



مقاله علمی - پژوهشی:

کنترل اکسیداسیون روغن کبد ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده از عصاره هیدروالکلی جلبک *Nannochloropsis oculata* از طریق آنالیز سطح پاسخ

مهدی شریفی اصل^۱، لاله رومیانی^{۲*}

*l.roomiani@yahoo.com

۱- گروه مهندسی شیمی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران.

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

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

چکیده

در این مطالعه در بخش اول شرایط بهینه استخراج عصاره (دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد، مدت زمان ۲۰، ۷۰ و ۱۲۰ دقیقه و نسبت ماده خشک به حلال ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی لیتر بر گرم) جلبک (*Nannochloropsis oculata*) مورد بررسی قرار گرفت. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های جلبکی در بخش اول به وسیله اندازه گیری قدرت مهار رادیکال DPPH (-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) اندازه گیری شد. در بخش دوم تأثیر افزودن عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس در غلظت های ۰، ۳۵۰، ۵۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی به روغن کبد ماهی تون زرد باله مورد بررسی قرار گرفت. تیمار زمان ۱۲۰ دقیقه، درجه حرارت ۷۰ درجه سانتی گراد، نسبت ماده خشک به حلال ۳۰ میلی لیتر بر گرم بالاترین بازده عصاره را از نظر مهار رادیکال های آزاد داشت. طول دوره نگهداری ۵۶ روز بود و پارامترهای پراکسید، تیوباربیتریوریک اسید و پی-آنیسیدین در روغن ماهی تون اندازه گیری شدند. بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر (۵۵/۰ ± ۸۵/۴۵ درصد) اندازه گیری شد. مقادیر شاخص پراکسید، TBA و *p*-anisidine روغن ماهی تون با افزایش زمان نگهداری روندی افزایشی داشت و در روز ۵۶ به بالاترین میزان خود رسید. تیمار شاهد، بالاترین و تیمار روغن ماهی دریافت کننده ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس کمترین سطح شاخص های اکسیدانی را داشت. با توجه به نتایج تیمارهای دریافت کننده عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس فاکتور حفاظتی و قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری در مقایسه BHT داشتند که نشان می دهد، عصاره جلبکی در هر سه غلظت ۳۵۰، ۵۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به خوبی می تواند جایگزین ترکیبات سنتتیک باشد.

لغات کلیدی: بهینه سازی، فعالیت آنتی اکسیدانی، عصاره هیدروالکلی، نانوکروپسیس، روغن ماهی تون زرد باله
*نویسنده مسئول

مقدمه

چربی ماهیان منبع بسیار مهمی از اسیدهای چرب ضروری به‌ویژه اسیدهای چرب بلند زنجیره چند غیر اشباع از خانواده امگا-۳ می‌باشد که علاوه بر افزودن ارزش تغذیه‌ای آبزیان، سبب افزایش توجه به آنها برای مصارف تغذیه‌ای - دارویی شده است (Haliloğlu et al., 2019). امگا-۳ گروهی از اسیدهای چرب ضروری بوده که منبع اصلی تأمین آنها محصولات دریایی به‌خصوص ماهیان هستند و مصرف آنها برای بدن انسان ضروری است (Belkouch et al., 2016). اسیدهای چرب امگا-۳ نه تنها برای بدن ضروری هستند بلکه اثرات سلامت‌بخش و درمانی آنها به‌ویژه در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و بهبود عملکرد سامانه اعصاب مرکزی، طی تحقیقات زیادی به اثبات رسیده است (GOED, 2018).

تون ماهیان یکی از با ارزش‌ترین ماهیان صنعتی در جهان محسوب می‌شوند (Pazouki et al., 2012) و روغن ماهی تون به دلیل داشتن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب امگا-۳ یکی از با ارزش‌ترین روغن‌هاست که اسیدهای چرب امگا-۳ آن جزو اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA) بوده که دارای زنجیره کربنی مستقیم (۲۲-۱۸ کربنه) منتهی به گروه کربوکسیلیک بوده و دارای ۳ پیوند دوگانه می‌باشند (Rubio-Rodriguez et al., 2008). وجود مقادیر قابل ملاحظه اسیدهای چرب ضروری منحصربه‌فرد در روغن ماهی این امکان را فراهم می‌سازد که از آن در تولید غذاهای فراسودمند به منظور تأمین نیازهای تغذیه‌ای و در عین حال اثرات سودمند بر سلامت مصرف‌کنندگان، استفاده نمود (Jalili et al., 2019). چالش اصلی در به‌کارگیری روغن ماهی جهت مصرف مستقیم یا تولید غذاهای فراسودمند، حساسیت اکسیداسیون بالای آنها به دلیل داشتن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب چند غیر اشباعی و کمبود آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است که منجر به فساد اکسیداتیو و بد طعمی روغن ماهی می‌شود (Wanasundra and Shahidi, 1996; Mausavipour et al., 2021). در این فرآیند اکسیژن هوا به اسیدهای چرب اضافه می‌شود و تولید مواد واسطه ناپایداری می‌کند که در نهایت این مواد بدطعمی و بدبوئی روغن را به‌دنبال

دارد (Erickson, 2008). آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان هر ماده‌ای که به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن از قبیل اکسیژن فعال و نیتروژن در فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن شود و اکسیداسیون ماده را به تأخیر اندازد یا از آن جلوگیری کند، تعریف می‌شود (Venugopal, 2009; Golmakani et al., 2018; Oujifard et al., 2021). یکی از راه‌های کاهش سرعت فساد و افزایش ماندگاری روغن ماهی می‌تواند افزودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به روغن ماهی باشد. گیاهان آبی از مهم‌ترین تولیدکنندگان در محیط‌های دریایی بوده که اهمیت اکولوژیک وسیعی در محیط زندگی خود دارند. تعدادی از گیاهان دریایی از منابع غذایی در آسیا به‌شمار می‌روند که حاوی مواد مغذی ضروری نیز هستند (Lupoae et al., 2015).

فعالیت‌های بیولوژیک ناشی از وجود ترکیبات زیستی طبیعی فعال همانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، کارتنوئیدها و توکوفرول‌ها و ترکیبات وابسته در گیاهان آبی سبب شده است که این گیاهان به عنوان ترکیبات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی محسوب شوند (McCune and Johns, 2017). مطالعاتی اندکی بر خواص آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعات Namiki (۲۰۱۷)، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی علف‌های دریایی، Golmakani و همکاران (۲۰۱۸)، تأثیر عصاره جلبک *Arthrospira platensis* به عنوان آنتی‌اکسیدانی طبیعی در بهبود پایداری اکسیداتیو روغن کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris* *caspia*) و Grassi و همکاران (۲۰۲۰)، تأثیر افزودن مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و جلبک *Spirulina platensis* بر پایداری اکسیداسیونی غذای ماهی تیلاپای حاوی روغن اشاره کرد. جلبک‌های نانوکروپسیس *Nannochloropsis oculata* به دلیل داشتن سطوح بالای اسیدهای چرب و مواد آنتی‌اکسیدان به‌ویژه کارتنوئیدها و گلوکاتینون (Wang et al., 2016) به شکلی گسترده به عنوان غذای مکمل به‌خصوص در آبی‌پروری استفاده می‌شوند (Harith et al., 2009; Khatoon et al., 2014; Ohse et al., 2015). با توجه

بازداری کروماتوگرام‌های نمونه مجهول با کروماتوگرام‌های به‌دست آمده در محلول استاندارد اسیدهای چرب متیل‌استر، اسیدهای چرب موجود در روغن ماهی مشخص گردید. شناسایی نقاط اوج در نمودار کروماتوگرام نمونه‌ها با مقایسه با نقاط اوج در نمودار کروماتوگرام استاندارد (پالمیتیک، میرستیک، استئاریک، اولئیک، لینولیک، ایکوزانوئیک، میریستولئیک، پالمیتولئیک و آلفا-لینولئیک) و همچنین زمان بازداری نقاط اوج استاندارد صورت گرفت (کروماتوگرام استاندارد از تزریق مخلوط اسیدهای چرب متیله شده استاندارد به‌دست آمده است).

بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره هیدروالکلی جلبک

پودر ریزجلبک *N. oculata* به صورت خشک شده (انجماد در خلاء) از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان (ایستگاه بندرلنگه) تهیه و در شرایط دمایی خنک به محل انجام تحقیق منتقل گردید. جهت تهیه عصاره هیدروالکلی مقادیر ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم پودر ریزجلبک با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و الکل اتیلیک ۹۶ درجه به نسبت ۱ به ۱ مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری شد. هر ۱۶ ساعت محتویات ارلن به مدت ۲۵ دقیقه بهم‌زده شد. پس از ۴۸ ساعت محتویات ارلن به‌وسیله کاغذ صافی، صاف شد و مایع صاف شده در دستگاه تبخیرگر چرخان تحت خلأ در دماهای ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰، ۷۰ و ۱۲۰ دقیقه عصاره‌گیری گردید. عصاره تغلیظ شده در پتری‌دیش‌های استریل ریخته و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد (Salehi et al., 2005). عصاره‌های به‌دست آمده از نظر فعالیت مهار رادیکال DPPH^۱ مورد آزمایش قرار گرفته و بهترین دما، زمان و درصد ماده خشک به حلال به عنوان شرایط بهینه استخراج مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

به این موضوع، در این مطالعه تأثیر افزودن عصاره جلبک نانوکلوپسیس بر کاهش اکسیداسیون روغن ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنالیز سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج روغن کبد ماهی تون زرد باله

۱۰ گرم روغن کبد ماهی درون ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتر توزین و ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول و ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم به آنها اضافه و به مدت ۲ دقیقه به‌وسیله دستگاه همگن‌ساز (Arsan cream separator, Turkey) با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه یکنواخت و در ادامه ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه یکنواخت شد. قسمت رویی به همراه روغن با پمپ خلأ و قیف بوختر از مواد جامد جداسازی و قسمت رویی با استفاده از دکانتور و لایه کلروفرمی به دو قسمت مجزا تقسیم شد که حلال کلروفرم با دستگاه روتاری خارج و روغن خارج گردید (Karim et al., 2016).

ترکیب اسیدهای چرب

برای شناسایی و تعیین اسیدهای چرب روغن کبد ماهی تون زرد باله از دستگاه کروماتوگراف گازی استفاده شد. آماده‌سازی نمونه به صورت مشتق متیل‌استر و به‌وسیله مونوکسیدسدیم ۰/۵ نرمال انجام گردید (Christie, 1973). جهت بررسی پروفایل اسیدهای چرب از دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل Agilent Technologies-7890B GC متصل به طیف سنجی جرمی مدل Agilent Technologies-5975C با ستون کاپیلاری HP-5MS (طول ۳۰ متر × قطر بیرونی ۰/۲۵ میلی‌متر × ۲۵ میکرومتر قطر داخلی) با حد تشخیص میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد. درجه حرارت محل تزریق نمونه ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، درجه حرارت ستون ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد و درجه حرارت آشکارکننده ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان کامل هیدروژن ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه و میزان تزریق ۱ میکرولیتر بود. از مقایسه زمان

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

اندازه‌گیری شاخص پراکسید در روغن ماهی تون زردباله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

۰/۳ گرم روغن ماهی تون زردباله داخل یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری توزین و ۱۰ میلی‌لیتر اسید استیک کلروفرمی به روغن ماهی تون زردباله افزوده و همراه با تکان دادن ظرف حل گردید. ۱ میلی‌لیتر محلول یدید پتاسیم اشباع به محلول درون ارلن اضافه و به مدت ۱ دقیقه همراه با تکان شدید و ثابت، نگهداری شد. پس از طی این زمان، ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول مقدار ۱ درصد نشاسته اضافه و تکان داده شد تا رنگ محلول به صورت بنفش درآمد. محلول با استفاده از تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تا ناپدید شدن رنگ بنفش تیترا گردید. هم زمان یک آزمایش شاهد (بدون افزودن روغن یا چربی استخراجی) نیز آزمایش شد (AOAC, 2002). محاسبه PV براساس فرمول ذیل انجام شد:

$$PV = [(S-B) \times N \times 1000] / W$$

S = حجم میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم مورد نیاز برای تیترا کردن نمونه، B = حجم میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم لازم برای نمونه شاهد، N = نرمالیه محلول تیوسولفات سدیم، W = وزن نمونه (گرم)

اندازه‌گیری شاخص تیوباربیتوریک اسید در روغن ماهی تون زردباله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

۱ گرم روغن ماهی تون در ۱۰ میلی‌لیتر کربن تتراکلروئید حل و ۱۰ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید (۰/۶۷ درصد محلول تیوباربیتوریک اسید با اسید سیتریک خالص مخلوط شد) به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه با دور $\times g$ ۱۰۰۰ سانتیفریوژ شد. لایه بالایی جدا و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. شاهد به‌وسیله حل شدن ۲۰۰ میلی‌گرم از TBA در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال ۱- بوتانل پس از فیلتر شدن به‌دست آمد (AOAC, 1990).

بررسی قدرت خنثی کردن رادیکال‌های آزاد (DPPH) با استفاده از عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل ۱ پیکریل-هیدرازیل (DPPH) طبق روش Brand-Williams و همکاران (۱۹۹۵) انجام شد. دو میلی‌لیتر از عصاره جلبکی به دو میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۱۶٪ میلی مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس به‌خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی نگهداری شدند. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق فرمول ذیل محاسبه و به صورت درصد RSA محاسبه شد:

$$RSA\% = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{sample blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{sample} = جذب نمونه و محلول DPPH بعد از زمان موردنظر، A_{control} = جذب محلول DPPH بدون نمونه، A_{sample blank} = جذب نمونه DPPH بدون محلول

تیمارهای روغن ماهی تون زردباله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس با غلظت‌های ۳۵۰، ۵۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (Alavi and Golmakani, 2017) به میزان ۳ درصد به روغن ماهی (Jafarpour et al., 2017) اضافه شد. مدت زمان نگهداری ۵۶ روز بوده و نمونه‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵، ۴۲، ۴۹ و ۵۶ مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای مورد بررسی به قرار ذیل می‌باشند:

- ۱- تیمار روغن ماهی بدون افزودنی (شاهد)
- ۲- تیمار روغن ماهی حاوی ۳۵۰ (W/W) میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس
- ۳- تیمار روغن ماهی حاوی ۵۵۰ (W/W) میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس
- ۴- تیمار روغن ماهی حاوی ۱۰۰۰ (W/W) میلی‌گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس
- ۵- تیمار روغن ماهی حاوی BHT

آنیسیدین با استفاده از فرمول ذیل دست آمد (Frankel, 2012):

$$2PV + AV (p\text{-anisidine value}) = TV (\text{meqKg}^{-1})$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طراحی آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Design Expert (ورژن ۱۱) با استفاده از روش آماری سطح پاسخ انجام شد. در این روش برای بهینه‌سازی استخراج عصاره هیدروالکلی جلبک، زمان، دما و نسبت حلال به نمونه جلبک در نظر گرفته شد. با توجه به طراحی فاکتوریل در آنالیز سطح پاسخ، طراحی مرکب مرکزی در نظر گرفته شد. بعد از بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام گرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

اثرات متقابل سه گانه متغیرهای مؤثر در استخراج عصاره جلبک بر روی قدرت آنتی اکسیدانی با توجه به جدول ۱، p-value مدل انتخابی کمتر از ۰/۰۰۰۱ بوده و معنی‌دار نبودن فاکتور عدم برازش در سطح اطمینان ۹۵٪ نیز تأیید کننده مناسب بودن مدل منتخب است. برازش داده‌های به‌دست آمده برای فعالیت مهار DPPH بر اساس مدل چند جمله‌ای درجه دوم صورت گرفت. با توجه به جدول ۲ تجزیه واریانس اثرات خطی دما، زمان و نسبت حلال به ماده خشک و اثرات متقابل دما و زمان و دما و نسبت حلال به ماده خشک در سطح ۰/۰۵ بر فعالیت مهار DPPH معنی‌دار بودند.

اثر زمان بر فعالیت مهار DPPH با استفاده از عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

تأثیر متغیر مستقل زمان در سطوح (۲۰، ۷۰ و ۱۲۰ دقیقه) بر فعالیت مهار DPPH درحالی‌که دو متغیر دما و نسبت حلال به ماده خشک در نقطه مرکزی ثابت نگه داشته شوند در شکل ۱ نشان داده شده است. افزایش

اندازه‌گیری شاخص اسیدهای چرب آزاد در روغن ماهی تون زرد باله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

۳ گرم روغن در ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط نوتریال اتر-تانول (۷/۷۱:۱) حل و مخلوط با استفاده از دست همزده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، مخلوط با استفاده از پتاسیم هیدروکسید ۰/۰۱ مولار تیترو گردید. فنول فتالین (۱۰ گرم بر لیتر) به عنوان اندیکاتور استفاده شد. میزان اسیدهای چرب آزاد (meq/kg) بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید (Zhang et al., 2015):

$$\text{FFA (mg/g)} = (V \times C \times 56.11) / m$$

V = میزان پتاسیم هیدروکسید (میلی‌لیتر)؛ C = غلظت پتاسیم هیدروکسید (مول در لیتر) و m جرم نمونه روغن ماهی (گرم)

اندازه‌گیری شاخص p-آنیسیدین در روغن ماهی تون زرد باله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

برای اندازه‌گیری این شاخص، محلول ۰/۵ گرم روغن در بالون ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری با n-هگزان به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از این محلول با یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۲۵ درصد p-آنیسیدین در اسیداستیک گلاسیال مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۳۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل DR-2800 خوانده شد (AOAC, 2002).

$$\text{عدد آنیسیدین} = \frac{25 \times (1.245 - AB)}{W}$$

AS = میزان جذب محلول حاوی نمونه، AB = میزان جذب محلول حاوی نمونه خالص، W = وزن نمونه (گرم)

اندازه‌گیری شاخص Totax valve در روغن ماهی تون زرد باله حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

شاخص TV نشان دهنده مقدار کل تولید اکسیداسیونی اولیه و ثانویه بود و با استفاده از شاخص پراکسید و p-

دما، با افزایش دما تا حدود ۵۱/۹۷ فعالیت مهار DPPH به وسیله عصاره نانوکلوپسیس نسبتاً ثابت بود و با افزایش بیشتر دما فعالیت مهار DPPH کاهش یافت.

زمان از ۲۰ به ۱۲۰ دقیقه منجر به افزایش فعالیت مهار DPPH از ۳۱/۲۰ درصد به ۶۲/۲۶ درصد و افزایش نسبت حلال منجر به افزایش فعالیت مهار DPPH از ۲۹/۹۶ درصد به ۶۴/۸۳ درصد به وسیله عصاره شد. در خصوص

جدول ۱: اثرات متقابل سه گانه متغیرها بر فعالیت مهار DPPH

Table 1: Triple interactions of variables on DPPH inhibition activity

Run	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)	نسبت حلال به ماده خشک (میلی لیتر در گرم)	فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH
۱	۷۰	۹۰	۱۰	۲۹/۱۴
۲	۲۰	۷۰	۱۰	۱۴/۱۵
۳	۲۰	۵۰	۲۰	۲۱/۲۱
۴	۷۰	۷۰	۲۰	۴۵/۲۴
۵	۲۰	۹۰	۲۰	۳۲/۰۲
۶	۱۲۰	۵۰	۲۰	۶۸/۳۴
۷	۷۰	۵۰	۱۰	۲۴/۵۱
۸	۷۰	۹۰	۳۰	۴۷/۱۵
۹	۷۰	۷۰	۲۰	۵۱/۱۷
۱۰	۷۰	۷۰	۲۰	۵۱/۱۹
۱۱	۷۰	۷۰	۲۰	۵۲/۹۷
۱۲	۱۲۰	۷۰	۱۰	۳۷/۲۵
۱۳	۷۰	۵۰	۳۰	۷۴/۴۹
۱۴	۷۰	۷۰	۲۰	۵۳/۲۱
۱۵	۱۲۰	۹۰	۲۰	۵۱/۳۶
۱۶	۲۰	۷۰	۳۰	۴۴/۵۴
۱۷	۱۲۰	۷۰	۳۰	۷۷/۸۱

اثرات متقابل زمان و نسبت حلال به ماده خشک بر فعالیت مهار DPPH

اثرات متقابل زمان (۲۰-۹۰ دقیقه) و نسبت حلال به ماده خشک (۱۰-۳۰ میلی لیتر بر گرم) درحالی که دما در نقطه مرکزی ثابت می باشد در نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طوری که مشاهده می شود، افزایش زمان در تمام سطوح نسبت حلال به ماده خشک باعث افزایش فعالیت مهار DPPH شد.

اثرات متقابل زمان و دما بر فعالیت مهار DPPH با استفاده از عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکلوپسیس

نمودار سه بعدی سطح پاسخ اثرات متقابل فاکتورهای زمان (۲۰-۱۲۰ دقیقه) و دما (۵۰-۹۰) بر فعالیت مهار DPPH درحالی که نسبت حلال به ماده خشک در نقطه مرکزی ۲۰ میلی لیتر بر گرم ثابت نگه داشته شد، در شکل ۲ قابل مشاهده است. همان طوری که مشاهده می شود، افزایش زمان در سطوح پایین و دمای بالا منجر به افزایش فعالیت مهار DPPH شد. اما این تأثیر در دمای پایین بیشتر بود.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثرات متقابل سه گانه متغیرها بر فعالیت مهار DPPH عصاره استخراجی

Table 2: Analysis of variance of the three interactions of variables on the DPPH inhibitory activity of the extract

منبع	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
مدل	۵۰۶۴/۶۲	۹	۵۶۲/۷۴	۴۳/۸۹	<۰/۰۰۰۱	
A-Time (min)	۱۸۸۶/۲۱	۱	۱۸۸۶/۲۱	۱۴۷/۱۱	<۰/۰۰۰۱	
B-Temperature (°C)	۱۰۴/۲۶	۱	۱۰۴/۲۶	۸/۱۳	۰/۰۲۴۶	
C-Water to the raw material ratio (mL/g)	۲۴۱۳/۰۴	۱	۲۴۱۳/۰۴	۱۸۸/۲۰	<۰/۰۰۰۱	
AB	۱۹۳/۰۷	۱	۱۹۳/۰۷	۱۵/۰۶	۰/۰۰۶	significant
AC	۲۵/۸۶	۱	۲۵/۸۶	۲/۰۲	۰/۱۹۸۶	
BC	۲۵۵/۵۲	۱	۲۵۵/۵۲	۱۹/۹۳	۰/۰۰۲۹	
A ²	۶۵/۸۴	۱	۶۵/۸۴	۵/۱۳	۰/۰۵۷۸	
B ²	۵۳/۶۴	۱	۵۳/۶۴	۴/۱۸	۰/۰۸۰۱	
C ²	۴۷/۶۶	۱	۴۷/۶۶	۳/۷۲	۰/۰۹۵۲	
Residual	۸۹/۷۵	۷	۱۲/۸۲			
Lack of Fit	۴۸/۰۴	۳	۱۶/۰۱	۱/۵۴	۰/۳۳۵۴	not significant
Pure Error	۴۱/۷۱	۴	۱۰/۴۳			
Cor Total	۵۱۵۴/۳۷	۱۴				
R ²	۰/۹۸۲					
Adjusted R ²	۰/۹۶۰					
درصد تغییرات	۷/۸۵					

درصد، زمان ۸۶/۰۳ دقیقه، دما ۵۰/۵۷ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده خشک ۲۹/۵۳ میلی‌لیتر بر گرم بود.

پروفایل اسیدچرب روغن ماهی تون زرد باله

بر اساس پروفایل اسید چرب روغن ماهی تون در جدول ۳، اسیدهای چرب C16:0، C18:1 و C22:6 و DHA بالاترین درصد فراوانی را داشتند. اسیدهای چرب بدون پیوند دوگانه ۳۸/۲۸ درصد از اسیدهای چرب روغن تون و ۸۱/۱۶ درصد اسیدهای چرب دارای پیوند دو یا چند گانه بودند.

تأثیر افزودن عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس بر شاخص‌های سینتیکی روغن ماهی تون زرد باله

در جدول ۴، مقادیر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس نشان داده شده است. قدرت آنتی اکسیدانی یا AOP در تیمارهای روغن ماهی تون حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک با غلظت ۶۹

اثرات متقابل دما و نسبت حلال به ماده خشک بر فعالیت مهار DPPH با استفاده از هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

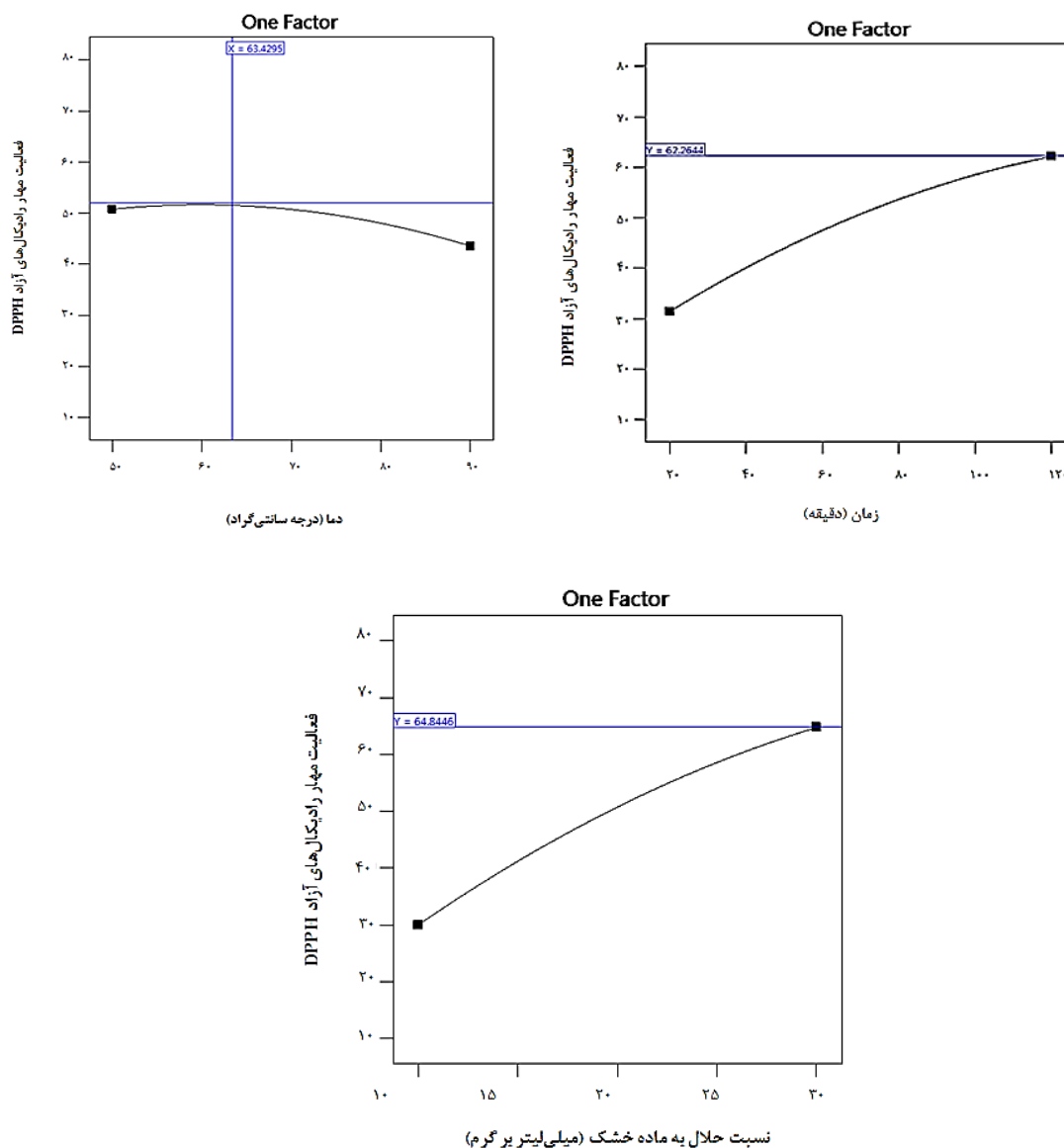
اثرات متقابل دمای استخراج (۲۰-۹۰) و نسبت حلال به ماده خشک (۱۰-۳۰ میلی‌لیتر بر گرم) درحالی‌که زمان در نقطه مرکزی ثابت می‌باشد در نمودارهای سه بعدی سطح پاسخ در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود، افزایش نسبت حلال به ماده خشک در تمام سطوح دما منجر به افزایش فعالیت مهار DPPH شد. اما این تأثیر سطوح پایین دما بیشتر بود.

بهینه سازی فعالیت مهار DPPH توسط عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

برای بهینه‌سازی فعالیت مهار DPPH از نرم افزار Design Expert استفاده شد. در شکل ۵ تأثیر متغیرها بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از روش سطح پاسخ می‌توان چنین اظهار کرد که شرایط عملیاتی بهینه برای بیشینه فعالیت مهار DPPH ۷۹/۲۵

$(P < 0.05)$

۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر بالاترین میزان را داشت. کمترین قدرت آنتی اکسیدانی در تیمار BHT اندازه گیری شد



شکل ۱: اثر متغیر مستقل بر فعالیت مهار DPPH توسط هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

Figure 1: Effect of independent variable on DPPH inhibition activity by hydroalcoholic *N. oculata*

Totax Value و Anisidine روغن ماهی تون زرد
باله

با توجه به نتایج جدول ۵، شاخص های اکسیداسیون پراکسید، TBA، ρ-Anisidine و Totax Value در تیمارهای دارای عصاره، شاهد و نیز BHT (Butylated

تأثیر افزودن عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس بر شاخص پراکسید، TBA¹، ρ

¹ Thiobarbituric Acid

شاخص‌ها کاهش یافت ($P < 0.05$). میزان پراکسید و TBA (از روز ۳۵ نگهداری) در تیمار BHT بالاتر از تیمارهای دارای ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره جلبکی بود، اما در مقایسه با غلظت‌های ۳۵۰ و ۵۵۰ میلی گرم بر لیتر مقدار کمتری داشت ($P < 0.05$) (جدول ۶).

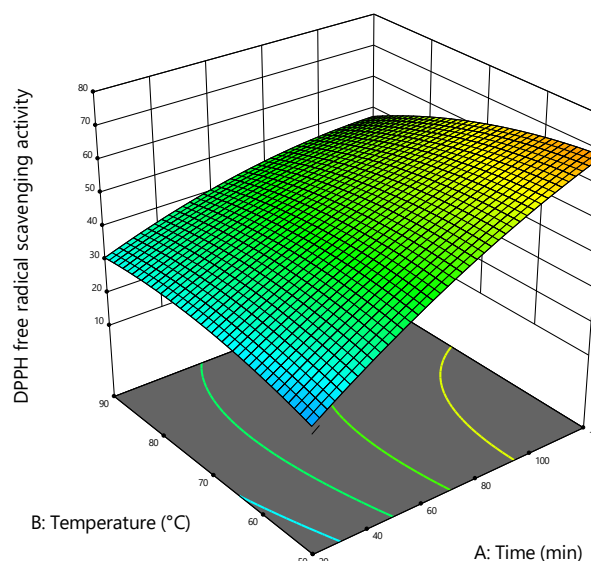
hydroxytoluene) روند افزایشی داشته است و در انتهای دوره (روز ۵۶ نگهداری) به بالاترین میزان خود رسید ($P < 0.05$) و در تمامی روزهای نگهداری به جز روز صفر، تیمار شاهد با اختلاف معنی دار در مقایسه با سایر تیمارها بالاترین میزان شاخص‌های اکسیداسیونی را در روغن ماهی تون زرد باله داشت و با افزایش سطح عصاره میزان این

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

DPPH free radical scavenging activity
14.15 77.81

X1 = A: Time (min)
X2 = B: Temperature (°C)

Actual Factor
C: Water to the raw material ratio (mL/g) = 20



شکل ۲: اثر متقابل زمان و دما بر فعالیت مهار DPPH به وسیله هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

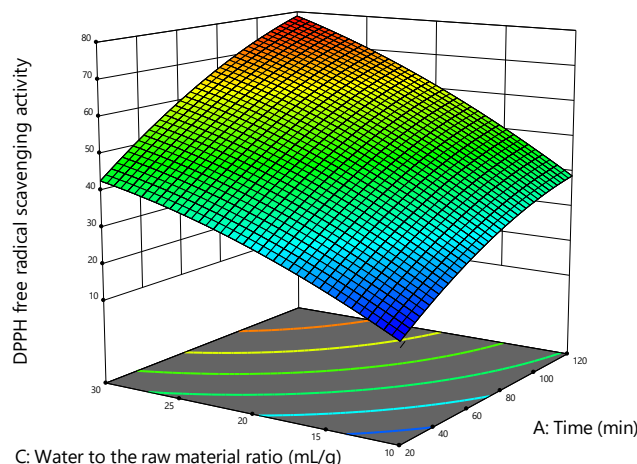
Figure 2: Interaction of time and temperature on the inhibitory activity of DPPH by hydroalcoholic *N. oculata*

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

DPPH free radical scavenging activity
14.15 77.81

X1 = A: Time (min)
X2 = C: Water to the raw material ratio (mL/g)

Actual Factor
B: Temperature (°C) = 70



شکل ۳: اثر متقابل زمان و نسبت حلال به ماده خشک بر فعالیت مهار DPPH به وسیله هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

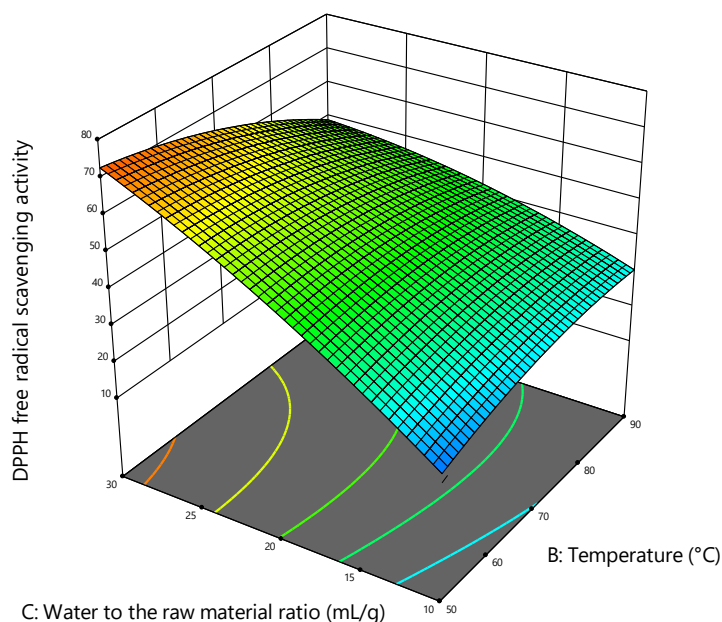
Figure 3: Interaction of time and solvent-to-dry matter ratio on DPPH inhibition activity by hydroalcoholic *N. oculata*

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

DPPH free radical scavenging activity
14.15 77.81

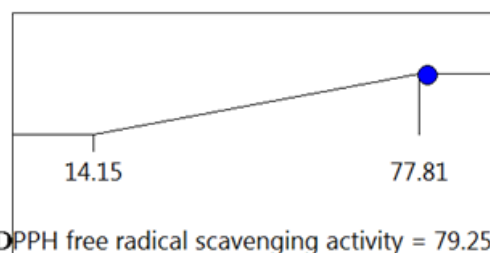
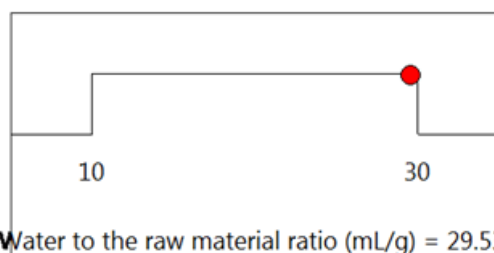
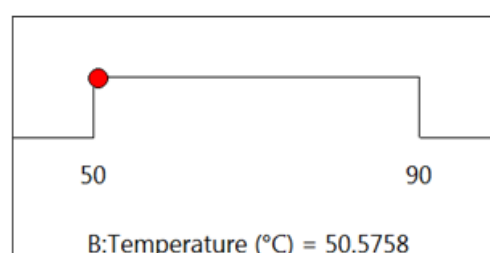
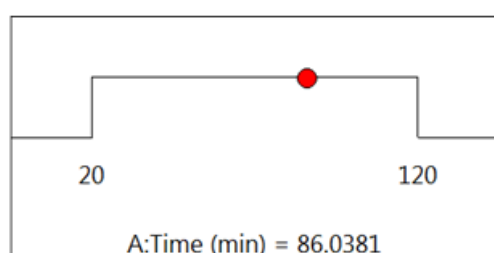
X1 = B: Temperature (°C)
X2 = C: Water to the raw material ratio (mL/g)

Actual Factor
A: Time (min) = 70



شکل ۴: اثر متقابل دما و نسبت حلال به ماده خشک بر فعالیت مهار DPPH به وسیله هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

Figure 4: Interaction of temperature and solvent to dry matter ratio on DPPH inhibition activity by hydroalcoholic *N. oculata*



شکل ۵: بهینه سازی فعالیت مهار DPPH به وسیله هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس

Figure 6: Optimization of DPPH inhibition activity by hydroalcoholic *N. oculata*

جدول ۳: پروفایل اسیدچرب روغن ماهی تون

Table 3: Fatty acid profile of tuna oil

ترکیب	درصد	ردیف	ترکیب	درصد	ردیف
C18:3 ω 3	۱/۸۹ $\pm$ ۰/۳۳	۱۵	C14:0	۰/۱۱ $\pm$ ۳/۵۱	۱
C20:3 ω 3	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۰۶	۱۶	C16:0	۰/۲۳ $\pm$ ۲۵/۰۸	۲
C20:4 ω 6	۳/۱۲ $\pm$ ۰/۵۱	۱۷	C17:0	۰/۰۱ $\pm$ ۰/۹۰	۳
C20:5 ω 3EPA	۶/۴۱ $\pm$ ۱/۵۳	۱۸	C18:0	۰/۲۷ $\pm$ ۸/۱۱	۴
C21:5	۳/۲۱ $\pm$ ۰/۸۴	۱۹	C20:0	۰/۰۵ $\pm$ ۰/۶۸	۵
C22:5 ω 3DPA	۲/۶۵ $\pm$ ۰/۰۹	۲۰	C14:1	۰/۰۳ $\pm$ ۱/۷۲	۶
C22:6 ω 3 DHA	۳۰/۱۵ $\pm$ ۳/۲۱	۲۱	C16:1 ω 9	۰/۰۵ $\pm$ ۱/۵۰	۷
Σ SFA	۳۸/۲۸	۲۲	C16:1	۰/۱۵ $\pm$ ۷/۱۲	۸
Σ MUFA	۲۷/۰۵	۲۳	C18:1 ω 9	۱/۵۴ $\pm$ ۱۳/۱۲	۹
Σ PUFA	۱/۴۱	۲۴	C18:1 ω 11	۰/۲۵ $\pm$ ۳/۵۰	۱۰
ω 6 / ω 3	۰/۱۲	۲۵	C18:1 ω 12	۰/۰۱ $\pm$ ۰/۰۹	۱۱
PUFA/SFA	۵۴/۱۱	۲۶	C16:3	۰/۰۵ $\pm$ ۲/۳۱	۱۲
C18:3 ω 3	۱/۸۹ $\pm$ ۰/۳۳	۲۷	C16:4	۰/۰۷ $\pm$ ۰/۵۴	۱۳
C20:3 ω 3	۱/۴۷ $\pm$ ۰/۰۶	۲۸	C18:2 ω 6	۰/۲۰ $\pm$ ۲/۳۶	۱۴

جدول ۴: ترکیبات آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکلوپسیس

Table 4: Antioxidant compounds of hydroalcoholic extract of *Nanochloropsis* algae

ترکیبات فنولی (mg/g GAE)	ترکیبات فلانوبیدی (mg/g QE)	IC ₅₀ عصاره هیدروالکلی جلبک (μ g/ml)
۳۹ $\pm$ ۳۳	۳۹ $\pm$ ۳۳ ۲/۰۴	۳۹ $\pm$ ۳۳ ۱/۷۹

جدول ۵: نتایج پارامترهای سینتیکی روغن ماهی حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکلوپسیس

Table 5: Results of kinetic parameters of fish oil containing hydroalcoholic extract of *Nanochloropsis* algae

نمونه	PF (%)	AOP (%)	AA	IP (day)
شاهد	-	-	-	۰/۹۱ $\pm$ ۰/۰۴h
۳۵۰ میلی گرم بر لیتر	۳/۴۱ $\pm$ ۰/۷۸ e	۶۵/۱۵ $\pm$ ۰/۱۱ e	۶۵۹۷ $\pm$ ۶۵/۲۳ f	۲/۵۱ $\pm$ ۰/۰۳f
۵۵۰ میلی گرم بر لیتر	۷/۲۳ $\pm$ ۰/۳۴c	۷۵/۲۴ $\pm$ ۰/۱۵c	۸۳۴۵ $\pm$ ۵۵/۲۳d	۵/۱۲ $\pm$ ۰/۱۲c
۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر	۸/۳۶ $\pm$ ۰/۹۹a	۸۵/۴۵ $\pm$ ۰/۵۵a	۹۰۲۳ $\pm$ ۶۱/۱۸b	۷/۱۱ $\pm$ ۰/۲۱a
BHT (۰/۰۱ درصد)	۱/۹۸ $\pm$ ۰/۰۴g	۶۰/۲۴ $\pm$ ۰/۱۸f	۱۰۳۴ $\pm$ ۲۳/۹۱a	۲/۱۱ $\pm$ ۰/۰۵e

حروف غیر مشابه به معنی اختلاف معنی دار بین پارامترها در هر ستون است ($p < ۰/۰۵$)

از روز ۳۵ نگهداری، میزان ρ -Anisidine در تیمار BHT به جز نسبت به شاهد در مقایسه با سایر روغن های حاوی عصاره هیدروالکلی نانوکلوپسیس مقدار بالاتری داشت. با افزایش غلظت عصاره جلبکی از ۳۵۰ به ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر میزان ρ -Anisidine و Totax Value به شکل معنی داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). میزان Totax Value در تمام تیمارها روند افزایشی داشته است و از مقدار

۵۶ نگهداری رسید. اما میزان Totax Value در تیمار BHT از روز ۲۱ نگهداری در مقایسه با تیمارهای حاوی ۳۵۰ و ۵۵۰ میلی گرم بر لیتر عصاره هیدروالکلی جلبک مقدار کمتری داشت ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۶: نتایج اندازه گیری شاخص های اکسیداسیون در روغن ماهی تون حاوی عصاره هیدروالکلی جلبک نانوکروپسیس
Table 6: Results of measurement of oxidation indices in tuna oil containing hydroalcoholic extract of *N. oculata*

تیماز	۰	۷	۱۴	۲۱	۲۸	۳۵	۴۲	۴۹	۵۶
دوره نگهداری (روز)									
شاهد	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۵/۱۲ ± ۰/۰۷	۹/۱۱ ± ۰/۰۵	۱۲/۱۰ ± ۰/۱۱	۱۶/۲۳ ± ۰/۱۶	۲۲/۱۳ ± ۰/۱۵	۲۵/۲۳ ± ۰/۲۱	۲۹/۱۷ ± ۰/۲۴	۳۱/۱۱ ± ۰/۲۱	۳۸/۱۰ ± ۰/۱۲
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۵/۱۰ ± ۰/۰۹	۷/۲۳ ± ۰/۰۷	۸/۱۲ ± ۰/۱۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۱۷	۱۶/۲۴ ± ۰/۲۳	۱۸/۲۴ ± ۰/۲۴	۲۵/۱۵ ± ۰/۲۷	۲۸/۱۰ ± ۰/۲۵	۳۴/۱۶ ± ۰/۱۵
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
نانوکروپسیس	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۵/۱۴ ± ۰/۰۹	۹/۱۰ ± ۰/۰۶	۱۱/۱۶ ± ۰/۱۲	۱۶/۲۴ ± ۰/۱۶	۲۲/۱۵ ± ۰/۲۴	۲۵/۲۳ ± ۰/۲۴	۲۹/۱۷ ± ۰/۲۴	۳۱/۱۱ ± ۰/۲۱	۳۸/۱۰ ± ۰/۱۲
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۵/۱۰ ± ۰/۰۹	۷/۲۳ ± ۰/۰۷	۸/۱۲ ± ۰/۱۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۱۷	۱۶/۲۴ ± ۰/۲۳	۱۸/۲۴ ± ۰/۲۴	۲۵/۱۵ ± ۰/۲۷	۲۸/۱۰ ± ۰/۲۵	۳۴/۱۶ ± ۰/۱۵
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
BHT	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۵/۱۰ ± ۰/۰۹	۹/۱۰ ± ۰/۰۶	۱۱/۱۶ ± ۰/۱۲	۱۶/۲۴ ± ۰/۱۶	۲۲/۱۵ ± ۰/۲۴	۲۵/۲۳ ± ۰/۲۴	۲۹/۱۷ ± ۰/۲۴	۳۱/۱۱ ± ۰/۲۱	۳۸/۱۰ ± ۰/۱۲
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۵/۱۰ ± ۰/۰۹	۷/۲۳ ± ۰/۰۷	۸/۱۲ ± ۰/۱۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۱۷	۱۶/۲۴ ± ۰/۲۳	۱۸/۲۴ ± ۰/۲۴	۲۵/۱۵ ± ۰/۲۷	۲۸/۱۰ ± ۰/۲۵	۳۴/۱۶ ± ۰/۱۵
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
TBA (mg MDA kg ⁻¹)									
شاهد	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۱۶ ± ۰/۰۱	۰/۲۰ ± ۰/۰۱	۰/۲۰ ± ۰/۰۶	۰/۲۰ ± ۰/۰۹	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۰ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
نانوکروپسیس	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
BHT	aI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bF	bE	bD	bC	bB	bA
	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۱۰ ± ۰/۰۱	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۳	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۴	۰/۲۰ ± ۰/۰۱
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cF	cE	cD	cC	cB	cA
p-anisidine (mg kg ⁻¹)									
شاهد	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۲/۴۵ ± ۰/۰۵	۶/۳۴ ± ۰/۲۳	۸/۶۷ ± ۰/۹۳	۱۱/۰۹ ± ۰/۰۹	۱۶/۲۴ ± ۰/۵۴	۲۰/۲۶ ± ۰/۷۴	۲۴/۷۶ ± ۰/۸۸	۲۶/۷۷ ± ۰/۹۴	۳۰/۱۳ ± ۰/۲۳
	۲۵۰ ppm	cI	bH	bG	bF	bD	bC	bB	bA
	۳/۱۶ ± ۰/۰۲	۵/۱۴ ± ۰/۱۵	۶/۳۳ ± ۰/۴۵	۹/۱۶ ± ۰/۶۵	۱۰/۳۵ ± ۰/۹۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۲۴	۱۶/۵۱ ± ۰/۱۱	۲۰/۱۸ ± ۰/۵۴	۲۶/۱۱ ± ۰/۹۱
	۵۵۰ ppm	dI	dH	dG	dF	dD	dC	dB	dA
نانوکروپسیس	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۲/۴۵ ± ۰/۰۵	۶/۳۴ ± ۰/۲۳	۸/۶۷ ± ۰/۹۳	۱۱/۰۹ ± ۰/۰۹	۱۶/۲۴ ± ۰/۵۴	۲۰/۲۶ ± ۰/۷۴	۲۴/۷۶ ± ۰/۸۸	۲۶/۷۷ ± ۰/۹۴	۳۰/۱۳ ± ۰/۲۳
	۲۵۰ ppm	cI	bH	bG	bF	bD	bC	bB	bA
	۳/۱۶ ± ۰/۰۲	۵/۱۴ ± ۰/۱۵	۶/۳۳ ± ۰/۴۵	۹/۱۶ ± ۰/۶۵	۱۰/۳۵ ± ۰/۹۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۲۴	۱۶/۵۱ ± ۰/۱۱	۲۰/۱۸ ± ۰/۵۴	۲۶/۱۱ ± ۰/۹۱
	۵۵۰ ppm	dI	dH	dG	dF	dD	dC	dB	dA
BHT	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۲/۴۵ ± ۰/۰۵	۶/۳۴ ± ۰/۲۳	۸/۶۷ ± ۰/۹۳	۱۱/۰۹ ± ۰/۰۹	۱۶/۲۴ ± ۰/۵۴	۲۰/۲۶ ± ۰/۷۴	۲۴/۷۶ ± ۰/۸۸	۲۶/۷۷ ± ۰/۹۴	۳۰/۱۳ ± ۰/۲۳
	۲۵۰ ppm	cI	bH	bG	bF	bD	bC	bB	bA
	۳/۱۶ ± ۰/۰۲	۵/۱۴ ± ۰/۱۵	۶/۳۳ ± ۰/۴۵	۹/۱۶ ± ۰/۶۵	۱۰/۳۵ ± ۰/۹۱	۱۲/۱۱ ± ۰/۲۴	۱۶/۵۱ ± ۰/۱۱	۲۰/۱۸ ± ۰/۵۴	۲۶/۱۱ ± ۰/۹۱
	۵۵۰ ppm	dI	dH	dG	dF	dD	dC	dB	dA
Totax valve									
شاهد	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۱۲/۷۱ ± ۰/۵۹	۲۲/۵۶ ± ۰/۲۳	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۲۵۰ ppm	bI	bH	bG	bF	bD	bC	bB	bA
	۱۲/۳۶ ± ۰/۵۵	۲۲/۵۷ ± ۰/۱۶	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۵۵۰ ppm	cI	cH	cG	cF	cD	cC	cB	cA
نانوکروپسیس	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۱۲/۳۶ ± ۰/۵۵	۲۲/۵۷ ± ۰/۱۶	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۲۵۰ ppm	cI	cH	cG	cF	cD	cC	cB	cA
	۱۲/۳۶ ± ۰/۵۵	۲۲/۵۷ ± ۰/۱۶	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۵۵۰ ppm	dI	dH	dG	dF	dD	dC	dB	dA
BHT	bI	aH	aG	aF	aE	aD	aC	aB	aA
	۱۲/۳۶ ± ۰/۵۵	۲۲/۵۷ ± ۰/۱۶	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۲۵۰ ppm	cI	cH	cG	cF	cD	cC	cB	cA
	۱۲/۳۶ ± ۰/۵۵	۲۲/۵۷ ± ۰/۱۶	۳۲/۸۷ ± ۰/۴۱	۴۲/۵۳ ± ۱/۸۴	۵۲/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۰/۱۵ ± ۱/۲۲	۶۸/۱۷ ± ۱/۲۴	۷۶/۱۹ ± ۱/۲۶	۸۴/۲۱ ± ۱/۲۸
	۵۵۰ ppm	dI	dH	dG	dF	dD	dC	dB	dA

حروف غیر مشابه بزرگ به معنی اختلاف معنی دار بین روزهای نگهداری است ($p < 0.05$)

حروف غیر مشابه کوچک به معنی اختلاف معنی دار بین غلظت های مختلف عصاره جلبکی و BHT است ($p < 0.05$)

بحث

مطالعه حاضر از دو مرحله تشکیل شده است. در مرحله اول شرایط بهینه استخراج عصاره هیدروالکلی از جلبک نانوکروپسیس مورد بررسی و در بخش دوم تأثیر افزودن این عصاره به روغن ماهی و تأثیر آن بر کاهش اکسیداسیون مورد مطالعه قرار گرفت. آزمون شماره ۱۷ (زمان ۱۲۰ دقیقه، دما ۷۰ درجه سانتی گراد، نسبت ماده خشک به حلال ۳۰ میلی لیتر بر گرم) بالاترین بازده عصاره را از نظر مهار رادیکال های آزاد داشت. افزایش زمان استخراج از ۲۰ به ۱۲۰ دقیقه منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال های آزاد به وسیله عصاره شد، زیرا درصد حضور ترکیبات فنولی موجود در عصاره با افزایش زمان استخراج افزایش می یابد (Rusak et al., 2008). Nahvi و Babakhani (۲۰۱۶) در مطالعه بهینه سازی استخراج ترکیبات ضد اکسیدانی جلبک قهوه ای (*Sargassum angustifolium*) با رفلکس حرارتی در روش تاگوچی عنوان کردند که در زمان های استخراج بالا میزان ترکیبات

فنولی نیز افزایش می یابد و بهترین زمان را بین ۹۰، ۱۸۰ و ۲۷۰ دقیقه، ۲۷۰ دقیقه گزارش کردند. در مطالعه Omidی و همکاران (۲۰۱۸) که بر استفاده از اسپرولینا بر پایداری روغن کتچد انجام شد، میزان جذب رادیکال های آزاد DPPH با افزایش غلظت عصاره، افزایش معنی داری یافت، به شکلی که بالاترین میزان جذب در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر و کمترین میزان جذب در غلظت ۵۰ میلی گرم بر لیتر گزارش شد. همچنین افزایش دمای استخراج به بیش از ۵۰ درجه سانتی گراد (۷۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد) منجر به کاهش فعالیت مهار رادیکال های DPPH شد. محصولات اکسایش لیپیدی تحت شرایط حرارتی پایدار نمی باشد و شکسته می شوند که این موضوع زمینه را برای کاهش رادیکال های آزاد فراهم می آورد. در سیستم DPPH، آنتی اکسیدان ها با رادیکال پایدار DPPH واکنش می دهند و آن را کم رنگ یا بی رنگ می کنند و میزان کاهش رنگ با قدرت آنتی اکسیدانی نمونه رابطه مستقیم دارد و با افزایش غلظت ترکیبات فنلی یا درجه هیدروکسیلاسیون ترکیبات فنلی،

دوگانه است که سرعت اکسیداسیون را افزایش می‌دهد و این روغن را به شدت مستعد اکسیداسیون می‌کند. فرآورده حاصل از اکسایش اولیه چربی‌ها هیدروپراکسیدها هستند که این ترکیبات ناپایدارند و در مرحله دوم اکسایش پس از تجزیه، موادی نظیر آلدئیدها، کتون‌ها، الکل‌ها، هیدروکربن‌ها، استرها، فوران‌ها و لاکتون‌ها را ایجاد می‌کنند. این مواد به عنوان عوامل تغییر بو و مزه در محصولات مطرح می‌باشند. پروفایل اسیدهای چرب روغن حاصل از ضایعات تن ماهیان نشان داد که حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع با پیوند دوگانه به میزان ۲۸/۰۵ درصد است که در صورت نگهداری در شرایط نامساعد اکسیداسیون آن اتفاق می‌افتد (Taati Keley et al., 2018). مقادیر بالای دوکوزاهگزانوئیک اسید مشخصه اصلی خانواده تن ماهیان است. به دلیل حضور پیوندهای دوگانه زیاد در DHA و EPA اکسیداسیون آنها به سرعت اتفاق می‌افتد (Mahmoodi et al., 2017). در مطالعه‌ای دیگر بر پروفایل اسیدچرب روغن ماهی تن، میزان EPA و DHA به ترتیب ۶/۱۲ و ۲۵/۲۶۳ درصد مشخص گردید. در این مطالعه از طریق نانومولسیون روغن به همراه کورکومین زردچوبه نسبت به کاهش اکسیداسیون اقدام کردند (Shehzad et al., 2021).

آزمایشی که به طور گسترده جهت اندازه‌گیری مقدار فساد اکسایشی چربی‌ها به کار گرفته می‌شود، شاخص TBA و PV^۱ است (Chouliara et al., 2004). در مطالعه حاضر، با افزایش زمان نگهداری تا ۵۶ روز در تمام تیمارهای دارای عصاره میزان پراکسید و TBA افزایش یافت. در مطالعه Omidی و همکاران (۲۰۱۸) نیز روند افزایش مقدار پراکسید و TBA با زمان مشاهده شد و افزایش غلظت، کاهش میزان پراکسید روغن کنجد را به همراه داشت که با توجه به کاهش میزان اکسیداسیون با افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی از ۳۵۰ به ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. مقدار قابل قبول پراکسید بر اساس استاندارد IFOMA در روغن ماهی تصفیه نشده، تا محدوده ۲۰ میلی‌اکی والان بر کیلوگرم تعیین شده است (Bimbo, 1998) که در تیمار شاهد (تا

فعالیت مهار رادیکالی جلبک افزایش پیدا می‌کند (Vieira et al., 2001).

در مطالعه Babakhani Lashkan و همکاران (۲۰۱۳) افزایش توان ماکروویو عامل بهبود استخراج عصاره جلبکی *Sargassum angustifolium* معرفی کرد، اما توان بسیار بالا را به سبب افزایش دما عامل منفی معرفی و عنوان کردند که در دمای بالا سوختن و کف کردن نمونه‌ها رخ داده و این موضوع بازده استخراج را کاهش می‌دهد که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

نسبت ماده خشک به حلال یک نسبت مهم در بهینه‌سازی استخراج محسوب می‌شود. افزایش این نسبت درصد استخراج ترکیبات فنولی را افزایش می‌دهد که خود عامل افزایش توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد (Pinelo et al., 2005). در واقع، بالاترین نسبت ماده خشک به حلال دارای بیشترین میزان ماده جامد است (Spigno et al., 2007). افزایش نسبت حلال منجر به افزایش فعالیت مهار DPPH شد، زیرا در این شکل ماده مؤثر عصاره افزایش می‌یابد. در مطالعه Babakhani Lashkan و همکاران (۲۰۱۳) بر شرایط استخراج عصاره جلبکی *Sargassum angustifolium*، عصاره استخراجی با نسبت ۱ به ۲۰ جلبک به حلال دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی بود و میزان قدرت آنتی‌اکسیدانی کل، خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد در این نسبت در مقایسه با سایر نسبت‌ها بالاتر بود. در واقع، شانس حضور ترکیبات زیست‌فعال در حلال با افزوده شدن حلال به سبب افزایش نرخ تراوش بالاتر می‌رود. در مطالعه حاضر، بازده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراجی در نسبت حلال به ماده خشک برابر ۲۰ میلی‌لیتر بر هر گرم در مقایسه با ۳۰ میلی‌لیتر بر هر گرم بالاتر بود که به نظر می‌رسد، با افزایش بالای ماده خشک توانایی حلال در فرآیند، استخراج کاهش می‌یابد که این نتیجه در مطالعه Babakhani Lashkan و همکاران (۲۰۱۳) نیز مشاهده شده و افزایش میزان ماده خشک سبب کاهش توان حلال در استخراج ترکیبات فنولی از جلبک شد.

براساس پروفایل اسیدچرب، درصد بالایی (۸۱/۱۶ درصد) از روغن کبد ماهی تون زردباله، اسیدهای چرب با پیوند

¹ Peroxide Value

روز ۲۱) و در تیمار حاوی ۲۵۰ (تا روز ۲۵) میلی گرم بر لیتر و در تیمار حاوی ۵۵۰ میلی گرم بر لیتر و BHT (تا روز ۴۲) از محدوده مجاز عبور کرد. میزان پراکسید در تیمار حاوی ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تا انتهای دوره در محدوده مجاز قرار داشت.

شاخص AV^1 میزان ترکیبات کربونیل و اساساً ۲- الکالین ها را نشان می دهد. در واقع، این شاخص برای اندازه گیری مولکول های اشباع با وزن بالا به ترکیبات کربونیل در تری گلیسرول ها مربوط می شود (Frankel, 2012) که نشان دهنده اکسیداسیون چربی است که روندی مشابه با پراکسید و TBA را در نمونه های روغن ماهی نشان داد. در واقع، عدد پراکسید و نیز مقادیر AV و TBA به غلظت آنتی اکسیدان ها بستگی دارد (Chouliara et al., 2004). زیرا افزایش گرادیان غلظت و در نتیجه افزایش ضریب انتشار آنتی اکسیدان در حضور غلظت های بالای عصاره اتفاق می افتد که باعث افزایش زمان رسیدن به حالت تعادلی می شود که حداکثر بازده در زمان ۱۲۰ دقیقه را نیز توجیه می کند. حد مجاز AV حداکثر ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم تعیین شده است (Codex, 2001) که به جز تیمار شاهد در روز ۵۶ در سایر روزها روغن در محدوده استاندارد قرار داشت.

همچنین کاهش TBA در روغن ماهی تون حاوی جلبک ناشی از حضور ترکیباتی آنتی اکسیدانی همانند الفا و بتا کاروتن، گزانتافیل، کریپتوزانتین، زئازانتین، ویتامین C، توکوفرول و ترکیبات پلی فنولیک است که در جلبک های با منشأ دریایی وجود دارد، باشد (Deng and Chow, 2010). براساس مطالعه Boran و همکاران (۲۰۰۶) TBA در محدوده ۷-۸ میلی گرم مالون دی آلدئید بر کیلوگرم نمونه، نشان دهنده روغن ماهی با کیفیت خوب است که تمام تیمارها در محدوده مجاز در این محدوده قرار داشتند.

Colla و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که پورد جلبک اسپیرولینا قادر به تأخیر در فرآیند اکسیداسیون و کاهش تشکیل ترکیبات پراکسید است و می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان کارآمد برای افزایش ماندگاری روغن سویا

استفاده شود که با یافته های مطالعه حاضر هم خوانی دارد. همچنین احتمالاً زمانی که هسته (روغن ماهی) در مرکز کوآسروات (ریزکیسه های دارای غشای دو لایه) حاصل از برهمکنش عصاره هیدروالکلی جلبک ها قرار می گیرد، مواد دیواره به عنوان یک مانع فیزیکی از ترکیب اکسیژن با هسته جلوگیری و نرخ اکسایش را کنترل می نمایند (Chen et al., 2013). در مطالعه Jafarpour و همکاران (۲۰۱۷) افزودن نانوکپسول دارای آنتی اکسیدانی طبیعی (اسانس گل میخک) را در ایجاد ثبات و کنترل نرخ اکسایش روغن ماهی مؤثر دانستند.

افزودن عصاره هیدروالکلی جلبک سبب افزایش IP و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی شد. قدرت آنتی اکسیدانی ۱۰۰- است و هر چقدر بزرگتر باشد، ماده مورد استفاده ظرفیت آنتی اکسیدانی قوی تری دارد. در غلظت های ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر جلبک نانوکلوپسیس، قدرت آنتی اکسیدانی ۸۵/۴۵ درصد را نشان دادند که در مقایسه با BHT (۶۰/۲۴) بالاتر بود. در مطالعه Alavi و همکاران (۲۰۱۷) نیز افزودن کلرلا به روغن و افزایش غلظت آن سبب افزایش IP شد که این امر را ناشی از آزادسازی بسیار بالای ترکیبات زیست فعال از کلرلا دانستند که می تواند در مورد نانوکلوپسیس نیز صادق باشد.

با توجه به نتایج، تیمارهای دریافت کننده عصاره جلبک، فاکتور حفاظتی و قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری در مقایسه BHT داشتند که نشان می دهد عصاره جلبکی در هر سه غلظت ۳۵۰، ۵۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به خوبی می توانند جایگزین ترکیبات سنتتیک باشند. Golmakani و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی تأثیر عصاره جلبکی *Arthrospira platensis* بر پایداری اکسیداتیو روغن ماهی کیلکا (*Clupeonella cultriventris*) *caspia* ضمن بیان روند افزایشی فرآیند اکسیداسیون، حضور مواد آنتی اکسیدانی فنولی موجود در جلبک را عامل کاهش پراکسید و Totox value در روغن کیلکا معرفی کردند. فنول های موجود در عصاره جلبکی، آنتی اکسیدانی های موثری برای اسیدهای چرب چند غیراشباعی هستند و در واقع، با دادن اتم هیدروژن به

¹ Anisidine Value

AOAC., 1990. Official methods of analysis. AOAC, Arlington, VA: Washington DC, USA.

AOAC., 2002. Official methods of analysis of the association of the official analysis chemists. Association of Official Analytical Chemists, (14th ed.), Washington, DC New

Babakhani Lashkan, A., Rezaei, M., Rezaei, K. and Seifabadi, S.J., 2013. Use of *Sargassum brown algae extract (Angustifolium Sargassum)* as an antioxidant in keeping minced meat of common *Kilka Cultiventris clupeonella* in the refrigerator. *Shilat Magazine. Iranian Journal of Natural Resources*, 6: 1-13.

Belkouch, M., Hachem, M., Elgot, A., Van, A.L., Picq, M., Guichardant, M. and Bernoud-Hubac, N., 2016. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional biochemistry*, 38: 1-11. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.03.002

Bimbo, A.P., 1998. Guidelines for Characterizing Food-Grade Fish Oils. *International News on Fats. Fish Oils*, 9: 473-48. DOI: 10.3390/foods10071566

Boran, G., Karach, and Boran M., 2006. *Food Chemistry*. p. 94 L4 693698

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5

رادیکال‌های پروکسیل، آن را تبدیل به فرم آریلوکسیل^۱ می‌کنند که توانایی عملکرد به عنوان حامل زنجیره و جفت شدن با سایر رادیکال‌ها را ندارد و در نتیجه، مهار واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد می‌گردد (Khatoun et al., 2014). نتایج نشان داد که تفاوت در میزان پارامترهای مرتبط با اکسیداسیون در نمونه روغن حاوی عصاره جلبک نانوکلوپسیس در مقایسه با شاهد می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در روغن ماهی تون مکمل شده باشد، زیرا حضور ترکیبات فلاونوئیدی (۳۹/۲۳ mg/gGAE در جلبک نانوکلوپسیس) و فلاونوئیدی (۴/۴۵ mg/gQE در جلبک نانوکلوپسیس) در ترکیب روغن سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تفاوت در دیاگرام اکسیداسیون این تیمارها در مقایسه با شاهد شده است. در مطالعه Alavi و همکاران (۲۰۱۶) حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در جلبک را عامل توانایی بالقوه روغن زیتون در برابر اکسیداسیون معرفی کردند. یافته‌ها نشان داد زمان ۱۲۰ دقیقه، دمای استخراج ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت حلال به ماده خشک (۳۰ میلی‌لیتر بر گرم) بهترین شرایط برای استخراج عصاره هیدرولیکی جلبک نانوکلوپسیس با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. افزایش دما سبب کاهش و افزایش نسبت حلال به ماده خشک و زمان استخراج سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبکی استخراج شده، گردید. بدین ترتیب، غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره جلبکی نانوکلوپسیس دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با شاهد و BHT، جهت مهار افزایش شاخص‌های اکسیدانی پراکسید، TBA و p-anisidine بود.

منابع

Alavi, N. and Golmakani, M.T., 2017. Improving oxidative stability of olive oil: Incorporation of *Spirulina* and evaluation of its synergism with citric acid. *Grasas Y Aceites*, 68: 1-11. DOI: 10.3989/gya.0940162

¹ Aryloxyl

- Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F. and Quek, S.Y., 2013.** Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *Journal of Food Engineering*, 117, 505-512. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.011
- Chouliara, I., Savvaidis, I., Panagiotakis, N. and Kontominas, M., 2004.** Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets by irradiation: microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology*, 21: 351-359. DOI:10.1016/S0740-0020(03)00065-0
- Christie, W.W., 1973.** Lipid analysis: isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Oxford: Pergamon. p. 261-9.
- Codex Alimentarius Commission, 2001.** Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius: Fats, Oils and Related Products, Vol. 8, Food & Agriculture Organization, Rome, Italy.
- Colla L, Bertol, C.D., Ferreira, D.J., Bavaresco J. and Costa, J.A.V., 2017.** Thermal and photo-stability of the antioxidant potential of *Spirulina platensis* powder. *Brazilian Journal of Biology*, 77 (2): 332-339. DOI: 10.1590/1519-6984.14315
- Deng, R. and Chow, T.J., 2010.** Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, 28 (4):33-45. DOI: 10.1111/j.1755-5922.2010.00200.x.
- Erickson, M.A., 2008.** Lipid oxidation of muscle foods. In: Akoh, C.C., Min, D.B. (3rd Eds.), *Food Lipids*, Marcel Dekker. New York. pp. 299-320.
- Frankel, E.N., 2012.** Lipid Oxidation. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. 470 p.
- GOED (Global Organization for EPA and DHA Omega-3s), 2018.** About EPA and DHA. <http://www.goedomega3.com/aboutepa-and-dha>, March 19, 2018
- Golmakani, M., Moosavi-Nasab, M., Keramat, M. and Mohammadi, M.A., 2018.** *Arthrospira platensis* Extract as a Natural Antioxidant for Improving Oxidative Stability of Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) Oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18:1315-1323. DOI: 10.4194/1303-2712-v18_11_08
- Grassi, T., Sedlacek- Bassani, J. and Ponsano, E., 2020.** Oxidative stability of tilapia feeds containing *Saccharomyces cerevisiae* and *Spirulina platensis*. *Animal Production*, 50:1-5. DOI: 10.1590/0103-8478cr20190344
- Haliloğlu, H.I., Bayir, A., Sirkecioğlu, A.N., Aras, N.M. and Atamanalp, M., 2019.** Comparison of fatty acid composition in some tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) living in seawater and freshwater. *Food Chemistry*, 86: 55-59. DOI:10.1016/j.foodchem.2003.08.028
- Harith, Z.T., Yusoff, F. M. and Mohamed, M.S., 2009.** Effect of different flocculants

- on the flocculation performance of microalgae, *Chaetoceros calcitrans*, cells. *African Journal of Biotechnology* 8 (21): 5971-5978. DOI:10.5897/AJB09.569
- Jafarpour, A., Sharifi, A. and Hosseini, M.H. 2017.** Stability and control of oxidation rate of rainbow trout oil in nanocapsules containing clove essential oil (*Syzygium aromaticum*). *Iranian Journal of Fisheries*, 26: 68-57. DOI: 20.1001.1.10261354.1396.26.6.7.4
- Jalili, S.H., Farhoosh, R., Koocheki, A. and Motallebi, A., 2019.** Microencapsulated Kilka fish oil stability using functional properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin hydrolysate. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 27: 76- 86. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118228
- Karim, B., Rezaei, M. and Bahramifar, N., 2016.** A comparison of yield and quality of the oil extracted from common kilka sprat (*Clupeonella cultriventris caspia*, Svetovidov, 1952) of the Caspian Sea with methods of wet reduction, soxhlet, supercritical fluid and ultrasound. Master's thesis. Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.
- Khatoon, H., Rahman, N.A., Banerjee, S., Harun, N., Suleiman, S., Zakaria, N., Lananan, F., Hamid, S. and Endut, A., 2014.** Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 95: 11-18. DOI:10.1016/j.ibiod.2014.06.022
- Lupoae, P., Cristea, V., Borda, D., Lupoae, M., Gurau, G. and Dinica, R.M., 2015.** Phytochemical Screening: Antioxidant and Antibacterial properties of Patampogeton species order to obtain valuable feed additives. *Journal of Oleo Science*, 64: 1111-1123. DOI: 10.5650/jos.ess 15023.
- Mahmoodi, V., Keramat, J., Hojjatoleslami, M. and Molavi, H., 2017.** Fatty acid profile and Quality of the oil extracted from Tuna Fish (*Katsuwonus pelamis*, *Thunnus albacares*) precooking liquid waste in canning factories. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 70: 293-304.
- McCune, L.M. and Johns, T., 2017.** Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacology*, 82: 197-205. DOI: 10.1016/s0378-8741(02)00180-0.
- Mousavipour, N., Bahaei, S., Moghimipour, E. and Moosavi-Nasab, M., 2021.** Effect of Caulerpa sp. extract on improving the oxidation intensity of rainbow trout waste oil during storage at room temperature. *Journal of Fisheries*, 74 (2): 165- 179. DOI: 10.22059/jfisheries.2021.321311.1240.
- Nahvi, Z. and Babakhani, A., 2016.** Optimization of extraction of antioxidant compounds of brown algae (*Sargassum angustifolium*) with heat reflux. *Aquatic*

- exploitation and breeding*, 5: 14-1. DOI: 20.1001.1.2345427.1395.5.3.1.0.
- Namiki, M., 2017.** Antioxidant/antimutagens in food science and nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29: 273-300. DOI: 10.1080/10408399009527528
- Ohse, S., Derner, R., Ozorio, R., Correa, R., Furlong, E. and Cunha, P., 2015.** Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *IDESIA (Chile)*, 33: 93-101. DOI:10.4067/S0718-34292015000100010
- Omidi, S.H., Sarhadi, H. and Shahdadi, F., 2018.** Improvement of the Oxidative Stability of Sesame Oil Using Spirulina as a Natural Antioxidant. *Journal of Nutrition and Food Security*, 3(4): 209-217. DOI:10.18502/JNFS.V3I4.165; Corpus ID: 91309199.
- Oujifard, A., Bagheri, D. and Zamani, L., 2021.** Antioxidant effects of red alga (*Gracilaria corticata*) ethanol extract on the Shelf-life of *Scomberomorus guttatus* fish fillet stored at 4 °C. *Journal of Fisheries*, 74 (2): 281-293. DOI: 10.22059/jfisheries.2021.317558.1223.
- Pazouki, J., Alijani, A., Tehrani, D. and Shokri, M., 2012.** Gelatin and Oil Extraction from Skin of Three Tuna Fish Species of Persian Gulf. *Fisheries Journal*, 65: 15-25. DOI: 10.22059/JFISHERIES.2012.24866
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sinerio, J. and Josea, N.M., 2005.** Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2111-2117. DOI: 10.1021/jf0488110.
- Rubio-Rodriguez, N., de-Diego-Rupérez, S., Beltran, S., Jaime, I., Sanz, M.T. and Rovira, J., 2008.** Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis Merluccius paradoxus*) byproducts: study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *Journal of Supercritical Fluids*, 47: 215-226. DOI: 10.1016/j.supflu.2008.07.007.
- Rusak, G., Komes, D., Likic, S., Horzicb, D. and Kovac, M., 2008.** Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110: 852-858. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.02.072
- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., 2005.** Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides* subs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28: 1892-6. DOI: 10.1248/bpb.28.1892
- Shehzad, Q., Rehman, A., Jafari, S.M., Zuo, M., Khan, M.A., Ali, A., Khan, S., Karim, A., Usman, M., Hussain, A. and Xia, W., 2021.** Improving the oxidative stability of fish oil nanoemulsions by co-encapsulation with curcumin and

- resveratrol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 199: 111481-111490. DOI: org/10.1016/j.colsurfb.2020.111481
- Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D.M., 2007.** Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81: 200-208. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021.
- Taati Keley, M.H., Shabanppour, B. and Ojagh, M., 2018.** Production of DHA-High Dosage Fish Oil from Tuna by-Products by Coupling of Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Supercritical Fluid Chromatography (SFC). *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 13: 31-40.
- Venugopal, V., 2009.** Marine products for healthcare: function and bioactive nutraceutical compound from the ocean. CRC Press Taylor and Francis Group; Boca Raton, FL, USA, pp. 23-50.
- Vieira, T.M.F.S., Marisa, A.B. and Regitano-d, A., 2001.** Canola oil thermal oxidation during oven test and microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, 34: 215-221. DOI: 10.1006/fstl.2000.0735
- Wanasundra, U.N. and Shahidi, F., 1996.** Stabilization of seal blubber and menhaden oils by green tea catechins extracts. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73: 1183-90. DOI: 10.1007/BF02523382.
- Wang, X., Yang, X., Chen, S., Li, Q., Wang, W., Hou, C., Gao, X., Wang, L. and Wang, S., 2016.** Zinc oxide Nanoparticles affect biomass accumulation and photosynthesis in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-9. DOI: 10.3389/fpls.2015.01243
- Zhang, B., Ma, L.K., Deng, S.G., Xie, C. and Qiu, X.H., 2015.** Shelf-life of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by weakly acid ice electrolyzed waterice-glazing and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 51: 114-121. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.11.016

Oxidation control of tuna (*Thunnus albacares*) liver oil using *Nannochloropsis oculata* extract by a response surface analysis

Sharifi Asl M.¹; Roomiani L.^{2*}

*l.roomiani@yahoo.com

1-Department of Chemistry Engineering, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2-Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Abstract

In this study, in the first phase, the optimum extraction conditions of the extract (temperatures of 50, 70 and 90°C, duration of 20, 70 and 120 min and the ratio of dry matter to solvent of 10, 20 and 30 mL/g) algae *Nannochloropsis oculata* was examined. The antioxidant activity of the algal extracts in the first phase was calculated by measuring the radical inhibitory power of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). In the second phase, the effect of adding the hydroalcoholic extract of *N. oculata* at 0, 350, 550 and 1000 mg/L in reducing the antioxidant activity of tuna oil was investigated. Treatment time of 120 minutes, temperature of 70°C, and dry matter to solvent ratio of 30 ml/g had the highest efficiency of the extract in terms of free radical scavenging.. The storage time was 56 days and the parameters of peroxide, TBA, and *p*-anisidine was measured in the tuna oil on 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days. The highest antioxidant power was measured at 1000 mg/L (85.45±0.55%). The index values of peroxide, TBA, and *p*-anisidine of the tuna oil had an increasing trend with increasing in the storage time and reached its highest levels on day 56. The control group had the highest and the fish oil treatment 1000 mg/L hydrochloric extract of *N. oculata* had the lowest levels of oxidative indices. According to the results of treatments receiving hydroalcoholic extract of algae *Nannochloropsis* protective factor and antioxidant power compared to BHT, which shows that algal extract in all three concentrations of 350, 550 and 1000 mg/L can be well replaced with synthetic compounds.

Keywords: Optimization, Antioxidant activity, Hydroalcohol extract, *Nannochloropsis oculata*, Yellowfin tuna oil

*Corresponding author