزمایشات کیفی میکروبی، شیمیایی و رنگ در روزهای ۰، ۴، ۷، ۹ و ۱۵ انجام شد.

۲-۵- آزمایشات میکروبی

برای شمارش باکتری های هوازی کل (TVC)^۲ از ISO 4833-1:2013 انجام شد. به این منظور ۵ گرم نمونه میگو از هر تیمار با ۴۵ میلی لیتر آب مقطر به کیسه استریل استومیکر (InterScience, France) منتقل و برای ۱۸۰ ثانیه به صورت هموژن درآمد. سپس نمونه تا رقت 10^{-5} میلی لیتر رقیق شد. ۱ میلی لیتر از هر رقت در پلیت حاوی محیط کشت کانت آگار قرار داده شد. بعد از چند دقیقه همه پلیت ها وارونه و در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت با دمای 30°C درجه سانتی گراد قرار داده شدند. جهت شمارش باکتری های سرمادوست طبق ISO 17410:2019، کشت به صورت سطحی روی محیط کشت پلیت کانت آگار انجام و بعد از نگهداری پلیت ها در دمای 10°C درجه سانتی گراد به مدت ۷ روز تعداد کلنی های موجود روی پلیت شمارش شدند. از نمونه های میگو به منظور انجام آزمون کپک و مخمر در فواصل روزهای مشخص شده، نمونه برداری صورت گرفت. برای تهیه سوسپانسیون اولیه، رقت 10^{-1} (۱۰ گرم نمونه میگو با ۹۰ میلی لیتر) محلول رینگر داخل دستگاه استومیکر به مدت ۲ دقیقه هموژن گردید. سپس از سوسپانسیون حاصله رقت های اعشاری تهیه گردید. در محیط کشت SDA و دمای انکوباسیون 25°C درجه سانتی گراد طبق ISO 21527-1:2008 به مدت ۱۲۰ ساعت انجام شد.

۲-۶- آزمایشات شیمیایی

۲-۶-۱- اندازه گیری K-value و H-value

۲ گرم از نمونه های میگو هر چهار تیمار با ۱۰ میلی لیتر تری-کلرواستیک (۶ درصد) به مدت دو دقیقه هموژنیزه شد. ۴ میلی لیتر هیدروکسیدپتاسیم ۱ مولار به محلول اضافه و با دور $3438 \times \text{g}$ به مدت ۱۲ دقیقه در دمای 4°C درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت یا مایع رویی با فیلتر $0.45 \mu\text{m}$ صاف و سپس برای ورود به ویال های HPLC (Shimadzu, LC-10ATseries، ساخت کشور ژاپن) با ستون COSMOSIL 5C18-OAQ فاز ثابت و بافر فسفات

گرم میگو در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر هموژنیزه و بعد از آن سنجش انجام شد [۲۴].

۲-۶-۴- اندازه گیری TBARS و TVB-N

اندازه گیری اسیدتیوباریتوریک با استفاده از روش رنگ-سنجی انجام شد. ۲۰۰ میلی گرم از نمونه های میگو هر چهار تیمار، به بالن ۲۵ میلی لیتری انتقال داده و با ۱- بوتانول به حجم رسانده شد. ۱۰ میلی لیتر از مخلوط بدست آمده به لوله های دربدار خشک شده وارد و به آنها ۵ میلی لیتر معرف اسیدتیوباریتوریک اضافه گردید. لوله ها در حمام آب گرم با دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شده و سپس در دمای اتاق سرد شدند. توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر (UV-VIS-NIR، مدل UV-3600، ساخت کشور ژاپن) مقدار جذب در ۵۳۰ نانومتر (A_s) در مقابل جذب نمونه شاهد (A_b) قرائت گردید. میزان TBA بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید بر کیلوگرم بافت میگو بر اساس معادله ۱ محاسبه گردید [۲۵]:

$$TBA \text{ (mg MDA/ kg)} = \frac{(A_s - A_b) \times 50}{200}$$

برای اندازه گیری TVB-N ۵ گرم عضله میگوی مربوط به هر تیمار با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و به مدت ۴ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه همگن شد. سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد با $3.438 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت یا مایع رویی با کاغذ واتمن فیلتر و ۵۰ میلی لیتر از آن به لوله تقطیر دستگاه کج لادل خودکار انتقال داده و به آن ۶/۵ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۲۰ درصد وزن/حجم اضافه شد. ماده تقطیر شده در یک فلاسک حاوی ۴۰ میلی لیتر محلول اسیدبوریک منتقل و تیتراسیون بازهای فرار موجود توسط اسیدکلریدریک ۰/۰۱ مولار تا رسیدن به pH=5 انجام شد. نتایج به صورت میلی گرم نیتروژن/۱۰۰ گرم عضله میگو بیان و طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۲۶]:

$$TVB-N \text{ (mg N/ 100 g)} = \frac{(V_s - V_b) \times 0.14 \times 2 \times 100}{m}$$

حجم مصرفی اسیدکلریدریک برای نمونه و شاهد به ترتیب با V_s و V_b نشان داده شد. m وزن نمونه بر حسب گرم است.

در pH=6.7 به عنوان فاز متحرک و متانول به نسبت ۹۵:۵ به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵۴ نانومتر آماده گردید [۲۲]. مقدار K و H با استفاده از معادلات ۲ و ۳ محاسبه گردید:

$$K\text{-value (\%)} = \frac{INO + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + INO + Hx} \times 100$$

$$H\text{-value (\%)} = \frac{Hx}{IMP + INO + Hx} \times 100$$

Hx: هیپوگزانتین، INO: اینوزین، IMP: اینوزین مونوفسفات، AMP: آدنوزین-۵-مونوفسفات، ADP: آدنوزین-۵-دی-فسفات، ATP: آدنوزین تری فسفات

۲-۶-۲- سنجش آمین های بیوژنیک

۲ میلی لیتر از سوپرناتانت تهیه شده در قسمت بالا، با ۱ میلی-لیتر هیدروکسید سدیم ۲ مولار مخلوط گردید. سپس ۱ میلی لیتر کلرید بنزوتیل ۲ درصد اضافه و محلول ورتکس گردید و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد تا استخراج آمین های بیوژنیک تسهیل شود. در مرحله بعد، ۲ میلی لیتر محلول کلرید سدیم اشباع اضافه و بنزیل آمین ها با دی اتیل اتر استخراج شدند. محلول تحت نیتروژن مایع در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تبخیر گردید و مواد باقی مانده در ۵۰۰ میکرو لیتر استونیتریل و آب با نسبت ۹۰:۱۰ مخلوط شد و برای ورود به دستگاه HPLC برای تشخیص آمین های بیوژن کاداورین، هیستامین، اسپرمیدین و اسپرمین آماده گردید. با استفاده از دستگاه (Shimadzu LC-10A,) HPLC دارای ستون C18 (۵ میکرومتر، 4.6×250 میلی متر) و شناساگر فلورسانس تزریق شد. برای فاز متحرک از استونیتریل (Sigma, USA) و آب تقطیر شده (۷۵:۲۵ حجمی/حجمی) استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی متر در دقیقه بود. آمین های بیوژنیک براساس تطابق زمان ماندگاری پیک های نمونه های مجهول با نمونه های استاندارد (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و با توجه به سطح زیر منحنی پیک ها با استفاده از منحنی استاندارد مربوط تعیین شدند [۲۳].

۲-۶-۳- اندازه گیری pH

میزان pH با دستگاه دیجیتال pH سنج (MI150، شرکت میلواکی مارتینی ایتالیا) تعیین گردید، که جهت این کار ۱۰

80

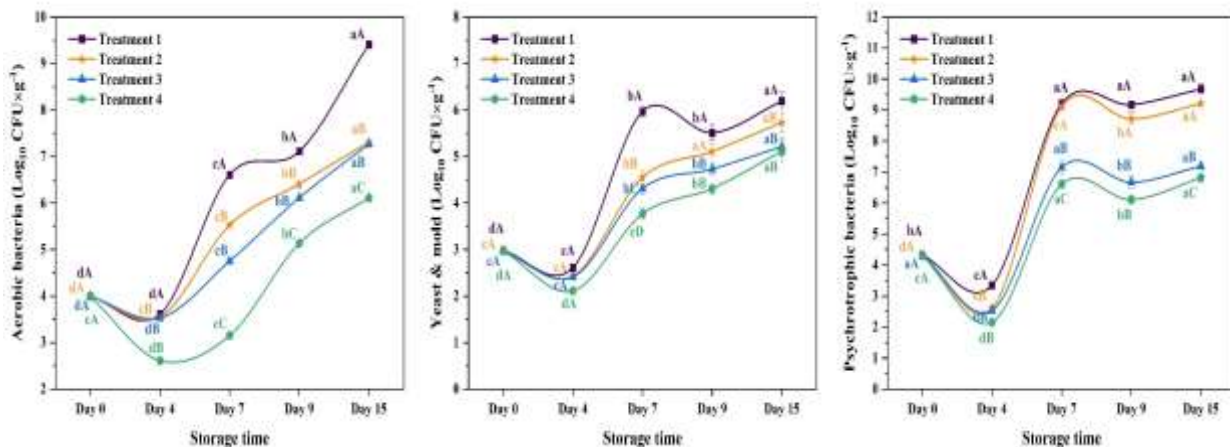


Figure 2- Change in wrapped shrimp quality microbial count during storage. Film 1: control (without CA); Film 2: 10% CA; Film 3: 20% CA; Film 4: 40% CA

عصاره نارنج، در روز پانزدهم، هیچ تفاوت معنی‌دار آماری در مورد میزان کپک و مخمر در نمونه‌های میگو مشاهده نشد ($P > 0.05$). بسته‌بندی فیلم در تیمار چهارم توانست میزان کپک و مخمر نمونه‌های میگو را در مقایسه با گروه کنترل (۴ لوگ) ۳ لوگ کاهش دهد. الگوی رشد باکتری‌های سرمادوست از رفتار رشد TVC پیروی کرد. میزان اولیه باکتری‌های سرمادوست نمونه‌های میگو بسته‌بندی شده با فیلم دولایه بدون عصاره و حاوی عصاره نارنج $\log \text{CFU/g}$ ۴/۳۱ بود. در گروه شاهد میزان باکتری‌های سرمادوست از $\log \text{CFU/g}$ ۹/۶۷ در روز پانزدهم رسید. در روز چهارم، در تمامی نمونه‌های میگو که با فیلم حاوی عصاره بسته‌شده بودند، از نظر میزان باکتری‌های سرمادوست کاهش معنی‌داری دیده شد که با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P < 0.05$). حد تعیین‌شده برای تعداد باکتری‌ها $10^6 - 10^7 \text{ CFU/g}$ است، اما فساد را می‌توان عمدتاً به دلیل بو در اکثر غذاهای با بیش از $\log \text{CFU/g}$ ۶ تشخیص داد [۳۱]. بنابراین، ماندگاری نمونه‌های گروه شاهد ۷ روز بود. نمونه‌های میگو بسته‌شده با فیلم حاوی ۲۰ درصد عصاره نارنج، حاوی میکروارگانیسم‌ها زیر 10^7 CFU/g تا روز پانزدهم نگهداری بودند که باعث افزایش ماندگاری میگو به مدت ۸ روز در مقایسه با تیمار ۱ شد. میزان میکروب‌های نمونه‌های میگو تیمار چهارم، در روز پانزدهم نگهداری از 10^6 CFU/g فراتر رفتند، اما حتی پس از ۱۵ روز، زیر سطح 10^7 CFU/g باقی ماندند. اثر

۲-۳- تغییرات میکروبی

نتایج تغییرات میکروبی نمونه‌های میگو در تیمارهای فیلم-های تهیه‌شده در شکل ۲ نشان داده شده است. در تمامی روزهای نمونه‌برداری میزان TVC در تیمار ۱ یا شاهد بیشترین مقدار را نشان داد، که دارای اختلاف معنی‌دار آماری با سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). میزان اولیه باکتری‌ها $\log \text{CFU/g}$ ۳/۹۹ بود. در طول دوره نگهداری تاثیر فیلم بر رشد باکتری‌ها مشخص گردید، بطوریکه از روز صفر تا پانزدهم در گروه شاهد یا تیمار ۱، میزان TVC در نمونه‌های میگو ۶ لوگ افزایش و در تیمار چهارم ۳ لوگ افزایش داشت. تا قبل از روز چهارم نسبت به روز صفر کاهش معنی‌داری در تیمارها نشان داده شد اما، از روز چهارم تا روز آخر نگهداری میزان باکتری‌ها افزایش نشان داد که کمترین مقدار آن در تیمار ۴ بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار آماری داشت ($P < 0.05$).

در سراسر دوره نگهداری، میزان کپک و مخمر از روز چهارم به بعد در تمامی نمونه‌های میگوهای بسته‌بندی‌شده در فیلم افزایش نشان داد. در روز هفتم نگهداری، بیشترین تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای مورد مطالعه در مقدار کپک و مخمر نشان داده شد ($P < 0.05$). در روز پانزدهم میزان کپک و مخمر در تیمار ۴ به $\log \text{CFU/g}$ ۵/۱۱ و در تیمار کنترل به $\log \text{CFU/g}$ ۶/۱۹ رسید. در فیلم‌های دولایه حاوی

کردند. آنها دریافتند که فیلم مهارکننده خوبی علیه باکتری-های اسیدلاکتیک و *Brochothrix thermosphacta* بود [۳۵].

۳-۳- پارامترهای شیمیایی

استفاده از K-value به عنوان یک شاخص تازگی به دلیل وابستگی قابل توجه آن به نوع غذای ماهیچه‌ای، گونه و فاکتورهای خارجی مانند شرایط دستکاری، فصل و روش کشتن بحث برانگیز بوده است. صرف نظر از نوع غذا و گونه حاوی گوشت، آنزیم‌های درون‌زا ATP را پس از مرگ به AMP، Hx، INO و در نهایت اسیداوریک تجزیه می‌کنند [۳۶]. وضعیت تازگی فرآورده‌های شیلاتی را می‌توان بر اساس K-value به سه دسته طبقه‌بندی کرد: (۱) محصولات با مقادیر $K \leq 20$ درصد بسیار تازه در نظر گرفته می‌شوند. (۲) آنهایی که در محدوده ۲۰ تا ۵۰ درصد هستند به عنوان نیمه-تازه طبقه‌بندی می‌شوند و (۳) محصولات با مقادیر $K \geq 70$ نشان‌دهنده مرحله فساد است [۳۷]. شکل ۳-A-F تغییرات محصولات وابسته به ATP در نمونه‌های میگوهای بسته‌شده در فیلم‌های دولایه بدون عصاره و حاوی درصد‌های مختلف عصاره را نشان می‌دهد. غلظت اولیه ATP در نمونه‌های میگو $0.99 \mu\text{mol/g}$ بود.

بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها در میگوها تا روز چهارم مطالعه، ممکن است به دلیل وجود پروتئین هیدرولیزشده در فیلم‌ها باشد، زیرا چنین فیلم‌هایی خاصیت ممانعت انتشار اکسیژن را افزایش می‌دهند و بنابراین، با تشکیل یک بیوفilm پروتئینی در اطراف نمونه‌های میگو، از تکثیر میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کنند [۳۲]. در مطالعات مختلف نشان داده شد که پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات مختلف آبزیان حاوی دی-پپتید آلانین-تیروزین است که تاثیر آنتی‌اکسیدانی دارد و دارای وزن مولکولی کمی است [۳۳]. مطالعات نشان دادند که کارن و لیمون بیشترین ترکیبات موجود در برگ گیاه نارنج بودند [۱۸ و ۱۹]. اثر بازدارندگی عصاره برگ نارنج بر میکروارگانیسم‌های میگو ممکن است ناشی از عمل تانن‌های قابل هیدرولیز، آنتوسیانین‌ها و اسیدبنزوئیک باشد. مکانیسم‌هایی که فعالیت ضد میکروبی چنین ترکیباتی را توضیح می‌دهد شامل مهار آنزیم میکروبی خارج سلولی، محرومیت از بسترهای مورد نیاز برای رشد میکروبی یا اقدام مستقیم در مورد متابولیسم میکروبی از طریق مهار مربوط به فسفوریلاسیون اکسیداتیو یا محرومیت آهن است [۳۴]. رمیا و همکاران (۲۰۱۷) از فیلم مبتنی بر کیتوزان حاوی اسانس زنجبیل به عنوان یک عامل ضد میکروبی فعال برای جلوگیری از فساد ماهی استفاده

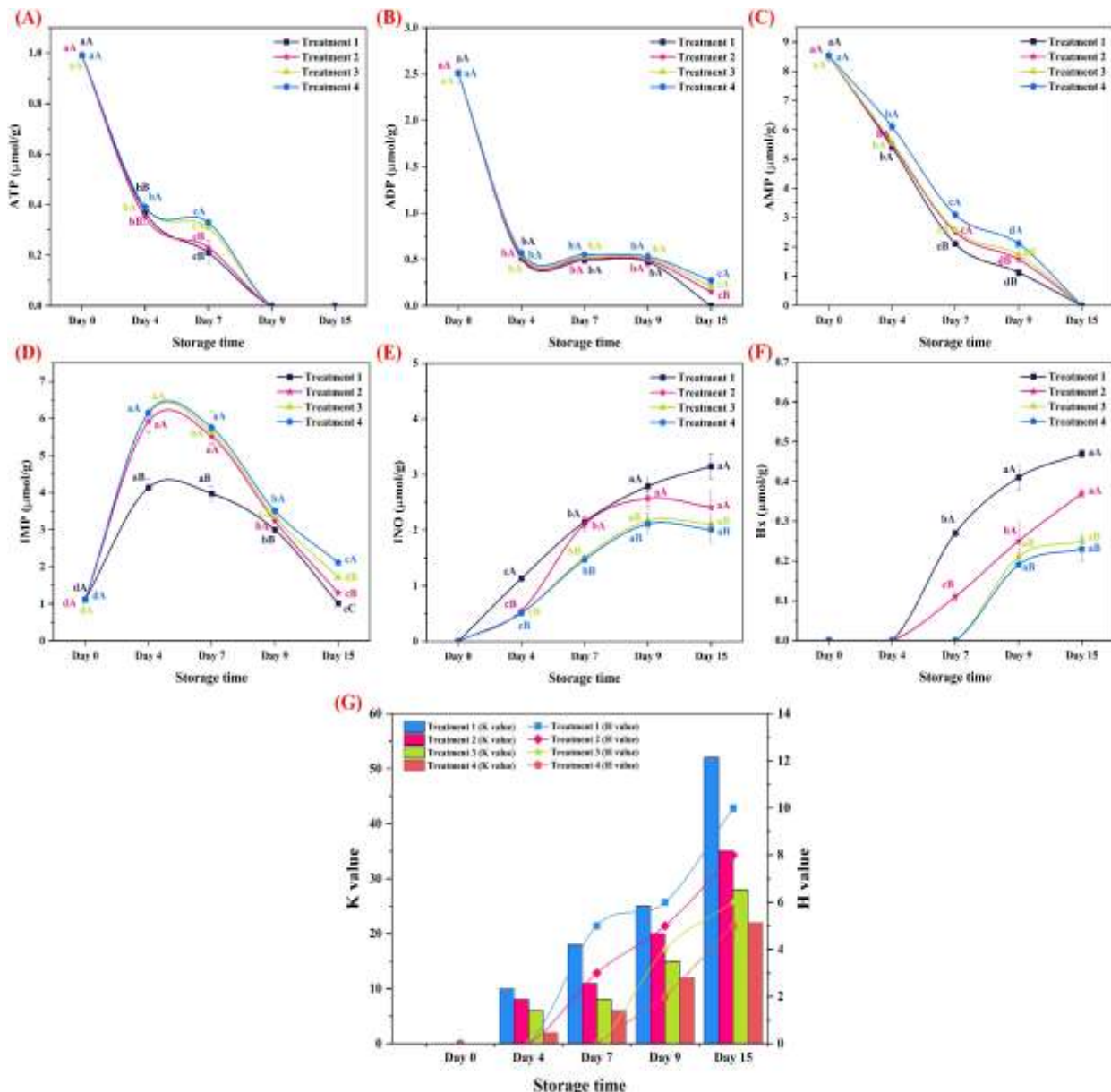


Figure 3- Changes in ATP-related products (A–F), K-value, and H-value of shrimp samples over the storage period. Different letters within each parameter represent statistically significant differences ($p < 0.05$).

میزان INO افزایش پیدا کرد و در تیمار شاهد بیشترین مقدار

آن $3/15 \mu\text{mol/g}$ مشاهده گردید. در تیمار ۲، ۳ و ۴ میزان INO از روز نهم به بعد کاهش نشان داد. لی و همکاران (۲۰۲۲) و سکی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تجزیه ATP به IMP در کمتر از چند ساعت تا دو روز انجام می‌شود و عمدتاً به فعالیت آنزیم‌های اتولیتیک درون‌زا مربوط می‌شود تا فعالیت میکروارگانیسم‌ها، در حالیکه تجزیه IMP توسط باکتری‌ها صورت می‌گیرد [۳۸ و ۳۹]. در طول زمان نگهداری میزان Hx در تمام تیمارها افزایش یافت. *Shewanella putrefaciens* و *Pseudomonas spp.*

از روز صفر تا چهارم نگهداری، میزان ATP و ADP نمونه‌های میگو کاهش نشان داد (شکل ۳). میزان AMP تا روز هفتم نگهداری با شیب زیادی کاهش و سپس شیب سرعت کم شد. در روز پانزدهم میزان AMP به صفر رسید. غلظت IMP در میگوهای تیمارهای مختلف از روز صفر تا چهارم افزایش و سپس کاهش نشان داد و در روز پانزدهم به صفر رسید. در پایان دوره نگهداری، در تیمار چهارم بیشترین میزان IMP $2/11 \mu\text{mol/g}$ و در تیمار شاهد کمترین مقدار $1/01 \mu\text{mol/g}$ آن مشاهده گردید. با افزایش زمان نگهداری

فیلم های خوراکی در قالب بسته بندی های فعال نشان داده اند که از تشکیل آمین های بیوژنیک، از جمله هیستامین، جلوگیری می کنند. تغییرات آمین های بیوژن کاملاً به ایمنی و کیفیت آبزیان از جمله میگو مربوط است [۴۲ و ۴۳]. هیستامین مهم ترین آمین بیوژن در آبزیان است که در طول زمان نگهداری افزایش یافت (شکل ۴). در روز صفر، میزان اولیه هیستامین ۱۷ میلی گرم بر کیلوگرم بود که در روز پانزدهم در تیمار شاهد و تیمار چهارم به ترتیب به ۷۱/۱۹ و ۵۳/۶۷ میلی گرم بر کیلوگرم رسید. این نتیجه نشان داد که فیلم های اعمال شده نه تنها از تشکیل هیستامین در نمونه های میگو جلوگیری نکردند، بلکه حتی تشکیل آن را افزایش دادند. با این حال، در هیچ یک از نمونه های میگو، میزان آن از ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم که محدوده خطر هیستامین است [۴۴]، تجاوز نکرد. تولید هیستامین به تعداد باکتری هایی نسبت داده می شود که قادر به سنتز هیستیدین دکربوکسیلازها باشند. تشکیل هیستامین معمولاً به دلیل انتروباکتریاسه است [۴۵].

توانند اینوزین نوکلئوسیداز تولید کنند که INO را به Hx تبدیل می کند [۴۰]. شکل G نشان می دهد که میزان K نمونه های میگو در تیمارهای ۲، ۳ و ۴ تا پایان روز نگهداری نیمه تازه بود و مقدار K میگوهای تیمار شاهد از ۵۰ درصد فراتر رفت. مطالعه محمدعلی نژاد و همکاران (۲۰۲۴) نشان داد که میزان Hx در نمونه های میگو تا $2/07 \mu\text{mol/g}$ طی ۷ روز نگهداری افزایش پیدا کرد [۴۱]. مقدار H یکی دیگر از پارامترهای کیفی برای ارزیابی فساد غذاهای دریایی است که نشان دهنده تجمع هیپوگزانتین است و هرچه مقدار آن بیشتر باشد نشان دهنده عدم کیفیت محصولات دریایی است [۳۶]. پارامتر H در ابتدای دوره نگهداری، در نمونه میگوهای بسته بندی شده در فیلم نزدیک به صفر بود و در پایان دوره به ۱۰/۵ درصد در تیمار کنترل و ۵/۲ درصد در تیمار چهارم رسید. مقدار H به طور مداوم افزایش یافت و به دنبال آن افزایش ناگهانی در روز آخر در چهار تیمار مشاهده گردید (شکل ۳).

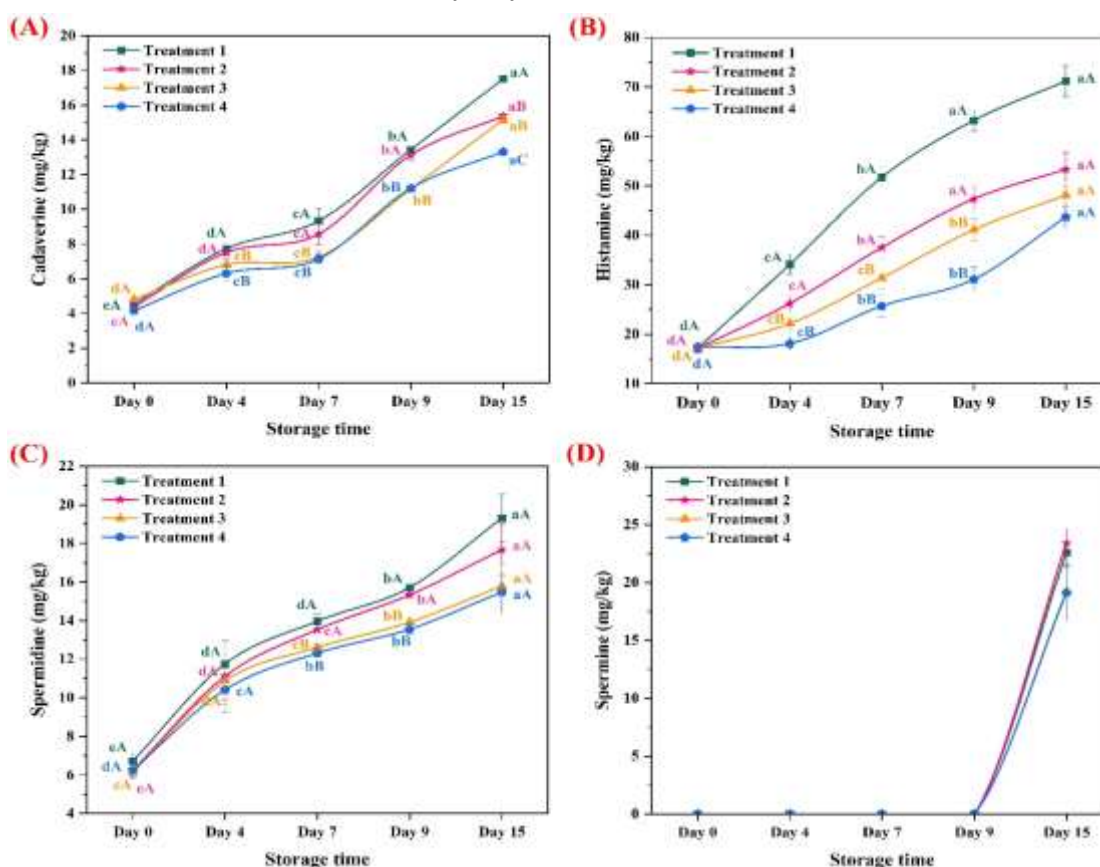


Figure 4- Changes in biogenic amine content (mg/ kg) of shrimp during storage at 4 °C for 15 days.

کاداورین به مزه و طعم نامطلوب محصولات آبزیان مرتبط است [۴۵]. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است میزان کاداورین در تمام دوره نگهداری پایین بود. سطوح اسپرمیدین و اسپرمین در طول زمان نگهداری افزایش داشت، ولی میزان اسپرمین تا روز نهم قابل تشخیص نبود. افزایش اسپرمین در تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد دیده شد. از آنجایی که آمین‌های بیوژنیک در محصولات غذایی عمدتاً از طریق دکربوکسیلاسیون پیش‌سازهای اسیدآمینه مربوطه، از طریق دکربوکسیلازهای باکتریایی یا آنزیم‌های درون‌زا، تولید می‌شوند، در دسترس بودن آمینواسیدهای آزاد برای تشکیل آمین‌های بیوژن ضروری است [۴۲]. با توجه به تحقیق توحیدی‌نسب و رومیانی (۲۰۲۳)، پروتئین هیدرولیزشده، که جزء اصلی فیلم‌های مطالعه حاضر است، منبع خوبی از اسیدهای آمینه آزاد، ۳/۳۹۶ گرم اسیدهای آمینه آزاد در ۱۰۰ گرم پروتئین هیدرولیزشده، است [۴۶]. بخشی از پروتئین هیدرولیزشده به شکل غیرمتصل می‌تواند منبع اسیدهای آمینه آزاد باشد که منجر به افزایش تولید آمین‌های بیوژنیک در نمونه‌های پوشیده شده با فیلم می‌شود. با این وجود، لازم به ذکر است که علیرغم ۱۵ روز نگهداری، سطح تمام آمین‌های بیوژنیک در نمونه‌های تیمارهای فیلم حاوی ۲۰ و ۴۰ درصد عصاره از ۵۰ mg/kg (سطح مجاز میزان هیستامین در فرآورده‌های دریایی) [۴۴] تجاوز نکرد. در مطالعه پونگ-سنگول و همکاران (۲۰۲۲) افزایش آمین‌های بیوژن در میگوهای بسته‌بندی شده در ظروف پلی‌اتیلن، شیشه‌ای، نایلونی و کیوم‌شده و پلی‌پروپیلن در طول دوره نگهداری دیده شد که بیشترین و کمترین مقدار آنها به ترتیب در بسته‌بندی نایلونی و کیوم‌شده و شیشه‌ای اندازه‌گیری گردید [۴۷]. در مطالعه لی و همکاران (۲۰۲۱) هیستامین و تریپتوفان بیشترین آمین‌های بیوژن در میگوهای پرورشی شناخته شدند [۴۸]. نوع و مقدار آمین‌های بیوژن بوجود آمده در طی نگهداری به عوامل زیادی مانند گونه میگو، فلور میکروبی، نوع بسته‌بندی، دما و عوامل دیگر بستگی دارد [۴۱ و ۴۳]. در این مطالعه، میگوهای نگهداری شده در تیمارهای مختلف فیلم، که می‌توانند نسبت به آب و گاز نفوذپذیری متفاوتی

داشته باشند، ممکن است منجر به تشکیل و تجمع متفاوت آمین‌های بیوژن شود. در مطالعه پونگ‌سنگول و همکاران (۲۰۲۲) میزان هیستامین در نمونه‌های میگو بسته‌بندی شده ۲۷/۴۸-۷۹/۱۴ میلی گرم بر کیلوگرم بود [۴۷]. تغییرات pH، TVB-N و TBARS در نمونه‌های میگو بسته‌شده با فیلم دولایه حاوی پروتئین هیدرولیزشده و عصاره نارنج در شکل ۵ نشان داده شده است. TVB-N از شکستن و تجزیه پروتئین‌ها و تبدیل آنها به تری‌متیل‌آمین اکسید، دی-متیل‌آمین، تری‌متیل‌آمین، فرمالدئید و از دامیناسیون نوکلئوتیدهای آدنین بوجود می‌آید. این فرآیند سبب افزایش pH و فعالیت آنزیم‌های درون‌زا و میکروارگانیسم‌ها می‌شود که هدف آنها آمین‌های متیله است [۴۲]. مقدار TVB-N بر اساس نوع غذا، آلودگی میکروبی و شرایط نگهداری متفاوت است [۲۷]. بخیت و همکاران (۲۰۲۱) حدمجاز پذیرش TVB-N برای میگوی خام $mg\ N/100\ g > 12$ ، $20 < mg\ N/100\ g$ خوردن، ۲۵-۲۰ برای خط مرز و $mg\ N/100\ g < 25$ غیرقابل خوردن را تعیین کردند [۴۹]. میزان TVB-N، $mg\ N/100\ g$ ۹/۰۷ در نمونه‌های میگو در روز اول نگهداری بدست آمد. با افزایش زمان نگهداری میزان pH و TVB-N در نمونه‌های میگو بسته‌شده در فیلم افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار این دو شاخص در تیمار شاهد (۷/۴۷، $mg\ N/100\ g$ ۴۳/۲۱) و کمترین در تیمار چهارم (۷/۲۴، $mg\ N/100\ g$ ۲۵/۱۳) اندازه‌گیری گردید. میزان pH در روزهای مختلف نگهداری در یک تیمار دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در این مطالعه، در روز صفر، میزان pH بیشتر از نمونه‌های میگو در مطالعات دیگر بود. این موضوع می‌تواند تا حدی به دلیل محتوی بالای ترکیبات نیتروژن‌دار غیرپروتئینی و اسیدهای آمینه آزاد باشد. علاوه بر این، محتوی کربوهیدرات پایین آنها منجر به تولید محدود اسیدلاکتیک می‌شود و از کاهش قابل‌توجه pH جلوگیری می‌کند [۵۰ و ۵۱]. مقدار اولیه TBARS در نمونه‌های میگو ۰/۵۱-۰/۹۱ میلی گرم بر کیلوگرم بدست آمد (شکل ۵). از روز صفر تا روز چهارم تغییرات این پارامتر کم و در تیمار شاهد و ۲ کاهشی بود و دارای تفاوت معنی‌دار آماری با تیمار ۳ و ۴

داشت ($P < 0.05$). از روز چهارم به بعد میزان TBARS افزایش یافت که در تیمار شاهد یا ۱ با شیب بیشتری بود.

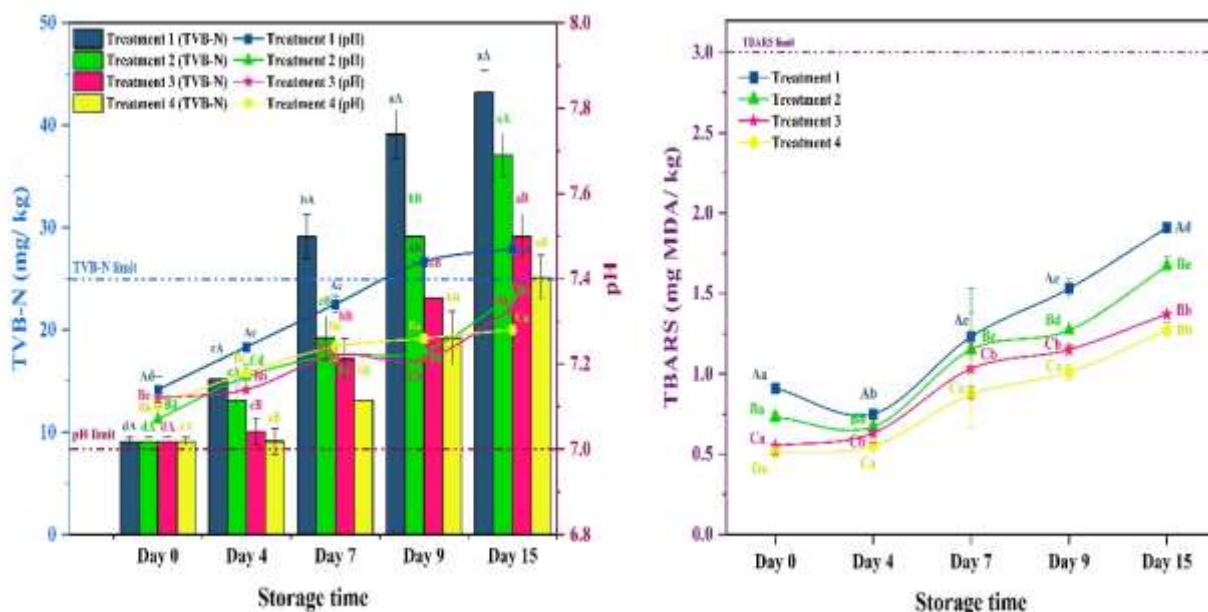


Figure 5- Changes in pH, TVB-N and TBARS level of shrimp during storage at 4 °C for 15 days.

عنوان آنتی اکسیدان، در مقایسه با تیمار شاهد بدون پتید، نتوانست اختلاف معنی داری با تیمار شاهد داشته باشد [۲۵]. این نتایج را می توان با انتشار تاخیری مولکول های فعال از ماتریکس فیلم یا برهمکنش های ایجاد شده بین ماتریکس فیلم و مولکول های فعال در فیلم، توضیح داد.

۳-۴- تغییرات رنگ

در شکل ۶ تغییرات پارامترهای رنگ L^* و b^* و a^* نمونه های میگو بسته شده در چهار تیمار فیلم نشان داده شده است. حفظ ثبات رنگ برای فرآورده های شیلاتی که حساس به pH هستند، بسیار مهم است. این امر برای اطمینان از اینکه نشانگر رنگ خود را در طول مدت ماندگاری محصول حفظ می کند، ضروری است و بازخورد بصری قابل اعتماد و دقیقی را در اختیار مصرف کنندگان قرار می دهد [۲۵]. با توجه به شکل ۶ روندهای متفاوتی در مؤلفه های رنگ نمونه های میگو ۴ تیمار مورد مطالعه دیده شد. میزان سفیدی یا L^* در میگوهای مورد مطالعه تا روز هفتم افزایش و سپس در روز نهم کاهش و دوباره افزایش یافت. بیشترین میزان پارامتر سفیدی در میگوهای بسته شده با فیلم دولایه حاوی عصاره نارنج در روز صفر دیده شد. بین میزان پارامتر a^* در ۴ تیمار مورد

در روز صفر کمترین و در روز پانزدهم بیشترین میزان TBARS در نمونه های میگو بسته شده در فیلم دولایه حاوی عصاره نارنج دیده شد. در تیمار سوم و چهارم هیچ تفاوت معنی دار آماری در نمونه های میگو در روزهای مختلف مطالعه دیده نشد ($P > 0.05$). در مطالعه دی آبرو و همکاران (۲۰۱۱) نتیجه مشابهی بدست آمد که نشان دادند در فیله کوسه آبی در فیلم پلی اتیلن با چگالی کم حاوی آنتی اکسیدان طبیعی، کاهش سرعت اکسیداسیون لیپیدها اتفاق افتاد، با این حال، این اثر در روزهای بعدی نگهداری باقی نماند [۵۲]. پروتئین هیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدهای فعال و غیرفعال هستند [۴۶]. در مطالعه دیگر نشان داده شد که میگوهای بسته بندی شده در پلی اتیلن با وزن کم به همراه نانوذرات SiO_2 سبب کاهش سرعت اکسیداسیون نسبت به تیمار کنترل گردید [۵۳] که با مطالعه حاضر همخوانی داشت. هم چنین نشان دادند اکسیداسیون لیپید در میگو توسط فعالیت های میکروبی کاتالیز می شود. در مطالعه دیگر نتیجه مشابه دیده شد که میزان TBARS فیلم دولایه حاوی ژلاتین هیدرولیز شده از پوست ماهی کپور با اضافه کردن پتید به

بطوریکه در تیمار ۲ تا روز هفتم کاهش، سپس افزایش و دوباره کاهش نشان داد. در تیمار ۳ و ۴ میزان b^* نمونه‌های میگو تا روز چهارم کاهش، سپس افزایش و بعد از آن کاهش پیدا کرد. در تیمار شاهد میزان b^* از روز صفر تا پایان دوره نگهداری کاهش نشان داد.

بررسی تا پایان دوره آزمایش هیچ تفاوت معنی‌داری آماری مشاهده نشد ($P>0/05$). مقدار a^* در نمونه‌های میگو بین ۷/۹۷ تا ۹/۰۴ بود. الگوی تغییرات شاخص b^* در نمونه‌های میگو با سایر پارامترهای رنگ متفاوت بود. میزان b^* در میگوهای بسته‌شده با فیلم دولایه حاوی پروتئین هیدرولیز شده و عصاره نارنج از الگوی یکسانی پیروی نکرد.

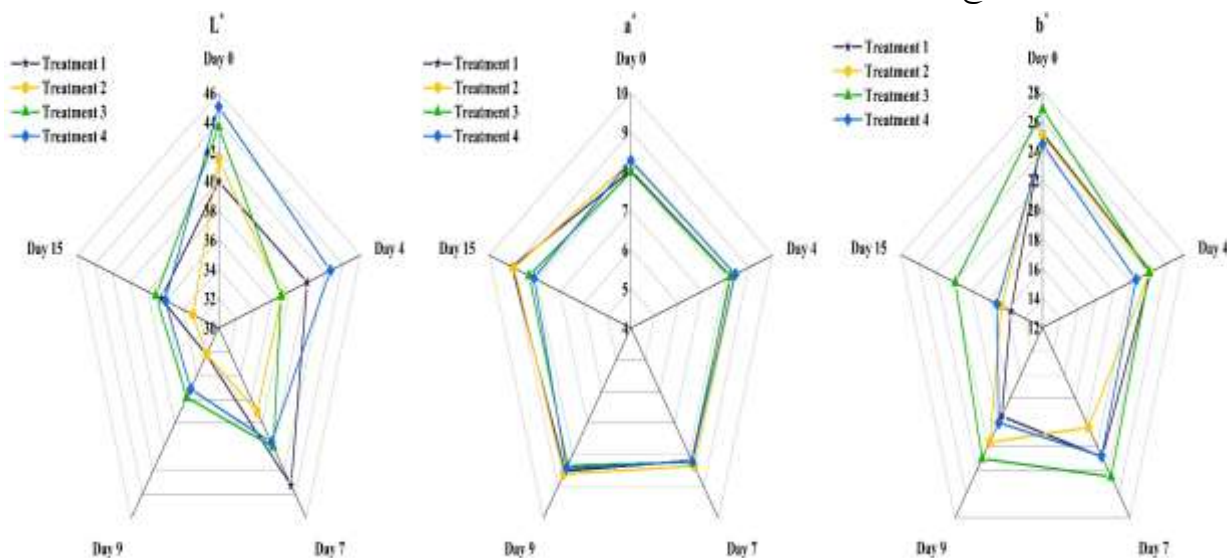


Figure 6- Changes in color parameters of shrimp during storage at 4 °C for 15 days.

چشم تشخیص داد، در حالی که مقادیر ΔE بالای ۱۲ امکان تشخیص تفاوت‌ها توسط اعضای آموزش ندیده را فراهم می‌کند [۴۱].

آنالیز مؤلفه‌های اصلی PCA^3 برای شناسایی پارامترهای میکروبی، شیمیایی و رنگ، درک روابط بین آنها و تشخیص الگوهای تغییرات در طول زمان نگهداری نمونه‌های میگو بسته‌شده در فیلم دولایه حاوی پروتئین هیدرولیز شده و غلظت‌های مختلف عصاره نارنج طی ۱۵ روز نگهداری در دمای یخچال را نشان می‌دهد (شکل ۷). آنالیز چندمتغیره خواص کیفی نمونه‌های میگو، اجازه داد متغیرها به دو مؤلفه-های اصلی کاهش یابند. همانطور که شکل ۷-A مربوط به تیمار ۱ یا شاهد نشان می‌دهد مؤلفه‌های $PC1$ (۸۵/۵۸ درصد) و $PC2$ (۶/۵۸ درصد) مجموعاً ۹۲/۱۶ درصد واریانس را توضیح می‌دهند. تصویر ۷-B در تیمار دوم مؤلفه‌های $PC1$ (۸۸/۶۷ درصد) و $PC2$ (۵/۶۳ درصد)

لین و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند که آستاگزانتین و آنتوسیانین به طور طبیعی به عنوان رنگدانه در میگو یافت و منبع رنگ قرمز در میگو است [۵۴]، بنابراین ایجاد رنگ تیره‌تر میگو می‌تواند دلیلی بر کاهش فاکتور b^* یا L^* در طول زمان نگهداری باشد. در مطالعات دیگری که بر میگو و محصولات آن انجام شد، به این نتیجه رسیدند که زمان نگهداری سبب قهوه‌ای شدن و تیره شدن رنگ میگو می‌شود [۴۸،۵۰]. از طرف دیگر مکانیسم تغییر رنگ در فیلم‌های فعال ممکن است بر این واقعیت استوار باشد که NH_3 فرار با H_2O در فیلم ترکیب شده که منجر به تولید یون NH_4^+ و OH^- می‌شود. یون‌های هیدروکسیل یک محیط قلیایی ایجاد می‌کنند که در آن ساختار آنتوسیانین‌ها به کالکون تبدیل می‌شود که در نتیجه رنگ آن را تغییر می‌دهد [۵۴]. مقدار ΔE بالای ۵ به این معنی است که تغییر رنگ را می‌توان با

و ۴ ارتباط مؤثرتری بین پارامترهای میکروبی، شیمیایی و رنگ نشان دادند که می توانند به تفکیک مطلوبی از تغییرات زمان مربوطه باشند. از طرفی دیگر ارتباط بین مؤلفه ها در روزهای آخر نگهداری بیشتر که نشان از فساد میگو بود. در هر چهار تیمار پارامترهای رنگ عدم همبستگی با سایر پارامترهای میکروبی و شیمیایی داشتند.

۹۴/۳۰ درصد واریانس، تصویر ۷- C مربوط به تیمار سوم مؤلفه های PC1 (۸۱/۱۴ درصد) و PC2 (۱۱/۵۳ درصد) ۹۲/۶۷ درصد واریانس و شکل ۷- D (تیمار چهارم) مؤلفه های PC1 (۸۱/۶۸ درصد) و PC2 (۹/۴۲ درصد) ۹۱/۱۰ درصد واریانس را توضیح می دهند. اگرچه درصد واریانس تیمار دوم یا B از سایر تیمارها بیشتر است، اما تیمار سوم و چهارم توزیع متعادل تری بین مؤلفه ها نشان می دهند. تیمار ۳

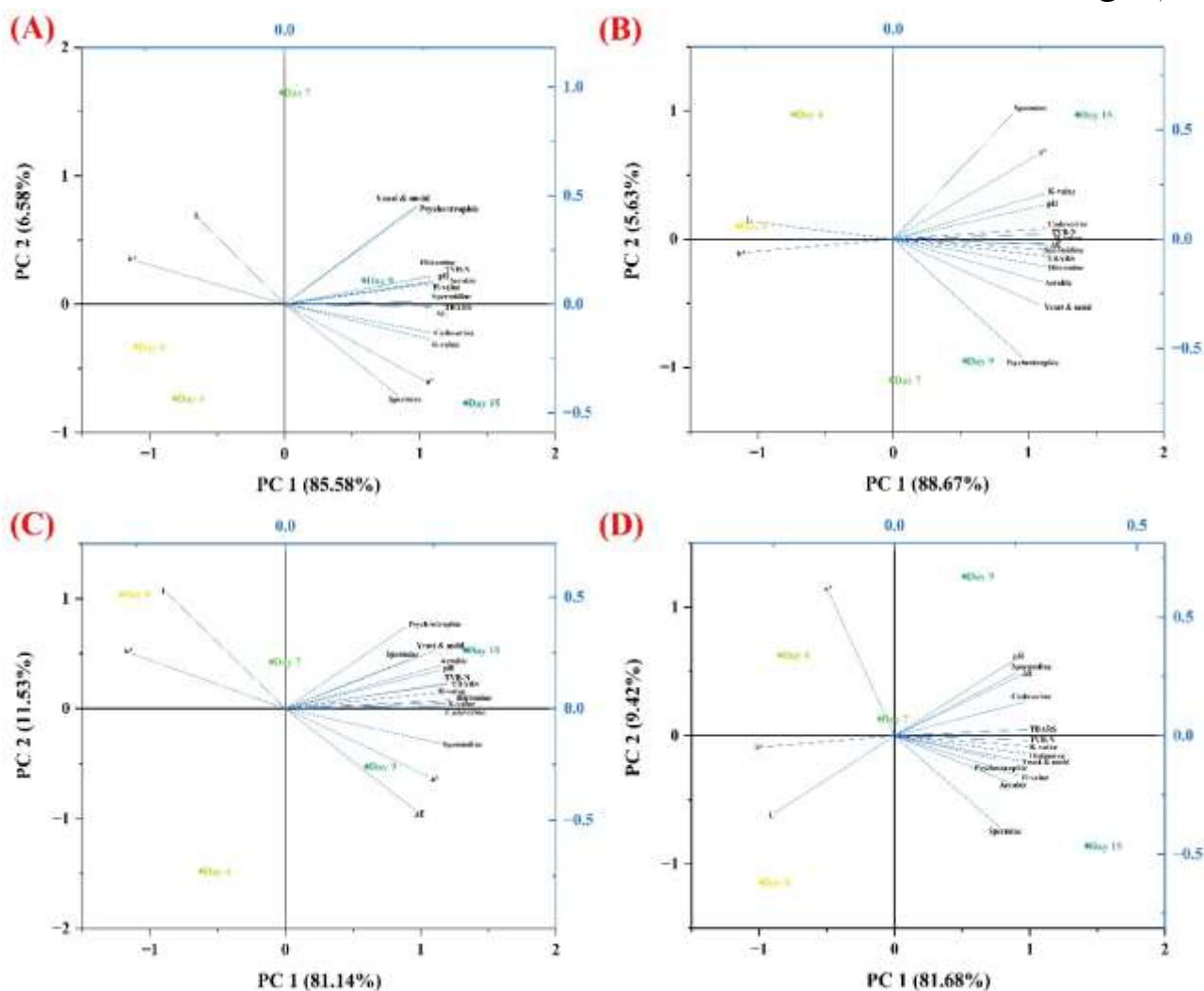


Figure 7- PCA score quality parameters (black color), plots of shrimp stored in different film containers for 15 days (other colors)

۴ تیمار مورد بررسی مؤلفه های رنگ همبستگی مثبتی با مؤلفه دوم داشتند، که در تیمار چهارم کاملاً مشخص بود، در صورتیکه پارامترهای میکروبی و شیمیایی همبستگی مثبت با مؤلفه اول و همبستگی منفی با مؤلفه دوم نشان دادند. در چهار تیمار مورد مطالعه پارامتر L^* و b^* همبستگی بالایی با هم نشان دادند. هم چنین ارتباط بین مخمر و کپک و باکتری های

از روز هفتم نگهداری میزان باکتری های سرمادوست و TVB-N (باتوجه به ارتباط نزدیک این دو شاخص با هم)، افزایش یافت. پس با توجه به شروع فساد از روز هفتم تا پایان دوره نگهداری، شاخص های کیفی ارتباط بیشتری باهم پیدا کردند که این انسجام در تیمار سوم و چهارم بهتر دیده می شود. در

دادند. پارامترهای میکروبی و شیمیایی ضرایب همبستگی مثبتی با هم داشتند. نتایج به دست آمده از ضرایب همبستگی، تاییدکننده نتایج حاصل از آنالیز مؤلفه‌های اصلی بود.

سرمادوست نیز در ۴ تیمار بخوبی نشان داده شد. همانطور که شکل ۸ نشان می‌دهد پارامتر L^* و b^* در چهار تیمار مورد بررسی دارای ضرایب منفی با سایر پارامترهای کیفی بودند. در تیمار چهارم هر سه پارامتر رنگ a^* ، L^* و b^* همبستگی منفی با تمام پارامترهای میکروبی، شیمیایی و رنگ نشان

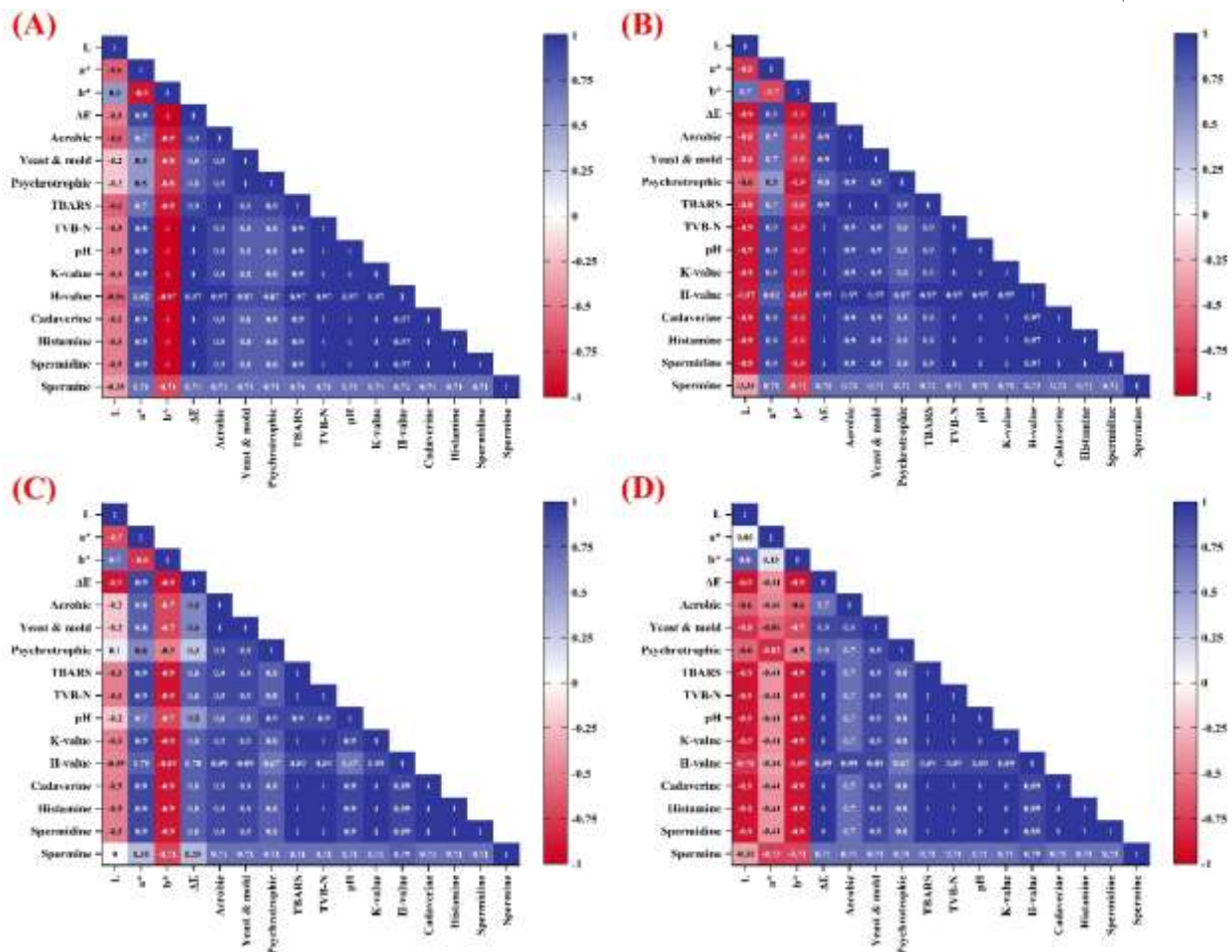


Figure 8- Correlation coefficients between microbial, chemical and color characteristics of shrimp samples in the four studied treatments

ماندگاری میگو را حفظ کند. پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی تن هوورمسطقی و استفاده از عصاره نارنج توانست سبب کاهش میکروارگانیسم‌ها و اکسیداسیون میگو شوند. نتایج به دست آمده ماهیت توسعه‌ای کار را نشان داد. بهبود اثر محافظتی همراه با کاهش میزان آلودگی زیست-محیطی، می‌تواند زمینه را برای تأثیر چنین ترکیبات زیست-فعالی در بسته‌بندی و نگهداری انواع دیگر محصولات غذایی توسعه دهد.

۴- نتیجه‌گیری کلی

میزان متفاوتی از تغییرات در خصوصیات میکروبی، شیمیایی و رنگ نمونه‌های میگو بسته شده در تیمارهای متفاوت فیلم اندازه‌گیری شد. نتایج فیلم دولایه حاوی پروتئین هیدرولیز شده و کربوکسی متیل سلولز (تیمار اول) در مقایسه با سایر تیمارها که حاوی عصاره برگ نارنج در غلظت‌های مختلف بودند، ۸ روز (نسبت به تیمار چهارم) کمتر توانست

۵- منابع

- [1] Mozuraityte, R., Rodríguez-Turienzo, L., Requena, R. and Slizyte, R. 2024. Valorisation of salmon backbones: Extraction of gelatine and its applicability in biodegradable films. *Heliyon*. 10: e34373.
- [2] Mishra, P.K., Gautam, R.K., Kumar, V., Kakatkar, A.S. and Chatterjee, S. 2020. Synthesis of biodegradable films using gamma irradiation from fish waste. *Waste and Biomass Valorization*. 12: 2247-2257.
- [3] Tsang, Y.F., Kumar, V., Samadar, P., Yang, Y., Lee, J., Ok, Y.S., Song, H., Kim, K.H., Kwon, E.E. and Jeon, Y.J. 2019. Production of bioplastic through food waste valorization. *Environment International*. 127: 625-644.
- [4] Gautam, R.K., Kakatkar, A.S. and Karani, M.N. 2016. Development of protein-based biodegradable films from fish processing waste. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5: 878-888.
- [5] Sasidharan, A. and Venugopal, V. 2020. Proteins and co-products from seafood processing discards: Their recovery, functional properties and applications. *Waste and Biomass Valorization*. 11: 5647-5663.
- [6] Romani, V.P., Martins, P.CH., da Rocha, M., Bulhosa, M.C.S., Kessler, F. and Martins, V.G. 2024. UV Radiation and Protein Hydrolysates in Bio-Based Films: Impacts on Properties and Italian Salami Preservation. *Antioxidants*. 13: 1-13.
- [7] Kunjiraman, S., Singh, I.S.B., Sarasan, M. and Puthumana, J. 2024. Immobilized microbial consortia: An eco-friendly and sustainable solution for aquaculture waste management. *The Microbe*. 4: 100100.
- [8] Eranda, D.H.U., Chaijan, M., Panpipat, W., Karnjanapratum, S., Cerqueira, M.A. and Castro-Munoz, R. 2024. Gelatin-chitosan interactions in edible films and coatings doped with plant extracts for biopreservation of fresh tuna fish products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 280: 135661.
- [9] Tahmasebi, M., Moazzezi, S. and Labeiki, G. 2024. Investigating the effect of lamb meat coating with flax seed mucilage containing *Echinophora platyloba* nanoemulsion on its shelf life. *Research in Plant Metabolites*. 2: 83-110.
- [10] Tadayoni, M. and Cheragi, P. 2024. The effect of aqueous and ethanolic extract of acorn (*Quercus persica*) on shelf life of prebiotic and egg-free salad sause. *Research in Plant Metabolites*, 1: 17-32.
- [11] Lima, D.A.S., Grisi, C.V.B., Florentino, G.I.B., Santos, M.M.F., Madruga, M.S., da Silva, F.A.P. 2024. Preparation and characterization of sustainable active packaging based on myofibrillar proteins and protein hydrolysates from the cutting by-product of *Scomberomorus brasiliensis* filleting on the band saw machine. *Food Chemistry*. 460: 140490.
- [12] Athanasopoulou, E., Bigi, F., Maurizzi, E., Karellou, E.I.E., Pappas, C.S., Quartieri, A. and Tsironi, T. 2024. Synthesis and characterization of polysaccharide and protein-based edible films and application as packaging materials for fresh fish fillets. *Scientific Reports*. 14:517
- [13] Leite, L.O., Nogueira, S.M.S., da Silva, A.I.M., do Vale, D.A., Cerqueira, D.A., da Silva, A.L.C., Filho, M.S.M., de Souza, B.W.S. 2024. Development and characterization of myofibrillar protein film obtained from Nile tilapia mechanically separated meat (MSM). *Revista Ciencia Agronomica*. 55: e20238808
- [14] Ali, M.S., Roy, V.Ch., Park, J.S., Haque, A.R., Mok, J.H., Zhang, W. and Chun, B.S. 2024. Protein and polysaccharide recovery from shrimp wastes by natural deep eutectic solvent mediated subcritical water hydrolysis for biodegradable film. *Marine Biotechnology*. 26: 876-890.
- [15] Nelluri, P., Rout, R.K., Tammineni, D.K., Joshi, T.J. and Sivaranjani, S. 2024. Technologies for management of fish waste & value addition. *Food and Humanity*. 2: 100228.
- [16] Fuentes, C., Verdú, S., Grau, R., Barat, J.M. and Fuentes, A. 2024. Impact of raw material and enzyme type on the physico-chemical and functional properties of fish by-products hydrolysates. *Food Science and Technology*. 201:116247.
- [17] Garofalo, S.F., Cavallini, N., Demichelis, F., Savorani, F., Mancini, G., Fino, D. and Tommasi, T. 2023. From tuna viscera to added-value products: A circular approach for fish-waste recovery by green enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*. 137: 155-167.
- [18] Dehghan, H. and Roomiani, L. 2020. Antimicrobial activity of Nano-clay films enriched with *Citrus aurantium* essential oil against indicator food-borne pathogens in fishery products. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 14: 103-111
- [19] Fathimoghadam, F., Shahamirian, M., Roomiani, L. and Tadayoni, M. 2024. Investigating the properties of gelatin-based film activated with *Citrus aurantium* essential oil and their impacts on the quality and shelf life of Jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*). *Iranian Journal of Chemistry Engineering*. 43: 302-313
- [20] Eshaghi, R., Mohsenzadeh, M. and Ayala-Zavala, J.F. 2024. Bio-nanocomposite active packaging films based on carboxymethyl cellulose,

myrrh gum, TiO₂ nanoparticles and dill essential oil for preserving fresh-fish (*Cyprinus carpio*) meat quality. International Journal of Biological Macromolecules. 263:129991

[21] Darvishi, Kh., Kamrani, E., Safaei, M., Daliri, M. and Owfi, F. 2024. Length-weight relationship, length abundance, maturity percentage and growth parameters of green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus* de Haan, 1844) caught by trawl net in the waters of Bushehr province (in Mond and Dayyer-Nakhilo). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics, 12 (4):173-184.

[22] Lerfall, J., Thomassen, G.M.B. and Jakobsen, A.N. 2018. Quality of fresh saithe (*Pollachius virens*) in modified atmosphere packages as affected by the gas composition. Food Packaging and Shelf Life. 18: 147–156

[23] Ozogul, F., Taylor, K., Quantick, P. and Ozogul, Y. 2002. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. International Journal of Food Science and Technology. 37: 515–522.

[24] Ocaño-Higuera, V., Maeda-Martínez, A., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D., Castillo-Y´añez, F., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A.Z. and Plascencia-Jatomea, M. 2011. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. The Scientific World Journal. 125: 49–54.

[25] Jamroz, E., Kulawik, P., Tkaczewska, J., Guzik, P., Zając, M., Juszczak, L., Krzyściak, P. and Turek, K. 2021. The effects of active double-layered furcellaran/gelatin hydrolysate film system with Ala-Tyr peptide on fresh Atlantic mackerel stored at -18 °C. Food Chemistry. 338: 127867.

[26] EU2019/627. 2019. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls. Official Journal of the European Union. L131: 51–100.

[27] Khalafpour, M.J. and Roomiani, L. 2022. Investigation of microbial, chemical and color changes of fish burgers in different storage conditions using artificial neural network. Research and Innovation in Food Science and Technology. 11: 67-82.

[28] Jamroz, E., Kulawik, P., Guzik, P. and Duda, I. 2019. The verification of intelligent properties of

furcellaran films with plant extracts on the stored fresh Atlantic mackerel during storage at 2 °C. Food Hydrocolloids. 97:105211.

[29] Jamroz, E., Kulawik, P., Krzyściak, P., Talaga-Ćwiertnia, K. and Juszczak, L. 2019. Intelligent and active furcellaran-gelatin films containing green or pu-erh tea extracts: Characterization, antioxidant and antimicrobial potential. International Journal of Biological Macromolecules. 122: 745–757.

[30] Arafat, Y., Altemimi, A., Pratap-Singh, A. and Badwaik, L.S. 2021. Active biodegradable films based on sweet lime peel residue and its effect on quality of fish fillets. Polymers. 13, 1240.

[31] HPA, H. 2009. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market; HPA: London, UK.

[32] Abdelhedi, O., Jridi, M., Nasri, R., Mora, L., Toldrá, F. and Nasri, M. 2019. Rheological and structural properties of *Hemiramphus far* skin gelatin: Potential use as an active fish coating agent. Food Hydrocolloid. 87, 331–341.

[33] Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., Zanfardino, A., Izzo, V.; di Donato, A. and Notomista, E. 2017. Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. Journal of Theoretical Biology. 419: 254–265.

[34] Pedram Nia, A., Mortazavi, A. and Nemat Shahi, M.M. 2018. Study of chemical compounds and the antimicrobial effects of leaf extract of *Laurus nobilis* L on various microbial strains. Journal of food science and technology. 81: 217-226

[35] Remya, S., Mohan, C.O., Venkateshwarlu, G., Sivaraman, G.K. and Ravishankar, C.N. 2017. Combined effect of O₂ scavenger and antimicrobial film on shelf life of fresh cobia (*Rachycentron canadum*) fish steaks stored at 2 °C. Food Control. 71: 71–78

[36] Jakobsen, A.N., Gabrielsen, L., Johnsen, E.M., Rotabakk, B.T. and Lerfall, J. 2022. Application of soluble gas stabilization technology on ready-to-eat pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Food Science. 87(6): 2377–2390.

[37] Huang, Y.R., Zelaya, M.F.G. and Shiau, C.Y. 2016. Changes in biochemical compositions and quality of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage. Journal of Aquatic Food Product Technology. 25: 35–45.

- [38] Li, D., Zhuang, S., Peng, Y., Tan, Y., Hong, H. and Luo, Y. 2022. Mechanism of inosine monophosphate degradation by specific spoilage organism from grass carp in fish juice system. *Foods*. 11(17): 2672.
- [39] Seki, H., Nakazato, K. and Hamada-Sato, N. 2017. Adenosine monophosphate degradation and inosinic acid accumulation in the shrimp *Penaeus japonicus*. *International Aquatic Research*. 9: 37–52.
- [40] Surette, M.E., Gill, T.A. and LeBlanc, P.J. 1988. Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 36(1): 19–22
- [41] Mohammadlinejad, S., Jensen, I.J., Kurek, M. and Lerfall, J. 2024. Novel colorimetric indicators based on alginate hydrogel beads containing anthocyanin for visual freshness monitoring of shrimp and minced chicken. *LWT-Food Science and Technology*. 199: 116127.
- [42] Tkaczewska, J., Jamróz, E., Guzik, P. and Kopeć, M. 2022. Attempt to extend the shelf-life of fish products by means of innovative double-layer active biodegradable films. *Polymers*. 14: 1717.
- [43] Fazlara, A., Peighan, R., Gharehchahi, M. and Ali Noori, S.M. 2020. Toxicity of biogenic amines and the chemical indices for spoilage in peeled white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Nutrition Fasting and Health*. 8: 248- 253.
- [44] Lehane, L. and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58: 1-37.
- [45] Alak, G., Hisar, S.A., Hisar, O. and Genççelep, H. 2011. Biogenic amines formation in Atlantic bonito (*Sarda sarda*) fillets packaged with modified atmosphere and vacuum, wrapped in chitosan and cling film at 4 °C. *European Food Research and Technology*. 232: 23–28.
- [46] Tohidi Nasab, M. and Roomiani, L. 2023. Optimizing the hydrolyzed protein process from *Metapenaeus affinis* shrimp wastes. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 18: 93-104
- [47] Pongsetkul, J., Benjakul, S. and Boonchuen, P. 2022. Changes in volatile compounds and quality characteristics of salted shrimp paste stored in different packaging containers. *Fermentation*. 8: 1-19.
- [48] Li, W., Lu, H., He, Z., Sang, Y. and Sun, J. 2021. Quality characteristics and bacterial community of a Chinese salt-fermented shrimp paste. *LWT-Food Science and Technology*. 136: 110358
- [49] Bekhit, A. E.-D. A., Holman, B. W., Giteru, S. G., & Hopkins, D. L. (2021). Total volatile basic nitrogen (TVB-N) and its role in meat spoilage: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 280–302.
- [50] Ghorbani, M., Divsalar, E., Molaei, R., Ezati, P., Moradi, M., Tajik, H., et al. (2021). A halochromic indicator based on polylactic acid and anthocyanins for visual freshness monitoring of minced meat, chicken fillet, shrimp, and fish roe. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, Article 102864.
- [51] Zhang, K., Huang, T.-S., Yan, H., Hu, X., & Ren, T. (2020). Novel pH-sensitive films based on starch/polyvinyl alcohol and food anthocyanins as a visual indicator of shrimp deterioration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 768–776.
- [52] de Abreu, D.A.P., Losada, P.P., Maroto, J. and Cruz, J.M. 2011. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12: 50–55
- [53] Lue, Z., Xu, Y. and Ye, Q. 2015. Effect of nano-SiO₂-LDPE packaging on biochemical, sensory, and microbiological quality of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* during chilled storage. *Fisheries Science*. 81: 983-993.
- [54] Lin, D., Sun, L., Chen, Y.L., Liu, G.M., Miao, S. and Cao, M.J. 2022. Shrimp spoilage mechanisms and functional films/coatings used to maintain and monitor its quality during storage. *Trends in Food Science & Technology*. 129: 25-37



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Study the biodegradable bilayer film based on hydrolyzed protein and its effect on the shelf life of *Penaeus semisulcatus*

Amir Ghalandari¹, Laleh Roomiani^{2*}

1- MSc. Department of Food Science and Technology, Ahv, C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2-Associate of Professor, Department of Fisheries, Ahv, C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/10/23 Accepted:2024/6/9 Keywords: Film, Shelf life, Microbial and Chemical indicators, Shrimp DOI: 10.22034/FSCT.22.166.75. *Corresponding Author E- laleh.roomiani@iau.ac.ir l.roomiani@yahoo.com	In this study, we aimed to produce environmentally compatible double-layer films with fish processing waste and orange leaf extract as additives. The double-layered films were based on carboxy-methyl-cellulose hydrolyzed protein obtained from fish waste (first layer) and using orange extract at levels of 10, 20 and 40 (weight/volume) (second layer). Evaluation of the effect of films on the shelf life of green tiger shrimp during 15 days of storage at 4 degrees Celsius was analyzed through microbial, chemical and color parameters. The obtained results showed that the shrimp samples closed with double-layer films decreased the number of total aerobic bacteria, mold and yeast and cold-loving bacteria by 3, 1 and 3 log compared to the control treatment. The double-layer film containing 40% orange extract was able to reduce K-value, H-value, TVB-N and TBARS in shrimp compared to other treatments. Histamine, cadaverine, spermidine and spermine increased with increasing storage time in the treatments. The amount of a* in shrimp samples did not have a significant difference between the treatments (P>0.05), but the values of b* and L* of shrimp showed a statistically significant difference between the study treatments (P < 0.05). The results of the correlation coefficients were confirmatory and consistent with the results of the principal components analysis. The results of this study showed that double-layer films can be a substitute for plastic materials.