بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹٤
http://japu.gau.ac.ir

اثر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) روی محیط کشت باکتری

حجت میرصادقی[1*]، علیرضا عالیشاهی[2]، مریم صالحیان[3] و رضا صفری[4]

[1]دانشجوی دکتری، فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2]استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [3]کارشناس آزمایشگاه میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، [4]دانشجوی دکتری، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۱٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۲/۳۰

چکیده

ضایعات حاصل از کارخانجات عمل‌آوری آبزیان، دارای پروتئین قابل بازیافت می‌باشند. در تحقیق حاضر تأثیر آنزیم‌های پایین (منشاء گیاهی)، تریپسین و پپسین (حیوانی)، آلکالاز و پروتامکس و فلاورزایم (میکروبی) و زمان تأثیرگذاری ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه برمیزان هیدرولیز ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مطالعه گردید. پروتئین بازیافت شده به‌عنوان منبع پپتوندر محیط کشت دو باکتری لاکتوباسیلوسپلانتاروم، آئروموناس هیدروفیلا استفاده شد و جذب نوری در زمان‌های ۰، ۳، ۹، ٦، ۱۲ و ۱۵ ساعت انکوباسیون، اندازه‌گیری گردید. تأثیر نوع آنزیم و مدت زمان و اثر متقابل آن‌ها بر بازده تولید پروتئین و درجه هیدرولیز دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p\leq$۰/۰۵). همچنین افزایش مدت زمان تأثیر آنزیم تا ۹۰ دقیقه، برمیزان پروتئین و درجه هیدرولیز تأثیر بیشتری داشت و از ۹۰ به ۱۲۰ دقیقه، کاهش و از ۱۲۰ به ۱۸۰ دقیقه، تقریباً ثابت بود. در این مطالعه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز نسبت به سایر آنزیم‌ها از لحاظ میزان پروتئین و درجه هیدرولیزاسیون،

*مسئول مکاتبه: hojatmirsadeghi@yahoo.com

بالاتربود. همچنین باکتری‌ها در محیط کشت حاوی پپتون با تیمارهای آنزیمی نسبت به محیط کشت تجاری MRS و TSB به‌عنوان نمونه شاهد، رشد بهتری داشتند ($p\leq$۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، ضایعات، محیط کشت باکتریایی، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

میزان تولید سالانه آبزیان بیش از ١٥٦ میلیون تن است (فائو، ٢٠١٢). این میزان بالای تولید باعث احداث کارخانجات عمل‌آوری و در نهایت تولید موادزائد غیرقابل مصرف می‌گردد. اصلی‌ترین ضایعات عمل‌آوری آبزیان شامل استخوان، امعاء و احشاء، پوست و فلس می‌باشد (بنجاکول و موریسی، ١٩٩٧) که منبع مهمی از چربی و پروتئین بوده که باعث فساد می‌شوند (بسکار و همکاران، ٢٠٠٨)، همچنین یک سوبسترای مناسب برای تخمیر اسید لاکتیکی و منبع باکتری‌های تولیدکننده آنزیم پروتئاز می‌باشد (بسکار و همکاران، ٢٠٠٧). چنانچه این ضایعات به شکلی مناسب استفاده شوند از یک سو باعث تولید فرآورده با ارزش و از سوی دیگر مانع آلودگی محیط‌زیست می‌شوند (اویسی‌پور و قمی، ٢٠٠٨) در سال‌های اخیر شیوع بیماری جنون گاوی، افزایش جمعیت، افزایش میزان صید آبزیان و به دنبال آن افزایش میزان ضایعات، متخصصان را بر آن داشت که پروتئین هیدرولیز شده از آبزیان را جایگزین منابع حیوانی نموده و به مردم معرفی نمایند (لیاست و همکاران، ٢٠٠٢؛ بسکار و همکاران، ٢٠٠٧). تولید پروتئین هیدرولیز شده به کمک آنزیم از مواد کم ارزش، بهترین روش برای تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا می‌باشد (کریستینسون و راسکو، ٢٠٠٠a). هیدرولیز آنزیمی فرآیندی نسبتاً ساده و مؤثر است که از ایجاد واکنش‌های نامطلوب و تخریب پروتئین‌ها جلوگیری می‌نماید. مطالعات زیادی در خصوص هیدرولیزآنزیمی ضایعات ماهی با استفاده از آنزیم با منشاء میکروبی مانند آلکالاز پروتامکس و فلاورزایم (بنجاکول و موریسی، ١٩٩٧؛ صفری و همکاران، ٢٠٠؛ آسپمو و همکاران، ٢٠٠٥b؛ بسکار و همکاران، ٢٠٠٨؛ اویسی‌پور و همکاران، a ٢٠٠٩؛ اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩d) گیاهی مانند پاپاین (هالی و مریت، ١٩٩٤؛ سیپسون و همکاران، ١٩٩٨) و جانوریمثل تریپسینوکموتریپسین (اسلیزیت و همکاران، ٢٠٠٥؛ اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩b) صورت گرفته است. به‌طور کلی، آنزیم‌ها با منشاء میکروبی به‌دلیل خصوصیت خوب پروتئولتیکی، پایداری حرارتی و pH بالا نسبت به سایر آنزیم‌ها، برتری دارند و خصوصیت پروتئین هیدرولیز شده

به نوع ماده خام اولیه، شرایط هیدرولیز (دما، زمان و pH) و نوع آنزیم وابسته است (کریستینسون و راسکو، ۲۰۰۰a) به‌طوری که با تغییر نوع آنزیم، می‌توان پروتئین هیدرولیز شده‌ای با ویژگی متفاوت از نظر درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت نیتروژنی و ترکیب اسیدهای آمینه انتظار داشت. پروتئین هیدرولیز شده از آبزیان به‌دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال، خواص ضداکسایشی، زنجیره پپتیدی کوتاه و وزن مولکولی پائین، هضم خوب و منبع نیتروژن، برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، مصرف در جیره غذایی انسان، دام، طیور و آبزیان و به‌عنوان محیط کشت باکتری استفاده می‌شوند (گیلبرگ و همکاران، ۱۹۸۹؛ اویسی‌پور و قمی، ۲۰۰۸؛ اویسی‌پور و همکاران، ۲۰۰۹d؛ صفری و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی ٦ آنزیم با منشاء میکروبی، گیاهی و حیوانی، از نظر میزان پروتئین، درجه هیدرولیزاسیون و استفاده در محیط کشت باکتری انجام شد. در تحقیق حاضر سعی شده تا از پپتون تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhyncus mykiss*) به‌عنوان یک جزء اصلی در محیط کشت باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophyla*) و لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

روش کار

آماده‌سازی نمونه: ضایعات بعد از انجمادزدایی همگن شده و آب مقطر به نسبت ۲ به ۱ (آب به سوبسترا) به آن اضافه گردید. به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم‌های داخلی، نمونه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (واسوا و همکاران، ۲۰۰۷). بعد از خنک شدن، محدوده pH ۸/۵ برای آلکالاز ۷ برای پاپائین، تریپسین و فلاورزایم، ۳ برای پپسین و ۸ برای پروتامکس تنظیم گردید. نمونه‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم‌های حیوانی و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای گیاهی و میکروبی به‌مدت ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه قرار گرفتند. مقدار آنزیم‌های مورد استفاده ۱/۵ گرم در صد گرم میزان پروتئین خام ضایعات بود. در پایان آزمایش، به‌منظور غیرفعال نمودن فعالیت آنزیمی، نمونه‌ها مجدداً در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند (کریستینسون و راسکو، ۲۰۰۰a؛ نیلسنگ و همکاران، ۲۰۰۵؛ واسوا و همکاران، ۲۰۰۷) سپس توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۸۰۰۰rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه،

مواد غیرمحلول از پروتئین‌های محلول در نمونه‌ها جداسازی شدند. پس از پایان آزمایش، ترکیب شیمیایی و درجه هیدرولیز، محصول و ماده اولیه مورد آزمایش قرار گرفت.

آنزیم: جدول ١ حاوی آنزیم‌های مورد استفاده و خصوصیت آن‌ها می‌باشد. آنزیم‌ها تا زمان آزمایش در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

جدول ١- آنزیم‌های مورد استفاده در تحقیق و اطلاعات کاربردی آن‌ها.

نوع آنزیم	pH فعالیت	دمای بهینه فعالیت	میزان فعالیت (واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم)[1]	منشاء
آلکالاز	٦/٥-٨/٥	٧٥-٥٥	٢/٤	میکروبی
پروتامکس	٥/٥-٧/٥	٦٠-٣٥	١/٥	میکروبی
فلاورزایم	٥-٧	٧٠-٥٠	١/٥	میکروبی
پاپائین	٥-٧	٧٠-٥٠	١/٥	گیاهی
ترپسین	٥-٧	٦٠-٣٥	١	حیوانی
پپسین	٢-٣	٦٠-٣٥	١	حیوانی

یک واحد آنسون عبارت است از میزان آنزیم موردنیاز برای آزاد شدن یک میلی‌اکی والان اسید آمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد و PH ٧/٥ (آسپمو و همکاران، ٢٠٠٥b؛ اویسی‌پور و همکاران، a ٢٠٠٩).

تعیین ترکیب شیمیایی: میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر از روش استاندارد (AOAC، ٢٠٠٥) به‌دست آمد. میزان پروتئین محلول در مایع رویی بعد از سانتریفوژ با روش بیورت اندازه‌گیری شد از تیروزین سرم آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد به‌کار برده شد و جذب با اسپکتوفوتومتر UV/VIS در طول موج ٥٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شد (لین، ١٩٥٧).

تعیین غلظت پروتئین محلول: غلظت پروتئین محلول و میزان پروتئین خارج شده به‌صورت درصد هیدرولیز محلول به روش بیورت تعیین شد (لین، ١٩٥٧) به ٠/٥ میلی‌لیتر مایع روماند در لوله آزمایش ٤/٥ میلی‌لیتر معرف بیورت اضافه و بلافاصله با ورتکس مخلوط شدند، مخلوط حاصل به‌مدت ٢٠ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ٥٤٠ نانومتر، قرائت و غلظت پروتئین مستقیماً از منحنی استاندارد محاسبه شد (شکل ١)،

منحنی استاندارد با رقیق‌سازی محلول استاندارد آلبومین سرم گاوی با غلظت ٦٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ترسیم شد. معرف بیورت طبق دستورالعمل زیر تهیه شد:

محلول (١)- ٩ گرم تارتارات سدیم پتاسیم، ٥ گرم سولفات مس ٥ آبه و ٣ گرم یدید پتاسیم با آب مقطر به حجم ٦٠٠ میلی‌لیتر رسانیده شد.

محلول (٢)- ٤٠٠ میلی‌لیتر محلول سود ٠/٢ مولار تهیه گردید.

ج) محلول ٢ به آرامی در محلول ١ اضافه شد تا ١٠٠٠ میلی‌لیتر محلول بیورد به‌دست آید، سپس جهت همگن شدن و جلوگیری از رسوب دادن در طی نگه‌داری با استفاده از همزن مغناطیسی بر روی همزن مغناطیسی به‌مدت یک ساعت قرار داده شد و پس از آن در یخچال نگه‌داری گردید (لین، ١٩٥٧).

درجه هیدرولیز: میزان هیدرولیز به روش تری کلرواستیک اسید (TCA) محاسبه گردید (کریستینسون و راسکو، ٢٠٠٠a) مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ١٠ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ٧٥٠ میکرولیتر از نمونه با ٧٥٠ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ١٠ درصد با سمپلر برداشته شد و در ماکروتیوپ ریخته و پس از بهم زدن به‌مدت ٥ دقیقه، با دور ٥٠٠٠rpm و زمان ١٠ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بیورت اندازه‌گیری و میزان درجه هیدورلیز از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید (اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩a).

١٠٠ (میزان پروتیین در نمونه/ میزان پروتیین در محلول ١٠ درصد اسید تری‌کلریدریک) = درجه هیدرولیزاسیون

استفاده از پروتئین تولید شده به‌عنوان منبع پپتون در محیط کشت: محیط کشت‌هایی با پپتون تولیدی از ضایعات ماهی قزل‌آلا براساس محیط کشت تجاری MRS[1] برای رشد لاکتوباسیلوس‌پلانتارومو محیط کشت تجاری TSB[2] برای رشد آئروموناس‌هیدروفیلاتولید گردیدند و با محیط کشت‌های تجاری مقایسه شدند. با توجه به این‌که در فاز هیدرولیز از ٦ زمان و ٦ آنزیم استفاده شد، در آزمایش ارزیابی رشد باکتری در محیط کشت تهیه شده با پپتون تولیدی از ضایعات ماهی قزل‌آلا فقط آن زمانی‌که بیشترین درصد پروتئین در پپتون تولید شده از آنزیم میکروبی، حیوانی

1- De man rogosa sharp
2- Tryptic Soy broth

و گیاهی وجود داشت مورد استفاده قرارگرفت (زمان ۹۰ دقیقه). پس از کشت اولیه باکتری در محیط MRS و TSB انکوباسیون بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه به‌مدت ۱۸ ساعت و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، شستشوی متوالی با سرم فیزیولوژی و متعاقب آنسانتریفوژ (دور ٦٠٠٠) به‌مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس لوگ مشخصی از باکتری به محیط‌کشت‌های تولیدی با پپتون حاصل از ضایعات ماهی قزل‌آلا اضافه گردید. جهت ارزیابی رشد باکتری در زمان‌های مختلف از دستگاه اسپکتوفتومتر و قرائت جذب نوری در طول موج ٦٠٠ نانومتر استفاده شد (صفری و همکاران، ۲۰۱۱).

آنالیز آماری: جهت بررسی نتایج هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی، از طرح آماری کاملاً تصافی به روش آزمون فاکتوریل و آنالیزواریانس (ANOVA) و برای بررسی دقیق‌تر اختلاف میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ١٦ تحلیل شدند. برای ترسیم نمودار نیز از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده گردید.

جدول ۲- درصد ترکیب شیمیایی ماده خام قبل و بعد از هیدرولیز با استفاده از آنزیم‌های مختلف.

ماده	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
ماده خام	٢٥/٤±٠/٤^{g}	٥/٨٥±٠/٩١^{a}	٦٤/٥٢±١/٠١^{a}	٦/٢١±١/٠٥^{e}
آلکالاز	٧٦/٥±٠/٨^{a}	١/٨٨±٠/٧١^{b}	٢/٣١±١/٠١^{d}	٢٤/٢١±٠/٨٥^{d}
پروتامکس	٦٧/٥٠±٠/٩٥^{b}	١/٩٥±٠/٨٢^{b}	٢/٧٨±١/٠٥^{c}	٢٥/٤١±٠/٥٦^{c}
فلاورزایم	٥٥/١٥±٠/٩٠^{d}	٢/٠٥±٠/٢٥^{b}	٣/١١±٠/٩١^{b}	٢٦/٧٠±٠/٨٤^{b}
پاپائین	٦٠/٤٧±٠/٩٥^{c}	٢/١٠±٠/٤٥^{b}	٣/٠٥±١/١٠^{b}	٢٥/٥٠±٠/٥٥^{c}
ترپسین	٣٩/٥٠±١/١٠^{f}	٢/١٥±٠/٢٦^{b}	٣/٢٧±١/١٢^{b}	٢٥/٤٠±٠/٩٠^{c}
پسین	٤٨/١٠±١/٠٧^{e}	٢/١١±٠/٤٥^{b}	٣/٢٠±١/٠٨^{b}	٢٧/٧٢±٠/٩٥^{a}

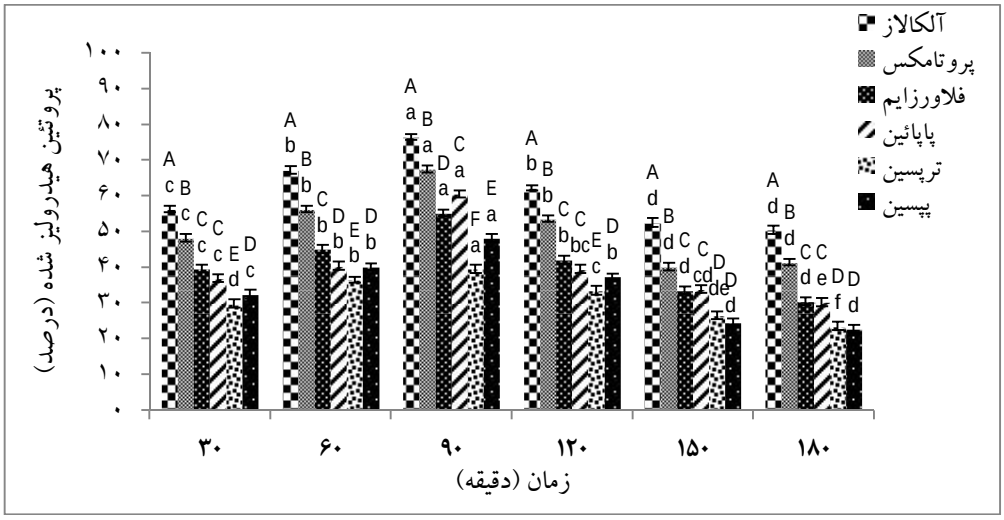
داده‌ها به‌صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

اعداد دریک ستون باحروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

نتایج

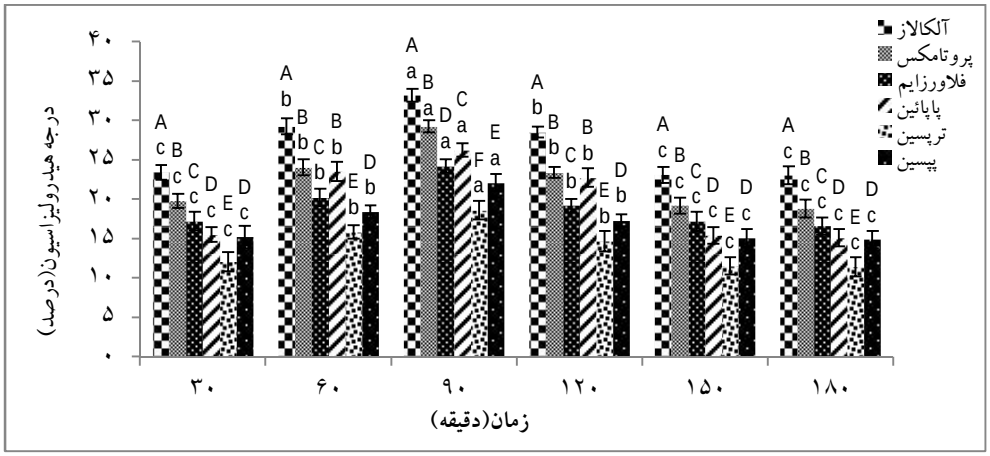
بررسی ترکیب شیمیایی: طبق جدول ۲ میزان پروتئین در ماده خام اولیه ٢٥/٤ درصد بود بعد از انجام عمل هیدرولیز آنزیمی، میزان پروتئین در ٦ نمونه هیدرولیز شده افزایش یافت ($p\leq$۰/۰۵). میزان چربی در ماده خام اولیه ۵/۸۵ درصد بود بعد از انجام عمل هیدرولیز توسط آنزیم‌ها، میزان چربی در هر ٦

نمونه نسبت به ماده خام ($p\leq$۰/۰۵). میزان رطوبت در ماده خام اولیه در حدود ٦٤/٥٢ درصد بود بعد از انجام عمل هیدرولیز، میزان رطوبت در ٦ نمونه هیدرولیز شده کاهش یافت اختلاف معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵). میزان خاکستر در هر نمونه هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه افزایش یافت و اختلاف معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵).



شکل ۱- میزان پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی. حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($p\leq$۰/۰۵).

بر طبق شکل ۱ میزان پروتئین هیدرولیز شده هر آنزیم طی زمان دارای اختلاف معنی‌داری است ($p\leq$۰/۰۵). میزان پروتئین هیدرولیز شده آنزیم‌ها نسبت به هم در هر زمان دارای اختلاف معنی‌داری است ($p\leq$۰/۰۵) و بیشترین میزان پروتئین مربوط به آنزیم آلکالازو کمترین آن مربوط به آنزیم تریپسین می‌باشد. افزایش مدت زمان تأثیرآنزیم تا ۹۰ دقیقه برمیزان پروتئین تأثیر زیادی دارد. با افزایش زمان از ۹۰ به ۱۲۰ دقیقه میزان پروتئین کاهش و از ۱۲۰ به ۱۸۰ دقیقه میزان پروتئین تقریباً ثابت بود.

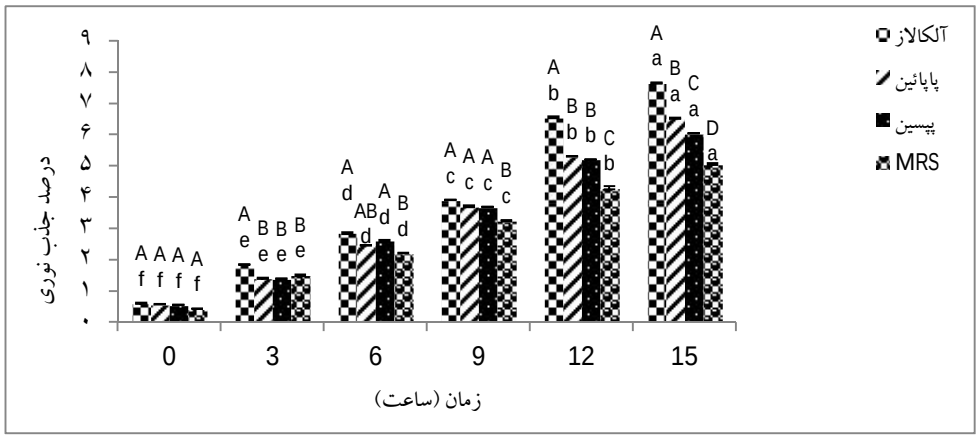


شکل ٢- روند درجه هیدرولیز پروتئین‌های ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی. حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (P≤٠/٠٥).

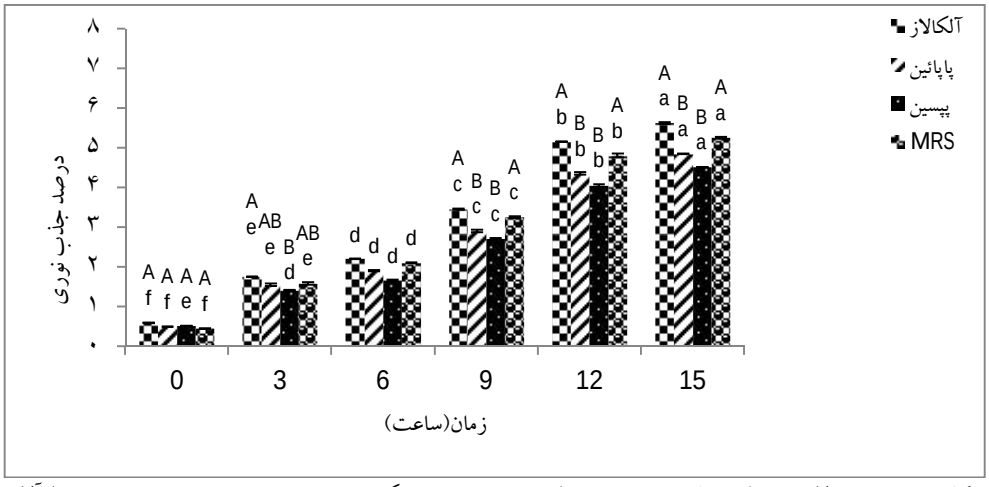
همان‌طور که در شکل ٢ نشان داده شده است با افزایش زمان، درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود به‌طوری که بیشترین میزان هیدرولیز در ٩٠ دقیقه اول رخداد. بین درجه هیدرولیز صورت گرفته توسط هر ٦ آنزیم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p≤٠/٠٥). بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز و کمترین آن مربوط به آنزیم تریپسین می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از افزایش درجه هیدرولیز برای تمام آنزیم‌ها در ٣٠ دقیقه اول بوده و بعد از آن با افزایش زمان هیدرولیز این روند افزایش نسبی داشته است. شکل ٢ نشان می‌دهد که درجه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز نسبت به ٥ آنزیم دیگر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P≤٠/٠٥).

بررسی روند رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت (MRS): شکل ٣ و ٤ نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ١٨ و ١٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (MRS) را نشان می‌دهد. طبق شکل ٣ از صفر تا ١٥ ساعت، لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ١٨ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین،

پپسین و MRS) رشد صعودی داشت اما در آنزیم آلکالاز، پاپائین، پپسین رشد باکتری‌ها مشهودتر است و اختلاف معنی‌داری نسبت به هم داشتند (P≤۰/۰۵). طبق نتایج این مطالعه تیمار آلکالاز بهتر از ۳ تیمار دیگر می‌باشد. طبق شکل ٤ رشد لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ۱۰ گرم پپتون تهیه شده از هیدرولیز ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از زمان صفر تا ۱۵ ساعت اگر چه در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و MRS) رشد صعودی داشته ولی در هر زمان اختلافات معنی‌داری بود (P≤۰/۰۵). باکتری در محیط کشت تهیه شده از هیدرولیز ضایعات توسط آنزیم آلکالازنسبت به نمونه تجاری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (p>۰/۰۵) ولی باکتری در محیط کشت تهیه شده از هیدرولیز ضایعات توسط آنزیم پاپائین، پپسین دارای رشد کم تر نسبت به نمونه تجاری و در هر زمان اختلافات معنی‌داری بود (P≤۰/۰۵).

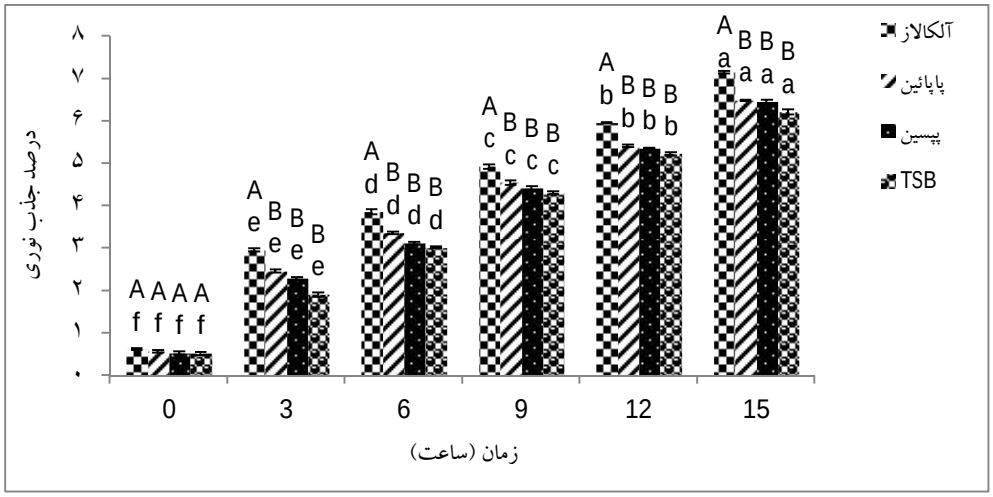


شکل ۳- تغییرات لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ۱۸ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (MRS). حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p≤۰/۰۵).

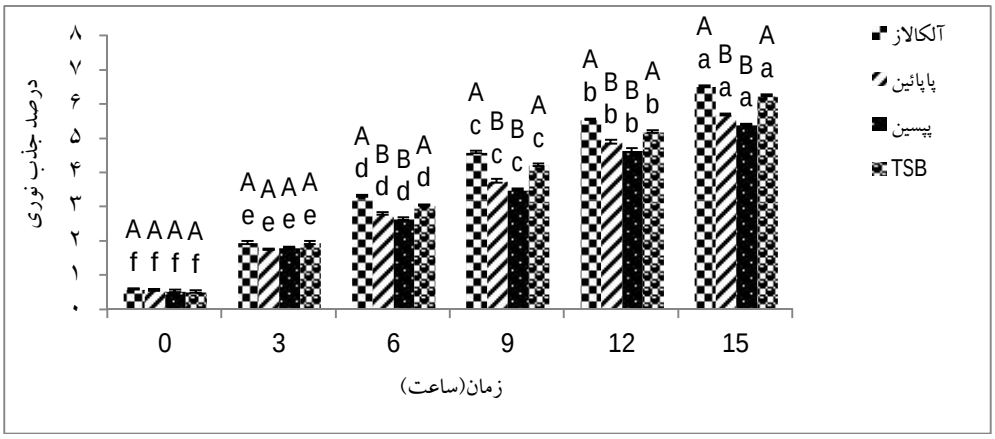


شکل ٤- تغییرات لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ١٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (MRS).حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p≤٠/٠٥).

بررسی روند رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در محیط کشت (TSB): شکل ٥ و ٦ به‌ترتیب نتایج جذب نوری آئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت (TSB) حاوی ٢٠ و ١٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (TSB) را نشان می‌دهد. طبق شکل ٥ رشدآئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ٢٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از زمان صفر تا ١٥ ساعت اگر چه در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و TSB) روند صعودی داشته اما در آنزیم آلکالاز، مشهودتر است و تیمار آلکالاز بهتر از ٣ تیمار دیگر می‌باشد (p≤٠/٠٥). طبق شکل ٦ باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ١٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از زمان صفر تا ١٥ ساعت اگر چه در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و TSB) دارای رشد صعودی بود ولی نسبت به هم دارای اختلاف معنی‌دار بودند (p≤٠/٠٥). باکتری در محیط کشت تهیه شده از هیدرولیز ضایعات توسط آنزیم پاپائین، پپسین دارای رشد کم تر و آلکالاز رشد بیشتری نسبت به نمونه تجاری داشتند. ولی در محیط کشت تهیه شده از هیدرولیز ضایعات توسط آنزیم آلکالاز نسبت به نمونه تجاری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (p>٠/٠٥).



شکل ۵- تغییرات رشد آئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ۲۰ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (TSB). حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p≤۰/۰۵).



شکل ٦- تغییرات رشدآئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ۱۰ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم میکروبی، گیاهی و حیوانی در مقایسه با نمونه تجاری (TSB). حروف کوچک متفاوت هر تیمار طی گذشت زمان، حروف بزرگ متفاوت تیمار به تیمار در هر زمان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p≤۰/۰۵).

بحث

طبق جدول ٢ میزان چربی در ماده خام اولیه بعد از انجام عمل هیدرولیز در ٦ نمونه هیدرولیز شده کاهش یافت. کاهش چربی، ناشی از شکست باندهای پپتیدیو سانتریفوژ نمونه‌ها می‌تواند باشد که طی سانتریفوژ با دور بالا، چربی به پروتئین‌های نامحلول متصل شده و با هم رسوب می‌نمایند. همچنین مقدار زیادی از چربی به‌صورت یک لایه جدا، بعد از سانتریفوژ روی مایع رویی دیده می‌شود که به راحتی قابل برداشت بوده و از ارزش غذایی بالایی نیز برخوردار است (کریستینسون و راسکو، ٢٠٠٠a؛ واسوا و همکاران، ٢٠٠٧). پروتئین هیدرولیز شده یک فرآورده کم‌چرب است، در مطالعه حاضر مقدار چربی در ٦ پروتئین هیدرولیزشده کم شد، که با نتایج اویسی‌پور و همکاران (٢٠٠٩a) مطابقت دارد البته اختلاف عددی، ناشی از تفاوت در روش تولید پروتئین هیدرولیز شده است. اشلیزت و همکاران (٢٠٠٥) و واسوا و همکاران (٢٠٠٧) بیان نمودند که طی فرآیند تولید پروتئین هیدرولیز شده، اگر از حرارت برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی استفاده شود، امولسیون‌های پایداری از چربی و پروتئین تشکیل می‌گردد که باعث افزایش میزان چربی در فرآورده نهایی می‌شود. میزان خاکستر در نمونه هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه افزایش یافت. علت این امر، افزایش میزان ماده خشک در نمونه محصول تولیدی است که با نتایج اویسی‌پور و همکاران (٢٠٠٩d) و اویسی‌پور و همکاران (٢٠٠٩a) همخوانی دارد. اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان چربی، رطوبت و خاکستر بین پروتئین‌های هیدرولیز شده دیده نشد ($p\geq$٠/٠٥). نتایج مطالعه حاضر در تطابق با نتایج سایر مطالعات می‌باشد (آسپمو و همکاران، ٢٠٠٥b؛ اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩b). طبق شکل ١ نتایج پروتئین هیرولیز شده نشان می‌دهد که میزان پروتئین در هر ٦ پروتئین هیدرولیز شده، مقدار بالایی دارد.

بیشترین میزان پروتئین مربوط به آنزیم آلکالازو کمترین آن مربوط به آنزیم تریپسی نمی‌باشد. افزایش مدت زمان تأثیر آنزیم تا ٩٠ دقیقه برمیزان پروتئین تأثیر زیادی دارد. با افزایش زمان از ٩٠ به ١٢٠ دقیقه میزان پروتئین کاهش یافت که با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (دنیز و مارتین، ١٩٩٧؛ کریستینسون و راسکو، ٢٠٠٠a؛ کریستینسون و راسکو، ٢٠٠٠b؛ بسکار و همکاران، ٢٠٠٨؛ اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩a؛ اویسی‌پور و همکاران، ٢٠٠٩c). در بررسی انجام شده توسط اویسی‌پور و همکاران (٢٠٠٩a) کاهش شدت هیدرولیز با افزایش زمان احتمالا به‌دلیل محدود شدن فعالیت آنزیمی به دنبال شکل‌گیری فرآورده‌های خاص بوده است. مطالعات کریستینسون و همکاران (٢٠٠٠b) در

خصوص هیدرولیز ماهی آزاد نشان می‌دهد که روند هیدرولیز با افزایش زمان کاهش یافته و ثابت باقی می‌ماند که مشابه نتایج مطالعه حاضر است. علت این امر کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم، مهار آنزیم و غیرفعال شدن آنزیم می‌باشد. کاهش میزان سوبسترای لازم جهت هیدرولیز بیشتر، فعالیت آنزیمی نیز کاهش یافته و روند هیدرولیز ثابت می‌ماند. نتایج لیاست و همکاران (a ۲۰۰۲) در ماهی آتلانتیک سالمون نشان داد بعد از ۱۲۰ دقیقه، بازیافت پروتئین دو برابر شد و از ۳۰ به ۷۰-٦۰ درصد رسید. این محققان دریافتند که با افزایش زمان واکنش و استفاده از آنزیم آلکالاز، بازیافت پروتئینی بالاتری نسبت به آنزیم‌ها و زمان‌های دیگر حاصل می‌گردد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد. شکل ۲ نشان می‌دهد که درجه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز نسبت به ۵ آنزیم دیگر دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p\leq$۰/۰۵). که ناشی از فعالیت بالای آنزیم است (هالی و مریت، ۱۹۹٤؛ کریستینسون و راسکو، b۲۰۰۰؛ اویسی‌پور و همکاران، b۲۰۰۹). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است با افزایش زمان، درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود به‌طوری که بیشترین فعالیت آنزیم در ۹۰ دقیقه اول هیدرولیز بوده که بیشترین تجزیه پروتئینی رخ می‌دهد. علت این امر را می‌توان ناشی از افزایش زمان هیدرولیزاسیون، کاهش تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم، کم شدن میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم و شکل‌گیری ترکیبات ممانعت کننده از فعالیت آنزیمی دانست. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات (دنیز و مارتین، ۱۹۹۷؛ کریستینسون و راسکو، a۲۰۰۰؛ کریستینسون و راسکو، b۲۰۰۰؛ گورارد و همکاران، ۲۰۰۲؛ دونگ و همکاران، ۲۰۰۸؛ اویسی‌پور و همکاران، a۲۰۰۹؛ اویسی‌پور و همکاران، b ۲۰۰۹) هم‌خوانی دارد.

هرن و همکاران (۲۰۰۷) و لیاست وآسپی (۲۰۰۸) بیان کردند لاکتو باسیلوس‌پلانتاروم احتیاج به برخی از اسیدهای‌آمینه نظیر آرژینین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین و پانتونتیک اسید دارد. پپتون تهیه شده از خانواده آزاد ماهیان غنی از اسیدآمینه‌های بالا و ویتامین‌های گروه B شامل نیاسین و پنتوتنیک اسید می‌باشد. طبق شکل ۳ باکتری لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ۱۸ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و MRS) رشد صعودی داشت اما در آنزیم آلکالاز، پاپائین و پپسین باکتری رشد بهتری نسبت به نمونه شاهد داشت و اختلافات معنی‌دار بود ($p\leq$۰/۰۵). طبق نتایج این مطالعه تیمار آلکالاز بهتر از ۳ تیمار دیگر می‌باشد. طبق شکل ٤ رشد باکتری لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم در محیط کشت حاوی ۱۰ گرم پپتون

تهیه شده از هیدرولیز ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توسط آنزیم آلکالاز، رشد بیشتر و آنزیم‌های پاپائین، پپسین رشد کم‌تری نسبت به نمونه شاهد داشت. طبق شکل ٥ رشد باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ٢٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و TSB) روند صعودی داشته اما در آنزیم آلکالاز، مشهودتر است و تیمار آلکالاز بهتر از ٣ تیمار دیگر می‌باشد ($p\leq$٠/٠٥). طبق شکل ٦ باکتری آئروموناس‌هیدروفیلا در محیط کشت حاوی ١٠ گرم پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در هر ٤ تیمار (آلکالاز، پاپائین، پپسین و TSB) دارای رشد صعودی بود آنزیم پاپائین، پپسین دارای رشد کمتر و آلکالاز رشد بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشتند. در مطالعه انجام شده توسط صفری و همکاران (٢٠١١) از سه غلظت ١٠، ٢٠ و ٣٠ گرم از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی فیتوفاگ به‌منظور کشت باکتری ویبریوآنگوئیلاروم استفاده شد. نتایج نشان داد رشد ویبریو آنگوئیلاروم در غلظت‌های ١٠ و ٢٠ گرم در لیتر از پپتون کمتر از محیط کشت تجاری بود. در مطالعه انجام شده توسط آسپمو و همکاران (٢٠٠٥) از ٥ گرم پپتون به‌جای ٢٢ گرم پپتون تجاری به‌منظور کشت باکتری‌های گروه اسیدلاکتیک استفاده شد. نتایج نشان داد که هر چند غلظت ٥ گرم باعث تقویت رشد باکتری‌های این گروه می‌شود ولی در مقایسه با ٢٢ گرم پپتون تجاری، رشد باکتری پایین‌تر می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات آسپمو و همکاران، ٢٠٠٥؛ صفری و همکاران، ٢٠١١) مغایرت دارد که می‌تواند ناشی از ترکیب اسیدهای‌آمینه پپتون تولیدی و نیاز باکتری باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثر ٦ نوع آنزیم پاپائین، تریپسین، پپسین، فلاورزایم، پروتامکس و آلکالاز بر میزان درجه هیدرولیز ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ***(Oncorhyncus mykiss)*** از نظر میزان درجه هیدرولیز و در نتیجه میزان پروتئین هیدرولیز شده انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که ضایعات تهیه شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان منبع غنی از پروتئین، قادر به تقویت رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم وآئروموناس‌هیدروفیلا در مقایسه با محیط کشت تجاری بوده و می‌توان از آن به‌عنوان منبع پروتئینی تهیه شده از ضایعات ماهی، به‌جای پپتون‌های تجاری محیط کشت میکروبی مثل کازئین، گوشت گاو و سویا استفاده نمود. از طرف دیگر نتایج نشان داد که آنزیم‌های پروتئازی با منشاء میکروبی به‌خصوص آلکالاز نسبت به سایر آنزیم‌ها دارای کارایی بهتری

است که می‌توان از آن در جهت تولید بالاتری از پروتئین هیدرولیزشده در مقیاس‌های آزمایشگاهی و صنعتی استفاده نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری صمیمانه آقای مهندس حیدری و آقای تورانی (آزمایشگاه مرکزی ساری) نهایت امتنان را دارند.

منابع

1. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
2. Aspmo, S.I., Horn, S.J., and Eijsink, V.G.H. 2005a. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua)* viscera. Journal of Process Chemistry. 40: 1957-1966.
3. Aspmo, S.I., Horn, S.J., and Eijsink, V.G.H. 2005b. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua*) viscera as components of microbial growth media. Process Chemistry. 40: 3714-22.
4. Benjakul, B., and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 3423-3430.
5. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology. 99: 335-343.
6. Bhaskar, N., Sathisha, A.D., Sachindra, N.M., Sakhare, P.Z., and Mahendrakar, N.S. 2007. Effect of acid ensiling on the stability of visceral 11-waste protease of Indian major carp *(Labeo rohita*) Journal of Aquatic. Journal of Food Product. Technology. 16: 73-86.
7. Diniz, A.M., and Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalusacanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. International Journal of Food Science and Nutrition. 48: 191-200.
8. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Food Chemistry. 107: 1485-1493.
9. FAO. 2012. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Yearbook of fishery statistics. Rome. 98, 1and 2.

10. Gildberg, A., Batista, I., and Strom, E. 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnology and Applied Biochemistry, 11: 413-423.
11. Guerard. F., Guimas, L., and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 19: 489-498.
12. Horn, S.J., Aspmo, S.I., and Eijsink, V.G.H. 2007. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. Enzyme Microbial Technology. 40: 1328-1334.
13. Hoyle, N.T., and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 59: 76-79.
14. Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40: 43-81.
15. Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 657–666.
16. Liaset, B., Lied, E., and Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of byproducts from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 560-581.
17. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., and Espe, M. 2002a. Studies on the nitrogen recovery in enzymichydrolysis of Atlantic salmon (*Salmon solar*) frames by Protamex MT protease. Journal of Process Biochemistry. 37: 1263-1269.
18. Liaset, B., and Espe, M. 2008. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials, Process Biochemistry. 43: 42-48.
19. Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology. 3: 450p. New York. Academic Press.
20. Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. 70: 571-578.
21. Ovissipour, M., and Ghomi, M.R. 2008. Biotechnology in seafood production. Tehran, Iran: Islamic Azad University Publication, Pp: 1-198. (In Persian)
22. Ovissipour, M., Abedian, A.M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Journal of Food Chemistry. 115: 238-242.
23. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., and Shabanpour, B. 2009b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Journal of Food and Bioprocess Technology. 5: 460-465.

24. Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Esmaeili Mulla, A. 2009c. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *(Huso Huso)* using Alcalase. International Aquatic Research. 1: 31-38.
25. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E., and Esmaeili Mulla, A. 2009d. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna *(Thunnus albacares)* fisheries by-products as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research. 1: 73-77.
26. Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A., and Rasco, B. 2009. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Journal of Food and Bioprocess Technology. 5: 73-79.
27. Safari, R., Nasrollahzadeh, H., Pourgholam, R., Motalebi, A., and Ghoroghi, A. 2010. Use of Hydrolysates from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Head as Peptone for *(Vibrio anguillarum)* and Optimization Using Response Surface Method (RSM). Journal of Aquatic Food Product Technology. 20: 1-11.
28. Safari, R., Nasrollahzadeh, H., Pourgholam, R., Motalebi, A., and Ghoroghi, A. 2011. Use of Hydrolysates from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Head as Peptone for *(Vibrio anguillarum)* and Optimization Using Response Surface Method (RSM). Journal of Aquatic Food Product Technology. 20: 247-257.
29. Shahidi, F., Han, X.Q., and Syniwiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from Capelin (*Mallotus villosus*). Journal of Food Chemistry. 53: 285-293.
30. Simpson, B.K., Nayeri, G., Yaylayan, V., and Ashie, N.A. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Journal of Food Chemistry. 61: 131-138.
31. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., and Rustad, T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Journal of Process Biochemistry. 40: 2021-2033.
32. Wasswa, J., Tang, J., Gu, X.H., and Yuan, X.Q. 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Journal of Food Chemistry. 104: 1698-1704.