Archive of SID

مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۹ شماره ۴ صفحات پاییز ۱۳۹۹ صفحات ۲۴۳-۲۳۲

تاثیر انواع مختلف کیتوزان بر شاخص‌های شیمیایی فیله فیل ماهی (Huso huso) ماهی نگهداری شده در یخچال

روح الله آهنگر[۱]، علیرضا عالیشاهی[۱]*، سیده مریم دانشور[۱]، سید مهدی اجاق[۱]، حجت میرصادقی[۱]

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ، ایران

چکـــیده

هدف از تحقیق ، بررسی تاثیر کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی بود. نتایج تاثیر کیتوزان‌های مختلف بر میزان شاخص‌های شیمیایی فیله فیل ماهی نگهداری شده در یخچال هدف تحقیق حاضر بود. ماهی پرورشی شسته شده و فیله گردید. در این تحقیق ۳ نوع کیتوزان بررسی شد: کیتوزان محلول در اسید، کیتوزان محلول در آب و کیتوزان الیگوساکارید. فیله‌ها ۳۰ ثانیه در محلول‌های فوق غوطه‌ور بوده، سپس خارج شده و پس از ۲ دقیقه، ۳۰ ثانیه دیگر در محلول غوطه‌ور شدند. نمونه‌های شاهد فاقد پوشش بودند. سپس فیله‌ها ۲ ساعت در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند تا پوشش روی فیله‌ها تشکیل شود. ۱۹۲ قطعه فیله ماهی ۱۰۰ گرمی برای ۴ تیمار و هر تیمار در ۴ زمان تقسیم شد: تیمار یک به عنوان شاهد (بدون نگهدارنده)، تیمار دوم حاوی ۱ درصد کیتوزان محلول در اسید، تیمار سوم حاوی ۱ درصد کیتوزان محلول در آب و تیمار چهارم حاوی ۱ درصد کیتوزان الیگوساکارید معین شدند. تمام نمونه‌ها در دمای ۱±۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری شدند و در روز (۰، ۴، ۸ و۱۲) میزان شاخص‌های شیمیایی (پراکسید، pH، تیوباربیتوریک اسید و بازهای نیتروژن فرار) آن‌ها سنجیده شد. همه شاخص‌های تیمارهای مختلف با گذشت زمان روند افزایشی داشتند. تنها در شاخص pH تیمار کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد روند نامنظمی داشت. کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد بیشترین تاثیر مثبت را در تمامی تیمارها داشت. با توجه به افزایش میزان شاخص‌های شیمیایی در همه تیمارها، افزودن انواع کیتوزان به فیله ماهی سبب جلوگیری و کاهش آن شد.

کـــلید واژه ها: شاخص‌های شیمیایی، انواع مختلف کیتوزان، نگهداری

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۸

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۳۹۹/۹/۲۹

***نویسنده مسول:**
seafood1144@yahoo.com

مقدمه

امروزه پرورش ماهی سهم زیادی در تامین منبع انرژی و پروتئینی مورد نیاز انسان دارد. در این رابطه ماهیان خاویاری از جهات مختلف دارای اهمیت ویژه‌ای هستند [۱]. وجود هرگونه عدم تعادل در سیستم ماهی پس از صید و خروج از آب و همچنین در طول مراحل آماده‌سازی و فرآوری منجر به تغییرات بدون بازگشت می‌شود، تغییراتی که می‌تواند بر کیفیت خوراکی و درجه مقبولیت محصول عرضه شده اثرات فراوان داشته و ارزش اقتصادی آن را کاهش دهد. به‌همین جهت کنترل این تغییرات (حفظ خواص کاری پروتئین‌های ماهی) در جهت حفظ و بهبود کیفیت محصول از

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

جمله نکاتی است که باید همواره مورد توجه تولیدکنندگان قرار داشته باشد [۲]. منظور از فساد ماهی، فساد شیمیایی (اتولیز) و فساد میکروبی (آلودگی با میکروارگانیسم‌ها و رشد آن‌ها) است [۳]. برای حفظ خواص حسی و تغذیه‌ای ماهی از روش نگهداری در سرما بسیار استفاده می‌شود. اما وجود چربی‌های غیراشباع فراوان و مقادیر بالای مولکول‌های پرواکسیدان در نگهداری به صورت منجمد و نیز فساد آنزیمی و غیرآنزیمی اثرگذار است [۴]. تکنیک‌های مختلف نگهداری برای بهبود کیفیت و گسترش مدت ماندگاری غذای دریایی شامل بسته‌بندی اتمسفر فعال و اصلاح‌شده، افزودن نگهدارنده‌های شیمیایی و طبیعی، دودی کردن، نمک‌سود کردن، پوشش‌های خوراکی و فیلم‌های قابل تجزیه زیستی مطالعه شده است [۵]. هر چند نگهداری ماهی در سرما و عمل انجماد روش مناسبی برای نگهداری ماهیان است اما همیشه به‌طور کامل از فساد کیفی محصولات دریایی جلوگیری نمی‌کند و ممکن است واکنش‌هایی که منجر به تغییرات اکسیداسیونی و آنزیمی و فساد پروتئین می‌شوند، تحت شرایط نگهداری در سرما و انجماد نیز ادامه یابند [۶]. مصرف‌کنندگان تمایل بیشتری برای استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده های مصنوعی نشان می‌دهند و این امر باعث شده تا مطالعات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد. به دلیل افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی، امروزه تحقیقات گسترده‌ای جهت شناسایی و جایگزینی ترکیبات ضداکسیداسیونی و ضدباکتریایی با منشاء گیاهی در حال انجام است. برای جلوگیری و کاهش شکل‌گیری فساد شیمیایی می‌توان از کیتوزان به عنوان یک پوشش طبیعی استفاده کرد. کیتوزان از استیل‌زدایی کیتین بدست می‌آید. کیتین در دیواره سلولی حشرات، قارچ‌ها و سخت‌پوستان وجود دارد [۷ و ۸].

هدف از این تحقیق، بررسی تاثیر ۳ نوع کیتوزان (محلول در اسید ۱ درصد ، محلول در آب ۱ درصد و الیگوساکارید ۱ درصد) بر شاخص‌های شیمیایی (PV, pH, TBA, TVN-B) فیله فیل ماهی طی دوره نگهداری در دمای یخچال بود.

مواد و روش‌ها

فیل ماهی از شرکت آبزی گستران مازند در شهرستان ساری با وزن ۸/۵ کیلوگرم تهیه و درون جعبه حاوی یخ در مدت ۶۰ دقیقه به آزمایشگاه مرکزی ساری منتقل گردید. ماهی با آب قابل شرب شستشو شد، سپس تخلیه شکمی، پوست‌کنی و فیله گردید. جهت تهیه محلول‌های پوششی از ۳ نوع کیتوزان استفاده گردید: کیتوزان محلول در اسید (با حل کردن ۱ درصد وزنی/حجمی)(درصد داستیله بیش از ۷۰ درصد و وزن مولکولی ۱۲۰۰ کیلودالتون)، در اسیداستیک (۱ درصد حجمی/حجمی)؛ کیتوزان محلول در آب (با حل کردن ۱ درصد وزنی/حجمی کیتوزان)(درصد داستیله بیش از ۸۰ درصد و وزن مولکولی ۲ کیلودالتون) در آب؛ کیتوزان الیگوساکارید (با حل کردن ۱ درصد وزنی‌حجمی کیتوزان الیگوساکارید)(درصد داستیله بیش از ۸۰ درصد و وزن مولکولی ۲ کیلودالتون). برای یکنواخت شدن محلول به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس گلیسرول به میزان ۰/۷۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم کیتوزان به‌عنوان پلاستی‌سایزر افزوده گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط گردید. درنهایت فیلتر کاغذی واتمن شماره ۳ برای حذف ناخالصی‌ها از محلول فوق استفاده گردید [۳]. جهت ایجاد پوشش بر سطح فیله‌ها، ابتدا آن‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در محلول‌های فوق غوطه‌ور نموده و سپس از محلول خارج کرده و پس از گذشت ۲ دقیقه، مجدداً ۳۰ ثانیه دیگر در محلول غوطه‌ور شدند. نمونه‌های شاهد نیز بدون پوشش باقی‌ماندند. سپس فیله‌ها به مدت ۲ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده تا پوشش روی فیله‌ها تشکیل شود [۳]. ۱۹۲ قطعه فیله ماهی ۱۰۰ گرمی برای ۴ تیمار و هر تیمار در ۴ زمان تقسیم شدند: تیمار یک به عنوان شاهد (بدون نگهدارنده)، تیمار دوم حاوی ۱ درصد کیتوزان محلول در اسید، تیمار سوم حاوی ۱ درصد کیتوزان محلول در آب و تیمار چهارم حاوی ۱ درصد کیتوزان الیگوساکارید تقسیم شدند. سپس تمام نمونه‌ها در ظروف آلومنیومی بسته بندی شده و در دمای۱±۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری شدند و در زمان‌های (۰، ۴، ۸ و۱۲) روز به منظور تعیین پارامترهای شیمیایی (PV, pH, TBA, TVN-B) مورد آزمایش قرارگرفتند.

اندازه‌گیری پراکسیدPV

پانزده گرم نمونه همگن شده گوشت ماهی با ۶۰ میلی لیتر متانول به همراه ۶۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه شد وبعد از ۲۴ ساعت به آن ۴۸ سی سی آب‌مقطر اضافه و پس از یک ساعت روغن مورد نیاز جدا گشت.

دویست و پنجاه میلی‌لیتر نمونه روغن استخراج شده ماهی به دقت در یک ارلن مایر وزن گردید وحدود ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اسیداستیک کلروفرم (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲) به محتویات ارلن اضافه شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول یدورپتاسیم اشباع، ۳۰ میلی‌لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته ۱ درصد به مجموعه افزوده شد، مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات‌سدیم ۰/۰۱ نرمال تیتر گردید و مقدار پراکساید طبق رابطه زیر محاسبه گردید [۹].

$$PV = \frac{\text{نرمالیته} \times \text{حجم مصرفی تیوسولفات}}{\text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰$$

اندازه‌گیری pH

پنج گرم از نمونه ماهی هموژن شـــده و با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و در نهایت pH نمونه با دســـتگاه pH متر که در pH ۴ و ۷ استاندارد شده بود، اندازه‌گیری شد [۱۰].

اندازه‌گیری تیوباربیتوریک اسید TBA

اندازه‌گیری TBA به‌وسیله رنگ‌سنجی صورت گرفت. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه چرخ شده ماهی به یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس با محلول ۱- بوتانل به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از محلول فوق به لوله‌های خشک درب‌دار وارد شده و به آن ۵ میلی‌لیتر از معرف TBA افزوده گردید (معرف TBA به‌وسیله حل شدن ۲۰۰ میلی‌گرم از TBA در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حلال ۱- بوتانل پس از فیلتر شدن به دست می‌آید). لوله‌های درب‌دار در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفته و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. سپس

www.SID.ir

Archive of SID

مقدار جذب (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (As) خوانده شد. مقدار TBA (میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم بافت ماهی) براساس رابطه زیر محاسبه گردید [۱۱].

$$TBA = \frac{۵۰ \times (As - Ab)}{۲۰۰}$$

اندازه‌گیری مجموع بازهای نیتروژنی فرار TVB-N

مجموع بازهای نیتروژن فرار TVB-N طبق روش لی و همکاران سنجش شد. بدین صورت که ۱۰ گرم از گوشت چرخ شده ماهی همراه با ۲ گرم اکسید منیزیم و ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بالن کلدال ریخته، سپس چند عدد پرل شیشه‌ای به همراه اکتان نرمال (ضد کف) به آن اضافه شد. سپس بالن به دستگاه وصل و به آن حرارت داده شد. در انتهای دستگاه یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری نیز حاوی ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اسید بوریک ۲ درصد به همراه چند قطره معرف متیل رد قرار داده شد. عمل تقطیر تا گذشت ۳۰ دقیقه از زمان پوشش مواد درون بالن، یا جمع شدن حدود ۱۲۵ میلی‌لیتر مایع در ارلن ادامه می‌یابد محلول اسید بوریک به محض قلیایی شدن با بازهای ازته فرار تقطیر شده زرد رنگ می‌شود. عمل تیتراسیون این محلول با اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تا جایی ادامه می‌یابد که اسیدبوریک دوباره قرمز شود. مقدار نیتروژن فرار طبق رابطه زیر محاسبه گردید [۱۲].

۱۴× حجم مصرفی تیترانت – مجموع بازهای نیتروژنی فرار (میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم نمونه)

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از تجزیه واریانس دو طرفه و جهت مقایسه میانگین از آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده گردید. اطلاعات و نتایج جمع‌آوری شده از آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.0) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

مقادیر پراکسید PV بافت ماهی

در جدول ۱ تغییرات مقادیر پراکسید تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد مشاهده می شود. با گذشت زمان مقادیر پراکسید در همه تیمارها طی مدت نگهداری افزایش یافت، اما این روند در تیمار شاهد در روز ۴ نگهداری دارای جهش قابل ملاحظه‌ای بود و مقدار پراکسید در روز ۴ تا روز ۱۲ نگهداری دارای یک روند افزایشی بود. در سایر تیمارها روند افزایشی تدریجی در کل دوره مشاهده شد. در بین پوشش‌ها کیتوزان، کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد کمترین میزان افزایش پراکسید نشان داد. در بین تیمارهای مورد مطالعه در تمامی زمان‌های نگهداری نمونه شاهد بیشترین میزان پراکسید را نشان داد ($p< 0.05$) و در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان پراکسید در تیمار پوششی کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد مشاهده شد ($p< 0.05$).

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تغییرات مقادیر پراکسید PV تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال(۱±۴) درجه سانتی گراد. داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر سطر و حروف بزرگ متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر ستون می‌باشد ($p< 0.05$).

تیمار / زمان	۰	۴	۸	۱۲
شاهد	۰/۷۶±۰/۰۱^{dA}	۲/۵۷ ±۰/۰۸^{cA}	۵/۵۲±۰/۳۹^{bA}	۹/۱۳±۰/۰۵^{aA}
کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد	۰/۷۲ ±۰/۰۲^{Ca}	۰/۸۶ ±۰/۰۲^{cC}	۲/۳۴ ±۰/۱۳^{bD}	۴/۴۰±۰/۰۹^{aD}
کیتوزان محلول در آب ۱ درصد	۰/۷۳ ±۰/۰۳^{dA}	۱/۰۵ ±۰/۰۲^{cB}	۴/۶۱ ±۰/۱۳^{bB}	۸/۴۰±۰/۰۲^{aB}
کیتوزان الیگوساکارید ۱ درصد	۰/۷۳ ±۰/۰۳^{dA}	۰/۹۷ ±۰/۰۳^{Bc}	۳/۰۹±۰/۰۵^{bC}	۵/۴۵ ±۰/۰۹^{aC}

مقادیر pH بافت ماهی

در جدول ۲ تغییرات مقادیر pH تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد مشاهده می‌شود. میزان pH در تیمارهای مختلف با گذشت زمان افزایش یافت به‌طوری‌که در نمونه شاهد میزان آن از ۶/۲۴ در روز صفر به ۷/۶۳ در روز ۱۲ نگهداری افزایش یافت بنابراین در نمونه شاهد روز صفر تا روز ۱۲ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در بین تیمارهای مورد مطالعه در تمامی زمان‌های نگهداری نمونه شاهد بیشترین میزان pH را نشان داد ($p< 0.05$)و در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان pH در تیمار پوششی کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد مشاهده شد ($p< 0.05$).

جدول ۲. تغییرات مقادیر pH تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد. داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر سطر و حروف بزرگ متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر ستون می‌باشد ($p< 0.05$).

تیمار / زمان	۰	۴	۸	۱۲
شاهد	۶/۲۴±۰/۰۴^{dA}	۶/۵۶ ±۰/۰۷^{Ca}	۷/۰۵ ±۰/۰۱^{bA}	۷/۶۳ ±۰/۱۵^{aA}
کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد	۵/۹۷ ±۰/۰۳^{dB}	۶/۱۱ ±۰/۰۷^{cB}	۶/۰۵ ±۰/۰۱^{bA}	۶/۸۸ ±۰/۰۵^{aC}
کیتوزان محلول در آب ۱ درصد	۶/۳۲ ±۰/۰۹^{bA}	۶/۴۷ ±۰/۰۴^{bA}	۷/۰۵ ±۰/۰۱^{aA}	۷/۲۴ ±۰/۱۳^{aB}
کیتوزان الیگوساکارید ۱ درصد	۶/۳۵ ±۰/۰۴^{bA}	۶/۵۳ ±۰/۰۲^{bA}	۷/۰۵ ±۰/۰۱^{aA}	۷/۰۶ ±۰/۰۴^{aBC}

مقادیر مربوط به آزمون تیوباربیتوریک اسید TBA بافت ماهی

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

در جدول ۳ تغییرات شاخص تیوباربیوتیک اسید تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد مشاهده می‌شود. میزان تیوباربیوتیک اسید در تیمارهای مختلف با گذشت زمان افزایش یافت، این افزایش به مراتب در تیمار شاهد با شدت بیشتری همراه بود به‌طوری که در نمونه شاهد میزان آن از ۰/۴۷ در روز صفر به ۳/۸۸ میلی‌گرم مالون‌آلدهید در روز ۱۲ نگهداری افزایش یافت ($p< 0.05$). در بین تیمارهای مورد مطالعه در تمامی زمان‌های نگهداری نمونه شاهد بیشترین میزان تیوباربیوتیک اسید را نشان داد ($p< 0.05$) و در روز ۱۲ نگهداری کمترین میزان تیوباربیوتیک اسید در تیمار پوششی کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد مشاهده شد ($p< 0.05$).

جدول ۳. تغییرات مقادیر تیوباربیوتیک اسید TBA تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد. داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر سطر و حروف بزرگ متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر ستون می‌باشد ($p< 0.05$).

تیمار/ زمان	۰	۴	۸	۱۲
شاهد	۰/۳۷±۰/۰۱^{dA}	۰/۷۳ ±۰/۰۲^{Ac}	۲/۱۹ ±۰/۱۳^{Bb}	۳/۸۸ ±۰/۰۵^{Aa}
کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد	۰/۳۵ ±۰/۰۲^{Ac}	۰/۳۹ ±۰/۰۱^{Bc}	۱/۴۹ ±۰/۰۳^{Cb}	۱/۹۰ ±۰/۰۵^{Da}
کیتوزان محلول در آب ۱ درصد	۰/۳۵ ±۰/۰۲^{Ac}	۰/۴۴ ±۰/۰۶^{Bc}	۲/۸۸ ±۰/۰۴^{Ab}	۳/۱۶ ±۰/۰۸^{Ba}
کیتوزان الیگوساکارید ۱ درصد	۰/۳۶ ±۰/۰۳^{Ac}	۰/۴۶ ±۰/۰۳^{Bc}	۲/۱۸ ±۰/۱۵^{Bb}	۲/۷۸ ±۰/۰۷^{Ca}

مقادیر بازهای ازته فرار TVN- B بافت ماهی

در جدول ۴ تغییرات شاخص بازهای ازته فرار تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد مشاهده می‌شود. میزان بازهای ازته فرار در تیمارهای مختلف با گذشت زمان افزایش یافت به‌طوری‌که در نمونه شاهد میزان آن از ۸/۴۵ در روز صفر به ۴۷/۵۵ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم بافت ماهی در روز ۱۲ نگهداری افزایش یافت. در بین تیمارهای مختلف در کل دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بازهای ازته فرار مشاهده شد ($p< 0.05$) به‌طوری‌که در روز ۱۲ نگهداری تیمار پوششی کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد همواره کمترین میزان بازهای ازته فرار را نشان داد ($p< 0.05$) و بیشترین میزان بازهای ازته فرار در نمونه شاهد مشاهده شد ($p< 0.05$).

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴. تغییرات مقادیر بازهای ازته فرار TVN- B تیمارهای مختلف در طی نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد. داده‌ها به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف کوچک متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر سطر و حروف بزرگ متفاوت بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار میان داده‌ها در هر ستون می‌باشد ($p< 0.05$).

تیمار/ زمان	۰	۴	۸	۱۲
شاهد	۸/۴۵±۰/۰۹^{Ac}	۹/۰۸ ±۰/۰۸^{Bc}	۲۴/۶۳ ±۰/۵۲^{Ab}	۴۷/۵۵ ±۰/۲۸^{Aa}
کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد	۸/۴۸ ±۰/۰۲^{Ac}	۸/۷۵ ±۰/۰۱^{Cc}	۱۲/۶۰ ±۰/۵۲^{Db}	۲۵/۱۴ ±۰/۲۱^{Da}
کیتوزان محلول در آب ۱ درصد	۸/۳۹ ±۰/۱۲^{Ad}	۱۰/۸۵ ±۰/۰۵^{Ac}	۲۰/۵۸ ±۰/۰۴^{Bb}	۳۰/۴۹ ±۰/۳۷^{Ba}
کیتوزان الیگوساکارید ۱ درصد	۸/۴۸ ±۰/۰۳^{Ac}	۸/۹۱ ±۰/۰۸^{CBc}	۱۳/۸۱ ±۰/۳۱^{Cb}	۲۶/۸۷ ±۰/۰۷^{Ca}

بحث

میزان اســـتاندارد برای پراکســـید، مقادیر ۲۰-۱۰ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم چربی گزارش شـــده اســـت و مقادیری بیش از این نشـــانه‌ای از اکسیداسیون چربی‌ها محسوب می‌گردد [۱۳]. نتایج مقادیر پراکسید تیمارهای مختلف در طول دوره نگهداری در یخچال حاکی از افزایش میزان پراکسـید همه تیمارهای مورد مطالعه در طی زمان نگهداری بود. روکش‌های کیتوزانی خواص ممانعت کنندگی خوبی نسـبت به اکسـیژن دارند، پوشش کیتوزانی که به‌طور مستقیم روی سطح گوشت ماهی به کار می‌روند ممکن است به‌صورت یک مانع مناسب بین گوشت ماهی و محیط اطراف عمل نمایند و بنابراین نفوذ اکسیژن به سطح گوشت ماهی را کم کنند. همان‌طور که مشاهده می شود نتایج تحقیق حاضر بیانگر تاثیر تیمارهای پوششی کیتوزان در کاهش میزان پراکسید نمونه‌های تحت مطالعه می‌باشد [۱۴]. در تحقیق حاضر با گذشت زمان تا روز ۱۲ میزان پراکسید به‌طور معنی‌داری در تمام تیمارها افزایش یافت که این امر به‌واسطه اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد. نقیبی و همکاران (۲۰۱۶) و فرجزاده و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که با افزایش زمان نگهداری میزان پراکســـید در کلیه نمونه‌ها تا پایان دوره در حال افزایش بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از تیمار کنترل، افزودن لیکوپن به صورت مجزا و یا در ترکیب با کیتوزان در کاهش میزان پراکسید بافت عضله کارایی بالایی داشت، اما در این بین فیله‌های غوطه‌ور شده در محلول‌های کیتوزان و سطوح بالای لیکوپن، دارای میزان پراکسید به مراتب کمتری بودند در فرآیند پیچیده اکسیداسیون چربی اسیدهای چرب غیر اشباع با اکسیژن مولکولی واکنش داده و تولید رادیکال‌های آزاد می‌کنند. رادیکال‌های پراکسی چربی (ROOo) با مولکول‌های دیگر اسید چرب ترکیب شده و تشکیل هیدروپراکسید و رادیکال‌های آزاد دیگر می‌نماید، تکرار این واکنش‌ها در نهایت باعث ایجاد تجمعی از هیدروپراکسیدها خواهد شد. آنتی‌اکسیدان‌ها با اهدای یک اتم هیدروژن یا الکترون آزاد باعث تشکیل ترکیبات پایدار می شوند، یا ممکن است از طریق شلاته‌کردن یون‌های فلزی (عوامل پروااکسیداسیون) یا فرونشاندن اکسیژن یگانه با حذف پراکسید، اثر مثبت خود را در جلوگیری از فساد اعمال کنند [۱۵ و ۱۶].

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

pH، یکی از پارامترها برای نشـان دادن کاهش کیفیت گوشـت در زمان نگهداری اسـت. افزایش pH اثر قابل توجهی بر کیفیت محصـول طی دوره نگه‌داری دارد که می‌تواند باعث کاهش کیفیت محصول شود [۱۷]. افزایش pH در تیمار شاهد و هر یک از تیمارهای پوششی را می‌توان به افزایش تولید بازهای فرار مثل آمونیاک، تری‌متیل‌آمین، فعالیت‌های آنزیمی باکتری‌ها و آنزیم‌های درونی دانست [۱۸]. محمدزاده و همکاران، (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزایش pH گوشـت به دلیل تجزیه ترکیبات نیتروژنی در طول نگهداری در یخچال اسـت که می‌تواند باعث رشـد باکتری‌ها و کاهش کیفیت و در نهایت فساد ماهی باشد [۱۹]. در مطالعه حاضر نیز با افزایش مدت زمان نگهداری در یخچال میزان pH افزایش یافت که همسو با نتایج فوق بود. موسوی و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند که در نمونه تیمارها که عبارت بودند از شستن گوشت چرخ شده با آب معمولی، با محلول آبی حاوی ۲ درصد کیتوزان و شستن با محلول آبی حاوی ۵ درصد کیتوزان pH در نمونه تیمار کیتوزان محلول در اسید ۵ در صد نسبت به تمامی تیمارها کمتر بود، که دلیل آن ماهیت اسیدی محلول کیتوزان بود. آن‌ها بیان کردند که در بین تمامی تیمارهای مورد مطالعه در تمامی زمان‌های نگهداری کمترین میزان pH در تیمار پوششی کیتوزان محلول در اسید۵٪ مشاهده شد. در تحقیق حاضر نیز کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد عملکرد بهتری در مقایسه با دو نوع کیتوزان دیگر داشت که حاکی از اسیدی بودن آن بود، که تایید کننده نتیجه تحقیق مذکور بود. حداکثر میزان pH برای محصـولات قابل مصـرف ۷/۵-۷ عنوان شـده اسـت که در این تحقیق تمام تیمارهای بجز تیمار کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد به این میزان رسیده‌اند [۲۰].

تیوباربیوتیک اسید از شاخص‌های اندازه‌گیری اکسیداسیون ثانویه چربی‌ها بر اساس محتوای مالون‌دی‌آلدهید می‌باشد. مالون‌دی‌آلدهید به‌واسطه اکسید شدن هیدروپرواکسیدها به مواد نظیر آلدئید و کتون، تشکیل می‌شود. چنین ترکیباتی می‌توانند شامل آمین‌ها، نوکئلوتیدها و نوکلئیک‌اسید، پروتئین، فسـفولیپیدها و همچنین دیگر آلدئیدهای تولیدی در پایان اکسـیداسـیون چربی باشـند. اجاق و همکاران (۲۰۱۰) میزان اولیه کمتری از تیوباربیتوریک اسید را برای فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان پوشش شده با کیتوزان غنی شده با عصاره دارچین ملاحظه کردند (از ۰/۰۸ در نمونه پوشش شده تا ۰/۰۹ در نمونه شاهد). جون و همکاران (۲۰۰۲) مقادیر کمتری از تیوباربیوتیک اسید در ماهیان کاد و هرینگ پوشش شده به وسیله کیتوزان در مقایسه با نمونه‌های شاهد طی ۱۲ روز نگهداری در سرما به‌دست آوردند. ساتیول و همکاران (۲۰۰۷) کاهش میزان فساد اکسیدا سیونی را در نمونه‌های ماهی سالمون صورتی طی نگهداری منجمد گزارش کردند. همچنین نتایج مشابهی توسط موهان و همکاران (۲۰۱۲) در مورد ماهی کاد و هرینگ هندی گزارش کردند [۲۱]. لوپز-کابالرو و همکارن (۲۰۰۵) نیز قدرت شـلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و یا ترکیب کیتوزان با چربی را که علل آنتی‌اکسـیدان بودند کیتوزان می‌داند. نتایج این تحقیقات با نتایج مطالعه حاضـر مطابقت دارد. افزایش این شـاخص درطول مدت نگهداری ممکن اسـت به‌دلیل افزایش آهن آزاد و دیگر پراکسـیدان‌ها در گوشـت باشـد. همچنین، آلدئیدها به‌عنوان محصولات ثانویه اکسیداسیون از شکست هیدروپراکسیدها ایجاد می‌شوند و روند افزایش هیدروپراکسیدها می‌توانند دلیل بر این امر باشند. لازم به ذکر است که بر اساس نظر آبورگ و همکاران (۱۹۹۳) شاخص تیوباربیتوریک اسید نمی‌تواند میزان دقیقی از سرعت اکسیدا سیون چربی را نشان دهد زیرا مالون‌آلدهید با سایر ترکیبات بدن ماهی واکنش می‌دهد. این ترکیبات می‌تواند آمین‌ها، نوکلئوزیدها و نوکلوییک‌اسیدها، پروتئین ها، فسفولیپیدها و سایر آلدهیدها که ترکیبات انتهایی اکسیدا سیون چربی هستند باشد. این واکنش‌ها می‌تواند در گونه‌های مختلف متغیر باشد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

[۲۲]. بازهای نیتروژنی فرار کل TVB-N یکی از شاخص‌های تازگی ماهی است که تعداد زیادی از ترکیبات فرار همانند آمونیاک، متیل‌آمین، دی‌متیل‌آمین، تری‌متیل‌آمین و دیگر ترکیبات مشابه را بر می‌گیرد که در نتیجه فعالیت‌های باکتریایی تولید می‌شود [۲۳]. سوخت و ساز باکتریایی آمینواسیدها در ماهی منجر به تجمع آمونیوم، مونواتیل‌آمین، دی‌اتیل‌آمین، تری‌اتیل‌آمین و سایر بازهای فرار می‌شود که همگی بر بد طعمی ماهی تاثیرگذار هستند [۲۴]. سنجش بازهای ازته فرار کل TVB-N به‌عنوان یک تست شیمیایی جهت تعیین سلامتی و بهداشت ماهی انجام می‌گیرد. افزایش مقدار بازهای ازته در مطالعه حاضر در تمامی نمونه‌ها طی دوره نگهداری را می‌توان با فعالیت‌های باکتری‌های مولد فساد مرتبط دانست. میزان بالای فعالیت باکتری‌ها ترکیباتی نظیر تری‌متیل‌آمین‌اکساید و پپتیدها و آمینواسیدها را به بازهای فرار می شکنند. در کل دوره نگهداری در نمونه‌های پوشش داده شده همواره مقدار بازهای ازته فرار نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. افزایش باکتری‌های عامل فساد در مدت زمان نگهداری، میزان افزایش بازهای ازته فرار کل را تایید می‌کند زیرا مقدار بازهای ازتهٔکل با افزایش فعالیت باکتری‌های عامل فساد و آنزیم‌های داخلی افزایش می‌یابد [۲۵]. لوپز-کابالرو و همکاران (۲۰۰۵) اثر محافظتی پوشش ترکیبی کیتوزان-ژلاتین را در کم‌کردن میزان بازهای ازته فرار و متعاقباً فساد میکروبی را گزارش نمودند. از آنجا که حضور باکتری‌ها در گوشت منجر به اتولیز پروتئین‌ها و تجزیه آن‌ها [۲۶] و شکستن ترکیباتی از جمله تری‌متیل‌آمین‌اکسیدها، پپتیدها، آمینواسیدها و غیره می‌شود [۲۷].

نتیجه‌گیری

با توجه به تقاضای مصرف‌کنندگان برای دسترسی به موادغذایی با کیفیت بالا و نگرانی آن‌ها به دلایل مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های مصنوعی و نیز نگرانی‌های زیست محیطی ناشی از تجمع پلیمرهای مصنوعی، تکنولوژی استفاده از پوشش‌های زیست‌تخریب پذیر با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا می‌توان جایگزین مناسبی باشد. لذا در تحقیق حاضر اقدام به تهیه پوشش‌های طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی بالا از کیتوزان‌های مختلف که شامل کیتوزان معمولی (محلول در اسید ۱ در صد)، کیتوزان محلول در آب ۱ در صد و کیتوزان الیگو ساکارید ۱ در صد و نموده و از آن‌ها در نگهداری فیله فیل ماهی در شرایط نگهداری در یخچال (۱±۴) درجه سانتی گراد استفاده شد تا محصولی با کیفیت بالاتر و ایمن‌تر به دست مصرف‌کنندگان رساند. در بررسی پارامترهای آنالیز شیمیایی کیتوزان محلول در اسید ۱ در صد کمترین میزان تغییرات را طی زمان نگهداری در یخچال نشان داد بنابراین تیمار کیتوزان محلول در اسید ۱ درصد نسبت به سایر تیمارها نتایج بهتری نشان داد. به‌طورکلی نتایج تحقیق حاضر تکنولوژی استفاده از پوشش‌های خوراکی کیتوزان را در حفظ کیفیت اولیه و افزایش ماندگاری فیله فیل ماهی را طی نگهداری در یخچال مورد تایید قرار می‌دهد. لذا کیتوزان به‌عنوان پوشش می‌تواند تقاضای مصرف کنندگان به موادغذایی عاری از مواد شیمیایی را تامین نموده و نیاز آن‌ها به موادغذایی با کیفیت بالاتر و ایمن و ارزانتر را تامین نماید. با توجه به اینکه میزان قابل توجهی کیتین به شکل ماده زاید در کارخانه‌های فرآوری آبزیان تولید می‌شود لذا می‌توان از شکل استیل‌زدایی شده آن یعنی کیتوزان جهت پوشش محصولات غذایی و افزایش ماندگاری آن‌ها بهره جست.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی: نگارنده از گروه فرآوری محصولات شیلاتی و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کمال تقدیر و تشکر را دارد.

منابع

1. Mazandarani M, Taheri Mirghaed A, Hoseini S.M. Hematological characteristics and reproduction indices of wild Beluga (*Huso huso*) broodstocks from the southeast of the Caspian Sea. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2014; 9 (1): 65-71.
2. Razavi Shirazi H. 2001. Seafood technology, processing science (2). Naghsh Mehr Publications. Pp: 292. [in Persian]
3. Ojagh S.M. 2010. The effect of using Chitosan preservative enriched with Cinnamon essential oil on the quality and shelf life of Rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D thesis. Faculty of Natural Resources and Marine Sciences Department of Fisheries Tarbiat Modares University. [in Persian]
4. Aubourg S, Rodríguez A, Gallardo, J. Rancidity development during frozen storage of Mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. European Journal of Lipid Science and Technology. 2005; 107: 316–323.
5. Kakaei S, Shahbazi Y. Effect of Chitosan-Gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and (*Ziziphora clinopodioides)* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced Trout fillet. LWT – Food Sciences and Technology. 2016; 72: 432-438.
6. Sathivel S, Liu Q, Huang J, Prinyawiwatkul W. The influence of Chitosan glazing on the quality of skinless pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. Journal of Food Engineering. 2007; 83(3): 366-373.
7. Latou E, Mexis S.F, Badeka A.V, Kontakos S, Kontominas M. G. Combined effect of Chitosan and modified atmosphere packaging for shelf life extension of chicken breast fillets. Journal of LWT – Food Science and Technology. 2014; 55: 263-268.
8. Inanli A.G, Aksun Tumerkan E.T, El Abed N, Regenstein J.M, Ozgul F. The impact of Chitosan on seafood quality and human health: A Review. 2020.
9. Hosseini S.V, Rezaei M, Sahari M.A, Hosseini H. Quality changes in Caspian white fish (*Rutilus frissi kutum*) fat during ice storage. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2005; 2 (2): 39-50. [in Persian]
10. Dos Santos J.A, Soares C. M, Bialetzki A. Effects of pH on the incubation and early development of fish species with different reproductive strategies. Aquatic Toxicology. 2020; *219*, 105382.
11. Allou L.A. Factors influencing the utilization of TBA services by women in the Tolon district of the northern region of Ghana. Scientific African. 2018; 1 (1): 00010.
12. Li Y, Tang X, Shen Z, Dong J. Prediction of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content of chilled beef for freshness evaluation by using viscoelasticity based on airflow and laser technique. Food Chemistry. 2019; 287: 126-132.
13. Razavi Shirazi H. 2006. Seafood technology, Principles of maintenance and operation (1). Pars Negar Publications. Pp: 325. [in Persian]
14. Butler B.L, Vergano P.J, Testin R.F, Bunn J.M, Wiles J.L. Mechanical and barrier properties of edible Chitosan films as affected by composition and storage. Journal of Food Science. 1996; 61: 953-955.

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

15. Naghibi S.S, Ehsani A, Tajik H, Talebi A, Delizhe N. Effect of Lycopene-enriched Chitosan coating on fatty acid profiles and lipid oxidation parameters of Rainbow trout fillet during refrigerated storage. Journal of Food Hygiene. 2016; 1 (6): 29-44. [in Persian]
16. Farajzadeh F, Motamedzadegan A, Shahidi S.A, Hamzeh S. The effect of Chitosan-Gelatin coating on the quality of Shrimp *(Litopenaeus vannamei)* under refrigerated condition. Food Control. 2016; 67: 163-170.
17. Souza B.W.S, Cerqueira M.A, Ruiz H.A, Martins J.T, Cassareigo A, Teixeira J.A. Effect of Chitosan-based coatings on the shelf life of Salmon (*Salmon salar*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010; 58 (21): 11456- 11462.
18. Kostaki M, Giatrakou V, Savvaidis I.N, Kontominas M.G. Combined effect of MAP and Thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. Food Microbiology. 2009; 26: 475-482.
19. Mohammadzadeh B, Rezaei M. Effect of Polyphenols green tea on microbial and chemical change Rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* during storage in ice. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2013; 38(10): 1-9.
20. Mousavi S.M, Zakipour Rahim Abadi A, Aein Jamshid K. The effect of Chitosan minced fish meat wash on heavy metals removal and oxidation stability during refrigeration storage. Journal of Food Science and Technology. 2017; 67 (14): 169-178. [in Persian]
21. Mohan C.O, Ravishankar C.N, Lalitha K.V, Srinivasa Gopal T.K. Effect of Chitosan edible coating on the quality of double filleted Indian oil Sardine (*Sardinella longiceps*) during chilled storage. Food Hydrocolloids. 2012; 26: 167–174.
22. Aubourg S.P. Interaction of Malondialdehyde with biological molecules-new trends about reactivity and significance. International Journal of Food Science and Technology. 1993; 28: 323-335.
23. Rodríguez A, Carriles N, Cruz J.M, Aubourg S.P. Changes in the flesh of cooked farmed Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with previous storage in slurry ice (-1.5° C). LWT-Food Science and Technology. 2008; 41: 1726-1732
24. Duan J, Jiang Y, Cherian G, Zhao G. Effect of combined Chitosan-Krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold-stored Lingcod *(Ophiodon elongates)* fillets. Food Chemistry. 2010; 122: 1035–1042.
25. Günlü A, Koyun E. Effects of vacuum packaging and wrapping with Chitosan-based edible film on the extension of the shelf life of Sea Bass *(Dicentrarchus labrax)* fillets in cold storage (4 ^{0}C). Food and Bioprocess Technology. 2013; 6 (7): 1713-1719.
26. El-Deen G, El-Shamery M.R. Studies on contamination and quality of fresh fish meats during storage. Academic Journal of Biological Science. 2010; 2: 65-74.
27. Gram L, Huss H.H. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology. 1996; 33: 121-137.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 9, Issue 4, Fall 2020
Pages: 232- 243

The effect of different types of chitosan on the chemical characteristics of huso fillet (Huso huso) stored in refrigerator

Rouhollah Ahangar[1], Alireza Alishahi[*1], Seyyedeh Maryam Daneshvar[1], Seyed Mahdi Ojagh[1], Hojat Mirsadeghi[1]

1- Seafood Processing Department, Fisheries and Environment Faculty, Gorgan University of Agricaltural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

A B S T R A C T

The aim of this study was to investigate the effect of chitosan as a natural preservative. Farmed fish were washed and filleted. In this study, 3 types of chitosan were investigated: acid-soluble chitosan, water-soluble chitosan and oligosaccharide chitosan. The fillets were immersed in the above solutions for 30 seconds, and then removed, and after 2 minutes, the immersion was repeated. Control samples were uncovered. The fillets were then placed at room temperature (20 °C) for 2 hours to form a coating on the fillets. 192 pieces of 100 g fish fillets were divided into 4 treatments and each treatment was divided into 4 times: treatment one as a control (without preservative), the second treatment containing 1% acid-soluble chitosan, the third treatment containing 1% water-soluble chitosan and the fourth treatment containing 1% Chitosan oligosaccharides. All samples were stored in refrigerator at 4±1 °C and their chemical parameters (Peroxide, pH, Thiobarbituric acid, Total Volatile Nitrogen) were measured on (0, 4, 8 and 12) days. All the indices of treatments had increasing trend over time. Only in the pH index of 1% acid-soluble chitosan had an irregular trend. 1% acid-soluble chitosan had the most positive effect in all treatments. Due to increase in chemical indices in all treatments, the addition different of chitosans to fish fillets could prevent or reduce them.

ARTICLE TYPE
Original Research

ARTICLE HISTORY
Received:
Accepted:
ePublished:

KEYWORDS: Chemical indicators, Different types of chitosan, preservation

* Corresponding Author:
Email address: seafood1144@yahoo.com
Tel: +98
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513

Downloaded from jfst.modares.ac.ir at 12:59 IRST on Sunday February 21st 2021

www.SID.ir