نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۳۰۸-۳۰۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 3, Fall 2012, p. 301-308

استفاده از پروتئین هیدرولیزشده امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) به‌عنوان محیط کشت پایه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*)

مرجانه علی نژاد[۱]- بهاره شعبان پور[۲]- رضا صفری[۳]- مژگان علی نژاد[۴]- حسن نصراله زاده ساروی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۴

چکیده

در تحقیق حاضر از آنزیم آلکالاز به منظور هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) استفاده گردید. به منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از لحاظ دما و pH از روش پاسخ سطح RSM (Response Surface Methodology) استفاده شد. امعاء و احشاء ماهی هوور تحت گستره ی دمایی ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد و pH، ۸تا ۸/۵ توسط آنزیم آلکالاز هیدرولیز شد (۱۳ تیمار). از بین تیمارها، نمونه ها با بیشترین مقدار پروتئین برای بررسی میزان رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*، به‌عنوان جایگزین پپتون تجاری محیط کشت Triptic Soy Broth (TSB)در زمان های صفر، ۱۸و۴۴ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان پروتئین (۷۶/۸۹ گرم در لیتر) مربوط به تیمار تهیه شده در دمای ۵۷ درجه سانتیگراد وpH، ۸ بود و کمترین میزان (۳۸/۵۴ گرم در لیتر) مربوط به تیمار با دمای ۵۰ و pH ، ۸ بوده است. بر اساس نمودار سه بعدی، شرایط بهینه هیدرولیز از لحاظ دما و pH به ترتیب عبارت از دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و pH، ۸/۵ بود. میزان رشد باکتریایی در تمامی محیط‌های کشت تهیه شده از پروتئین هیدرولیز شده امعاء واحشاء ماهی هوور نسبت به محیط کشت شاهد (TSB) بهتر بود ولی بطورکلی بیشترین میزان رشد در بین تیمارها مربوط به تیمار تهیه شده در دمای۶۵ درجه سانتیگراد و pH، ۸ و کمترین میزان رشد در تیمار تهیه شده در دمای ۵۷/۵ وpH، ۸/۲۵ دیده شد. نتیجه گیری کلی حاکی از آنست که از امعاء و احشاء ماهی هوور می‌توان به‌عنوان منبع نیتروژن ارزان قیمت جهت کشت لیستریا مونوسیتوژنز استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ماهی هوور (*Thunnus tonggol*)، آلکالاز، پروتئین هیدرولیز شده، روش پاسخ سطح، *لیستریا مونوسیتوژنز*

مقدمه

هر ساله در دنیا حدود ۱۳۲ میلیون تن ماهی صید می‌شود که ۲۹/۹ درصد از این مقدار به آرد ماهی تبدیل می‌گردد (FAO، ۲۰۰۶). میانگین ضایعات در ماهی (بسته به گونه‌های مختلف) در حدود ۵۰ درصد بوده و در نتیجه حجم سالانه ضایعات تقریباً حدود ۳۲ میلیون تن برآورد میگردد (Kristinsson *et al*., 2000a). مطالعات زیادی در ارتباط با استفاده بهینه از ضایعات آبزیان به منظور تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا انجام شده است (Perea *et al*.,2000 ؛ Kristinsson *et al*., 2000a ؛ *al*., 1993 Laufenberg *et al*., ؛ Guerard *et al*., 2001 ؛ Larsen 2003 ؛ Bhaskar *et al*., 2008 ؛ Nilsang *et al*., 2005).

یکی از این فرآورده ها، فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین ماهی می‌باشد. عمل هیدرولیز، شکسته شدن شیمیایی یا آنزیمی پروتئین ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی مختلف می‌باشد (Skanderby,1994). از کاربردهای متنوع پروتئین هیدرولیز شده می‌توان به استفاده از آنها به‌عنوان جایگزینی برای شیر، مکمل‌های پروتئینی، محیط کشت باکتریها، پایدار کننده نوشابه ها و طعم دهنده در صنایع شیرینی سازی اشاره نمود. فرآیند هیدرولیز به شکل شیمیایی، بیولوژیکی و آنزیمی انجام می‌گیرد. اگر چه تولید پروتئین هیدرولیز شده در مقیاس صنعتی نیز انجام گردیده ولی تاکنون روش کنترل مناسبی جهت انجام فرآیند و مکانیزم دقیق آن مشخص نشده

۱ و ۲ –دانش آموخته کارشناسی رشته شیلات و دانشیار گروه شیلات دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- مربی پژوهشی پایه ۱۵
(*- نویسنده مسئول: (Email: safari 1361@ gmail.com
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر
۵- استادیار پژوهشی پایه ۱۸

است (اویسی پور،۱۳۸۷).

به منظور هیدرولیز پروتئین ماهی از آنزیمهای مختلفی همچون آلکالاز[1]، پروتامکس[2]، فلاورزایم[3]، نوتراز[4]، پپسین[5]، تریپسین[6] و پاپائین[7] استفاده میگردد (Aspmo *et al*., 2005c).

آنزیم‌هایی با منشا میکروبی مثل آلکالاز در مقایسه با آنزیم های با منشاء گیاهی یا حیوانی، دارای فواید زیادی از جمله فعالیت کاتالیتیک گسترده، pH بهتر وثبات دمایی می‌باشند (Diniz, 1996).

آلکالاز،آنزیم آلکالینی تولید شده از باکتری *Bacillus licheniforms* بوده که توسط شرکت دانمارکی Novozymes برای صنایع مواد شوینده و غذایی تولید می‌شود. آنزیم آلکالاز به صورت Alcalase AF 2. 4L ، Alcalase2. 4LFG، Alcalase 2. 5L وجود داشته که از بین این سه آنزیم، فقط آنزیم Alcalase 2. 4LFG دارای درجه غذایی بوده و در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (اویسی پور، ۱۳۸۷).

یکی از مهمترین باکتریهای بیماریزا در انسان *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد. پراکنش این باکتری در محیط بسیار بالا بوده و تقریباً درتمامی مواد خام یافت می‌شود. بیماری ناشی از *لیستریا مونوسیتوژنز* (لیستریوزیس) بیشتر در افراد مستعد مثل زنان باردار، نوزادان، سالمندان دیده می شود(Miettinen ، ۲۰۰۱). لیستریوزیس یکی از عفونت‌های غذایی با شیوع کم ولی مرگ و میر بالا (۳۰ درصد) است (Rocourtوهمکاران؛ ۲۰۰۱). به لحاظ اینکه باکتری‌های جنس لیستریا جزء باکتریهای غنی دوست و پرنیاز بوده و در محیطهای معمولی قادر به رشد نمی‌باشند، برای جداسازی آنها از محیط‌های کاملاً افتراقی استفاده می‌شود. از محیط‌های کشت مورد استفاده جهت جداسازی جنس لیستریا خصوصاً گونه مونوسیتوژنز میتوان به Gum base-nalidixid acid-tryptone-soya agar (GNT)، McBride Listeria agar (MLA)، Oxford agarو غیره اشاره نمود. قیمت تمام شده این محیط ها بسیار گران بوده و و زمان جداسازی باکتری نیز نسبتاً طولانی می‌باشد. از طرف دیگر جداسازی *لیستریا مونوسیتوژنز* نیاز به غنی سازی اولیه داشته و از محیط‌های مایع نظیر University of Vermond broth (UVB) و FDA برای استفاده می‌گردد (Varnam، ۱۹۹۱). بنابراین انتخاب محیط‌های کشت ارزان قیمت ولی با کیفیت بالا به‌منظور جایگزین نمودن محیطهای مذکور لازم و ضروری به نظر می‌رسد. پپتونهای تولید شده از آبزیان بواسطه داشتن پپتیدهایی با زنجیره کوتاه و همچنین اسیدهای آمینه ضروری، می‌توانند به‌عنوان یکی از مواد پروتئینی با ارزش به‌منظور جداسازی باکتریهای سخت رشد در نظر گرفته شوند.

معمولاًجزء گرانقیمت یک محیط کشت میکروبی، منبع نیتروژنی آن است (Martone *et al*., 2005؛ Aspmo *et al*., 2005a). در این تحقیق ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) انتخاب گردید زیرا در تولید کنسرو ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌توان از ضایعات آن از جمله امعاء واحشاء به‌عنوان منبعی ارزان قیمت در جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده گردد.

میزان صید آبزیان در آبهای شمال و جنوب کشور ۳۶۸۷۴۵ تن و میزان تولید (صید و آبزی پروری) ۵۶۲۴۲۲ تن بوده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران،۱۳۸۶).

هدف از این مطالعه، تولید پپتون از امعاء و احشاء ماهی هوور توسط آنزیم آلکالاز 2. 4L و استفاده از آن به‌عنوان محیط کشت پایه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) در مقایسه با محیط کشت تجاری تریپتیک سوی براث (TSB) بوده است. از آنجاییکه ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده با توجه به نوع سوبسترا، نوع و میزان آنزیم و شرایط هیدرولیز متفاوت می‌باشد (Kristinsson *et al*., 2000a) ، بهینه سازی شرایط تولید، می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان و هزینه گردد. به همین منظور تحقیق حاضر با هدف بهینه سازی شرایط (دما و pH) تولیدی پروتئین هیدرولیز شده از امعا واحشا ماهی هوور، به‌منظور بدست آوردن درجه هیدرولیز بهینه جهت کشت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با استفاده از روش پاسخ سطح RSM (Response Surface Methodology) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تولید پپتون از امعاء واحشاء ماهی هوور

امعاء و احشاء ماهی هوور از کارخانجات تولیدکننده کنسرو ماهی در شهرکهای میرود و امیرآباد در استان مازندران تهیه و در مجاورت یخ در کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزرمنتقل گردید. تیمارها بر اساس روش RSM در ۱۳ گروه در محدوده دمایی ۵۰-۶۵ و pH، ۸-۸/۵ تعریف شدند (جدول ۱). امعا و احشاء با استفاده از چرخ گوشت صنعتی چرخ و با آب مقطر مخلوط شدند (نسبت۱:۳ v/w) و در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی (W614B، فاتر ریز پرداز، تهران، ایران) به‌منظور غیر فعال کردن آنزیم‌های درونی قرار داده شدند. بعد از تنظیم pH مطابق جدول ۱،آنزیم آلکالاز Alcalase 2. (4L) به نمونه ها اضافه شده (۱/۵ درصد میزان پروتئین اولیه) و نمونه ها در انکوباتور متحرک (JTSL20، ژال تجهیز، تهران، ایران) بمدت۳ ساعت در محدوده دمایی ۵۰-۶۵ (مطابق جدول ۱) قرار داده

1- Alcalase
2- Protamex
3- Flavourzyme
4- Neutrase
5- Pepsin
6- Trypsin
7- Papain

شدند. پس از اتمام هیدرولیز، نمونه ها در دمای ۹۰ درجه بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند تا آنزیم اضافه شده غیرفعال گردد (اویسی پور و همکاران، ۲۰۰۹).

نمونه ها پس از سانتریفوژ (H-، Japan 103N,KOKUSAN) در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه، فریز درای شدند.

اندازه گیری میزان پروتئین تیمارها بااستفاده از روش Layne (۱۹۵۷) و درجه هیدرولیز با استفاده از روشHoyle و Merritt ؛ (۱۹۹۴) محاسبه گردید. مطابق این روش، بعد از انجام هر آزمایش،محلول ۲۰ درصد اسیدتری کلرواستیک (TCA) به حجم برابری از محلول حاوی پروتئین هیدرولیز اضافه گردیدتا محلول ۱۰ درصد اسیدتری کلرو استیک به دست آید. سپس ترکیب فوق تحت سانتریفوژ(Hettich D-7200 (Tuttlingen, Germany قرار گرفت و مایع رویی جداسازی شد (Ovissipour *et al*., 2009a; Safari *et al*., 2009). درجه هیدرولیز بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

میزان نیتروژن در محلول ۱۰درصد اسید تری‌کلریدریک) =درجه هیدرولیز میزان نیتروژن در نمونه/× (۱۰۰

جدول ۱- دما و اسیدیته مورد استفاده در هیدرولیز پروتئین امعاء واحشاء ماهی هوور با استفاده از آنزیم آلکالاز

تیمار	دما (درجه سانتیگراد)	pH
۱	۵۷/۵	۸/۲۵
۲	۶۵	۸
۳	۶۵	۸/۲۵
۴	۵۷/۵	۸/۲۵
۵	۵۷/۵	۸/۵
۶	۵۷/۵	۸/۲۵
۷	۶۵	۸/۵
۸	۵۰	۸/۵
۹	۵۷	۸
۱۰	۵۰	۸
۱۱	۵۷/۵	۸/۲۵
۱۲	۵۷/۵	۸/۲۵
۱۳	۵۰	۸/۲۵

آماده سازی میکروارگانیسم

باکتری مورد استفاده دراین تحقیق *Listeria monocytogenes* بوده که سوش فریز درای شده آن از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت باکتری در محیط (Merck,Darmstadt,Germany TSB) و انکوباسیون آن در دمای ۳۰ درجه بمدت ۱۲ تا۱۸ ساعت، جهت تلقیح به محیط کشت‌های تهیه شده از پروتئین هیدرولیزشده اضافه گردید.

تهیه محیط کشت

بهترین تیمارها از نظر دارا بودن بالاترین میزان پروتئین (تیمارهای شماره۲،۶،۹،۱۱و۱۲) برای تولید محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۴). ترکیبات محیط کشت تولید شده از امعاء واحشاء ماهی هوور در مقایسه با محیط کشت تجاری TSB (محیط کشت شاهد) در جدول ۲ مشخص شده است.

پس از استریل کردن محیط‌های کشت تولیدی از امعا و احشاء ماهی هوور ، ۱ میلی لیتر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با رقت10^{7} × ۱/۲۲اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور متحرک با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. جذب نوری محتوای ارلن ها با استفاده از بیوفتومتر (Eppendorf ، Germany) در زمان‌های صفر،۱۸ و ۴۴ ساعت قرائت شد.

طرح آماری آزمایشات

به منظور ارزیابی تاثیر دو فاکتور دما و pH بر روند هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) روش عکس العمل سطحی (RSM) و CCD بکار برده شد. برای ساده سازی ثبت شرایط آزمایشات و پردازش داده ها، سطوح بالاتر با ۱+ ، سطح پایین تر با ۱- و سطح پایه با صفر نشان داده شد (جدول شماره ۳).

بعد از تهیه ۱۳ تیمار مطابق مدل CCD، داده‌های بدست آمده طبق مدل مذکور مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و پارامترهای غیرقابل قبول (از نظر آماری) در محاسبات نهایی لحاظ نشده اند. وجود یا عدم وجود ارتباط معنی دار ما بین داده‌های مختلف از طریق محاسبه ارزش P (در محدوده ۰/۰۵) و ضریب اطمینان ۹۵ درصد تعیین گردید.

بهینه سازی دو متغیر مستقل، دما و pH، برای درجه هیدرولیز (DH) (Y) با استفاده از مدل آماری RSM انجام شد. طراحی انجام شده بر اساس غلظت g/l ۲۰ پروتئین امعاء و احشاء و در ۳ فاصله زمانی مختلف (صفر ، ۱۸و ۴۴ ساعت) انجام گرفت. انتخاب متغیر و محدوده آن براساس نتایج بدست آمده در مقالات مروری وتحقیقات گذشته بدست آمده است. در این مطالعه نرم افزار The DESIGN of EXPERT 6. 07 (Stat-Ease Inc. , Minneapolis, MN, USA) برای رگرسیون وتجزیه و تحلیل گرافیکی داده‌های بدست آمده، مورد استفاده قرار گرفت.

سیستم آنالیز آماری RSM برای تجزیه و تحلیل داده ها بکار برده شد (Montgomery, 2001). داده‌های آزمایشگاهی متناسب با مدل چند جمله ای درجه دوم ارائه و ضریب رگرسیون آن بدست آمد.

مدل چند جمله ای درجه دوم مورد استفاده در آنالیز CCD در فرمول (۱) می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i . X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} . X_i^{\,2} + \sum_{i_{i\le j}}^{k} \sum_{j}^{k} \beta_{ij} . X_i . X_j + e \qquad (۱)$$

جدول ۲- ترکیب محیط کشت مورد استفاده در آزمایشات میکروبیولوژیکی (گرم/لیتر)

ترکیبات	پپتون تولیدشده از امعاء واحشاء ماهی هوور	محیط کشتTSB (گرم/لیتر)
سدیم کلراید	۵/۰۰	۵/۰۰
کازئین	–	۱۵/۰۰
سویا	–	۵/۰۰
پروتئین هیدرولیز شده ماهی هوور	۲۰	–

i و j به ترتیب ضرایب خطی و درجه دوم اند. ß ضریب رگرسیون و k شماره فاکتورهای مورد مطالعه و بهینه شده در آزمایش و e خطای تصادفی است (Parajo *et al*., 1992).

جدول ۳- متغیرهای مستقل و مقادیرآنها برای آنالیز نتایج حاصل به روش CCD

متغیرها	علامت اختصاری	سطوح متغیر کدداده شده		
		+۱	۰	-۱
دما	Temp.	۶۵	۵۷/۵	۵۰
اسیدیته	pH	۸/۵	۸/۲۵	۸

نتایج و بحث

دما وpH

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز و میزان پروتئین درتیمارهای تعریف شده به روش RSM در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به تیمار شماره ۱۳ بوده (۵۳/۹۶ درصد) که در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و pH ۸/۲۵ انجام شده است. کمترین درجه هیدرولیز (۷/۳۷ درصد) مربوط به تیمار شماره ۴ (دما:۵۷/۵ درجه سانتیگراد و pH:۸/۲۵) بوده است. بیشترین مقدار پروتئین (۷۶/۸۹ گرم در لیتر) مربوط به تیمار شماره ۹ (دما: ۵۷ درجه سانتیگراد و pH: ۸) و کمترین مقدار پروتئین (۳۸/۵۴ گرم در لیتر) مربوط به تیمار شماره ۱۰ (دما:۵۰ درجه سانتیگراد وpH :۸) بوده است.

استفاده از هیدرولیز آنزیمی به منظور تبدیل ضایعات آبزیان به مواد با ارزش، کاربرد فراوانی داشته و در اکثر کشورها از این روش در جهت تولید محصولات مختلف استفاده میگردد. محققین مختلف با کمک آنزیم‌های پروتئازی با منشأ میکروبی، حیوانی و یا گیاهی، مطالعات گسترده ای را در خصوص استفاده از ضایعات ماهیان و تبدیل آن به پروتئین هیدرولیز شده انجام داده و محصول نهایی رااز نظر کمی، کیفی، پروفایل اسیدهای آمینه، خواص عملکردی و ویژگی‌های کاربردی آن مورد بررسی قرار داده اند. در اکثر موارد نیز به استفاده بهینه از ضایعات مذکور در جهت تهیه محیطهای کشت میکروبی اشاره شده است (Dufosse *et al*., 2001 ؛ Aspmo *et al*., 2005a,b ؛ Martone *et al*., 2005 ؛ Vazquez *et al*., 2008a ؛ Ovissipour *et al*., 2009c ؛ Safari *et al*., 2011).

جدول٤- نتایج درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای تعریف شده به روش RSMاز امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*)

تیمار	[1]Temp. (°c)	pH	[2]%DH	[3]Pr (g/l)
	۶۵-۵۰	۸-۸/۵		
۱	۵۷/۵	۸/۲۵	۲۴/۱۷	۴۳/۷۷
۲	۶۵	۸	۱۰/۵۲	۵۷
۳	۶۵	۸/۲۵	۳۱/۸۶	۵۳/۶۳
۴	۵۷/۵	۸/۲۵	۷/۳۷	۵۰/۵۴
۵	۵۷/۵	۸/۵	۱۵/۲۵	۴۷/۳۶
۶	۵۷/۵	۸/۲۵	۲۱/۹۲	۶۶/۵۴
۷	۶۵	۸/۵	۴۴/۸۲	۴۳/۴
۸	۵۰	۸/۵	۴۱/۱	۵۱/۰۹
۹	۵۷	۸	۱۲/۶۷	۷۶/۸۹
۱۰	۵۰	۸	۱۷/۸	۳۸/۵۴
۱۱	۵۷/۵	۸/۲۵	۲۱/۳۵	۵۱/۷۲
۱۲	۵۷/۵	۸/۲۵	۱۷/۸۷	۶۰/۲۵
۱۳	۵۰	۸/۲۵	۵۳/۹۶	۵۱/۷۲

۱. دما (درجه سانتیگراد)

۲. درجه هیدرولیز

۳. مقدار پروتئین (گرم/لیتر)

رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*

جدول شماره۵ نشان دهنده میزان رشد باکتری *لستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت تولید شده از پپتون ماهی هوور در مقایسه با محیط کشت شاهد (TSB) می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین درصد رشد مربوط به تیمار شماره ۲ (دما:۶۵ درجه سانتیگراد-pH:۸) و کمترین درصد رشد مربوط به تیمار شماره ۶ (دما:۵۷/۵درجه سانتیگراد-pH:۸/۲۵) بوده که در مقایسه با نمونه شاهد (TSB) رشد بیشتری را نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به مجموعه نتایج جایگزین نمودن پروتئین هیدرولیز شده امعا واحشاء ماهی هوور به میزان ۲۰ گرم در لیتر به جای پروتئین محیط کشت

تجاری TSB به رشد بیشتر *لیستریا مونوسیتوژنز* منجرمی‌گردد.

نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران بدست آمده است (Vazquaes *et al*., 2004 ؛ Kristinsson *et al*., 2000a, b ؛ Vazquez *et al*., 2008a ؛Aspmo *et al*., 2005 a,b ؛Vazquez *et al*., 2008b ؛Safari *et al*., 2009 ؛Ovissipour *et al*., 2009c).

Dufosse و همکاران (۲۰۰۱) از منابع پپتونی تولید شده از ماهیان مختلف (کاد، تون و سالمون) استفاده کردند. نتایج بدست آمده از ۶ گونه باکتری (*Lactobacillus casei*،*Escherichia coli* مخمر (*Saccharomyces cerevisiae* و *Sporobolomyces odorus*) وقارچ (*Penicillium roqueforti* و *Aspergillus niger*) نشان داد که در اکثر موارد، استفاده از پپتون‌های تولید شده از ماهی نتایج خوبی به همراه داشته است.

نتایج آزمایشاتVazquez و همکاران (۲۰۰۴) که از پپتونهای تولید شده از ماهی برای رشد باکتری‌های بیماری زا و پروبیوتیک (Vibrio,Roseobacterوو Pseudomonas) استفاده کردند، رشد بیشتر پپتون‌های تولید شده از امعاء واحشاء ماهی تون را در مقایسه با محیط‌های کشت تجاری معمول نشان داد.

Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹b) از دو روش شیمیایی و آنزیمی جهت هیدرولیز پروتئین امعاء واحشاء ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) استفاده نمودند. نتایج آزمایشات آنها نشان داد که هیدرولیز آنزیمی نسبت به هیدرولیز شیمیایی از کارایی بالاتری برخودار بوده ودر بین آنزیمهای مختلف نیز آنزیمهای پروتئازی با منشاء میکروبی دارای قدرت هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیم‌های حیوانی بوده اند. یکی از دلایل انتخاب آنزیم آلکالاز نیز کارایی بالاتر آن نسبت به سایر آنزیم‌های پروتئازی بوده است.

نتایج تحقیقات Aspmo وهمکاران (۲۰۰۵b) بر روی هیدرولیز امعا واحشاء ماهی کاد (*Gadus morhua*) توسط آلکالاز، پاپایین و آنزیم‌های داخلی ماهی و استفاده از آن به‌عنوان منبع ترکیبی برای نیتروژن، آمینواسیدها و ویتامین ها در محیط کشت ۵باکتری مختلف: *Bacillus subtilis* ,*Lactobacillus sakei* ,*Escherichia coli* ,*Aspergillus niger* وSaccharomyces cerevisiae نشان داد که آلکالاز، بهترین آنزیم برای تولید پپتون از امعاء و احشاء ماهی کاد می‌باشد.

عملکرد بهتر پپتون بدست آمده توسط آلکالاز از روشهای مختلفی قابل تشریح می‌باشد. آلکالاز منجر به جذب بهتر منابع اسید آمینه قابل دسترس می‌شود، زیرااین فعالیت اندوپروتئازی، مکملی برای سیستم‌های پروتئولتیکی و جذب پپتیدی باکتریایی است و هیدرولیز توسط این آنزیم باعث تولید پپتیدهایی باوزن مولکولی پائین ترو حلالیت بیشتر می‌شود (Kristinsson *et al*., 2000a).

Aspmoو همکاران (b ۲۰۰۵) ثابت کردند که پپتون تولید شده توسط آلکالاز دارای محتوای بالاتری از پپتیدهای با زنجیره کوتاه هستند. دلیل دیگر این پدیده مربوط به درجه هیدرولیز بالاتر در پپتون‌های تولیدی توسط آلکالاز (۳۴ درصد) در مقایسه با پپتون‌های تولید شده توسط پروتامکس (۱۹ درصد) می‌باشد.

به نظر می‌رسد که درجه هیدرولیز بالاتر در پپتون‌های تولیدی توسط آنزیم آلکالاز، جذب پپتون ها رااز محیط کشت تسریع خواهد کرد (Gildberg *et al*., 1989).

آنالیز داده ها

پارامترهای آماری بدست آمده از نرم افزار DOE برای مدل RSM جهت بهینه سازی پپتون ماهی در جدول ۶ آمده است. در تحقیق حاضر، R^2 تنظیم شده در محدوده ۰/۵۵ بود.

مدل های کاهشی پپتون (Alcalase/Listeria) براساس آنالیز مدل رگرسیون بعد ازتهیه ۱۳ تیمار در مدل CCD در معادله زیر آمده است:

$$OD(DH) = 17.64 - 4.28FRT + 10.55pH + 15.56RT^2 \quad (۲)$$

جدول ۵- درصد رشد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت تولیدشده از پپتون ماهی هوور در مقایسه با محیط کشت شاهد (TSB*)

نمونه	زمان صفر	۱۸ ساعت	٤٤ ساعت	درصدرشد
شاهد	۰/۰۴	۱/۲۵	۲/۱۲۸	٪۹۸/۱۲
۲ (pH ۸:T** ۶۵)	۰/۰۶	۴/۹۳	۱۳/۰۹	٪۹۹/۵
۶ (pH ۸/۲۵:T ۵۷/۵)	۰/۰۶	۱/۳۲	۵/۹۰	٪۹۸/۹
۹ (pH ۸:T ۵۷)	۰/۰۵	۲/۵۴	۸/۷۵	٪۹۹/۴۲
۱۱ (pH ۸/۲۵:T ۵۷/۵)	۰/۰۶	۲/۷۳	۷/۳۲	٪۹۹/۱۸
۱۲ (pH ۸/۲۵:T ۵۷/۵)	۰/۰۶	۱/۷۱	۸/۵۷	٪۹۹/۲۹

*تریپتیک سوی براث

** دمای هیدرولیز بر حسب درجه سانتیگراد

تمامی ضرایب رگرسیون معنی دار بودند. ضرایب این معادله نشان می‌دهد که اثر متغیر pH بر هیدرولیز پروتئین در مقایسه با متغیر دما بدلیل بیشتر بودن ضریب بیشتر بوده است. همچنین معادله نشان می‌دهد که اثر متغیر pH بر هیدرولیز پروتئین مستقیم (ضریب با علامت مثبت) ولی اثر دما معکوس (ضریب با علامت منفی) است. به بیان دیگر هرچه pH بیشتر و دما کمتر باشد هیدرولیز بهتر صورت می‌گیرد.

لازم به ذکر است که محدوده pH و دما برای آنزیم آلکالاز دارای دامنه مشخصی بود و اگر از محدوده استاندارد خارج گردد بالطبع فعالیت آنزیمی نیز کاهش خواهد یافت (Ovissipour2009b، *et al.*,).

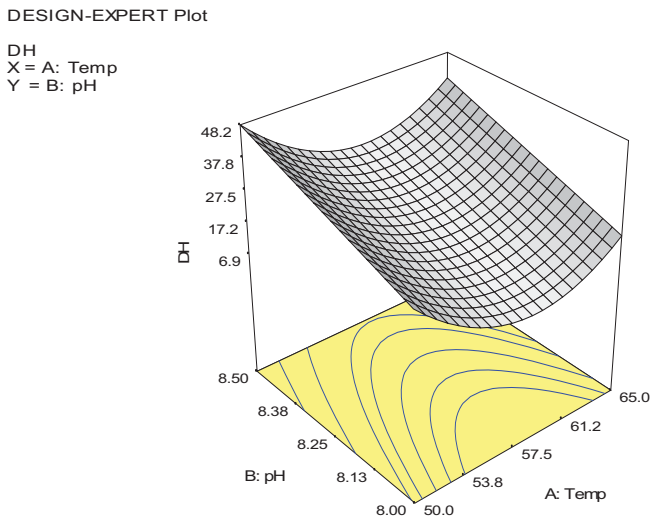
به‌منظور تایید مدل انتخابی طراحی شده نرم افزار DOE از تست‌های آماری تکمیلی نیزاستفاده شده که نتایج آن در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج حاکی از ارتباط منطقی مدل با داده‌های آزمایش می‌باشد، زیرا مقدار R^2، ۰/۶۶ بوده است. در تست F مقدار p کمتر از ۰/۰۵۰۰ نشا ن دهنده این است مدل معنی دار است. همچنین نسبت سیگنال به نویز که Adeq. Precision معرف آن است بایستی از ۴ بزرگتر باشد تا داده های بدست آمده از آزمایشات با مدل انتخابی منطبق باشد که در این بررسی مقدار آن به بالاتر از ۴ رسیده است که نشان دهنده این است که مدل انتخابی مناسب بوده است. میزان Lack of fit (LOF) بایستی معنی دار نباشد و در این آزمایش معنی دار نبوده بنابراین مدل در نظر گرفته شده مناسب ((fit بوده است.

شکل سه بعدی هیدرولیز پروتئین ماهی تون در شکل (۱) نشان داده شده است. نتایج نشاندهنده آنست که بهترین شرایط هیدرولیز در pH ۸/۵ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رخ داده است.

Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که شرایط بهینه برای دستیابی به یک درجه هیدرولیز بالا (۵۰ درصد) پروتئین امعا و احشاء کپور هندی (*Catla catla*) توسط آنزیم آلکالاز در pH ۸/۵ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد می‌باشد.

تقی اف و همکاران (۱۳۸۹) از روش پاسخ سطحی (RSM) به‌منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعا واحشاء فیل ماهی (*Huso huso*) از لحاظ دما، زمان ومیزان آنزیم استفاده نمودند. در این روش اثر سه فاکتور دما، زمان و میزان آنزیم (متغیر مستقل) بر درجه هیدرولیز (به‌عنوان سطح پاسخ) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نمودارهای سه بعدی، شرایط بهینه از لحاظ دما، زمان و میزان آنزیم به ترتیب عبارتند از ،دمای ۵۰درجه سانتیگراد، زمان ۱۲۰ دقیقه و میزان آنزیم ۱ درصد بودند.

در مطالعات انجام شده توسط صفری و همکاران (۲۰۱۱) از آنزیم آلکالاز به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده از سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) استفاده نموده و محصول تولید شده نیز به‌عنوان محیط کشت پایه باکتری *Vibrio anguillarum* مورد ارزیابی قرارگرفته است و مقدار پپتون مورد استفاده در محیط کشت پایه نیز با مدل RSM بهینه سازی گردید. نتایج نشان داد که به هنگام استفاده از پپتون در غلظت ۳۰ گرم در لیتر، پس از ۱ ساعت، رشد باکتری به بیشترین مقدار می‌رسد.



شکل ۱- اثر متقابل دو متغیر pH و دما بردرجه هیدرولیز

جدول ٦- پارامترهای بدست آمده از تجزیه و تحلیل آماری برای مدل RSM

متغیرها	پپتون ماهی هوور
R^2	۰/۶۶۰۰
R^2 adjusted	۰/۵۴۶۶
Prob. >F	<۰/۰۵۰۰
(Lack of fit (LOF	۰/۱۶۴
.Std. Dev	۹/۴۸
Adeq. Precision	۷/۸۰۳

نتیجه‌گیری

بطور کلی تحقیق حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از ضایعات ماهی هوور تحت شرایط هیدرولیزآنزیمی مناسب در جهت تولید محیط کشت باکتری‌های پر نیازی نظیر *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده کرده و آنرا به‌عنوان جایگزین مناسب برای محیط‌های کشت تجاری معرفی نمود. ولی با این وجود تکمیل مطالعات مذکور از طریق انتخاب تیمارهای مختلف جهت دستیابی به نتایج مستدل و منطقی ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

اویسی پور، م. ر. و قمی م. ر. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۶۶-۶۸. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۸۶.

تقی اف، م. ، قمی، م. ر. و اویسی پور،م. ر. ۱۳۸۹. تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء فیل ماهی (*Huso huso*) با استفاده از آنزیم آلکالاز. مجله شیلات ایران۴ (۱) ، ۳۵-۴۰.

Aspmo SI, Horn SJ, and Eijsink VGH. 2005a. Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. FEMS Microb Lett 248: 65–68.

Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VGH. 2005b. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. Process Biochem 40: 3714–22.

Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VGH. 2005c. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochem 40, 1957–1966.

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.

Diniz, F. M. , and Martin, A. M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (Squalus acanthias). International Journal of Food Science and Technology, 31, 419–426.

Dufossee, L. , de la Broise, D. , and Guerard, F. 2001. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. Current Microbiololgy, 42, 32–38.

FAO 2006. Year book of fishery statistics (Vol. 98/1and2). Rome: Food and Agricultural Organisation of the United Nations.

Gildberg A, Batista I, Strøm E. 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnol Appl Biochem 11, 413– 423.

Guerard, F. , Dufosse, L. , De La Broise, D. , and Binet, A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using Alcalase. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 11, 1051– 1059.

Hoyle, N. T. , and Merritt, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (Clupea harengus). Journal of Food Science, 59, 76–79 and 129.

Kristinsson, H. G. , and Rasco, B. A. 2000a. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40 (1) , 43–81.

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.

Larsen, T. , Thilsted, S. H. , Kongsback, K. , and Hanse, M. 2000. Whole small fish as a rich calcium source. British Journal of Nutrition, 83, 191– 196.

Laufenberg, G. , Kunz, B. , and Nystroem, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products. Bioresource Technology, 87, 167–198.

Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in ensymology, vol. 3 (p. 450). NewYork: Academic.

Martone, C. B. , Borla, O. P. , and Sanchez, J. J. 2005. Fishery by - product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. Bioresource Technol0gy, 96, 383-387.

Miettinen, H. , Aarnisalo, K. , Salo, S. and Sjöberg, A. -M. 2001. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. J. Food Prot. 64, 635-639.

Montgomery D. C. 2001. Design and analysis of experiments (5^{th} Ed.) New York, USA.

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.

Ovissipour, MR. , 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. *Food Chemistry*, *115*, 238–242.

Ovissipour, MR. , Safari, R. , Motamedzadegan, A. , Shabanpour, B. 2009b. Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (Acipenser persicus) Visceral Protein. Food Bioprocess Technol, DOI 10. 1007/s11947-009-0284-x.

Ovissipour, MR. , Safari, R. , Motamedzadegan, A. , Rasco, B. ,Pourgholam, R. , Mohagheghi, E. , Esmaeili Molla, A. 2009c. Use of hydrolysates from yellofin tuna (*Thunnus albacares*) fisheries by-product as nitrogen source for bacteria growth media. Int Aquat Res 1,73-77.

Parajo J. C. Alonso J. L. Lage M. A. and Vazquez D. 1992. Empirical modeling of Eucalyptus wood processing, Bioprocess Engineering, 8, 129–136.

Perea, A. , Ugalde, U. , Rodriguez, I. , and Serra, J. L. 1993. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: application in industrial whey bioconversion processes. Enzyme and Microbial Technology, 15, 418–423.

Rocourt, J. , Hogue, A. , Toyofuku, H. , Jacquet, C. and Schlundt, J. 2001. Listeria and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. Am. J. Infect. Control 29, 225-227.

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. *Food and Bioprocess Technology*, doi:10. 1107/s11947-009-0225-8.

Safari, R. ,Nasrollahzadeh Saravi, H. ,Pourgholam, R. , Motalebi, A. , 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, 20,1-11.

Skanderby, M. 1994. Protein hydrolysates: their functionality and applications, Food Technol.. int. Eur. , 10, 141.

Varnam, A. H. 1991. Foodborn pathogens. Wolf Publishing Ltd, England, Pp327-353.

Vazquez, J. A. , Gonzalez, M. P. , and Murado, M. A. 2004. A new marine medium—use of different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 35, 385–92.

Vazquez JA, and Murado MA. 2008a. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. Enzyme Microbial Technol 43, 66–72.

Vazquez JA, Docasal SF, Prieto MA, Gonzalez MP, and Murado MA. 2008b. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. An approach to bio-silage of fishing by-products. Bioresour Technol 99, 6246–6257.