

## استفاده از پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) به عنوان محیط کشت پایه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (*Listeria monocytogenes*)

مرحانه علی نژاد<sup>۱</sup> - بهاره شعبان پور<sup>۲</sup> - رضا صفری<sup>۳</sup> - مژگان علی نژاد<sup>۴</sup> - حسن نصراله زاده ساروی<sup>۵</sup>

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 (Response Surface Methodology) RSM استفاده شد. امعاء و احشاء ماهی هوور تحت گستره ی دمایی ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد و pH، ۸ تا 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، به عنوان جایگزین پپتون تجاری محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) در زمان های صفر، ۱۸ و ۴۴ 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 و pH، 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 و احشاء ماهی هوور نسبت به محیط کشت شاهد (TSB) بهتر بود ولی بطور کلی بیشترین میزان رشد در بین تیمارها مربوط به تیمار تهیه شده در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و pH، ۸ و کمترین میزان رشد در تیمار تهیه شده در دمای ۵۷/۵ و pH، ۸/۲۵ دیده شد. نتیجه گیری کلی حاکی از آنست که از امعاء و احشاء ماهی هوور می‌توان به عنوان 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

تولید محصولات با ارزش افزوده بالا انجام شده است (Perea et al., 2000; Kristinsson et al., 2000a; al., 1993; Laufenberg et al., 2001; Guerard et al., 2003; Larsen et al., 2003; Nilsang et al., 2005; Bhaskar et al., 2008). یکی از این فرآورده ها، فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین ماهی می‌باشد. عمل هیدرولیز، شکسته شدن شیمیایی یا آنزیمی پروتئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی مختلف می‌باشد (Skanderby, 1994). از کاربردهای متنوع پروتئین هیدرولیز شده می‌توان به استفاده از آنها به عنوان 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

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

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<sup>۱</sup>، پروتامکس<sup>۲</sup>، فلاورزایم<sup>۳</sup>، نوتراز<sup>۴</sup>، پپسین<sup>۵</sup>، تریپسین<sup>۶</sup> و پاپائین<sup>۷</sup> استفاده میگردد (Aspmo et al., 2005c).

آنزیم‌هایی با منشا میکروبی مثل آلکالاز در مقایسه با آنزیم‌های 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 licheniformis* بوده که توسط شرکت دانمارکی Novozymes برای صنایع مواد شوینده و غذایی تولید می‌شود. آنزیم آلکالاز به صورت Alcalase AF 2. 4L، Alcalase 2. 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 می‌گیرد (اویسی پور، ۱۳۸۷).

یکی از مهمترین باکتری‌های بیماریزا در انسان لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. پراکنش این باکتری در محیط بسیار بالا بوده و تقریباً در تمامی مواد خام یافت می‌شود. بیماری ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز (لیستریوزیس) بیشتر در افراد مستعد مثل زنان باردار، نوزادان، سالمندان دیده می‌شود (Miettinen, ۲۰۰۱). لیستریوزیس یکی از عفونت‌های غذایی با شیوع کم ولی مرگ و میر بالا (۳۰ درصد) است (Rocourt و همکاران؛ 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 agar و غیره اشاره نمود. قیمت تمام شده این محیط‌ها 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 Vermont broth (UVB) و FDA برات استفاده می‌گردد (Varnam, ۱۹۹۱). بنابراین انتخاب محیط‌های کشت ارزان قیمت ولی با کیفیت بالا به منظور جایگزین نمودن محیط‌های مذکور لازم و ضروری به نظر می‌رسد. پیتونهایی تولید شده از آبزیان بواسطه داشتن

پیتیدهایی 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.

معمولاً جزء گرانیقیمت یک محیط کشت میکروبی، منبع نیتروژنی آن است (Martone et al., 2005; Aspmo et al., 2005a). در این تحقیق ماهی هورور (*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 آبری پروری) ۵۶۲۴۲۲ تن بوده است (سالنامه آماري سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۶).

هدف از این مطالعه، تولید پیتون از امعاء و احشاء ماهی هورور 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 برات (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 امعاء واحشاء ماهی هورور، 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 پیتون از امعاء واحشاء ماهی هورور

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

### تهیه محیط کشت

بهترین تیمارها از نظر دارا بودن بالاترین میزان پروتئین (تیمارهای شماره ۲، ۱۱، ۱۲ و ۴) برای تولید محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۴). ترکیبات محیط کشت تولید شده از امعاء و احشاء ماهی هور در مقایسه با محیط کشت تجاری TSB (محیط کشت شاهد) در جدول ۲ مشخص شده است.

پس از استریل کردن محیطهای کشت تولیدی از امعاء و احشاء ماهی هور، ۱ میلی لیتر باکتری لیستریا مونوسیژنوز با رقت  $10^7 \times 1/22$  اضافه 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 هور (*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، داده های 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 داده های 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 ۲۰ g/l پروتئین امعاء و احشاء و در ۳ فاصله زمانی مختلف (صفر، ۱۸ و ۴۴ ساعت) انجام گرفت. انتخاب متغیر و محدوده آن براساس نتایج بدست آمده در مقالات مروری و تحقیقات گذشته بدست آمده است. در این مطالعه نرم افزار The DESIGN of EXPERT 6. 07 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) برای رگرسیون و تجزیه و تحلیل گرافیکی داده های بدست آمده، مورد استفاده قرار گرفت.

سیستم آنالیز آماری RSM برای تجزیه و تحلیل داده ها بکار برده شد (Montgomery, 2001). داده های 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 فرمول (۱) می باشد:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i < j}^k \sum_j \beta_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + e \quad (1)$$

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 با استفاده از روش Layne (۱۹۵۷) و درجه هیدرولیز با استفاده از روش Hoyle 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 گردید تا 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 ۱۰ درصد اسید تری کلریدریک = درجه هیدرولیز میزان نیتروژن در نمونه  $\times (100)$

جدول ۱- دما و اسیدیته مورد استفاده در هیدرولیز پروتئین امعاء و احشاء ماهی هور با استفاده از آنزیم آلكالاز

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 میکروارگانیزم

باکتری مورد استفاده در این 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 تا ۱۸ ساعت، جهت تلقیح به محیط کشت های تهیه شده از پروتئین هیدرولیز شده اضافه گردید.

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

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

Vazquez et al., : Martone et al., 2005a,b  
2008a ; Ovissipour et al., 2009c ; Safari et al., 2011).

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

جدول ۴- نتایج درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای تعریف

شده به روش RSM از امعاء و احشاء ماهی هوور (Thunnus tonggol)

تیمار	Temp. (°C)	pH	%DH	Pr (g/l)
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)

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

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

## نتایج و بحث

### دما و pH

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای 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 و pH: 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 گسترده‌ای را در خصوص استفاده از ضایعات ماهیان و تبدیل آن به پروتئین هیدرولیز شده انجام داده و محصول نهایی را از 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 (Aspmo et al., 2001 ; Dufosse et al., 2001).

### رشد باکتری لیستریا مونوسیتوزنز

جدول شماره ۵ نشان دهنده میزان رشد باکتری لیستریا مونوسیتوزنز 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: ۵۷/۵ درجه 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 امعاء واحشاء ماهی هوور به میزان ۲۰ گرم در لیتر به جای پروتئین محیط کشت

نیترژن، آمینواسیدها و ویتامین ها در محیط کشت ۵باکتری مختلف: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus sakei*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* نشان داد که آلکالاز، بهترین آنزیم برای تولید پپتون از امعاء و احشاء ماهی کاد می باشد.

عملکرد بهتر پپتون بدست آمده توسط آلکالاز از روشهای مختلفی قابل تشریح می باشد. آلکالاز منجر به جذب بهتر منابع اسید آمینه قابل دسترس می شود، زیرا این فعالیت اندوپروتنازی، مکملی برای سیستم های پروتئولیتیکی و جذب پپتیدی باکتریایی است و هیدرولیز توسط این آنزیم باعث تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی پائین تر حلالیت بیشتر می شود (Kristinsson et al., 2000a).

Aspmo و همکاران (۲۰۰۵ b) 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 پپتون های تولیدی توسط آلکالاز (۳۴ درصد) در مقایسه با پپتون های تولید شده توسط پروتامکس (۱۹ درصد) می باشد.

به نظر می رسد که درجه هیدرولیز بالاتر در پپتون های تولیدی توسط آنزیم آلکالاز، جذب پپتون ها را از 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 کاهش پپتون (Alcalase/Listeria) براساس آنالیز مدل رگرسیون بعد از تهیه ۱۳ تیمار در مدل CCD در معادله زیر آمده است:

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

تجاری TSB به رشد بیشتر لیستریا مونوسیژنر منجر می گردد. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران بدست آمده است (Vazques et al., 2004; Kristinsson et al., 2000a, b); Vazquez et al., 2008a; Aspino et al., 2005 a, b; Ovissipour; Safari et al., 2009; Vazquez et al., 2008b (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 odor* و قارچ (*Aspergillus niger*) و *Penicillium roqueforti* نشان داد که در اکثر موارد، استفاده از پپتون های تولید شده از ماهی نتایج خوبی به همراه داشته است.

نتایج آزمایشات Vazquez و همکاران (۲۰۰۴) که از پپتونهای تولید شده از ماهی برای رشد باکتری های بیماری زا و پروبیوتیک (*Vibrio*, *Roseobacter*, *Pseudomonas*) استفاده کردند، رشد بیشتر پپتون های تولید شده از امعاء و احشاء ماهی تون را در مقایسه با محیط های کشت تجاری معمول نشان داد.

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

نتایج تحقیقات Aspino و همکاران (۲۰۰۵b) بر روی هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی کاد (*Gadus morhua*) توسط آلکالاز، پاپابین و آنزیم های داخلی ماهی و استفاده از آن به عنوان منبع ترکیبی برای

جدول ۵- درصد رشد باکتری لیستریا مونوسیژنر در محیط کشت تولید شده از پپتون ماهی هوور در مقایسه با محیط کشت شاهد (TSB\*)

نمونه	زمان صفر	۱۸ ساعت	۴۴ ساعت	درصد رشد
شاهد	۰/۰۴	۱/۲۵	۲/۱۲۸	۹۸/۱۲٪
۲ (**T:۶۵:pH:۸)	۰/۰۶	۴/۹۳	۱۳/۰۹	۹۹/۵٪
۶ (T:۵۷/۵:pH:۸/۲۵)	۰/۰۶	۱/۳۲	۵/۹۰	۹۸/۹٪
۹ (T:۵۷:pH:۸)	۰/۰۵	۲/۵۴	۸/۷۵	۹۹/۴۲٪
۱۱ (T:۵۷/۵:pH:۸/۲۵)	۰/۰۶	۲/۷۳	۷/۳۲	۹۹/۱۸٪
۱۲ (T:۵۷/۵:pH:۸/۲۵)	۰/۰۶	۱/۷۱	۸/۵۷	۹۹/۲۹٪

\*تریپتیک سوی برات

\*\* دمای هیدرولیز بر حسب درجه سانتیگراد

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.

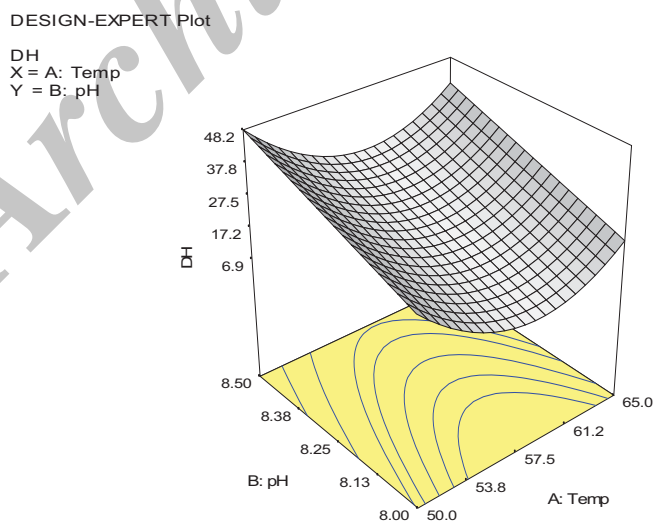
تقی اف و همکاران (۱۳۸۹) از روش پاسخ سطحی (RSM) به منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعا و احشاء فیل ماهی (*Huso huso*) از لحاظ دما، زمان و میزان آنزیم استفاده نمودند. در این روش اثر سه فاکتور دما، زمان و میزان آنزیم (متغیر مستقل) بر درجه هیدرولیز (به عنوان سطح پاسخ) مورد بررسی قرار گرفت. براساس نمودارهای سه بعدی، شرایط بهینه از لحاظ دما، زمان و میزان آنزیم به ترتیب عبارتند از: دمای ۵۰ درجه 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 به عنوان محیط کشت پایه باکتری *Vibrio anguillarum* مورد ارزیابی قرار گرفته 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.

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).

به منظور تایید مدل انتخابی طراحی شده نرم افزار DOE از تست‌های آماری تکمیلی نیز استفاده 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 نشان 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 ۱- اثر متقابل دو متغیر pH و دما بر درجه هیدرولیز

جدول ۶- پارامترهای بدست آمده از تجزیه و تحلیل آماری برای مدل

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

### نتیجه گیری

بطور کلی تحقیق حاضر نشان می‌دهد که می‌توان از ضایعات ماهی هوور تحت شرایط هیدرولیز آنزیمی مناسب در جهت تولید محیط کشت باکتری‌های پر نیازی نظیر لیستریا مونوسیوتونز استفاده کرده و آنرا به عنوان 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 ایران ۴ (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.
- Dufosse, 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 Microbiology*, 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, Ström 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 enzymology*, 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 Technol*ogy, 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<sup>th</sup> 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 yellowfin 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, Docal 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.