بررسی هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی سرگنده و استفاده از هیدرولیزات حاصل به عنوان منبع پپتون برای رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم

یونس صفدری[1]، محمد رضا سعیدی اصل[2]، رضا صفری[3]، عیسی جاهد[4]

1- دانش آموخته ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار، ایران

2- دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

3- مربی پژوهشی، مسئول امور تحقیقات ژنتیک مولکولی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

4- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت:1391/3/1 تاریخ پذیرش: 1391/9/1

چکیده

با وجود میزان نسبتا بالای صید جهانی ماهی و به دنبال آن صنایع عمل آوری که منجر به تولید حجم بالایی از تولیدات جانبی گردیده است، تلاش بسیار کمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از این مواد جانبی صورت گرفته و بدون هیچ توجه زیست محیطی، دور ریخته می شود. اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، از یک طرف باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر به لحاظ داشتن پروتئین های با ارزش، قابل بازیافت می باشند. در این پژوهش ابتدا تاثیر سه نوع آنزیم پاپائین، پپسین، تریپسین (با غلظت 1/5 درصد پروتئین سوبسترا) و زمان تاثیر گذاری آن ها (30 ، 60 و 90 دقیقه) بر میزان هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سر گنده به منظور بازیافت پروتئین بررسی شد. سپس از پروتئین بازیافت شده به عنوان منبع پپتون در محیط کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده و میزان جذب نوری بعد از مدت زمان های صفر، 3، 6، 9، 12، 15، و 18 ساعت انکوباسیون، اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که آنزیم پاپائین در مدت زمان 90 دقیقه بیشترین راندمان را از نظر درجه هیدرولیز و در نتیجه تولید پروتئین داشت. همچنین مشخص شد که میزان رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم در پپتون مربوط به تیمارهای آنزیمی نسبت به محیط MRS به عنوان نمونه شاهد، بیشتر بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل خوبی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ارزش غذایی بالا از مواد جانبی ماهی به منظور کاربردهای مختلف وجود دارد.

واژه های کلیدی: بازیافت پروتئین، هیدرولیز آنزیمی، امعاء و احشاء ماهی سرگنده، لاکتوباسیلوس پلانتاروم

* مسوول مکاتبات : ysafdari@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

1- مقدمه

بر اساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان بالغ بر 132 میلیون تن می باشد، که فقط 50% از آنها قابلیت مصرف انسانی دارند. از میلیون ها تن ماهی صید شده، تقریبا 29/5% از آن تبدیل به خوراک دام می گردد که حدود 50% از مقدار ذکر شده مربوط به ضایعات کارخانجات فرآوری ماهی می باشد. این میزان نسبتا بالای صید جهانی و به دنبال آن صنایع عمل آوری، منجر به تولید حجم بالایی از مواد جانبی و غیر قابل استفاده گردیده است که بدون هیچ توجه زیست محیطی، دور ریخته می شود. عمده ترین مواد جانبی صنایع عمل آوری آبزیان، شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوانهای تنه می باشد(1). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، از یک طرف باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر به لحاظ داشتن پروتئین های با ارزش قابل بازیافت می باشند (6). در دهه 1960 تحقیقات زیادی برای دستیابی به منابع پروتئینی ارزان قیمت مغذی جهت تغذیه جمعیت انسانی در حال رشد و نیز حیوانات صورت گرفت و در این راستا توجه زیادی به ضایعات معطوف شد (7). شیوع جنون گاوی در سال های اخیر، محققان را بر آن داشته که فرآورده های دریایی هیدرولیز شده را جایگزین پروتئین های حیوانی کرده و به مردم معرفی نمایند (11). با توجه به پیشرفت تکنولوژی، افزایش جمعیت در جهان و افزایش میزان صید فرآورده های دریایی و به دنبال آن افزایش میزان ضایعات، پژوهشگران به دنبال روش هایی برای استخراج مواد با ارزش از ضایعات می باشند.

با بکارگیری تکنولوژی آنزیم برای بازیافت پروتئین، تولید طیف وسیعی از مواد به عنوان افزودنی غذای دام، طیور و آبزیان و یا فرآورده هایی برای کاربردهای صنعتی و دارویی فراهم می شود.(8). شاید بتوان اذعان نمود که بهترین راه برای تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا، تولید پروتئین هیدرولیز شده از این مواد خام کم ارزش می باشد. یکی از راه های مناسب برای افزایش بهره وری از این ضایعات، هیدرولیز آنزیمی است. هیدرولیز آنزیمی فرآیندی نسبتاً ساده، موثر و کارا است که مانع از تخریب پروتئین ها در اثر واکنشهایی مشابه با آنچه که در واکنشهای شیمیایی نامطلوب اتفاق می افتد، می شود. هدف اصلی هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی، بدست آوردن حداکثر بازیافت اجزای قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا در آنهاست (9).

آنزیم های مورد استفاده به منظور هیدرولیز آنزیمی، از منابع مختلف، گیاهی مانند آنزیم پاپائین(15)، یا جانوری مانند تریپسین و پپسین و یا میکروبی مانند آلکالاز، پروتامکس، نئوتراز بوده که به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرند(1).آنزیم های پپسین و تریپسین جزء پروتئازهای حیوانی بوده و در دستگاه گوارش حیوانات خونگرم و خونسرد وجود دارند. تفاوت دو آنزیم فوق در pH بوده که پپسین در pH اسیدی و تریپسین در pH خنثی عمل می کند. از تریپسین برای شکستن کازئین شیر، تحقیقات بیولوژیکی جهت بررسی خصوصیات پروتئین ها، درمان التهاب و انحلال لخته های خونی استفاده می شود. آنزیم پاپائین جزء آنزیمهای گیاهی بوده که در صنایع گوشت و کالباس، جداکردن مو از چرم قبل از دباغی، از بین بردن پروتئین های رسوب کرده روی لنزهای چشمی و به طور کلی برای هیدرولیز سوبستراهای محتلف مورد استفاده قرار گرفته و در pH خنثی بیشترین تاثیر را نشان می دهد. انجام تحقیقات به منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده، به دلیل کاربردهای فراوان آن حائز اهمیت است. یکی از موارد استفاده پروتئین تولید شده از ضایعات آبزیان، استفاده از آنها به عنوان منبع نیتروژن در فرمولاسیون محیطهای کشت میکروبی می باشد. معمولا گرانترین ترکیب در محیطهای کشت میکروبی، منبع نیتروژن بوده که از ترکیبات مختلف نظیرکازئین، سویا، گوشت گوساله و گوشت خوک تهیه می شود. برخی از باکتریها نظیر باکتریهای گروه لاکتیک اسید جهت رشد خود نیاز به محیط های کشت پرنیازی (غنی) دارند که حاوی انواع ویتامینها، اسیدهای آمینه، املاح معدنی و سایر پارامترهای رشد باشد، ولی با این وجود برخی دیگر از میکروارگانیسم ها نیز قادر به رشد در محیطهای ساده بوده و قادر به تولید متابولیتهای خود در محیطهای حاوی منابع ساده نیتروژن نظیر آمونیوم و نمک های نیتراتی می باشند. پپتونهای تجاری موجود در بازار از منابع مختلف نظیر گوشت خوک، گوشت، ارگانهای داخلی، ژلاتین، شیر، گیاهان و مخمرها تامین می شوند. استفاده از گوشت خوک به لحاظ شیوع بیماری انسفالوپاتی خوکی و حرام بودن استفاده از آن، محدودیتهای مختلفی وجود دارد. استفاده از ماهی به عنوان منبع غذایی برای رشد میکروبها اولین بار درسال 1949 گزارش شده

Archive of SID

www.SID.ir

است.از آن زمان به بعد، تحقیقات مختلفی در خصوص استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی به عنوان جزء اصلی در محیطهای کشت میکروبی انجام شده است. پروتئین هیدرولیز شده ماهی منبع غنی از اسید های آمینه ضروری، مواد معدنی شامل پتاسیم و منیزیم، ویتامین های گروه B و آمین های بیوژنیک می باشد. ماهی سرگنده به واسطه داشتن سر بزرگتر ، دارای ضایعات دور ریختنی بیشتری بوده و از این رو می تواند به عنوان یک سوبسترای مناسب در جهت هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان پپتون با منشاء ماهی در فرمولاسیون محیط کشت باکتریها مورد استفاده قرار گیرد. میزان صید کپور ماهیان پرورشی در سال 89 بالغ بر 70 هزار تن بوده که 5 درصد آن (3500 تن) مربوط به ماهی بیگ هد می باشد.

در تحقیق حاضر ابتدا اثر سه آنزیم پاپائین، پپسین و تریپسین بر درجه هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سر گنده و در نتیجه میزان پروتئین قابل بازیافت از آن بررسی شد. سپس از پپتون تولید شده از ضایعات ماهی کپور سرگنده به عنوان یکی از اجزاء اصلی در محیط کشت باکتری لاکتو باسیلوس پلانتاروم استفاده گردید و اثر آن بر رشد لاکتو باسیلوس با محیط کشت MRS به عنوان نمونه شاهد و تجاری مورد مقایسه قرار گرفت.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

امعاء و احشاء ماهی سرگنده به عنوان ماده خام اولیه، از بازار ماهی فروشان شهرستان ساری تهیه و به منظور جلوگیری از فرآیند اتولیز آنزیمی و میکروبی، نمونه های اخذ شده در ظرف پلاستیکی و در دمای 20- درجه سانتی گراد، تا شروع آزمایش، نگهداری شدند. آنزیم های پروتئاز مورد استفاده شامل پاپائین (آنزیمی با منشاء گیاهی)، تریپسین و پپسین (آنزیم هایی با منشاء حیوانی) بودند که به صورت پودر به ترتیب از شرکت سیگما و مرک تهیه شدند. آنزیمهای مذکور تا زمان شروع آزمایش در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

2-2- آماده سازی نمونه به منظور هیدرولیز آنزیمی

به منظور آماده سازی نمونه، ابتدا نمونه در دمای 4 درجه سانتی گراد، انجماد زدایی و سپس نمونه امعاء و احشاء، با استفاده از دستگاه Muolinex کاملا هموژن شده و پس از اضافه نمودن آب مقطر به نسبت 2 به 1 (آب به سوبسترا) ، به منظور غیر فعال شدن آنزیم های داخلی، برای مدت 20 دقیقه در دمای 85 درجه سانتی گراد قرار داده شد(17). بعد از خنک شدن و تنظیم pH در محدوده 7 برای پاپائین و تریپسین و 3 برای پپسین، نمونه ها در دمای 35 درجه برای آنزیم های حیوانی و 50 درجه سانتی گراد برای پاپائین، به مدت 30 ، 60 و 90 دقیقه قرار داده شدند. مقدار آنزیم های مورد استفاده 1/5 درصد میزان پروتئین امعاء و احشاء بود. بعد از هر نمونه گیری و نیز در پایان آزمایش، به منظور غیر فعال نمودن فعالیت آنزیم، نمونه ها مجددا در دمای 95 درجه سانتی گراد برای مدت 10 دقیقه قرار گرفتند. سپس نمونه ها به منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین های محلول، تحت عمل سانتریفوژ در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار، در دمای 4 درجه سانتی گراد با دور 8000 دور در دقیقه برای مدت 20 دقیقه قرار گرفتند. پس از پایان آزمایش درصد پروتئین و درجه هیدرولیز محصول و سوبسترای اولیه مورد آزمایش قرار گرفت.

2-3- استفاده از پروتئین تولید شده به عنوان منبع پپتون در محیط کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم

به منظور مقایسه رشد لاکتوباسیلوس در محیط کشت تجاری MRS و محیط کشت تهیه شده با پپتون تولید شده از ضایعات امعاء و احشاء ماهی سرگنده ، ابتدا ترکیبات اولیه محیط کشت MRS تهیه شده و پپتون تهیه شده از امعاء و احشاء ماهی سرگنده جایگزین پپتون تجاری شده و عمل استریل در دمای 121 درجه و بمدت 15 دقیقه انجام گرفت. با توجه به اینکه در فاز هیدرولیز از سه زمان استفاده شد، در آزمایش ارزیابی رشد باکتری فقط از آن زمانی که بیشترین درصد پروتئین در پپتون تولید شده وجود داشت استفاده گردید(زمان 90 دقیقه). پس از کشت اولیه باکتری در محیط MRS و انکوباسیون بی هوازی در دمای 30 درجه بمدت 18 ساعت و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی ، شستشو متوالی با سرم فیزیولوژی و متعاقب آن سانتریفوژ در دور 6000 به مدت 20 دقیقه انجام شده و در نهایت لوگ مشخصی از باکتری به محیط MRS و تهیه شده از امعاء و احشاء ماهی اضافه گردید. جهت ارزیابی رشد باکتری در زمانهای مختلف از دستگاه اسپکتوفتومتر و قرائت جذب نوری در طول موج 600 نانومتر استفاده شد(13 و 14).

Archive of SID

www.SID.ir

2-4- اندازه گیری شیمیایی

میزان پروتئین کل در مواد خام به روش کجلدال بدست آمد(3). میزان پروتئین در سوپرناتانت بعد از سانتریفوژ با روش بیورت اندازه گیری شد. سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد بکار برده شد و جذب با اسپکتوفوتومتر UV/VIS در طول موج 540nm اندازه گیری شد(10).

درجه هیدرولیز بر اساس گزارشهای کریستین سون و راسکو در سال 2000 و به روش تری کلرواستیک اسید(TCA) محاسبه گردید. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئینهای محلول در تری کلرواستیک اسید 10% به کل پروتئینهای موجود در نمونه می باشد. برای این منظور 750 میکرولیتر از نمونه با 750 میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید 20% با سمپلر برداشته شد و در ماکروتیوپ ریخته و پس از بهم زدن به مدت 5 دقیقه، با دور 5000 دور در دقیقه و زمان10 دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بیورت اندازه گیری و میزان درجه هیدورلیز از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید(12).

$$\%DH = \frac{\text{پروتئین حل شده در TCA}}{\text{پروتئین کل نمونه}} \times 100$$

2- 5- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده ها

جهت بررسی نتایج هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی، از طرح آماری کاملا تصافی به روش فاکتوریل استفاده شد. اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری SAS ویرایش 9/1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال آلفا برابر با 0/05 با همین نرم افزار انجام گردید. متغیرهای فرآیند شامل نوع آنزیم بکار رفته(پاپائین، تریپسین و پپسین) و زمان اثرگذاری آن ها (30، 60 و 90 دقیقه) بود که در سه تکرار انجام شد. جهت مقایسه میانگین نتایج حاصل از اثر نوع پپتون بکار رفته در زمان های مختلف انکوباسیون (صفر، 3، 6، 9، 12، 15، و 18 ساعت) بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم، از آزمون LSD در سطح احتمال آلفا برابر با 0/05 و آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم افزار Mstat-C انجام گردید. پارامتر های اندازه گیری شده شامل درجه هیدرولیز انجام گرفته (درصد)، میزان پروتئین بازیافت شده (میلی گرم در میلی لیتر) و درصد جذب نوری بود. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2007 استفاده گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- تاثیر سه نوع آنزیم پاپائین، تریپسین، پپسین و مدت زمان واکنش بر میزان پروتئین تولیدشده حاصل از هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سرگنده

نتایج آنالیز واریانس اثر متغیرهای فرآیند شامل سه نوع آنزیم پاپائین، تریپسین، پپسین و مدت زمان اثر آن ها بر هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سرگنده به منظور بازیافت پروتئین در جدول 1 نشان داده شده است. طبق نتایج جدول ANOVA تاثیر هر دو متغیر و همچنین اثر متقابل آن ها بر راندمان تولید پروتئین حاصل از هیدرولیز سوبسترا (امعاء و احشاء) در سطح خیلی بالایی معنی دار بودند (P <0/0001). نتایج همچنین نشان داد که افزایش مدت زمان تاثیر آنزیم ها بر سوبسترا از 30 دقیقه به 90 دقیقه، نسبت به تغییر نوع آنزیم بکار رفته، بر راندمان تولید تاثیر بیشتری داشت (جدول 1).

جدول 1- خلاصه نتایج جدول آنالیز واریانس تاثیر سه نوع آنزیم پاپائین، تریپسین، پپسین و زمان واکنش بر میزان تولید پروتئین حاصل از هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سرگنده

منبع تغییرات	درجه آزادی	Mean Square	F- Value	p-value
زمان	2	708/65	767/71	<0/0001
نوع آنزیم	2	377/33	408/77	<0/0001
اثرات متقابل	4	32/15	34/83	<0/0001
خطا	18	0/923		
کل	26			

مقایسه میانگین انواع آنزیم اضافه شده به سوبسترا به منظور هیدرولیز امعاء و احشاء و در نتیجه تولید پروتئین قابل بازیافت، نشان داد که در بین سه نوع آنزیم بکار رفته که شامل پاپائین، تریپسین و پپسین بود، آنزیم پاپائین بیشترین تاثیر را داشت، به طوری که حداکثر راندمان تولید پروتئین و درجه هیدرولیز صورت گرفته که به ترتیب برابر 43/05 میلی گرم در لیتر و 24/2 درصد بود، مربوط به آنزیم پاپائین است (شکل 1). همان طور که در شکل 1 مشاهده می شود بین میانگین پروتئین تولیدی و

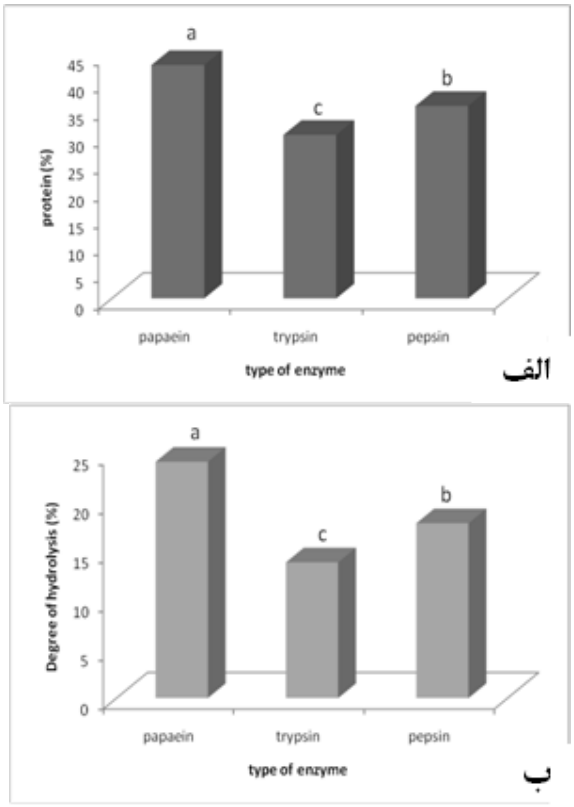
Archive of SID

www.SID.ir

همچنین درجه هیدرولیز صورت گرفته توسط هر سه آنزیم پاپائین، تریپسین، پپسین از نظر آماری در سطح آلفا برابر 0/05 اختلاف معنی داری وجود دارد. در مورد هر دو پارامتر اندازه گیری شده که شامل میزان پروتئین بازیافتی (بر حسب میلی گرم در میلی لیتر) و درجه هیدرولیز (درصد) بود، آنزیم پاپائین، بیشترین و آنزیم تریپسین کمترین تاثیر را داشت. میزان پروتئین تولیدی و درجه هیدرولیز انجام گرفته برای آنزیم تریپسین به ترتیب برابر 30/16 میلی گرم در میلی لیتر و 13/87 درصد بود.

اسپمو و همکاران در سال (2005 a) هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی آتلانتیک کد[2] را بررسی کردند. آن ها امعاء و احشاء ماهی را توسط آنزیم های داخل سلولی به تنهایی و همچنین در ترکیب با یکی از هفت پروتئاز مختلف تجاری شامل آلکالاز، نئوتراز، پروتامکس، پاپائین، بروملاین، اکتینیدین و مخلوط پروتئاز گیاهی هیدرولیز کردند. میزان هیدرولیزات با نسبت مواد جامد محلول، کدورت، غلظت گروه های آلفا آمینو و توزیع وزن مولکولی پپتیدها اندازه گیری شد. طبق نتایج این محققان آنزیم های آلکالاز و پاپائین بیشترین راندمان مواد جامد محلول را نتیجه دادند، که میزان آن در حالتی که آنزیم آلکالاز در حداکثر مقدار بود، 95 درصد بدست آمد(5).

آنتونیو وازکیوز و انکسو مورادو (2008) از هیدرولیزات آنزیمی حاصل از ضایعات مواد غذایی به عنوان منبع پپتون جهت رشد باکتری های اسید لاکتیکی استفاده کردند. برای این منظور ابتدا انواع پپتون را از هیدرولیز آنزیمی ضایعات حاصل از صنایع فرآوری هشت پا[3] تهیه کرده و سپس از آن جهت رشد باکتریهای اسید لاکتیکی و تولید باکتریوسین ها استفاده کردند. نتایج آن ها نشان داد که بیشترین مقدار نایسین تشکیل شده توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیک با استفاده از پپتون حاصل از هیدرولیز آنزیم پاپائین (غلظت آنزیم 1/25 میلی گرم) به مدت 24 ساعت بدست آمد. بیشترین مقدار پدیوسین[4] تولیدی نیز توسط باکتری پدیوکوکوس لاکتیکی اسید با استفاده از پپتون مشتق شده از هیدرولیز آنزیم پپسین (3/75 میلی گرم) به مدت 4 ساعت حاصل شد. آن ها گزارش دادند که پپتون های دریایی جایگزین مناسب و قابل دسترسی برای محیط کشت های تجاری رایج و گران قیمت هستند(2).



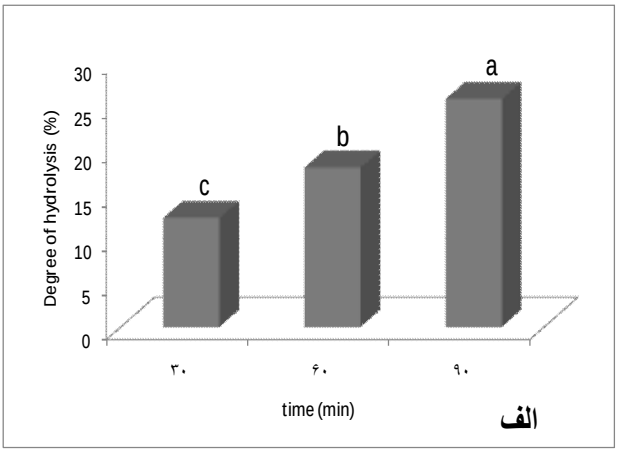
شکل1- تاثیر نوع آنزیم بکار رفته بر (الف) میزان پروتئین تولیدی و (ب) درجه هیدرولیز صورت گرفته در امعاء و احشاء ماهی سرگنده

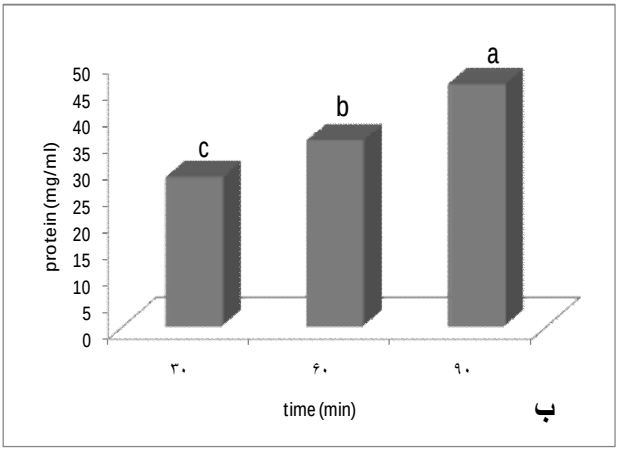
نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از 30 دقیقه به 90 دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز انجام گرفته توسط آنزیم ها افزایش یافته است (شکل 2). میزان پروتئین در زمان 30 دقیقه برای آنزیم پاپائین 30/93 میلی گرم در میلی‌لیتر بود که به 55/47 میلی گرم در میلی‌لیتر در زمان 90 دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیم تریپسین 25/07 میلی گرم در میلی‌لیتر بوده که به 36/95 میلی گرم در میلی‌لیتر در زمان 90 دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیم پپسین28/02 میلی گرم در میلی‌لیتر بوده که به 44/48 میلی گرم در میلی‌لیتر در زمان 90 دقیقه رسید. درجه هیدرولیز برای آنزیم پاپائین در زمان 30 دقیقه 13/9 درصد بوده که به 35/21 در زمان 90 دقیقه رسید. این روند برای آنزیم تریپسین و پپسین در زمان‌های 30 و 90 دقیقه به ترتیب 10/07 و 18/31 درصد و 12/89 و 23/82 درصد بوده است.

[2]. Atlantic cod
[3]. Octopus
[4]. Pediocin

Archive of SID

www.SID.ir





شکل 2- ارتباط بین زمان واکنش و (الف) درجه هیدرولیز صورت گرفته (ب) میزان پروتئین تولید شده از امعاء و احشاء ماهی سرگنده توسط سه نوع آنزیم پاپائین، تریپسین و پپسین

با مقایسه میانگین میزان پروتئین تولید شده و درجه هیدرولیز انجام گرفته توسط آنزیم ها در زمان های 30، 60 و 90 دقیقه مشاهده شد که بین هر سه زمان ذکر شده از نظر کارایی آنزیم ها و میزان پروتئین هیدرولیز شده، در سطح احتمال 95 درصد اختلاف معنی داری وجود دارد (شکل 2)، به طوری که بیشترین راندمان در زمان 90 دقیقه حاصل گردید.

مطالعات انجام شده توسط اویسی پور و همکاران در سال 2009 نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی قره برون از 30 دقیقه به 205 دقیقه، درجه هیدرولیز افزایش نسبی پیدا کرده است، ولی این روند در دماهای مختلف متفاوت بوده به طوری که برای دمای 35 درجه سانتی‌گراد درجه هیدرولیز در زمان 30 دقیقه به 10/5 درصد افزایش یافته و تا زمان 205 دقیقه در همین دامنه ثابت مانده است. در دمای 45 درجه سانتی گراد روند افزایش سریعتر بوده و از 10/25 درصد در زمان 30 دقیقه به 35/27 درصد در زمان 205 دقیقه افزایش یافت. با افزایش دما به 55 درجه سانتی گراد این روند افزایش معنی‌داری داشته و به 64/13 در زمان 205 دقیقه رسید. طبق نتایج آن ها، با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز بسته به دمای مورد استفاده تغییرات معنی‌داری کرده و افزایش آن به دمای مورد استفاده بستگی دارد(12).

در مطالعه حاضر دمای مورد استفاده برای فعالیت آنزیم‌های پپسین و تریپسین، 35 درجه سانتیگراد و پاپائین55 درجه سانتیگراد بود که با در نظر گرفتن سایر مطالعات انجام شده انتخاب شد تا بهترین تغییرات در میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بدست آید.

نتایج مطالعات کریستین سون و راسکو در سال 2000 درخصوص هیدرولیز ماهی آزاد نشان داد که درجه هیدرولیز با طولانی تر شدن زمان واکنش، کاهش و سپس ثابت باقی می‌ماند. آنها علت این امر را کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم بخاطر عدم وجود سوبسترای لازم جهت هیدرولیز، مهار آنزیم و غیر فعال شدن آن بیان کردند(9).

لیاست و همکاران (2002)، ماهی *Atlantic salmon*, را تحت 3 آنزیم نئوتراز ، آلکالاز و پپسین به مدت (1، 15، 30، 45، 60، 90 و 120 دقیقه) پروتئولیز کردند. طبق نتایج این محققان بعد از 120 دقیقه، بازیافت پروتئین دو برابر شد و از 30 به70-60 درصد رسید. آنها به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان واکنش و استفاده از آنزیم آلکالاز، بازیافت پروتئینی بالاتری نسبت به آنزیم ها و زمانهای دیگر حاصل می گردد. در مطالعه حاضر نیز میزان بازیافت پروتئین از زمان 30 تا 60 دقیقه روندافزایشی داشته و در زمان 90 دقیقه تقریبا دو برابر گردید.

به طور کلی نتایج حاصل از مقایسه اثرات متقابل بین نوع آنزیم بکار رفته و مدت زمان تاثیر گذاری آن ها نشان داد که آنزیم پاپائین در مدت زمان 90 دقیقه بیشترین کارایی را از نظر میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز انجام گرفته داشت، به طوری که حداکثر میزان پروتئین تولید شده و درجه هیدرولیز که به ترتیب 55/47 میلی گرم در میلی لیتر و 35/22 درصد بود، در شرایط ذکر شده حاصل گردید.

Archive

www.SID.ir

2-3- تاثیر محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از امعاء و احشاء ماهی سر گنده توسط آنزیم های پاپائین، پپسین و تریپسین، و مدت زمان انکوباسیون بر روند رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم

برای استفاده از پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی سر گنده ، از پپتون هیدرولیز شده توسط آنزیم پاپائین در زمان 90 دقیقه که دارای بیشترین میزان پروتئین و در حقیقت محصول نهایی فرآیند هیدرولیز بود، استفاده گردید. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز توسط سه آنزیم پاپائین، تریپسین و پپسین و مقایسه آن با محیط کشت تجاری MRS[5] در جدول 2 و شکل 3 نشان داده شده است. به طور کلی در یک زمان انکوباسیون ثابت، میزان رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در بین محیط کشت های حاوی پپتونهای تولید شده از هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سر گنده توسط سه آنزیم پاپائین ، تریپسین و پپسین از نظر آماری در سطح آلفا برابر 0/05 اختلاف معنی داری وجود ندارد، ولی به غیر از زمان های صفر و سه ساعت، میزان جذب نوری در نمونه های مربوط به پپتون های آنزیمی نسبت به محیط کشت MRS به عنوان نمونه شاهد، بالاتر بوده و این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد (جدول 2).

نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از زمان صفر تا 18 ساعت انکوباسیون در هر چهار تیمار پاپائین، تریپسین ، پپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی این افزایش در تیمار پاپائین بهتر از سه تیمار دیگر بوده و تغییرات در دو تیمار آنزیمی دیگر، نسبت به نمونه شاهد بیشتر بوده است (شکل 3). در تیمار پاپائین، جذب نوری باکتری از 0/51 در زمان صفر به 7/34 در زمان 18 ساعت رسید در حالی که در تیمارهای تریپسین ، پپسین و شاهد این میزان به ترتیب از 0/51 ، 0/52 و 0/45 در زمان صفر به 7/25 ، 7/31 و 6/1 در زمان 18 ساعت رسید. نتایج آنالیز آماری جذب نوری محیط کشت های حاوی پپتون های آنزیمی و همچنین نمونه شاهد نشان داد که در یک تیمار ثابت، با افزایش زمان انکوباسیون تا 18 ساعت، میزان جذب نوری افزایش پیدا کرده است به طوری که میزان جذب نوری در زمان های مختلف اختلاف معنی داری دارد (جدول 2). این نتیجه نشان می دهد که افزایش زمان انکوباسیون نسبت به تغییر سوبسترای انتخابی در این پژوهش، بر رشد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم تاثیر بیشتری داشته است.

در مطالعه انجام شده توسط صفری و همکاران در سال 2011، از سه غلظت 10، 20 و 30 گرم از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی فیتوفاگ به منظور کشت ویبریوآنگوئیلاروم استفاده شده است. در مطالعه آنها تاثیر دو پارامتر مقدار پپتون مورد استفاده و زمان انکوباسیون بر روند رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش میزان پپتون، زمان فاز سکون باکتری کاهش یافته و باکتری سریع‌تر وارد فاز رشد می‌گردد. رشد ویبریو آنگوئیلاروم در غلظت‌های 10 و 20 گرم در لیتر از پپتون کمتر از محیط کشت تجاری بوده است که نتیجه حاصل با مطالعه انجام شده در این تحقیق مغایرت دارد. بهترین نتیجه تحقیق آنها غلظت 30 گرم از پروتئین و زمان 1/5 ساعت بوده است. یکی از دلایل ممکن است ترکیب متفاوت اسیدهای آمینه امعاء و احشاء ماهی سر گنده از ماهی فیتوفاگ باشد که برخی از اسیدهای آمینه ضروری باعث تقویت رشد لاکتوباسیلوس گردند(13). هرچند که هر دو ماهی از یک خانواده می‌باشند ولی این تفاوت ممکن است وجود داشته باشد که نیاز به مطالعه بیشتر و آنالیز پروفایل اسیدهای آمینه می‌باشد. در مطالعه دیگری که توسط صفری و همکاران در سال 2009 انجام شد، از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی تون با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پروتامکس به منظور کشت گونه‌های مختلف باکتری‌های گروه لاکتیک استفاده شده است. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از تیمارهای آلکالاز و پروتامکس بهتر از محیط کشت تجاری MRS بوده است. میزان پروتئین مورد استفاده 10 گرم در مقیاس 18 گرم (پپتون در محیط کشت تجاری MRS) بوده است(14). نتایج مطالعه مذکور با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

وازکیوز و همکاران در سال 2004 از محیط کشت حاوی پپتون ماهی به منظور رشد باکتری های بیماریزا و پروبیوتیک (ویبریو، روزئوباکتر و سودوموناس) استفاده نمودند. نتایج آن ها نشان داد که پپتون‌های مورد استفاده باعث تقویت رشد باکتری‌های شاخص شده و در بین آنها نیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون بهتر از سایر سوبسترا پاسخ داده است(16).

5 . De Man Rogosa & Sharp

Archive of SID

www.SID.ir

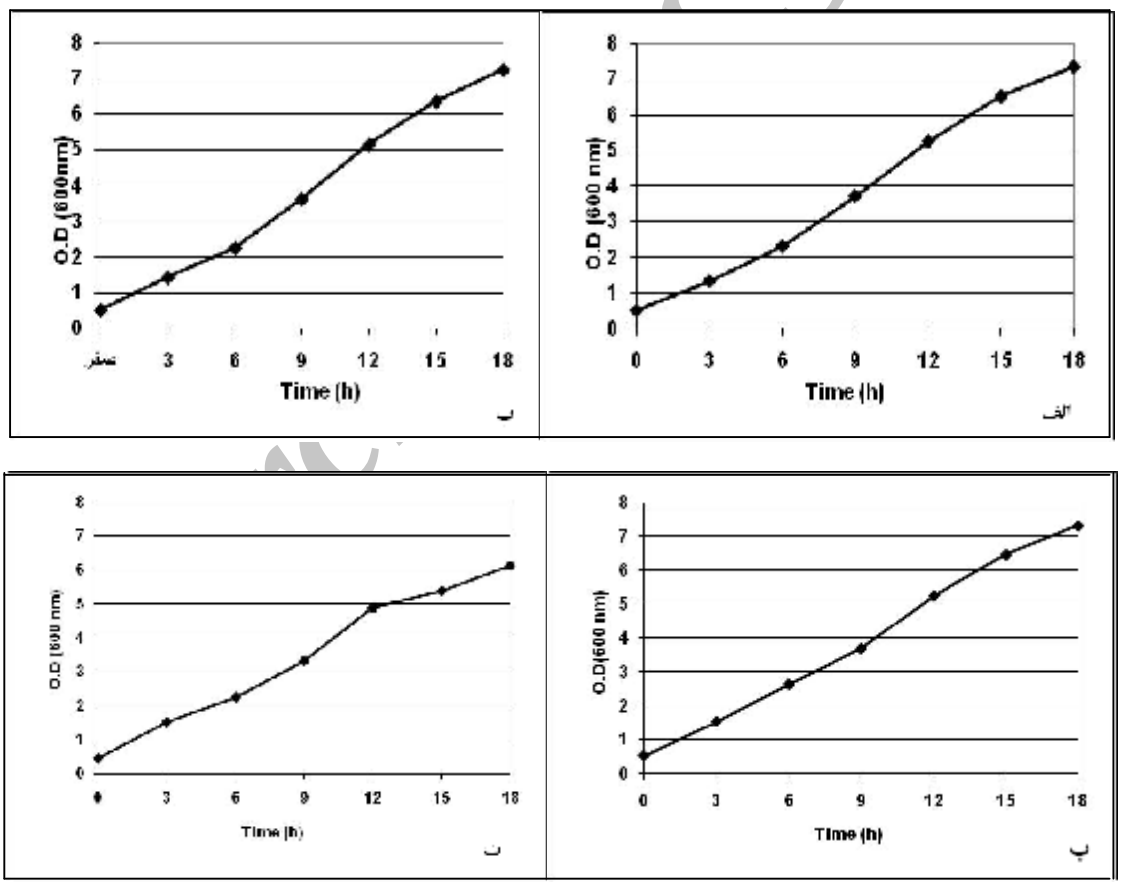
جدول (2)- نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت **MRS** براث و محیط کشت مایع حاوی پپتونهای تولید شده از هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سر گنده توسط سه آنزیم پاپائین ، تریپسین و پپسین

زمان(ساعت)	پاپائین	تریپسین	پپسین	MRS
صفر	A0/51 ±0/01 g	A0/51 ±0/01 g	A0/52 ±0/01 g	A0/45 ±0/005 g
3	B1/34 ± 0/025 f	AB1/43 ± 0/01 f	A1/54 ± 0/026 f	A1/53 ± 0/035 f
6	B2/32 ± 0/025 e	B2/26 ± 0/005 e	A2/64 ± 0/01 e	B2/25 ± 0/01 e
9	A3/72 ± 0/02 d	A3/63 ± 0/026 d	A3/68 ± 0/025 d	B3/31 ± 0/02 d
12	A5/25 ± 0/026 c	AB5/15 ± 0/02 c	A5/26 ± 0/02 c	B4/89 ± 0/07 c
15	A6/45 ± 0/05 b	A6/36 ± 0/02 b	A6/45 ± 0/015 b	B5/38 ± 0/01 b
18	A7/34 ± 0/02 a	A7/25 ± 0/02 a	A7/31 ± 0/01 a	B6/14 ± 0/03 a

- اعداد میانگین 3 تکرار هستند

* حروف بزرگ لاتین (از A تا B) اختلاف بین میانگین های هر ردیف را نشان می دهد.

** حروف کوچک لاتین (از a تا g) اختلاف بین میانگین های هر ستون را نشان می دهد.



شکل 3- تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از امعاء و احشاء ماهی سر گنده توسط (الف) آنزیم پاپائین (ب) آنزیم تریپسین (پ) آنزیم پپسین و (ت) محیط کشت تجاری **MRS** به عنوان نمونه شاهد

www.SID.ir

اسپمو و همکاران (2005 b) با تحقیقی که بر روی تولید هیدرولیزات از ماهی کد توسط آنزیم های مختلف به منظور استفاده از آن در محیط کشت رشد باکتری به عنوان منبع نیتروژن، آمینو اسید و ویتامین ها انجام دادند، اعلام کردند که هیدرولیزات ماهی به طور کلی جایگزین مناسبی به عنوان منبع نیتروژن برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم ها نسبت به سایر منابع است.

بر اساس نتایج این محققان آنزیم های پروتئولیتیک تاثیر قابل توجهی بر راندمان تولید هیدرولیزات ماهی و در نتیجه حداکثر سرعت رشد میکروارگانسم های انتخابی و تولید بیومس داشت. نتایج آن ها همچنین نشان داد که بهترین آنزیم پروتئولیتیک برای تولید هیدرولیزات از امعاء و احشاء ماهی کد، آنزیم آلکالاز بود(4).

به نظر می‌رسد که درجه هیدرولیز بالا در پپتون تولید شده از تیمارهای آنزیمی باعث تسریع جذب پپتون در محیط کشت مورد استفاده شده و از این رو روند رشد لاکتوباسیلوس در پپتون مربوط به تیمارهای آنزیمی بهتر از نمونه شاهد بوده است زیرا پپتون‌های تولید شده در این تیمار، از نظر وزن مولکولی و طول زنجیره پپتیدی در وضعیت مناسب (به عنوان سوبسترای باکتریایی) قرار داشتند. مقدار پپتون مورد استفاده در مطالعه حاضر برابر 10 گرم در لیتر از محیط کشت تجاری بوده است. محیط کشت تجاری مورد استفاده در این تحقیق MRS بوده که میزان پپتون پایه آن 18 گرم در لیتر بوده است. نتایج نشان داد که 10 گرم از پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی سر گنده باعث تقویت رشد لاکتوباسیلوس شده و بهتر از محیط کشت تجاری پاسخ داده است.

4- نتیجه گیری

با بررسی اثر سه نوع آنزیم پاپائین، تریپسین و پپسین بر میزان درجه هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی سرگنده به منظور بازیافت پروتئین آن مشخص شد که آنزیم پاپائین به عنوان یک آنزیم پروتئاز گیاهی نسبت به پروتئیناز های حیوانی (تریپسین و پپسین) راندمان بیشتری از نظر میزان درجه هیدرولیز انجام گرفته و در نتیجه میزان پروتئین هیدرولیز شده قابل بازیافت، داشت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در مورد هر سه آنزیم با افزایش زمان اثر گذاری بر سوبسترا، راندمان پروتئین قابل بازیافت افزایش یافته به طوری که بیشترین میزان پروتئین تولیدی و درجه هیدرولیز انجام گرفته در زمان 90 دقیقه توسط آنزیم پاپائین، به ترتیب برابر 43/05 میلی گرم در لیتر و 24/2 درصد بود. همچنین استفاده از پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تیمار آنزیمی به عنوان پپتون در محیط کشت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم، نشان دهنده رشد بیشتر باکتری لاکتوباسیلوس نسبت به پپتون تجاری MRS به عنوان نمونه شاهد بود، به طوری که حداکثر میزان جذب نوری در محیط کشت حاوی پپتون حاصل از آنزیم پاپائین در مدت زمان انکوباسیون 18 ساعت بدست آمد که برابر 7/34 بود.

5- منابع

1. اویسی پور، م.ر.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع.، محمد نظری، ر. 1389. بررسی خواص پروتئینهای هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیمهای تجاری. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، جلد6، شماره 1، ص 67 تا 76.
2. Antonio V´azquez, J., and Anxo Murado, M. 2008. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. Enzyme and Microbial Technology, 43 , 66–72.
3. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
4. Aspmo, S. I., Horn, S. J., . Eijsink, V. G.H. 2005b. Hydrolysates from Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera as components of microbial growth media. Process Biochemistry 40 , 3714–3722.
5. Aspmo, S. I., Horn, S. J., and Eijsink, V. G.H. 2005 a. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera. Process Biochemistry 40 , 1957–1966.
6. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R. G. 2008a. 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.
7. Bhaskar, N.,and Mahendrakar, N.S. 2008b. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (Catla catla): Optimization of hydrolysis conditions for a

Archive of SID

www.SID.ir

commercial neutral protease. Bioresource Technology 99 ,4105–4111.
8. 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.
9. 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.
10. Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology, 3:p. 450. New York: Academic Press.
11. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., and Espe, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar, L.) frames by Protamex™ protease. Process Biochemistry, 37, 1263–1269.
12. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E., and Esmaeili Molla, A. 2009. Use of hydrolysates from yellowfin tuna Thunnus albacores fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research, 1:73–77.
13. Safari, R. Nasrollahzadeh, 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 (2) 247–257.
14. 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.
15. Shahidi, F., Han, X-Q., and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus), Food Chem., 53, 285.
16. V´azquez, J.A., Gonz´alez, M.P., Murado, M.A. 2004. A new marine medium. Use of the different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. Enzyme Microb Technol, 35:385–92.
17. 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. Food Chemistry, 104, 1698-1704.

Archive of SID

www.SID.ir