Archive of SID

بررسی تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک، (*Acanthopagrus latus*) در شرایط *in vitro* با هدف انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی

سعید ضیایی نژاد[۱]*، غلامرضا رفیعی[۲]، جاسم غفله مرمضی[۳]، علیرضا میرواقفی[۲] و حمید فرحمند[۲]

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، مجتمع آموزش عالی بهبهان

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور

چکیده

این مطالعه با هدف سنجش فعالیت ویژه‌ی سه آنزیم آمیلاز، پروتئاز و لیپاز به عنوان‌یک معیار اولیه جهت انتخاب پروبیوتیک‌ها از باکتری‌های *Bacillus sp*. و *Lactobacillus sp*. جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) انجام پذیرفت. بدی‌ن منظور فعالی‌ت وی‌ژه‌ی سه آنزی‌م آمیلاز، پروتئاز و لیپاز با استفاده از سوبستراهای اختصاصی در هفت گونه باکتری جنس *Bacillus* و سه گونه باکتری جنس *Lactobacillus* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک سنجی‌ده شد. نتایج نشان داد همه‌ی ای‌ن باکتری‌ها قادر به تولید آنزیم بوده و فعالیت ویژه‌ی این آنزیم‌ها بی‌ن برخی از باکتری‌ها تفاوت چشمگیری با هم دارند ($P<0/05$). در مجموع می‌توان این‌گونه عنوان نمود که فعالیت ویژه‌ی هر سه آنزیم در باکتری‌های جنس باسیلوس (BP1-7) بیش از باکتری‌های لاکتوباسیل (LP1-3) بود ($P<0/05$). از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز، نتایج نشان داد که سویه *Bacillus* BP5 با میانگین IU/mg protein۳/۱۳ بیشترین فعالیت را داشت که دارای تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) با سویه *Lactobacillus* LP1 با کمترین فعالیت (۱/۰۳IU/mg protein) بود. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم آمیلاز به ترتیب در سویه‌های *Bacillus* BP6 (۳/۰۰IU/mg protein) و *Lactobacillus* LP2 (۰/۰۴IU/mg protein) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری با هم بودند ($P<0/05$). بیشترین فعالیت ویژه لیپاز در سویه *Bacillus* BP6 (۱/۴۰IU/mg protein) مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌داری با سایر سویه‌ها بود ($P<0/05$).

واژگان کلیدی: باکتری، پروبیوتیک، آمیلاز، پروتئاز، لیپاز، *Acanthopagrus latus*

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zbsaeed@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

استفاده از باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک در آبزی پروری در چند سال گذشته گسترش زیادی یافته است (Ziaei-nejad *et al*., 2006). معیارهای مختلفی برای انتخاب سویه‌های مناسب برای این منظور در نظر گرفته می‌شود، اما به طور عمده در بسیاری از مطالعات انتخاب باکتری‌های پروبیوتیکی بر اساس توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی استوار است (Gatesoupe and Lesel, 1998; Rengpipat *et al*., 1998; Rico-Mora *et al*., 1998; Gibson, 1999). با این وجود به نظر می‌رسد تولید ترکیبات مفید نیز باید به هنگام انتخاب پروبیوتیک‌ها مد نظر قرار گیرد. میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید مولکول‌های پیچیده، هم به طور مستقیم به عنوان بخشی از فعالیت‌های متابولیک آن‌ها و هم به طور غیر مستقیم در زمانی که می‌میرند هستند (Vine *et al*., 2006). این ترکیبات که می توانند برای میزبان مفید باشند شامل رنگدانه‌ها (Holmstorm *et al*., 2002)، پروتئین‌ها (Klein *et al*., 1998)، اسیدهای چرب (Shirasaka *et al*., 1995; Yazawa, 1996)، ویتامین‌ها (Sugita *et al*., 1991) و آنزیم‌ها (Hansen and Olafsen, 1999; Ramirez and Dixon, 2003) می باشند. میزان این ترکیبات در میکروارگانیسم‌ها را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از تکنیک‌های استاندارد میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی سنجید. البته باید توجه داشت که به هر حال حضور و تولید ترکیبات مفید به‌وسیله میکروارگانیسم‌ها تضمینی برای این نیست که این ترکیبات مفید حتما به موجود میزبان منتقل خواهد شد (Vine *et al*., 2006).

آنزیم‌ها ترکیبات مفیدی هستند که برخی از باکتری‌ها قادر به تولید آن‌ها می‌باشند. مسلماً باکتری‌های پروبیوتیکی که دارای چنین ویژگی باشند می‌توانند هم اثرات مفید تغذیه ای و هم اثرات مفیدی بر کیفیت آب داشته باشند. از این رو تحقیق حاضر با هدف سنجش فعالیت ویژه آنزیمی در باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شانک (*Acanthopagrus latus*) به عنوان‌یک معیار اولیه جهت انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی اجرا گردید.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- جداسازی سویه‌های باکتریایی

برای این منظور تعداد پنجاه قطعه ماهی شانک (*A. latus*) جوان و سالم حاصل از صید گرگور در منطقه بندر دیلم ویا صید شده از سیستم پرورشی در ایستگاه تحقیقاتی ماهیان دریایی بندر امام (بچه ماهیان‌یک ساله 15-7 سانتیمتری)، انتخاب گردید. ماهیان به صورت زنده پس از انتقال سریع به آزمایشگاه از طریق قطع نخاع کشته شدند. جهت استریل نمودن، سطح خارجی بدن، ماهیان به مدت‌یک دقیقه در معرض بنزوالکانی‌وم کلراید (۱/۰٪) قرار گرفت. در شرایط استریل قطعاتی از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش بریده شد و نمونه‌ها به‌طور جداگانه در آب شور استریل هموژن شدند. سپس نمونه‌ها به طور سریالی رقیق و 100µl از نمونه‌ی رقیق شده در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت پخش گردید. در این مرحله از 2 محیط کشت انتخابی برای جداسازی هدفمند سویه‌های باکتریایی متعلق به دو جنس Bacillus و Lactobacillus استفاده شد:

1- محیط کشت *Bacillus cereus* (Oxoid, UK) agar برای انتخاب جنس Bacillus

2- محیط کشت MRS (de Man, rogosa, Sharpe) agar (Oxoid, UK) برای انتخاب جنس Lactobacillus

www.SID.ir

Archive of SID

پتری دیش‌ها به مدت 48 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد نگه داری شده و سپس کلونی‌های باکتریایی تشکیل شده بر اساس واحد تشکیل دهنده کلونی(CFU[1]) شمارش و کلونی‌ها بر اساس ویژگی‌های ظاهری شامل رنگ، فرم و اندازه جدا سازی، خالص سازی و کدگذاری گردیدند (Vine *et al*., 2004). باکتری‌های باسیلوس با کد BP و باکتری‌های لاکتوباسیل با کد LP مشخص شدند. ذخایر خالص سازی شده این باکتری‌ها بر اساس روش Vine و همکاران (2004) هم بر روی آگار اسلنت[2] و هم در دمای 80- درجه سانتی گراد (با استفاده از گلیسرول استریل) نگهداری شدند.

۲-۲- آماده سازی سویه‌های جداسازی شده

برای سنجش آنزیمی، ذخیره ای از هریک از باکتری‌ها در محیط کشت Marine broth با تراکم 10^8 CFU/ml تهیه گردید. برای این منظور یک کلونی خالص از ذخیره باکتری در حالت اسلنت برداشته شد و در 500 میلی لیتر محیط Marine broth تلقیح و به مدت 24 ساعت در 30 درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور نگه‌داری گردید. بر اساس رابطه میزان تراکم باکتری و جذب نوری در طول موج 640 نانومتر که از پروفیل رشد باکتری به دست آمد (Vine *et al*.,2004)، تراکم فوق برای هر سویه حاصل گردید. سپس محیط کشت حاوی باکتری به مدت 10 دقیقه در 2000g سانتریفیوژ و محلول رویی برای سنجش آنزیمی برداشت شد.

۲-۳- سنجش میزان پروتئین محلول

میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به روش Bradford (1976) با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA)[3] به عنوان استاندارد سنجیده شد. نمونه‌های آزمایشی با افزودن 90 میکرولیتر بافر 05/0 مول Tris (hydroxyl methyl) aminomethan، pH=8/7 به همراه‌یک میلی‌لیتر معرف برادفورد به 10 میکرولیتر عصاره آنزیمی به دست آمد. میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Hach-DR2800) در طول موج 595 نانومتر تعیین گردید.

۲-۴- اندازه‌گیری فعالیت ویژه[4] آنزیم پروتئاز کل

فعالیت پروتئاز کل بر اساس روش Anson (1938) [ذکر شده در Mongkolthanaruk و Dharmsthiti (2002) با کمی‌تغییر] تعیین گردید. بدین صورت که 1 میلی‌لیتر از محلول 5/1 درصد کازئین (Merck) با pH=7 به عنوان سوبسترا در حمام آب گرم در دمای 37ºC قرار داده شد. سپس‌یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به آن اضافه گردید. واکنش حاصله به مدت 15 دقیقه در 37ºC ادامه‌یافت و سپس جهت متوقف نمودن آن 2 میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک (4/0 مولار) به مخلوط افزوده شد. مخلوط حاصله فیلتر گردید و ۲/۵ میلی‌لیتر Na_2Co_3 4/0 مولار به 5/0 میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده افزوده و سپس 5/0 میلی‌لیتر معرف فولین[5] به آن اضافه شد. سپس جذب مخلوط به دست آمده به‌وسیله اسپکتروفتومتر (Hach-DR2800) به عنوان فعالیت پروتئاز کل در 660 نانومتر قرائت گردید. فعالیت ویژه‌ی پروتئاز کل با تقسیم نمودن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان

[1] Colony Forming Unit
[2] Agar Slant
[3] Bovine Serum Albumin, BSA
[4] Specific activity
[5] Folin reagent

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین محلول هر نمونه بر حسب IU/mg protein به دست آمد.

۲-۵- سنجش فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز کل

فعالیت آنزیم آمیلاز بر اساس روش Bernfeld (1955) [ذکر شده در Lovett و Felder (1990) و Mongkolthanaruk و Dharmsthit (2002)] و با استفاده از سوبسترای نشاسته سنجش گردید. برای این منظور ابتدا معرف DNS از طریق حل نمودن‌یک گرم پودر 2-Hydroxy-3,5-dinitrobenzoic acid در 50 میلی‌لیتر آب مقطر و اضافه نمودن 30 گرم سدیم پتاسیم تارتارات و 20 میلی‌لیتر سود (NaOH)2 مولار و رساندن حجم محلول به 100 میلی‌لیتر تهیه گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم، 10 میکرولیتر از عصاره آنزیمی، 290 میکرولیتر بافر استات 05/0 مولار و 5/1 میلی‌لیتر محلول نشاسته[1] (Merck) 2 درصد (w/v) در بافر استات مخلوط شدند. این مخلوط به مدت 10 دقیقه در حمام آب 40ºC قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این مخلوط به یک میلی‌لیتر معرف DNS اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه جوشانده شد. در مرحله بعد جذب نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Hach- DR2800) در طول موج 520 نانومتر به عنوان فعالیت آمیلاز قرائت گردید. فعالیت ویژه آمیلاز کل با تقسیم نمودن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول هر نمونه بر حسب IU/mg protein به دست آمد.

۲-۶- سنجش آنزیم لیپاز

تولید آنزیم لیپاز در باکتری‌های مورد مطالعه بر اساس روش Albro و همکاران (1985) سنجیده شد. 300 مایکرولیتر سوبسترایp-nitrophenyl myristate (4/1 mM , FLUKA) به 200 مایکرولیتر از نمونه اضافه گردید و با بافر بی کربنات آمونیوم (25 mM) حاوی 5/0 درصد (v/v) Triton X-100 به حجم 1000 مایکرولیتر رسانده شد. این مخلوط به مدت 30 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت 10 دقیقه با دور 8000g سانتریفیوژ گردید. در نهایت میزان فعالیت آنزیم لیپاز در طول موج 405 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hach-DR2800) قرائت گردید. فعالیت ویژه لیپاز کل با تقسیم نمودن فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها بر میزان پروتئین محلول حاصل از هر نمونه بر حسب IU/mg protein به دست آمد.

2-7- تجزیه و تحلیل آماری

میانگین داده‌های به دست آمده از فعالیت ویژه‌ی هر آنزیم با استفاده از نرم افزار SAS و آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's Multiple Range Test) در سطح 5 درصد با هم مقایسه گردید.

3- نتایج

در این تحقیق هفت سویه از جنس باسیلوس (با کدهای BP1، BP2، BP3، BP4، BP5، BP6 و BP7) و سه سویه از جنس لاکتوباسیل (با کدهای LP1، LP2، LP3) از دستگاه گوارش ماهی شانک جداسازی و خالص سازی گردید. نتایج این بررسی نشان داد که کلیه‌ی باکتری‌های جداسازی شده دارای توان تولید آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و لیپاز هستند اما فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در باکتری‌های مختلف تفاوت چشمگیری با هم داشت. در مجموع می‌توان این‌گونه عنوان نمود که فعالیت ویژه‌ی هر سه آنزیم در باکتری‌های باسیلوس (BP1-7) بیش از باکتری‌های لاکتوباسیل (LP1-3) بود (نمودارهای 1، 2 و 3).

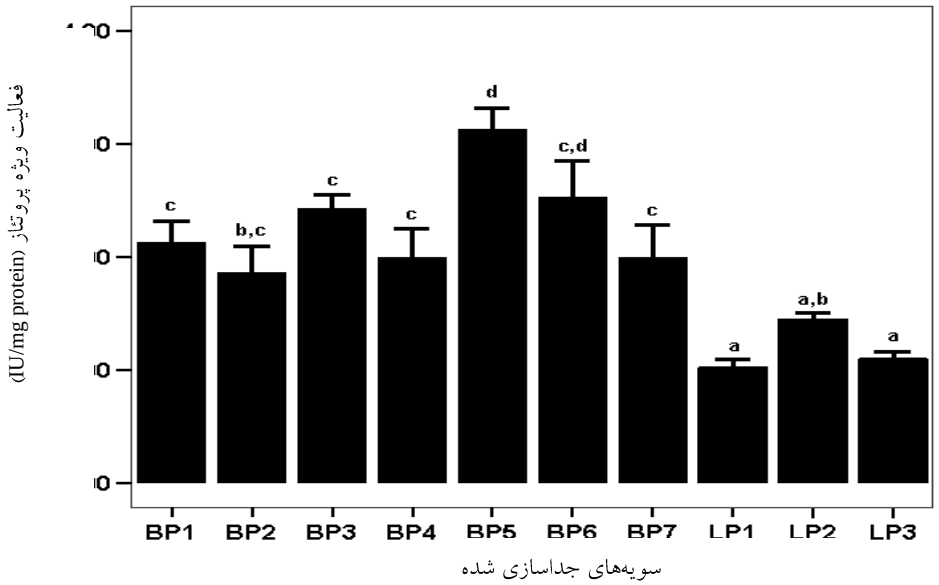
[1] Soluble Starch

www.SID.ir

Archive of SID

از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز، نتایج نشان داد که سویه BP5 با میانگین 13/3 IU/mg protein بیشترین فعالیت را دارا می‌باشد که دارای تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) با سویه LP1 با کمترین فعالیت (0/31 IU/mg protein) بود (نمودار 1). سایر سویه‌ها همانند BP1، BP3 و BP6 نیز فعالیت بالایی را در مورد این آنزیم بروز دادند. از بین باکتری‌های لاکتوباسیل نیز سویه LP2 فعالیت بیشتری را نسبت به دو سویه دیگر نشان داد.

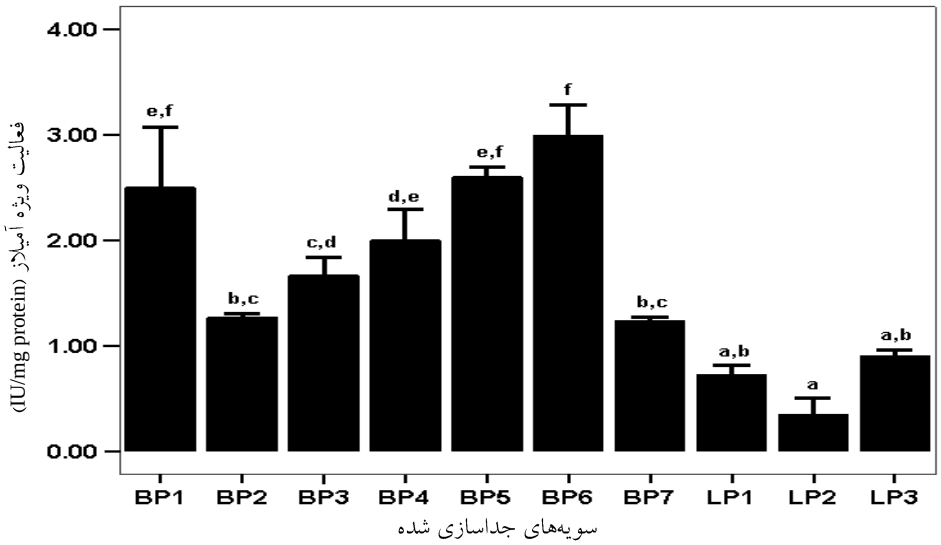
بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم آمیلاز به ترتیب در سویه‌های BP6 (3/00 IU/mg protein) و LP2 (0/40 IU/mg protein) مشاهده گردید که دارای اختلاف معنی‌داری با هم بودند ($P<0/05$). از نظر فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز در بین باکتری‌های باسیلوس سویه‌های BP5 و BP1 نیز فعالیت نسبتا بالایی داشتند و از باکتری‌های لاکتوباسیل بیشترین فعالیت در سویه LP3 (0/90IU/mg protein) دیده شد (شکل 2).



نمودار 1- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز (IU/mg protein) در سویه‌های مختلف. برای هر سویه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. BP- سویه‌های باسیلوس، LP- سویه‌های لاکتوباسیل. سویه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$).

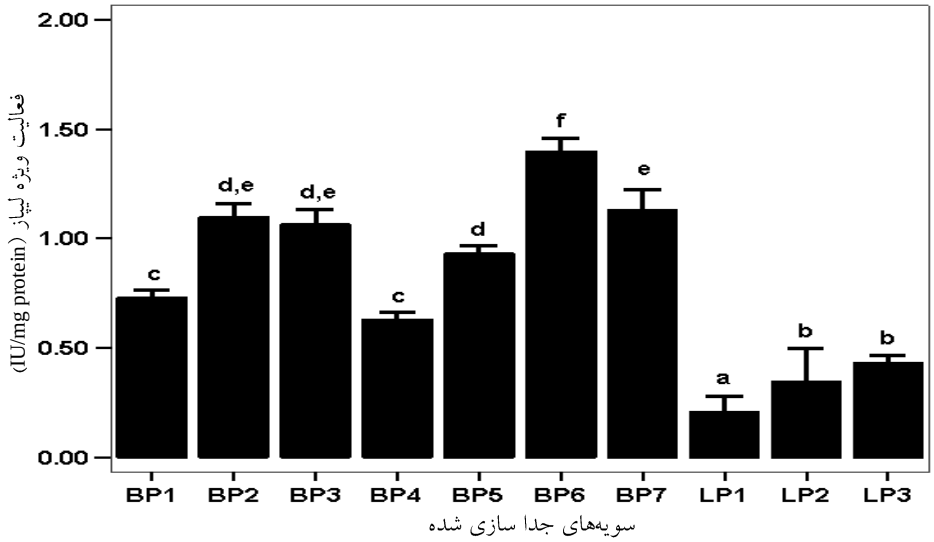
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار 2- فعالیت ویژه آنزیم آمیلاز (IU/mg protein) در سویه‌های مختلف. برای هر سویه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. BP- سویه‌های باسیلوس، LP- سویه‌های لاکتوباسیل. سویه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$).

از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم لیپاز نتایج نشان داد که فعالیت این آنزیم در مجموع در کلیه سویه‌ها کمتر از سایر آنزیم‌ها می‌باشد. بیشترین فعالیت ویژه لیپاز در سویه BP6 (40/1IU/mg protein) مشاهده گردید که دارای تفاوت معنی‌داری با سایر سویه‌ها بود ($P<0/05$). باکتری‌های BP2، BP3 و BP7 نیز فعالیت نسبتا خوبی را از نظر این آنزیم از خود نشان دادند. کمترین فعالیت ویژه آنزیم لیپاز نیز مربوط به سویه LP1 (15/0IU/mg protein) بود.



نمودار 3- فعالیت ویژه آنزیم لیپاز (IU/mg protein) در سویه‌های مختلف. برای هر سویه میانگین داده ± خطای استاندارد نشان داده شده است. BP- سویه‌های باسیلوس، LP- سویه‌های لاکتوباسیل. سویه‌هایی که دارای حروف بالاچین مشابهی هستند اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

4- بحث

همان گونه که قبلا نیز اشاره گردید یکی از مراحلی که جهت ارزیابی توان پروبیوتیکی سویه‌های جداسازی شده در نظر گرفته می شود، بررسی تولید ترکیبات مفید از جمله آنزیم‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. تولید آنزیم از این نظر به عنوان یک معیار مثبت برای باکتری‌های پروبیوتیکی در آبزی پروری در نظر گرفته می‌شود که احتمالا باکتری‌های تولید کننده آنزیم خواهند توانست هم در بعد بهبود کیفیت آب (اگر به عنوان پروبیوتیک آب مصرف شوند) و هم در بعد بهبود کیفیت تغذیه ای و افزایش رشد (اگر در جیره غذایی مصرف شوند) موثر باشند (Ziaei-nejad *et al*., 2006). باکتری‌های تولید کننده آنزیم می‌توانند نقش مهمی در شکستن اجزای غذا و جذب بهتر مواد غذایی در دستگاه گوارش آبزیان به‌ویژه در دوران لاروی داشته باشند. Dixon and Ramirez (2003) بیان نموده اند که باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی طیف گسترده ای از آنزیم‌های کربوهیدراز، فسفاتاز، استراز، لیپاز و پپتیداز را تولید می‌نمایند که همه آن‌ها می‌توانند در هضم غذا موثر باشند. الگوی تولید آنزیم به سویه باکتری و شرایط محیطی که باکتری در آن قرار دارد بستگی دارد اما آن‌گونه که Dixon and Ramirez (2003) عنوان نموده اند، معمولا باکتری‌های گرم مثبت پپتیداز و باکتری‌های گرم منفی کربوهیدراز بیشتری ترشح می‌نمایند. در حالی‌که آنزیم‌های استراز، لیپاز و فسفاتاز توسط هر دو گروه از باکتری‌ها تولید می‌شوند.

در آبزی پروری، لاروها در یک محیط مصنوعی که محدودیت‌هایی از نظر کیفیت و کمیت غذای زنده دارند پرورش داده می‌شوند. از طرف دیگر به خاطر کامل نبودن سیستم گوارشی لاروها بویژه در مورد لارو ماهیان دریایی از نظر آنزیم‌های گوارشی همواره مشکلاتی مانند پایین بودن رشد و بازماندگی لاروها و وابستگی شدید به غذای زنده با وجود هزینه بالای این نوع غذا در این زمینه بروز نموده است. از این لحاظ افزایش سطح آنزیم‌های گوارشی ممکن است منجر به افزایش نرخ رشد گردد. در همین راستا نشان داده شده است که افزایش آنزیم‌های با منشا خارجی رشد را در لارو ماهی شانک (*S. aurat*a) (Kolkovski *et al*., 1993) و آزاد ماهی آتلانتیک (*S. salar*) (Carter *et al*., 1994) بهبود بخشیده است. افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی باسیلوس نیز به سیستم پرورشی لارو میگوی سفید هندی (*F. indicus*) توانسته است با افزایش آنزیم‌های گوارشی میگو، رشد و فاکتورهای تغذیه ای را افزایش دهد (Ziaei-nejad *et al*., 2006). مشکل بسیاری از گونه‌ها در آبزی پروری، هضم و جذب جیره‌های غذایی مصنوعی در طول دوران اولیه لاروی می‌باشد و بیان شده است که این امر به دلیل کمبود سطح آنزیم‌های گوارشی مسئول هضم غذاها می‌باشد (Kolkovski *et al*., 1997). از این‌رو به نظر می‌رسد افزودن باکتری‌های پروبیوتیکی که قادر به تولید آنزیم‌های مفید هستند ممکن است در هضم غذاهای مصنوعی موثر بوده و در نتیجه دوره غذادهی با غذاهای زنده و هزینه‌های بالای آن را کاهش دهد. بر همین اساس در تحقیق حاضر تولید آنزیم توسط باکتری‌های جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی به عنوان‌یک معیار اولیه جهت غربالگری آن‌ها در نظر گرفته شد.

در مورد تولید آنزیم توسط باکتری‌ها تحقیقات زیادی صورت پذیرفته است. در شرایط آزمایشگاهی آنزیم‌های باکتریایی را می‌توان هم از لحاظ کیفی با استفاده از کیت‌های آنزیمی (مانند سیستم APIZYME) (Ramirez and Dixon, 2003) و محیط‌های کشت انتخابی (Bairagi *et al*., 2002) و هم از لحاظ کمی با استفاده از سوبستراهای اختصاصی سنجید.

www.SID.ir

Archive of SID

Sugita و همکاران (۱۹۹۷) باسیلوس‌های تولید کننده آمیلاز را از ماهیانی مانند کپور و تیلاپیا جداسازی نمودند. Bairagi و همکاران (۲۰۰۲) نیز مجموعه ای از سویه‌های باکتریایی تولید کننده آمیلاز، لیپاز، سلولاز و پروتئاز را از دستگاه گوارش کپور ماهیان هندی و چینی جداسازی کردند.

در چندین مطالعه فعالیت آنزیم‌های مختلف در باکترهای باسیلوس (Sugita *et al*., 1997; Esakkiraj *et al*.,2007) و لاکتوباسیلوس (Lindgren and Refai, 1984) به اثبات رسیده است اما به دلیل این‌که عوامل زیادی از جمله ترکیب و شرایط محیط کشت بر فعالیت آنزیم‌ها تاثیر گذار هستند و از طرف دیگر فعالیت آنزیمی بر اساس واحدهای مختلفی بیان شده است لذا نمی‌توان مقایسه چندانی بین نتایج به دست آمده انجام داد.

در تحقیق حاضر نتایج نشان داد که تمام باکتری‌های باسیلوس و لاکتوباسیلوس جداسازی شده قادر به تولید هر سه آنزیم پروتئاز، آمیلاز و لیپاز هستند. فعالیت آنزیم‌های مختلف بر اساس نوع سویه متفاوت بود ولی باسیلوس‌ها فعالیت ویژه بیشتری را نسبت به لاکتوباسیل‌ها در مورد هر سه آنزیم از خود نشان دادند. در کلیه سویه‌ها فعالیت ویژه آنزیم لیپاز کمتر از دو آنزیم دیگر بود.

به نظر می رسد می‌توان بررسی فعالیت آنزیم‌ها به عنوان ترکیبات مفید در سویه‌های جداسازی شده را به عنوان‌یک مرحله غربالگری در انتخاب سویه‌های پروبیوتیکی قرار داد. اما لازم به ذکر است که سنجش این آنزیم‌ها در سویه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی متضمن این نخواهد بود که سویه‌های مورد نظر حتما در بدن موجود زنده نیز این میزان فعالیت آنزیمی را از خود نشان دهند، زیرا شرایط محیط دستگاه گوارش آبزیان مسلما با شرایط محیط کشت متفاوت است و از طرف دیگر در دستگاه گوارش آبزیان ممکن است شرایطی حاکم باشد که باکتری قادر به استقرار و کلونی سازی نبوده ویا این‌که به تعدادی که ما در آزمایشگاه جهت سنجش آنزیمی‌به کار بردیم (10^8 CFU/ml) نرسد. دلیل این عدم استقرار و یا استقرار به تعداد ناکافی ممکن است به خاطر نامساعد بودن شرایط دستگاه گوارش، مغلوب شدن در اثر پدیده‌ی حذف رقابتی ویا بیشتر بودن سرعت شستشوی این باکتری‌ها از دستگاه گوارش نسبت به سرعت رشد آن‌ها باشد (Vine *et al*., 2004). اما قطعا سنجش آنزیم‌ها ویا هر ترکیب مفید دیگری مانند ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها و غیره به عنوان‌یک شاخص اولیه در مراحل انتخاب پروبیوتیک‌ها مفید خواهد بود (Vine *et al*., 2006).

منابع

Albro, P. W., Hall, R. D., Corbett, J. T. and Schroeder, J. 1985. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.) by bile salts. Biochim Biophys Acta 835: 477-490.

Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79– 89.

Bairagi, A., Ghosh, K. S., Kumar, S., Sen, S. K. and Ray, A. K. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquacult. Int. 10: 109-121.

Bernfeld, P. 1955. Amylase. In: Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (Eds), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, Pp: 149-158.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing, the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.

Carter, C. G., Houlihan, D. F., Buchanan, B. and McCarthy, I. A. 1994. Growth and feed utilisation efficiencies of seawater Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a diet containing

www.SID.ir

Archive of SID

a mixed bacterial consortium. Inter. Biodet. Biodeg. 50: 101-105.

Ramirez, R. F. and Dixon, B. A. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). Aquacult. 227: 417-426.

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., Menasveta, P., Sirirat, R., Wannipa, P., Somkiat, P. and Piamsak, M. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp Penaeus monodon survival and growth. Aquacult. 167: 301-313.

Rico-Mora, R., Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J. A. 1998. Biological control of Vibrio alginolyticus in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. Aquacult. Eng. 19: 1-6.

Shirasaka, N., Nishi, K. and Shimizu, S. 1995. Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1258: 225-227.

Sugita, H., Miyajima, C. and Deguchi, Y. 1991. The vitamin B_{12}-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquacult. 92: 267-276.

Sugita H., Kawasaki J., and Deguchi Y., 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. Letters Appl. Microbiol. 24: 105–108

Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. J. Fish Dis. 27: 319–326.

Vine N. G., Leukes W. D., and Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol. Rev. 30: 404–427

Yazawa, K. 1996. Production of Eicosapentaenoic acid from marine bacteria. Lipids 31: 297-300.

Ziaei-Nejad, S., Habibi-Rezaei, M., Azari-Takami, G., Lovett, D. L., Mirvaghefi, A. and Shakouri, M. 2006. The effect of Bacillus spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white supplementary enzymes. Aquacult. Fish Manage. 25: 37-46.

Esakkiraj, P., Immanuel, G., Sowmya, S. M., Iyapparaj, P. and Palavesam, A. 2007. Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cer*eus for Aqua Feed. Food Bioprocess Technol. 4:383-390.

Gatesoupe, F. J. and Lesel, R. 1998. An environmental approach to intestinal microflora in fish. Cahiers Agricult. 7: 29-35.

Gibson, L. F. 1999. Bacteriocin activity and probiotic activity of Aeromonas media. Symp. Ser. Soc. Appl. Bacteriol. 28: 243S-248S

Hansen, G. H. and Olafsen, J. A. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecol. 38: 1-26.

Holmstrom, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. and Kjelleberg, S. 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated Pseudoalteromonas species. FEMS Microbiol Ecol. 41: 47-58.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 26: 103-125.

Kolkovski, S., Tandler, A. and Izquierdo, M. S. 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquacult. 148: 313-322.

Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G. and Gertler, A. 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Sparidae, Linnaeus) larvae. Fish Physiol. Biochem. 12, 203-209.

Lindgren, S. and Refai, O. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. J. Appl. Bacteri. 51: 221-228.

Lovett, D. L. and Felder, D. L. 1990. Ontogenic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Biol. Bull. 178:144-159.

Mongkolthanaruk, W. and Dharmsthiti, S. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by

www.SID.ir

Archive of SID

shrimp Fenneropenaeus indicus. Aquacult. 252: 516-524.

www.SID.ir