

## بررسی و تولید پنیر فراسودمند حاوی روغن ماهی کیلکای دریای خزر

سیدرضا حجازیان<sup>۱\*</sup>

۱- بخش علوم و صنایع غذایی، اداره کل استاندارد مازندران، ساری، ایران  
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۱۹)

### چکیده

هدف از این پژوهش ریزپوشانی روغن ماهی کیلکای دریای خزر و بکارگیری آن در پنیر برای تولید فرآورده فراسودمند بود. ماهی کیلکا یکی از فراوانترین و صنعتی‌ترین گونه‌های ماهی دریای خزر می‌باشد که علی‌رغم مزایای متعدد سلامتی بخش، سهم ناچیزی از صید آن برای مصرف انسان استفاده می‌شود و بیشتر برای خوراک طیور بکار می‌رود. اسیدهای چرب روغن ماهی کیلکای مورد استفاده در این پژوهش علاوه بر دارا بودن اسیدهای چرب مریستیک ( $3/74 \pm 0/04$  درصد)، پالمیتیک ( $19/97 \pm 0/06$  درصد)، پالمیتولئیک ( $4/81 \pm 0/06$  درصد)، استئاریک ( $4/2 \pm 0/03$  درصد) و لینولئیک ( $21/67 \pm 0/05$  درصد)، دارای مقادیر قابل توجه اسیدهای چرب بلند زنجیر شامل ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) ( $6/6 \pm 0/04$  درصد)، دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) ( $16/83 \pm 0/06$  درصد) بود. مقادیر ۱ و ۲ درصد روغن ماهی کیلکا همراه با مواد پوششی به شیر اضافه و با استفاده از خشک کن پاششی به پودر تبدیل شد. دو تیمار پنیر فراسودمند با افزودن ۵ درصد از پودرهای تولید شده تهیه گردید. آزمون‌های کلی‌فرم، اشربشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت، کپک و مخمر و سالمونلا نیز انجام شد که تمامی پنیرها در محدوده مجاز استاندارد ملی ایران قرار داشتند. با افزودن روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده به پنیر، امکان تولید فرآورده‌هایی وجود دارد که با دارا بودن  $0/2 \pm 0/042$  درصد،  $0/32 \pm 0/056$  درصد ایکوزاپنتانوئیک اسید و  $0/37 \pm 0/028$  درصد و  $0/66 \pm 0/042$  درصد دوکوزاهگزانوئیک اسید، بخشی از نیازهای تغذیه‌ای روزانه مصرف کنندگان را رفع می‌نمایند. رنگ و بوی پنیرهای فراسودمند با نمونه پنیر شاهد اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند. هرچند طعم دو نوع پنیر فراسودمند تولید شده با نمونه پنیر شاهد اختلاف معنی‌دار آماری ( $P < 0/05$ ) داشت اما هر دو در گروه خوب قرار گرفتند. از لحاظ ارزیابی حسی کلی نیز، نمونه‌های پنیر در روزهای ۰، ۱۵ و ۳۰ پس از تولید مورد بررسی قرار گرفتند که در این فواصل با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند.

کلید واژگان: پنیر، روغن، ریزپوشانی، فراسودمند، کیلکا

\* مسئول مکاتبات: Hejazian\_r@yahoo.com

## ۱- مقدمه

و حمل و نقل و نگهداری محصول را نیز تسهیل می‌نماید [۹]. انتخاب صحیح مواد پوشش دهنده برای کارایی امولسیون و پایداری ریز کپسول تولید شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. رایج‌ترین ترکیبات برای استفاده به عنوان ترکیبات دیواره در فرآیند ریزپوشانی روغن ماهی، ژلاتین و پروتئین‌های شیر است [۱۰ و ۱۱]. پروتئین‌های شیر به میزان زیادی در صنعت غذا به عنوان امولسیفایر مورد استفاده قرار می‌گیرند. چراکه هم پایداری امولسیون‌های روغن در آب را افزایش می‌دهند و هم اکسایش چربی را محدود می‌نمایند [۱۲ و ۱۳]. کازئین و پروتئین‌های شیر ظرفیت بالایی در جذب آب، خصوصیات امولسیون‌کنندگی چربی دارند و مهمتر از همه اینکه بی مزه هستند [۱۴]. پنیر یک محصول لبنی است که ارزش تغذیه‌ای بالایی دارد که از گذشته به روش‌های سنتی تولید می‌شده است. پنیر از نظر اسیدهای چرب ضروری فقیر است [۱۵]. با توجه به اینکه مصرف اسیدهای چرب ضروری در رژیم غذایی احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی را کاهش می‌دهد این مطالعه، ابتدا بخشی از چربی شیر با روغن ماهی کیلکای دریای خزر جایگزین شد. تبدیل شیر به پودر با استفاده از خشک کن پاششی انجام شد و استفاده از پودر تهیه شده در فرمولاسیون نوعی پنیر فراسودمند مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد

روغن ماهی کیلکای از شرکت تولید روغن (نوشدارو، ایران) تهیه شد. تمامی مواد شیمیایی و محلول‌ها از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

## ۲-۲- روش‌ها

## ۲-۲-۱- آماده‌سازی امولسیون و تولید پودر

فرآیند ریزپوشانی با تهیه امولسیون آغاز شد و شیر (۱/۱ چربی) به عنوان ماده پایه برای ساخت امولسیون استفاده شد. امولسیون‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و فشار ۱۸ MPa با استفاده از هموژنایزر (Albertslund, Denmark) و مطابق با جدول ۱ تهیه شدند. یک خشک کن پاششی کوچک ساخت شده در شرکت به‌سوزان (بابل، ایران) با ابعاد ۲/۲۷×۲ متر برای تبدیل امولسیون به پودر ریزپوشانی شده مورد استفاده قرار گرفت. دمای ورودی ۱۴۲ درجه سانتیگراد و دمای خروجی ۷۰

مصرف اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید<sup>۱</sup> (C20:5 n-3) و دوکوزاهگزانوئیک اسید<sup>۲</sup> (C22:6 n-3) که به وفور در غذاهای دریایی یافت می‌شوند، مزایای متعددی از جمله رشد و بهبود عملکرد سیستم عصبی (مغز) و بینایی، محافظت از سلول‌ها در برابر بسیاری از بیماری‌ها از جمله قلبی-عروقی، سرطان سینه، پروستات و عیوب مغزی مانند آلزایمر را دارا می‌باشند [۳-۱]. اثرات سلامتی بخش روغن ماهی باعث شده است که این روغن کاربردهای فراوانی در مواد غذایی، دارویی و بهداشتی پیدا کند. ماهی کیلکا که زیستگاه آن نواحی مرکزی و جنوبی دریای خزر می‌باشد، یکی از فراوان‌ترین و صنعتی‌ترین گونه‌های ماهی است. بخش ناچیزی از صید این ماهی به منظور مصرف انسان انجام می‌شود که به ترتیب برابر ۹-۳ درصد در استان گیلان و ۱۲-۵ درصد در استان مازندران می‌باشد. در مقابل، مقدار قابل توجه باقیمانده صید ماهی کیلکا، جهت خوراک طیور انجام میشود [۴]. در سال ۱۳۹۵، میزان صید ماهیان کیلکا ۱۴۰۰۰ تن بوده است که ۷۵۰ تن به مصرف انسانی و مابقی جهت تبدیل به پودر ماهی به کارخانجات و صنایع مرتبط شیلاتی ارسال شده است. روغن ماهی که در این کارخانجات به دست می‌آید یک محصول جانبی با ارزش تجاری پایین محسوب می‌شود [۵]. در حالی که مطالعات نشان داده است این ماهی کوچک حاوی اسیدهای چرب چند غیر اشباع و همچنین امگا-۳ می‌باشد [۱ و ۶]. نسبت بین ۵۶:۳ یکی از شاخص‌های رژیم غذایی است. این نسبت در محدوده ۵-۱ به عنوان معیار سلامتی بخش توصیف می‌گردد [۷] که در این خصوص روغن ماهی کیلکا با داشتن نسبت مناسب ۵۶:۳ دارای مزیت است [۱ و ۸]. متاسفانه روغن ماهی کیلکا دارای طعم و بوی نامطلوبی است که استفاده از آن را در فرمولاسیون مواد غذایی محدود می‌سازد و نیازمند بکارگیری فرآیندهای اصلاحی جهت تسهیل مصرف می‌باشد. یکی از تدابیری است که در صنعت غذا برای محافظت اسیدهای چرب چند غیراشباع حساس به اکسیداسیون در طی فرآوری و نگهداری، بکار می‌رود، استفاده از تکنولوژی ریزپوشانی است. بعلاوه، ریزپوشانی منجر می‌شود محصول نهایی عاری از هرگونه بو و طعم نامطلوب ماهی باشد

1. Ecosa Pentanoic Acid (EPA)  
2. Docosa Hexanoic Acid (DHA)

درجه سانتیگراد بر دقیقه افزایش پیدا کرد و در این دما ۱۵ دقیقه نگه داشته شد. از گاز نیتروژن با سرعت متوسط ۱۸ سانتیمتر بر ثانیه و نرخ ۰/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان حامل استفاده شد. جهت تزریق نمونه از اسپلیت با نسبت ۱:۱۰۰ استفاده شد.

#### ۲-۲-۴-آزمون‌های شیمیایی

اندازه‌گیری مواد جامد، مقدار پروتئین و چربی مطابق با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۱۳۸۶۳ انجام شد [۱۹]. pH نمونه‌های پنیر بوسیله pH متر ( Metrohm 744, Switzerland) اندازه‌گیری شد. اسیدیته و pH با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ اندازه‌گیری شد [۲۰]. اندازه‌گیری رطوبت کپسول‌های پودر شده مطابق با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۸۷۸۱ انجام شد [۲۱]. اسیدیته روغن ریزپوشانی شده مطابق با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۸ انجام شد [۲۲].

#### ۲-۲-۵-آزمون میکروبیولوژی

آزمون‌های میکروبی بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۴۰۶ انجام شد [۲۳]. آزمون کلی‌فرم مطابق با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲۶۳ انجام شد [۲۴]. شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی با استاندارد ملی ایران به شماره ۵۲۷۲-۱ انجام شد [۲۵]. آزمون اشرشیاکلی مطابق با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۲۹۴۶ انجام شد [۲۶]. آزمون استافیلوکوکوس اورئوس کوآگولاز مثبت با روش استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۰۶-۱ انجام شد [۲۷].

#### ۲-۲-۶-ارزیابی حسی

ویژگی‌های حسی نمونه‌ها شامل رنگ، بو و طعم توسط ۲۰ ارزیاب آموزش دیده از طریق آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای و با تکمیل فرم‌های طراحی شده انجام شد. به این ترتیب نمره ۵، ۴، ۳، ۲ و ۱ به ترتیب به نمونه‌های پنیر بسیار خوب، خوب، متوسط، بد و خیلی بد اختصاص داده شد [۲۸]. نمونه‌ها در ظروف دارای کد شناسایی آماده شدند. فرم‌ها پس از تکمیل توسط ارزیابان جمع‌بندی و امتیاز حسی هر نمونه محاسبه گردید.

#### ۲-۳-تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده از آزمون‌های مختلف با استفاده از روش آنووا در نرم افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان

درجه سانتیگراد بود. کپسول‌ها جمع‌آوری شدند و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ در دمای اتاق برای آنالیزهای بعدی نگهداری شدند [۱۶].

**Table 1** Emulsion for powder production

Composition (%)	Code		
	A	B	C
Milk	95	94	100
Kilka fish oil	1	2	-
Sodium caseinate	2	2	-
Pectin	1.93	1.93	-
Lecithin	0.07	0.07	-

#### ۲-۲-۲-تولید پنیر فراسودمند

پنیر اولیه با استفاده از شیر پاستوریزه ۱٪ چربی (کاله آمل، ایران) تهیه شد. ابتدا دمای شیر به ۴۰ درجه سانتیگراد رسانده شد و سپس ۱٪ رنت و ۰/۲٪ کلرید کلسیم به طور یکنواخت به شیر اضافه شد. به منظور کارایی بهتر رنت دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از گذشت یک ساعت، لخته‌های تشکیل شده برش داده شدند و آب پنیر خارج گردید. تیمارها با افزودن ۱/۵٪ نمک و ۵٪ روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده تهیه شدند. تیمارهای مورد بررسی در پژوهش شامل پنیر شاهد بدون روغن کیلکای ریزپوشانی شده (C)، پنیر با ۵٪ روغن کیلکای ریزپوشانی شده حاوی ۱٪ روغن کیلکا (A) و پنیر با ۵٪ روغن کیلکای ریزپوشانی شده حاوی ۲٪ روغن کیلکا (B) آماده گردیدند. پس از اختلاط نهایی پنیرها مطابق با دستورالعمل ساخت پنیر ایرانی جهت آگیری به مدت ۶ ساعت تحت فشار ده کیلوگرمی قرار گرفتند و سپس پنیرها در ظروف پلی اتیلنی بسته بندی شده و برای آنالیزهای بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند [۱۷].

#### ۲-۳-۲-روش آزمون اسیدهای چرب روغن ماهی کیلکا

ابتدا روغن به استرهای متیل اسید چرب، ترانس استریفیه شد و سپس شناسایی اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی (Agilent 6890N, USA) انجام شد [۱۸]. طول، قطر داخلی و ضخامت فیلم داخلی ستون موئین مورد استفاده به ترتیب ۶۰ متر، ۰/۲۵ میلی‌متر و ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای بخش تزریق و آشکارساز (FID) نیز، به ترتیب برابر ۱۸۰ و ۲۵۰ درجه سانتیگراد بود. برنامه دمایی آن ابتدا در ۱۸۰ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ دقیقه ثابت و سپس با نسبت ۴ تا ۲۴۰

۹۵٪ ( $p < 0.05$ ) انجام شد. به منظور کاهش خطا کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم شدند.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- پروفایل اسید چرب روغن ماهی کیلکا

جداول ۲ و ۳ به ترتیب پروفایل اسیدهای چرب روغن ماهی کیلکا و پنیرهای تولید شده را نشان می‌دهد. مجموع اسیدهای چرب چند غیر اشباع و اسیدهای چرب اشباع به ترتیب ۵۴/۶۱ و ۲۷/۶۴ بدست آمد. نسبت PUFA/SFA برای روغن ماهی کیلکا که در این پژوهش برابر ۱/۹۷ بود، بالاتر از مقدار توصیه شده توسط دپارتمان سلامتی انگلستان بود. این دپارتمان نسبت مناسب PUFA/SFA را بین ۰/۴۵ تا ۰/۷۳ تعریف نموده است [۲۹]. حسینی و همکاران (۲۰۱۷) مقادیر اسیدهای چرب چند غیر اشباع و اشباع در روغن ماهی کیلکای آب شور را به ترتیب ۴۰/۶۶ و ۲۰/۵۹ درصد گزارش نمودند که از مقادیر بدست آمده در این پژوهش کمتر بود. ضمناً آنها نسبت اسیدهای چرب امگا-۶ به اسیدهای چرب امگا-۳ را ۱/۱۷ محاسبه نمودند که از مقدار بدست آمده در این پژوهش کمتر بود. مقادیر ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید در پژوهش آن‌ها به ترتیب ۷/۷۴ و ۲۸/۴۷ درصد محاسبه شد که از مقادیر بدست آمده در این پژوهش بالاتر بود [۳۰]. اختلاف در وارسته ماهی و نیز شرایط استخراج بر نوع و میزان اسیدهای چرب استخراج شده تاثیر میگذارد [۳۱]. نکته حائز اهمیت دیگر، میزان بالای ایکوزا پنتانوئیک اسید و به ویژه دوکوزا هگزانوئیک اسید در روغن ماهی کیلکا بود. شجاعی و همکاران (۲۰۰۱) مقدار اسیدهای چرب امگا-۳ روغن کیلکا را ۱۶۷۷ درصد گزارش نمودند که شامل ۱۰/۷۶ درصد دوکوزا هگزانوئیک اسید، ۲/۴۳ درصد ایکوزا پنتانوئیک اسید و ۳/۴۹ درصد اسید لینولنیک گزارش نمودند که از مقدار بدست آمده در این پژوهش کمتر است [۳۲]. مطلبی و همکاران (۲۰۱۵) نیز مجموع امگا-۳، ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید روغن ماهی کیلکا را به ترتیب ۱۹، ۵/۲ و ۱۰/۸ درصد گزارش کردند که کمتر از مقدار بدست آمده در این پژوهش بود. آن‌ها همچنین مجموع اسیدهای چرب اشباع، تک غیر اشباع و چند غیر اشباع و اسیدهای چرب خانواده امگا-۳ روغن ماهی کیلکا استخراج شده را به ترتیب ۳۳/۱۶، ۲۴/۸۳ و

۱۸/۷۸ گزارش نمودند که کمتر از مقادیر بدست آمده در این پژوهش بود [۵]. مهمترین اسیدهای چرب چند غیر اشباع امگا-۳، ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید هستند که اساساً در روغن ماهی وجود دارند [۳۳]. مطالعات مختلف توصیه کرده‌اند که مقدار روزانه ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید برای یک فرد معمولی تقریباً ۳۳۰-۱۹۰ میلی‌گرم است [۳۴]. جرجانی و همکاران (۲۰۱۴) مقادیر ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید کیلکا را به ترتیب ۶/۹۷ و ۲۰/۷۹ درصد محاسبه نمودند. نسبت امگا-۶ به امگا-۳ در پژوهش آن‌ها ۷/۵ بود که از مقدار بدست آمده در این پژوهش بالاتر بود. آنها اعلام نمودند که بیشترین اسیدهای چرب در روغن ماهی کیلکا به ترتیب اسید اولئیک، اسید پالمیتیک، دوکوزا هگزانوئیک اسید و ایکوزا پنتانوئیک اسید بود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۳۵]. ناصری و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که اسید پالمیتیک اسید چرب اشباع غالب در روغن ماهی کیلکا است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۳۶]. گوتیئرز و سیلوا (۱۹۹۳) پالمیتیک اسید را اسید چرب غالب در روغن ماهی‌های دریا و آب‌های رودخانه بیان نمودند [۳۷]. کریس‌اترتون (۱۹۹۹) اعلام نمودند که جایگزینی ۵ درصد انرژی که از اسیدهای چرب اشباع بدست می‌آید با اسیدهای چرب چند غیر اشباعی (PUFA)، بیماری‌های قلبی عروقی را کاهش می‌دهد. چون اسیدهای چرب بلند زنجیر چند غیر اشباع امگا-۳ میزان کلسترول را کاهش می‌دهند منافع تغذیه‌ای و سلامتی زیادی ایجاد می‌کنند [۳۸].

**Table 2** Main fatty acids of Kilka fish oil

Fatty acid type	Amount (Means $\pm$ standard deviations)
C14:0	3.47 $\pm$ 0.04
C16:0	19.97 $\pm$ 0.06
C16:1	4.81 $\pm$ 0.06
C18:0	4.2 $\pm$ 0.03
C18:1 n6	21.67 $\pm$ 0.05
C18:2 n6	4.7 $\pm$ 0.06
C20:5 n6 (EPA)	6.6 $\pm$ 0.04
C22:6 n3 (DHA)	16.83 $\pm$ 0.06

یه و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که امولسیون روغن ماهی با پروتئین شیر یک کمپلکس مفید برای بالا بردن سطح غنی سازی اسیدهای چرب بلند زنجیر چند غیر اشباع امگا-۳ در فرآورده‌های پنیر پروسس ایجاد می‌نماید [۱۷]. این هدف با تغییر الگوی تغذیه‌ای و اصلاح مواد غذایی که بطور طبیعی از نظر اسیدهای چرب اشباع غنی هستند با اسیدهای چرب چند

مقادیر اسیدهای چرب اشباع بوتریک (C4:0)، کاپروئیک (C6:0)، کاپریک (C8:0)، کاپریلیک (C10:0)، لوریک (C12:0)، مریستیک (C14:0)، پالمیتیک (C16:0) و استئاریک (C18:0) در نمونه پنیر شاهد بالاتر از نمونه های با چربی جایگزین شده است.

غیر اشباع حاصل می شود [۳۹]. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود بجز اسید چرب C8:0، C16:1، C18:2، C18:3، C20:1، C20:5 و C20:6 که در پنیر کنترل فاقد روغن ماهی کمتر است، سایر اسیدهای چرب در نمونه های حاوی غنی شده با روغن ماهی کمتر است. این نتایج با نتایج فتحی آچاچلوئی مطابقت دارد [۴۰]. آن ها اعلام نمودند که

**Table 3** Fatty acids of functional cheeses containing kilka fish oil

Fatty acid	A	B	C
C4:0	1.57±0.014 <sup>a</sup>	1.6±0.056 <sup>a</sup>	1.65±0.028 <sup>a</sup>
C6:0	1.28±0.028 <sup>a</sup>	1.34±0.042 <sup>a</sup>	1.38±0.014 <sup>a</sup>
C8:0	1.98±0.014 <sup>a</sup>	1.3±0.42 <sup>a</sup>	1.06±0.056 <sup>a</sup>
C10:0	2.85±0.042 <sup>a</sup>	2.87±0.014 <sup>a</sup>	2.97±0.028 <sup>a</sup>
C12:0	3.73±0.028 <sup>a</sup>	3.7±0.056 <sup>a</sup>	3.85±0.014 <sup>a</sup>
C14:0	12.65±0.042 <sup>b</sup>	12.57±0.014 <sup>b</sup>	12.87±0.028 <sup>a</sup>
C14:1	1.38±0.014 <sup>a</sup>	1.41±0.056 <sup>a</sup>	1.45±0.028 <sup>a</sup>
C16:0	32.18±0.042 <sup>a</sup>	32.02±0.056 <sup>a</sup>	32.45±0.014 <sup>a</sup>
C16:1	1.65±0.042 <sup>a</sup>	1.75±0.056 <sup>a</sup>	1.64±0.028 <sup>a</sup>
C18:0	10.1±0.042 <sup>b</sup>	10.14±0.028 <sup>b</sup>	10.34±0.014 <sup>a</sup>
C18:1	23.45±0.056 <sup>a</sup>	23.46±0.042 <sup>a</sup>	23.52±0.028 <sup>a</sup>
C18:2	3.22±0.042 <sup>b</sup>	3.39±0.014 <sup>a</sup>	3.33±0.028 <sup>a</sup>
C18:3	0.13±0.042 <sup>a</sup>	0.17±0.07 <sup>a</sup>	0.1±0.028 <sup>a</sup>
C20:0	0.68±0.028 <sup>a</sup>	0.77±0.056 <sup>a</sup>	0.78±0.014 <sup>a</sup>
C20:1	0.13±0.014 <sup>a</sup>	0.18±0.28 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>
C20:5	0.2±0.042 <sup>a</sup>	0.32±0.056 <sup>a</sup>	0±0 <sup>b</sup>
C22:6	0.37±0.028 <sup>b</sup>	0.66±0.042 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>

Different letters in the rows indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

[۴۱]. برخی محققان بیان کرده اند که مقدار اسیدیته ممکن است به علت پیشرفت هیدرولیز ناشی از رطوبت اولیه روغن، افزایش پیدا نماید [۴۲]. اما همانطور که از جدول ۴ مشخص است رطوبت پودرهای تولید شده در محدوده مجاز پودرها که بین ۴ تا ۵ درصد در منابع مختلف و از جمله استانداردهای ملی ذکر گردیده قرار داشته است که بالا رفتن اسیدیته را محدود می نماید.

### ۳-۲- ارزیابی شیمیایی پودر روغن ماهی

#### کیلکای ریزپوشانی شده و پنیر فراسودمند

رطوبت و اسیدیته کپسول های حاوی روغن ماهی تهیه و خشک شده اندازه گیری و با شیر خشک شده مقایسه شد. (جدول ۴). اختلاف معنی دار آماری در مقدار رطوبت و اسیدیته پودرهای تولید شده مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ). مقدار اسیدیته بالاتر از ۳ درصد غیرقابل خوراکی توصیف می شود

**Table 4** chemical characteristics of encapsulated Kilka fish oil

Factor	A	B	C
Moisture (%)	2.1±0.23 <sup>a</sup>	2.04±0.18 <sup>a</sup>	2.15±0.25 <sup>a</sup>
Acidity (%)	0.83±0.06 <sup>a</sup>	0.86±0.04 <sup>a</sup>	0.78±0.03 <sup>a</sup>

Different letters in the rows indicate significant differences ( $P < 0.05$ )A: Encapsulated kilka oil produced from A emulsion; B: Encapsulated kilka oil produced from B emulsion; C: Encapsulated kilka oil produced from C emulsion

شاهد که فاقد روغن دانه خرفه هستند، بالاترین pH را دارند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. آن ها همچنین نشان دادند که نمونه هایی که حاوی مقدار بالاتری از روغن در فرمولاسیون است، پروتئین کمتری دارد که همراستا با نتایج این پژوهش است.

ویژگی های شیمیایی پنیرهای تولید شده نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۵ آمده است. همانطور که مشاهده می شود نمونه های تولیدی از نظر خصوصیات شیمیایی و میزان چربی و پروتئین با یکدیگر اختلاف معنی دار آماری نداشتند. کیوانی و بلندی (۲۰۱۵) نشان دادند که نمونه پنیر

کیوانی و بلندی (۲۰۱۵) و کالیگاریس و همکاران (۲۰۱۵) می- باشد [۴۳ و ۴۴].

افزایش مقدار جایگزینی چربی با روغن ماهی منجر به افزایش میزان درصد چربی در نمونه های پنیر شد که مطابقت با نتایج

**Table 5** Chemical characteristics of functional cheeses with Kilka fish oil

Treatment	Protein (%)	Fat (%)	TSS (%)	pH
Cheese fortified with (A) powder	14.4±0.4 <sup>a</sup>	16±0.2 <sup>a</sup>	35.2±0.33 <sup>a</sup>	4.72±0.03 <sup>a</sup>
Cheese fortified with (B) powder	14.2±0.3 <sup>a</sup>	16.4±0.4 <sup>a</sup>	35.4±0.25 <sup>a</sup>	4.78±0.03 <sup>a</sup>
Cheese fortified with (C) powder	14.4±0.5 <sup>a</sup>	15.8±0.2 <sup>a</sup>	35.5±0.3 <sup>a</sup>	4.8±0.03 <sup>a</sup>

Different letters in the rows indicate significant differences (P< 0.05)

نتایج سالم و همکاران (۲۰۱۵) می باشد. آن ها روغن برگ های گیاه مورینگا اولیفر را در مقادیر ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ ppm به پنیر اضافه نمودند که نشان داده شد مقادیر مختلف روغن تاثیر در شمارش میکروبی و رشد قارچ ها نداشته است [۴۵].

### ۳-۳- آنالیز میکروبی

نتایج آزمون های میکروبی انجام شده بر روی تیمارها نشان داد که پنیرهای تولید شده مطابق با حدود مجاز تعریف شده در استاندارد ملی ۲۴۰۶ بوده است (جدول ۶). این نتایج مطابق با

**Table 6** Microbiological characteristics of functional cheeses with Kilka fish oil

Bacteria Type	Standard Count	Cheese fortified with (A) powder	Cheese fortified with (B) powder	Cheese fortified with (C) powder
Coliform	Maximum 10	<10	<10	<10
Escherichia coli	0	0	0	0
Staphylococcus coagulase+	0	0	0	0
Mold and yeast	Maximum 10	10	10	10
Salmonella in 25 gram	0	0	0	0

مشاهده گردید. در مجموع امتیاز اکتسابی برای پنیر حاوی پودر A بالاتر از پنیر حاوی پودر B اما هر دو در گروه خوب قرار گرفتند. یه و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که نمونه های پنیر غنی شده با روغن ماهی از نظر خصوصیات حسی با نمونه شاهد فاقد روغن ماهی اختلاف معنی دار آماری ندارد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۱۷]. کدیور و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که با افزایش مقدار روغن در فرمولاسیون پنیر امتیاز حسی مزه کاهش می یابد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۴۴].

### ۳-۴- ارزیابی حسی

نتایج ارزیابی حسی (جدول ۷) پنیرهای تولید شده نشان داد که در تمامی تیمارها به لحاظ رنگ تفاوت معنی داری مشاهده نشد و به لحاظ بو نیز تفاوت معنی داری بین نمونه فاقد روغن ماهی و نمونه پنیر حاوی پودر A مشاهده نگردید اما در پنیر حاوی پودر B با سایر نمونه ها تفاوت معنی دار (p<0.05) مشاهده شد. همچنین در ویژگی طعم، پنیرهای حاوی پودر A و B تفاوت معنی داری نداشتند اما با پنیر شاهد این تفاوت

**Table 7** Score of organoleptic evaluation of cheeses

Treatment	Color	Flavor	Odor
Cheese fortified with (A) powder	5±0.01a	4.6±0.59b	4.85±0.36b
Cheese fortified with (B) powder	5±0.0a	4.5±0.6b	5±0.0a
Cheese fortified with (C) powder	5±0.0a	5±0.0a	5±0.0a

داشت. این نتایج با نتایج یه و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد [۱۷]. آن ها نشان دادند که با گذشت زمان نگهداری در نمونه های پنیر حاوی روغن ماهی ریزپوشانی شده با گذشت زمان نگهداری امتیاز ارزیابی حسی کاهش می یابد. در تحقیقی که مارتینی و همکاران (۲۰۰۹) انجام دادند، ۵۰٪ چربی پنیر چدار را با مقادیر پایین اسیدهای چرب امگا-۳ (۱۸ میلی گرم ایکوزا

همچنین به لحاظ ارزیابی تغییرات احتمالی حسی برای پنیرهای تولیدی، در فواصل زمانی پس از تولید، ۱۵ روز و یک ماه پس از تولید، ارزیابی کلی صورت پذیرفت که نتایج آن به شرح جدول ۸ آمده است. همانطور که مشاهده می شود علی رغم تغییرات جزئی در پنیرهای تولیدی در بازه زمانی مورد آزمون، در مجموع ارزیابی صورت گرفته با شاخص خوب مطابقت

چرب امگا-۳ بود جایگزین نمود و تفاوت معنی‌داری بین طعم‌های پنیر غنی شده در مقایسه با نمونه‌های کنترل در طی ۲ ماه نگهداری در شرایط سرد دست یافت [۴۷]. کدیور و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که امتیاز پذیرش کلی در نمونه های پنیر حاوی روغن و نمونه شاهد فاقد روغن با هم اختلاف معنی دار آماری ندارد که همراستا با نتایج این پژوهش می باشد [۴۳].

پنتانویک اسید و ۳۵ میلی‌گرم دوکوزا هگزانویک اسید در یک وعده) غنی کردند که این نمونه در مقایسه با نمونه کنترل طعم ماهی نداشت اما بالاترین مقادیر غنی سازی (۱۸ میلی‌گرم ایکوزا پنتانویک اسید و ۳۵ میلی‌گرم دوکوزا هگزانویک اسید در یک وعده) طعم ماهی به راحتی تشخیص داده شد [۴۶]. آریانا (۲۰۰۷)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ درصد چربی شیر در پنیر چدار را با امگا-۳ خالص که یک روغن تجاری غنی از اسیدهای

**Table 8** Overall organoleptic assessment of cheeses at 0, 15 and 30 days of production

day	Cheese fortified with (B) powder	Cheese fortified with (A) powder	Cheese fortified with (C) powder
1	4.78±0.58 <sup>a</sup>	4.86±0.59 <sup>a</sup>	5±0 <sup>a</sup>
15	4.71±0.57 <sup>a</sup>	4.79±0.51 <sup>a</sup>	5±0 <sup>a</sup>
30	4.66±0.58 <sup>a</sup>	4.7±0.56 <sup>a</sup>	4.96±0.2 <sup>a</sup>

- [2] Sargent, J. R., Bell, J. G., McGhee, J., McEvoy, J. and Webster, J. L. 2001. The Nutritional Value of Fish. In: "Farmed Fish Quality", (Eds.): Kestin, S. C. and Warriss, P. D. Fishing News Books. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, PP. 3-12.
- [3] Sidhu, K. S. 2003. Health Benefits and Potential Risks Related to Consumption of Fish or Fish Oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 38, 336-344.
- [4] Motalebi A. A., and Seyfzadeh M. 2011. Effects of whey protein edible coating on bacterial, chemical and sensory characteristics of frozen common Kilka (*Clupeonelladelitula*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 11(1), 132-144.
- [5] Motalebi-Moghanjoghi, A.A., Hashemi, G., Mizani, M., Gharachorloo, M., and Tavakoli, H. R. 2015. The effects of refining steps on Kilka (*Clupeonelladelicatula*) fish oil quality. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 14(2), 382-392.
- [6] Fazel, M., Sahari, M. A., and Barzegar, M. 2008. Determination of main tea seed oil antioxidants and their effects on common Kilka oil. *International Food Research Journal*. 15, 209-217.
- [7] Osman, H., Suriah, A. R., and Law, E. C. 2001. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian water. *Food Chemistry*. 73(1), 55-60.
- [8] Prato, E., and Biondolino, F. 2012. Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. *Food Chemistry*. 131, 1233-1239.

## ۴- نتیجه گیری

این تحقیق نشان داد که ریزپوشانی روغن ماهی کیلکا بو و طعم نامطبوع آن را می‌پوشاند. با افزودن روغن کیلکا به شیر و سپس تبدیل آن به پودر با خشک کن پاششی، امکان بهره‌مندی از اسیدهای چرب امگا-۳، ایکوزا پنتانویک اسید و دوکوزا هگزانویک اسید به عنوان یک نیاز روزانه فراهم می‌گردد. این محصول حد واسط را می‌توان به برخی مواد غذایی مانند پنیر اضافه نمود. پنیر به عنوان یکی از محصولات لبنی مصرف بالایی داشته و از طریق غنی‌سازی، ارزش تغذیه‌ای آنها افزایش پیدا می‌کند. با این استراتژی تغذیه‌ای مفید، روغن کیلکا از یک محصول فرعی با اهمیت تجاری پایین می‌تواند به یک منبع با ارزش اسیدهای چرب امگا-۳ برای مصرف انسان تبدیل شود. اسید اولئیک بیشترین اسید چرب تشکیل دهنده روغن ماهی است. جایگزینی روغن ماهی با چربی شیر در رژیم غذایی خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی را کاهش می‌دهد. با توجه به نتایج ارزیابی‌های حسی امکان عملی شدن جایگزینی روغن ماهی ریزپوشانی شده با چربی شیر برای تولید پنیر و تهیه محصول لبنی فراسودمند وجود دارد.

## ۵- منابع

- [1] Pirestani, S., Sahari, M.A. and Barzegar, M. 2010. Fatty Acids Changes during Frozen Storage in Several Fish Species from South Caspian Sea. *Journal of Agriculture Science and Technology*. 12, 321-329.

- [20] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 2852. 2006. Milk and milk products-Determination of titrable acidity and value pH- Test method. 21P.
- [21] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 8781. 2006. Dried milk - Determination of moisture content (Reference method). 14 P.
- [22] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 4178. 2012. Animal and vegetable fats and oils - Determination of acid value and acidity - Test method. 11P.
- [23] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 2406. 2008. Microbiology of milk and milk products-Specifications. 7 P.
- [24] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 9263. 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. 1st. edition.
- [25] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 5272-1. 2015. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique. 1st. edition.
- [26] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 2946. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* -Most probable number technique.2nd. revision.
- [27] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 6806-1. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (*staphylococcus aureus* and other species) – Test method Part 1 :Technique using baird – parker agar medium. 1st. edition.
- [28] Lawless, H. T., and Hymann, H. 1998. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practises. New York, NY: Chapman and Hall. 606-608.
- [29] HMSO, UK (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and social subjects No. 46). London: HMSO.
- [30] Hosseini, H., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., and Jafari, S. M. 2017. Evaluating properties of oils extracted from fish by-products pretreated in various conditions. *Journal of Food Science and Technology*. 65, 14, 36-49 [In Persian].
- [9] Yolande, L., Yep, D., Li, N., Mann, J., Ortwin, B., and Sinclair, A. J. 2002. Bread enriched with microencapsulated tuna oil increases plasma docosahexaenoic acid and total omega-3 fatty acids in humans. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 11(4), 285–291.
- [10] Vega, C., Kim, E. H. J., Chen, X. D., and Roos, Y. H. 2005. Solid-state characterization of spray-dried ice cream mixes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 45, 66–75.
- [11] Turgeon, S.L., Schmitt, C. and Sanchez, C. 2007. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 12, 166–178.
- [12] Faraji, H., McClements, D. J., and Decker, E. A. 2004. Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4558–4564
- [13] Hu, M., McClements, D. J., and Decker, E. A. 2003. Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 1696–1700.
- [14] Day, L., Xu, M., Hoobin, P., Burgar, I., and Augustin, M. A. 2007. Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. *Food Chemistry*. 105, 469–479.
- [15] Aminifar, M., Hamed, M., Emamjomeh, Z., and Mehdinia, A. 2010. Microstructural, Compositional and Textural Properties during Ripening of Lighvan Cheese, A Traditional Raw Sheep Cheese. *Journal of Texture Study*. 41, 579–593.
- [16] Let Mette, B., Jacobsen, C., and Meyer. A. S. 2004. Effects of fish oil type, lipid antioxidants and presence of rapeseed oil on oxidative flavor stability of fish oil enriched milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 106, 170–182.
- [17] Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., and Singh, H. 2009. Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International*. 42, 1093-1098.
- [18] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 13126-2. 2016. Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl esters-Part 2:Preparation of fatty acid methyl esters. 17 P.
- [19] ISIRI (Institute of Standard and Industrial Researches of Iran). No. 13863. 2011. Lactic cheese- Specifications and test methods. 7 P.



- (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*. 61, 200-207.
- [40] Fathi-Achachlouei, B., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S.H., and Esmaili, M. 2013. Manufacture of functional cheese using olive and canola oils. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 8(1), 25-34.
- [41] Gracey, J. F., Collins, D. S. and Huey, R. 1999. *Fat Rancidity*. Harcourt Brace and Co. Ltd, UK 10th ed.: 407 in *Meat hygiene*.
- [42] Yin, H. and S. Sathivel. 2010. Physical Properties and Oxidation Rates of Unrefined Menhaden Oil (*Brevoortia patronus*). *Journal of Food Science*. 75(3), 163-168.
- [43] Keyvani, M. and Bolandi, M. 2015. Physicochemical and Organoleptic Properties of Lighvan Cheese Fortified with Protulaca Oleracea Seed Oil. *Journal of Chemical Health Risks*. 5(1), 21-27
- [44] Calligaris, S., Ignat, A., Biasutti, M., Innocente, N., and Cristina-Nicol, M. 2015. Cheese fortification using saturated monoglyceride self-assembly structures as carrier of omega-3 fatty acids *International Journal of Food Science and Technology*. 50, 2129-2134.
- [45] Salem, A. S., Salama, W. M. and Ragab, W. A. 2015. Prolonged Shelf Life of Sour Cream by Adding Moringa oleifera Leaves Extract (MOLE) or Moringa oleifera Oil (MOO). *American Journal of Food Technology*. 10, 58-67.
- [46] Martini, S., Thurgood, J. E., Brotherson, C., Ward, R., and McMahon, D. J. 2009. Fortification of reduced-fat Cheddar cheese with n-3 fatty acids: effect on off-flavor generation. *Journal of Dairy Science*. 92, 1876-1884.
- [47] Aryana, K. J. 2007. Cheddar cheese manufactured with oil high in omega-3 fatty acids. *Milchwissenschaft*. 62, 167-170.
- [31] Hearn, T. L., Sgoutas, S. A., Hearn, J. A. and Sgoutas, D. S. 1987. Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. *Journal of Food Science*. 52, 1209-1211.
- [32] Shojaei, A. H., Gholamipour, S., Salmani, A. and Safari, R. 2001. Kilka oil assessment for edible purposes. *Ecological Research Center of the Caspian sea, Iranian Fisheries Science Research Institute [in Persian]*.
- [33] Hooper, L., Thompson, R.L., Harrison, R.A., Summerbell, C.D., Moore, H. 2004. Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database System*. 18(4), 33-37.
- [34] American Heart Association Nutrition Committee, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, et al. (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114. 82-96.
- [35] Jorjani, S., Khanipour, A. A., and Ghelichi, A. 2014. Chemical composition and fatty acid profile of common Kilka, *Clupeonella cultriventris caspia* Caspian. *Journal of Environmental Science*. 12(1), 119-128.
- [36] Naseri, M., Rezaei, M. and Abasi, M. 2010. Lipid changes during long-term storage of canned common Kilka (*Clupeonella cultriventris*). *Journal of Fisheries. Iranian Journal of Natural Resources*. 63(3), 229-242 [In Persian].
- [37] Gutierrez, L.E. and da Silva, R. C. M. 1993. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. *Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)*. 50 (3), 478-483.
- [38] Kris-Etherton, P. M. 1999. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *American Heart Association. Nutrition Committee. Circulation*, 100: 1253-1258.
- [39] Lopez-Huertas, E. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids

## Investigation and production of functional cheese containing Caspian Kilka fish oil

Hejazian, S. R. <sup>1\*</sup>

1. Food science and industry, Mazandaran administration of Standard, Sari, Iran

(Received: 2017/11/27 Accepted:2018/01/08)

The aim of this research was encapsulating of Caspian Kilka fish oil and its application in cheese to produce functional product. Kilka fish is one of the most abundant and most industrial fish species in the Caspian Sea that despite its many health benefits, it has a small share of its catch for human consumption and is used most for poultry feed. The fatty acids of Kilka fish oil used in this study, in addition to having myristic ( $3.74 \pm 0.04$ ), palmitic ( $19.97 \pm 0.06$  %), palmitoleic ( $4.81 \pm 0.06$  %), stearic ( $4.2 \pm 0.03$  %), and linoleic fatty acids ( $21.67 \pm 0.05$ ), have significant amounts of long chain fatty acids, including eicosapentaenoic acid (EPA) ( $6.6 \pm 0.04$ ) and docosahexaenoic acid (DHA) ( $16.83 \pm 0.06$ ). The amount of 1 and 2 percent of Kilka oil were added to the milk with the aid of the process aid and was turned to the powder using a spray dryer. Two processed cheeses were prepared by adding 5% of the produced powders. Tests of *Coliform*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Coagulase positive, Mold, Yeast and *Salmonella* were performed that was according to the Iranian national standard. By adding Kilka fish oil to cheese, it is possible to produce products with  $0.2 \pm 0.042\%$  and  $0.32 \pm 0.056\%$  EPA and  $0.37 \pm 0.028\%$  and  $0.66 \pm 0.042\%$  DHA which is part of the daily nutritional needs of consumers. The color and smell of functional cheeses with blank cheese were not statistically significant. However, the flavor of two types of functional cheeses with blank cheese was statistically significant, but both were in good group. In terms of general sensory evaluation, cheese samples were examined at 0, 15 and 30 days after production, which did not show any significant differences at these intervals.

**Keywords:** Cheese, Oil, Encapsulation, Functional, Kilka

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: Hejazian\_r@yahoo.com