فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ٤، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹٤، صفحه ٤۷- ۵۹

تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء واحشاء تاسماهی سیبری پرورشی (*Acipenser baerii*) و استفاده از آن به عنوان محیط کشت باکتری *Salmonella typhi*

رقیه جعفری تراجی[۱]، علیرضا عالیشاهی[۲] ، سید مهدی اجاق[۲]*، عباس اسماعیلی ملا[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲- استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳-استادیار، فیزیولوژی آبزیان، موسسه آموزش عالی غیرانتفاعی رودکی، تنکابن

تاریخ دریافت: ۹٤/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹٤/۰۷/۲٦

*نویسنده مسئول مقاله: mahdi_ojagh@yahoo.com

چکیده:

پروتئین هیدرولیز شده از امعاء واحشاء تاسماهی سیبری تولید شد. به منظور بهینه سازی شرایط تولید، با استفاده از روش آماری سطح پاسخ (RSM) اثر سه عامل زمان، pH و غلظت آنزیم (آلکالاز) به روی درجه هیدرولیز بررسی گردید. مدل ریاضی، برازش خوبی با داده‌های آزمایش داشت، زیرا R2 معادل ۰/۹۷ نشان داد که ۹۷ درصد از تغییرات درون محدوده آزمایش توسط مدل قابل توضیح است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بالاترین درجه هیدرولیز (۵۸/۲۱ درصد) مربوط به تیمار حاوی غلظت آنزیمی ۲درصد، زمان ٦۰ دقیقه و pH =۸ انجام شد و تیمار با شرایط هیدرولیز (نسبت آنزیم به سوبسترا ۲ درصد، زمان ٤۵ دقیقه، pH=۸/۵) دارای بیشترین مقدار پروتئین (٤۲/۳۷) به عنوان جایگزین پپتون تجاری محیط کشت (Triptic soy broth) برای بررسی میزان رشد باکتری *Salmonella typhi* در زمان‌های صفر تا ٤۸ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. تغییرات رشد *S. typhi* در تیمار شاهد روند صعودی بهتری نسبت به تیمارشماره ۱۵ (آلکالاز) داشته، ولی اختلاف معنی‌دار نبود.

کلید واژگان: تاس‌ماهی سیبری(*Acipenser baerii*)، سالمونلا تیفی، پروتئین هیدرولیز شده، آلکالاز

مقدمه

در فراوری صنعتی ماهی حدود ٦٠ درصد از وزن بدن ماهی به شکل ضایعات تولید می‌شود (Dekkers et al., 2011). ضایعات تولید شده به شکل امعا و احشا، پوست، سر، استخوان، دارای مقادیر قابل توجهی از پروتئین با کیفیت بالا (۱۰ تا ۲۳ درصد وزن ضایعات) هستند که در حال حاضر برای تولید پودر ماهی و کود استفاده می‌شوند (Hsu, 2010). فرایند هیدرولیز برای تبدیل پروتئین ضایعات فراوری ماهی به اشکال قابل قبول‌تر و تجاری توسعه یافته است. هیدرولیز روشی مؤثر برای جداسازی پپتیدهای زیست فعال از پروتئین ضایعات است (Nikoo et al., 2014). پروتئین هیدرولیز شده از طریق شکستن پروتئین به پپتیدها توسط واکنش‌های آنزیمی و یا شیمیایی به‌دست می‌آید. البته فرایندهای زیستی بر پایه استفاده از آنزیم در مقایسه با فرایندهای شیمیایی به‌دلیل شرایط مناسب‌تر و قابلیت کنترل بیشتر استفاده می‌شوند (Kristinsson and Rasco,2000b). ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده به شرایط هیدرولیز (دما، نوع آنزیم و غلظت پروتئین) بستگی زیادی دارد (Kristinsson and Rasco, 2000). همچنین نوع ماده اولیه بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده تأثیر می‌گذارد. بسترهای[1] پروتئینی مختلف سبب تولید انواع مختلفی از پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های تغذیه‌ای و فراسودمندی مختلف می‌شوند. از این‌رو با کاربرد آنزیم‌های مختلف، تغییر pH و زمان طی فرایند هیدرولیز، می‌توان فراورده‌هایی با ویژگی‌های مختلف از لحاظ درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژنی و ترکیب اسیدهای آمینه تولید کرد (Ovissipour et al., 2012b). به‌طورکلی، پپتیدهای با اندازه کوچک در مقایسه با پروتئین و یا اسیدهای آمینه آزاد مفیدترند (Nalinanon et al., 2011). هیدرولیز آنزیمی از طریق استفاده از آنزیم‌های پروتئازی آندوپپتیداز که سبب شکستن پیوندهای پپتیدی در داخل مولکول پروتئین می‌شوند و آنزیم‌های اگزوپپتیداز که پیوندهای پپتیدی را در موقعیت انتهایی N و C هیدرولیز می‌کنند، انجام می‌شود (Nalinanon et al., 2011). در این باره، پروتئازهای میکروبی تجاری به‌صورت گسترده و موفقیت‌آمیزی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی‌های زیست فعالی استفاده شدند. آلکالاز (EC 3.4.21.14) نوعی آنزیم قلیایی است که از باکتری باسیلوس لیچنیفورمیس *Bacillus licheniforms* تولید می‌شود. این آنزیم در زمان کوتاه و در شرایط pH مناسب می‌تواند درجه هیدرولیز بالایی را ایجاد کند. همچنین پپتون‌های تولید شده به‌وسیلهٔ این آنزیم دارای نیتروژن بیشتری هستند (Ovissipour et al., 2009a). باکتری‌ها انواع مختلفی دارند، جنس سالمونلا از نوع باسیل گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه است. گونه‌های مختلف این جنس عامل مسمومیت غذایی بوده و مهم‌ترین گونه آن تیفی بوده که عامل بیماری حصبه است. محیط‌های کشت متعددی برای سالمونلاها وجود دارد که هر یک دارای معایب و مزایای مربوط به خود هستند ولی حساسیت، دقت، سرعت نتیجه‌گیری و از همه مهم‌تر قیمت تمام شده محیط کشت اختصاصی، از عوامل مهم در انتخاب محیط کشت هستند (D'Aoust and Purvis, 1998). از محیط‌های کشت مورد استفاده برای غنی‌سازی و جداسازی این جنس می‌توان به تتراتیونات براث، سلنیت اف براث، سالمونلا شیگلا آگار و بیسموت سولفیت آگار اشاره کرد. قیمت تمام شده محیط‌های ذکر شده بسیار بالا بوده و انتخاب محیط‌های کشت ارزان قیمت ولی با کیفیت بالا به‌منظور جایگزین کردن محیط‌های تجاری موجود ضروری به‌نظر می‌رسد. پپتون‌های تولید شده از آبزیان به‌واسطه داشتن

1 .substrate

پپتیدهایی کوچک زنجیره و اسیدهای آمینه ضروری، می‌توانند به‌عنوان یکی از مواد پروتئینی با ارزش برای جداسازی باکتری‌ها به‌ویژه سالمونلا در نظر گرفته شوند. تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) یکی از گونه‌های ماهیان خاویاری است که برای تولید خاویار و گوشت پرورش داده می‌شود. امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری می‌توانند به‌طور بالقوه منبع مناسبی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده باشند. با توجه به اینکه ویژگی زیست فعالی و سایر ویژگی‌های عملکردی و فراسودمندی پروتئین هیدرولیز شده تحت تأثیر نوع پروتئین، آنزیم و شرایط هیدرولیز قرار می‌گیرد، بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند موجب تولید فراوردهایی با ترکیب شیمیایی خاص شوند که بهترین عملکرد را در فراورده نهایی داشته باشند. از امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری تاکنون برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده نشده است. از طرفی دیگر، اطلاعی نیز دربارهٔ تولید پپتون و تأثیر آن در رشد باکتری *Salmonella typhi* در مقایسه با سایر محیط‌های کشت تجاری وجود ندارد. بنابراین هدف از این تحقیق، تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری و بررسی تأثیر شرایط هیدرولیز (pH، نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) و مدت زمان هیدرولیز) بر کیفیت شیمیایی و عملکردی پروتئینی هیدرولیز شده است. علاوه بر آن، قابلیت پپتون تولید شده از امعا و احشا بر رشد باکتری *Salmonella typhi* بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آلکالاز(با فعالیت آنزیمی AU/kg ۲/٤ و چگالی ۱/۱۸g/ml)از شرکت نووازیم (دانمارک) تهیه شد. تری کلرواستیک اسید، اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، منو سدیم فسفات، دی سدیم فسفات و سولفات مس پنج آبه از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند.

هیدرولیز آنزیمی

امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری از مرکز تکثیر و پرورش شهید رجایی (ساری، مازندران) تهیه و در مجاورت یخ (نسبت امعا و احشا به یخ ۱ به ۲)، به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید و تا زمان استفاده در۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تیمارها براساس روش RSM در ۱۵ گروه با دمای ثابت ۵۵ درجه سانتی‌گراد (Ovissipour et al,. 2009a) وشرایط هیدرولیز زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) و pH در محدوده مشخص شده، تعریف شدند (جدول ۱). ابتدا امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری توسط مخلوط‌کن کاملاً به‌صورت هموژن درآمد. سپس از آن برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های درونی امعا و احشا، مواد خام اولیه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد (Ovissipour et al,. 2009a). بعد امعا و احشای پخته شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند. پس از تنظیم پی اچ، آنزیم (آلکالاز) به نمونه‌ها اضافه شده و نمونه‌ها در بن‌ماری شیکردار (شرکت اختریان-ایران) با مدت زمان مربوطه قرار داده شدند (جدول ۱). در پایان آزمایش، برای قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از سانتریفوژ (مدل Kokusan ،ساخت ژاپن) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی برای بررسی‌های بعدی جمع‌آوری شد. بخشی از این مواد برای تعیین درجه هیدرولیز استفاده شد و بخشی دیگر برای انجام آزمایش‌های مربوط به محیط کشت، به روش انجماد خشک (فریز درایر) خشک و پودر گردید و در دسیکاتور نگهداری شد.

جدول ١ متغیرهای مستقل و سطوح آن در بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری با استفاده از RSM

متغییرهای مستقل	علامت	سطوح و حدود متغییرها		
		+١	٠	−١
pH	X_1	٨/٥	٨	٧/٥
زمان(دقیقه)	X_2	٦٠	٤٥	٣٠
نسبت آنزیم به سوبسترا (٪ v/w)	X_3	٢	١/٥	١

ترکیب شیمیایی

رطوبت نمونه‌ها به روش AOAC تعیین شد (AOAC, 2005). حدود ٢ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده، قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در داخل آون با دمای٢±١٠٣درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار داده شد. برای تعیین میزان چربی از دستگاه سوکسله استفاده شد (AOAC, 2005). تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال استفاده شد (AOAC, 2005) و درصد خاکستر نیز با قرار دادن نمونه در کوره با دمای ٥٠٠ تا ٥٥٠ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (AOAC, 2005).

اندازه‌گیری پروتئین محلول و درجه هیدرولیز

پروتئین محلول در پروتئین هیدرولیز شده تاس‌ماهی سیبری، به روش بیورت براساس Layne (1975) تعیین شد. درجه هیدرولیز براساس روش Hoyle and Merritt, 1994به‌دست آمد. پس از هیدرولیز، فاز محلول حاوی پروتئین هیدرولیز شده، جدا گردید و محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ٢٠ درصد به آن اضافه، نمونه به مدت ١٠ دقیقه در ٦٠٠٠ دور در دقیقه در ١٠ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و محلول تری‌کلرواستیک اسید ٢٠ درصد شفاف حاوی پروتئین‌های محلول جمع‌آوری شد. درجه هیدرولیز براساس رابطه زیر محاسبه گردید:

DH% = (نیتروژن کل در نمونه/ نیتروژن موجود در محلول ٢٠ درصد TCA در نمونه) ×١٠٠

آماده‌سازی میکروارگانیسم و تهیه محیط کشت

باکتری مورد استفاده در این تحقیق *Salmonella typhi* (PTCC:١٦٠٩) بوده که از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. پس از کشت باکتری در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) و انکوباسیون آن در دمای ٣٠ درجه به مدت ١٨ ساعت، برای تلقیح به محیط کشت حاوی پروتئین تهیه شده از ضایعات تاس‌ماهی سیبری استفاده گردید.

بهترین تیمار از نظر بالاترین میزان پروتئین (تیمار شماره ١٥) برای تولید محیط کشت استفاده شد. پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی، معادل پپتون محیط کشت تریپتیک سوی براث بوده و معادل ٢٠ گرم در لیتر در نظر گرفته شد. ترکیب محیط کشت مورد استفاده در ارزیابی رشد *Salmonella typhi* در جدول ٢ نشان داده شده است. روند رشد *Salmonella typhi* در زمان‌های مختلف، از طریق قرائت جذب نوری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (ساخت شرکت Eppendorf آلمان) انجام شد (Safari et al,. 2011).

جدول ۲ ترکیب محیط کشت مورد استفاده در آزمایش‌های میکروبیولوژی(گرم/ لیتر)

ترکیبات	پپتون تولید شده از امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری	محیط کشت TSB(گرم/لیتر)
سدیم کلراید	۵/۰۰	۵/۰۰
کازئین	–	۱۵/۰۰
سویا	–	۵/۰۰
پروتئین هیدرولیز شده تاس‌ماهی سیبری	۲۰	–

آنالیز آماری

آنالیز ترکیب شیمیایی و بررسی رشد باکتری با آزمون ANOVA – دانکن انجام گرفت. رسم نمودار با نرم‌افزارMicrosoft Excel 2010 انجام شد. بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) براساس طرح باکس- بنکن انجام گردید. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده‌های آزمایشی برای انطباق با مدل ریاضی، تعیین ضریب رگرسیونی و تعیین معناداری آزمون‌های آماری شرایط مدل و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Design Expert 7.0.0 انجام شد. طبق این مدل تعداد ۱۵ تیمار (جدول ۳) پیشنهاد شد که در نقطه مرکزی آزمایش ۳ بار تکرار شدند. سه متغیر مستقل pH (X۱)، زمان (X۲)، نسبت آنزیم به سوبسترا (X۳) در سه سطح (۱+، ۰ ، ۱-) آزمایش شدند (جدول ۳). درجه هیدرولیز به‌عنوان پاسخ به متغیرها در نظر گرفته شد. پاسخ سیستم آزمایشی براساس رابطه زیر انجام گرفت:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Yعبارت است متغیر وابسته (درجه هیدرولیز)، β_0 و β_i و β_{ii}و β_{ij} ثابت‌های براورد شده توسط مدل هستند، X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و به‌ترتیب نمایانگر اثرهای خطی، درجه دوم و اثرهای متقابل متغیرهای X۱، X۲ و X۳ روی پاسخ می‌باشند. این مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ نشان می‌دهد.

جدول ۳ نتایج درجه هیدرولیز و میزان پروتئین امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری با آلکالاز به روش RSM

تیمار	X_1	X_2	X_3	DH (%)	Pr(g/l)
	۷/۵-۸/۵	۳۰-۶۰(min)	۱-۲ (٪)		
۱	۰	-۱	-۱	٤۳/٦٤	۳۲/۵۹
۲	-۱	+۱	۰	۵۳/٤۱	۳۰/۰۷
۳	۰	+۱	-۱	۵۲/۷۷	۳٦/٤٤
٤	۰	۰	۰	۵۳/۷٦	۳٦/۷٤
۵	+۱	۰	-۱	۵۱/۲٤	۲۹/۳۷
٦	-۱	-۱	۰	٤۱/٤۳	۲۹/۳۷
۷	۰	۰	۰	۵۵/۹۸	۳۳/۸۵
۸	۰	۰	۰	۵٤/٦۹	۳۳/٤
۹	-۱	۰	+۱	۵۱/۳۵	۳۰/۸۵
۱۰	۰	+۱	+۱	۵۸/۲۱	۲۹/۳۷

١١	+١	−١	٠	٤٧/٠٦	٣٠/٤٨
١٢	−١	٠	−١	٤٣/٣٢	٢٨/٥٩
١٣	+١	+١	٠	٥٦/٠١	٣١/٠٣
١٤	٠	−١	+١	٥١/٨٩	٢٦/٩٦
١٥	+١	٠	+١	٥٤/٦	٤٢/٣٧

نتایج

ترکیب شیمیایی امعا و احشا و پودر پروتئین هیدرولیز شده تاس‌ماهی سیبری در جدول ٤ ارائه شده است. نتایج نشان داد میزان پروتئین پس از فرایند هیدرولیز افزایش یافت و به ٨٨/٤٢ درصد رسید. میزان خاکستر پس از هیدرولیز افزایش یافته (٢/٩١) و در عوض درصد چربی(١/١١) و رطوبت کاهش یافت.

جدول ٤ ترکیب شیمیایی مادهٔ خام و پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری

ماده	پروتئین(٪)	چربی (٪)	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)
مادهٔ خام(وزن‌تر)	b١٧/٩٧±١/٤٦	a١/٩٦±٠/٠٦	a٧٤/٨٢±١/٤٥	b٢/١١±٠/١٤
پروتئین هیدرولیز شده	a٨٨/٤٢±٢/١٤	a١/١١±٠/٢٣	b٧/٣٢±٠/٢٥	a٢/٩١±٠/١١

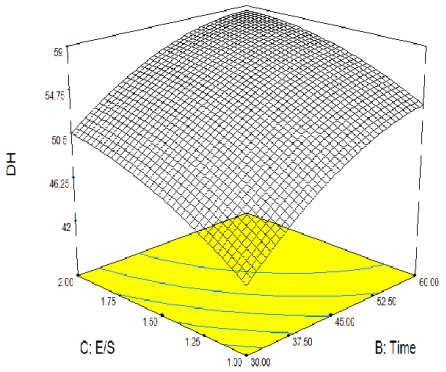
حروف کوچک متفاوت در ستون حاکی از اختلاف معنادار در بین داده‌ها است.

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز به‌عنوان متغیر وابسته در تیمارهای تعریف شده به روش RSM براساس طرح باکس-بنکن در جدول ٣ نشان داده شده است. بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به تیمار شماره ١٠ بوده (٥٨/٢١) که در نسبت آنزیمی ٢درصد، زمان ٦٠ دقیقه و pH=٨ انجام شده است. کمترین درجه هیدرولیز (٤١/٤٣) مربوط به تیمار شماره ٦، نسبت آنزیمی ١/٥ درصد، زمان ٤٥ دقیقه و pH=٧/٥ بوده است. مقدار F برای آنالیز واریانس درجه هیدرولیز امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری ٢٤/٨٥ به‌دست آمد که در سطح احتمال ٥ درصد از مقدار F جدول بزرگ‌تر بود. از سوی دیگر مقدار P مدل، ٠/٠٠١٢ بود و چون از ٠/٠٥ کوچک‌تر است، از این‌رو نشان‌دهندهٔ معناداری مدل است. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت و معنادار نبود (p>٠/٠٥). براساس نتایج به‌دست آمده، ضرایب رگرسیونی چندگانه برای پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معناداری ضرایب، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

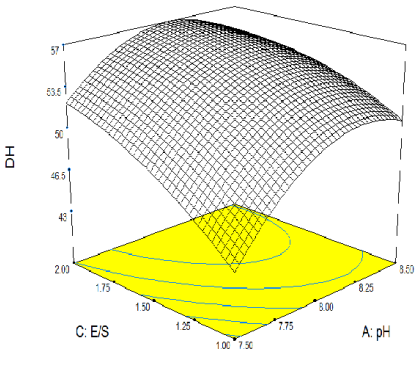
$$DH = ٥٤/٨١ + ٢/٤٢\ (X_١) + ٤/٥٥\ (X_٢) + ٣/١٤\ (X_٣) - ٣/٤٢\ (X_١^٢) - ١/٩٢\ (X_٢^٢)$$

آزمون آنالیز واریانس مشخص کرد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ است. ضریب همبستگی ($R^٢$) ٠/٩٧٨١ بیانگر این بود که مدل رگرسیون واکنش را به‌خوبی توضیح داده است. مقدار ضریب همبستگی تنظیم شده برای درجه هیدرولیز امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری ٠/٩٣٨٨ بود که با مقدار ضریب همبستگی آزمایش همخوانی داشت. آماره دقت کافی برای این آزمایش برابر با ١٦/٣٤٤ بود. هرگاه مقدار این آماره بیش از ٤ باشد، مطلوب بوده و نشان‌دهندهٔ دقت در پیش‌بینی داده‌ها است. در این مطالعه، مقادیر ٢/٤٦درصد برای ضریب تغییرات و

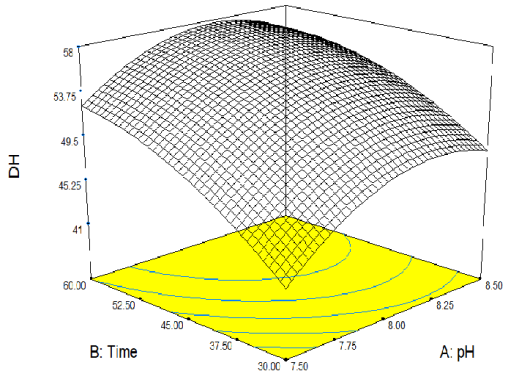
۱/۲۶برای انحراف استاندارد نشانگر دقتی است که آزمایش در آن انجام شده است. براساس معادله رگرسیون، معنادار بودن هر یک از ضرایب مربوط به متغیرهای معادله درجه دوم به‌وسیله مقادیر F و P بررسی شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری نشان می‌دهد در مدل آزمایش، هر سه عامل به‌صورت مستقل، تأثیر بسیار معناداری بر درجه هیدرولیز دارند ($p<۰/۰۱$) و اثر متقابل آنها غیرمعنادار است و همچنین اثر درجه دوم فقط در مورد pH و زمان معنادار است. به‌منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی، برای حصول بالاترین درجه هیدرولیز، نمودارهای سه بعدی برای متغیرها ترسیم شده است. هر شکل اثرهای دو متغیر را روی پاسخ نشان می‌دهد، متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه داشته شده است. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز در یک نسبت آنزیم به سوبسترای ثابت، افزایش یافته و در زمان‌های بالاتر دستخوش کاهش شده است و با کاهش پیوندهای پپتیدی قابل هیدرولیز، در سطح نسبتاً ثابت باقی می‌ماند. مطابق این شکل بالا رفتن نسبت آنزیم به سوبسترا در یک زمان ثابت، باعث افزایش درجه هیدرولیز می‌گردد. در شکل ۲ که تغییرات درجه هیدرولیز در نسبت‌های مختلف آنزیمی و pH را نشان می‌دهد، مشخص است که متغییر pH در ناحیه ۸/۰۲ بیشترین اثر را در افزایش درجه هیدرولیز داشته، در حالی‌که با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، درجه هیدرولیز روند صعودی به خود گرفته و سپس از شیب آن کاسته می‌شود. شکل ۳ بیانگر تغییرات درجه هیدرولیز در زمان‌ها و pHهای مورد آزمایش است که بیان می‌دارد افزایش زمان منتج به افزایش درجه هیدرولیز می‌گردد و سپس درجه هیدرولیز روند کاهشی به خود می‌گیرد. علت این کاهش را می‌توان در کاهش شدت فعالیت آنزیمی، کاهش میزان باندهای پپتیدی در دسترس برای هیدرولیز دانست. همچنین بالارفتن pH نیز باعث افزایش درجه هیدرولیز می‌شود، ولی با افزایش بیشتر آن، میزان درجه هیدرولیز کاهش می‌یابد.



شکل ۱ نمودار سه بعدی اثر متغیرهای زمان و E/S بر درجه هیدرولیز



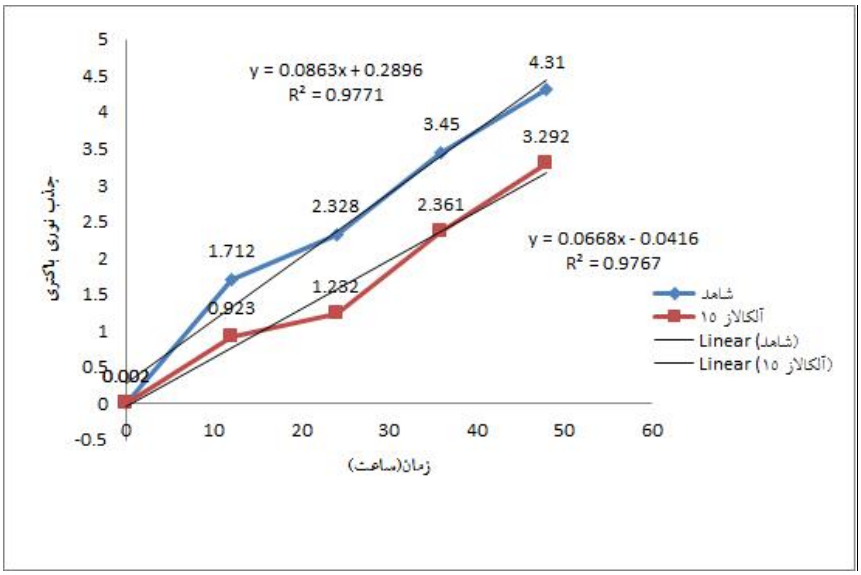
شکل ۲ نمودار سه بعدی اثر متغیرهای نسبت‌های آنزیم به سوبسترا وpH بر درجه هیدرولیز



شکل٣ نمودار سه بعدی اثر متغیرهای زمان و pH بر درجه هیدرولیز

روند رشد *Salmonella typhi* در محیط کشت

برای استفاده از پروتئین هیدرولیز شده از امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری، از تیمار شماره ١٥ که دارای بالاترین میزان پروتئین (٤٢/٣٧ گرم/لیتر) بود، استفاده شد. نتایج تغییرات جذب نوری سالمونلا تیفی از زمان صفر تا ٤٨ ساعت در تیمار شاهد و تیمار آلکالاز در شکل ٤ نشان داده شده است. تغییرات رشد باکتری در تیمار شاهد بهتر از تیمار آلکالاز بوده ولی با این وجود هیچ گونه اختلاف معناداری بین دو تیمار وجود نداشته است.



شکل ٤ تغییرات *Salmonella typhi* در محیط کشت حاوی پپتون تجاری و پپتون تهیه شده از امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری با آلکالاز

بحث

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی (جدول٤) نشان می‌دهد که میزان پروتئین در پودر پروتئین هیدرولیز شده، بالا و ٨٨/٤٢ درصد است. این افزایش در واقع نوعی غنی‌سازی پروتئین به‌حساب می‌آید و مشابه نتایج سایر مطالعات است که میزان پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده را بین ٦٣ تا ٩٠ درصد گزارش کردند (Diniz and Martin, 1997, Ovissipour et al., 2009a ,Bhaskar et al., 2008 ، Kristinsson and Rasco, 2000a,b). میزان چربی در ماده خام ١/٩٦درصد بود ولی پس از انجام هیدرولیز، میزان چربی به ١/١١ درصد کاهش یافت. دلیل این کاهش، شکسته شدن پیوندهای پپتیدی و سانتریفوژ نمونه‌ها بوده که باعث جدا کردن چربی از کمپلکس پروتئینی شده و بالاتر از مایع رویی قرار گرفته و به‌راحتی از آن جدا شده است. پروتئین هیدرولیز به‌طور معمول فراورده کم‌چرب محسوب شده که به‌دلیل وگی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند سبب جلوگیری یا کاهش اکسیداسیون چربی و پروتئین در ماهی در زمان نگهداری گردد (Nikoo et : Shahidi et al., 1995 al., 2014). میزان چربی در پروتئین هیدرولیز شده معمولاً کمتر از ١ درصد عنوان گردید Kristinson and (Rasco.,2000a). میزان خاکستر در نمونهٔ هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه افزایش یافت. این امر می‌تواند به‌علت افزایش میزان ماده خشک و نیز کاربرد اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم برای تنظیم pH در طی واکنش باشد (Meshginfar et al., 2014).

Ovissipour و همکاران (2009a) نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز امعا و احشای تاس‌ماهی ایرانی از ٣٠ دقیقه به ٢٠٥ دقیقه، درجه هیدرولیز افزایش نسبی پیدا می‌کند، ولی این روند در دماهای مختلف متفاوت است به‌طوری‌که در دمای ٣٥ درجه سانتی‌گراد، درجه هیدرولیز در زمان ٣٠ دقیقه به ١٠/٢٥ افزایش و تا زمان ٢٠٥ دقیقه در همین دامنه ثابت می‌ماند. در دمای ٤٥ درجه روند افزایش سریع‌تر بوده و از ١٠/٢٥ در زمان ٣٠ دقیقه به ٣٥/٢٧ درصد افزایش می‌یابد. با افزایش دما به ٥٥ درجه این روند افزایش معناداری داشته و به ٦٤/١٣ در زمان ٢٠٥ دقیقه می‌رسد. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز بسته به دمای مورد استفاده تغییرات معناداری داشته و افزایش آن به دمای استفاده شده بستگی دارد. در تحقیق حاضر دمای مورد استفاده ٥٥ درجه بوده که انتخاب آن با در نظر گرفتن سایر مطالعات انجام شده تا بهترین تغییرات در میزان پروتئین و درجه هیدرولیز به‌دست آید.

نتایج این تحقیق نشان داد که متغیرهای نسبت آنزیم به سوبسترا، زمان و pH اثر معناداری روی پاسخ آزمایش که درجه هیدرولیز است، داشته‌اند. هر سه عامل نسبت آنزیمی، زمان و pH به‌صورت مستقل تأثیر بسیار معناداری بر درجه هیدرولیز دارند. همچنین اثر درجه دوم در مورد pH و زمان معنادار بود که مشابه با نتایج سایر مطالعات است(Dong et al., 2008; Guerard et al., 2002). Taghiof و همکاران (2010) از روش سطح پاسخ و آنزیم آلکالاز برای بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعا و احشای فیل‌ماهی استفاده کردند .براساس نمودارهای سه بعدی، شرایط بهینه از لحاظ دما، زمان و میزان آنزیم به‌ترتیب، دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد، زمان ١٢٠ دقیقه و میزان آنزیم ١ درصد بود. Esmaeili and Hovasnnisyan (2011) با هیدرولیز پروتئین امعا و احشای فیل‌ماهی با استفاده از آنزیم پروتامکس دریافتند که در دمای ٣٩/٢١ درجه سانتی‌گراد، زمان ١١٤/٢دقیقه و فعالیت آنزیمی ٢٧/٤١ واحد آنسون بر کیلوگرم، درجه هیدرولیز بیش از ٣٠ درصد بوده است. Aliasgari و

همکاران (2015) شرایط بهینه را برای هیدرولیز سر و بازوی ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) با استفاده از آلکالاز دمای ٥٤/٣٣ درجه سانتی‌گراد، pH= ٨/٤٩ و نسبت آنزیم به سوبسترا ١/٩٧درصد با درجه هیدرولیز ١٤/٥٠ اعلام کردند.

نتایج تغییرات جذب نوری در رشد باکتری *Salmonella typhi* نشان داد که در هر دو محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق، با افزایش زمان انکوباسیون تا ٤٨ ساعت، میزان جذب نوری افزایش پیدا کرده است. ولی رشد *Salmonella typhi* در محیط کشت تجاری بیشتر بوده است. در مطالعه انجام شده از سوی Safari و همکاران (2011) از سه غلظت ١٠، ٢٠ و ٣٠ گرم از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی کپور نقره‌ای به‌منظور کشت باکتری ویبریو آنگوئیلاریوم استفاده شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان پپتون، زمان مرحلهٔ سکون باکتری کاهش یافته و باکتری سریع‌تر وارد مرحلهٔ رشد می‌گردد. رشد ویبریو آنگوئیلاریوم در غلظت‌های ١٠ و٢٠ گرم در لیتر از پپتون کمتر از محیط کشت تجاری بوده است که نتیجه حاصل با نتیجه تحقیق حاضر مشابه است. بهترین نتیجه تحقیق غلظت ٣٠ گرم از پروتئین و زمان ١/٥ساعت بوده است. Vazquez و همکاران (2004b) از محیط کشت حاوی پپتون ماهی برای رشد باکتری‌های بیماری‌زا و پروبیوتیک (ویبریو،روزئوباکتر و سودوموناس) استفاده کردند و نتایج نشان داد پپتون‌های مورد استفاده باعث تقویت رشد باکتری‌های شاخص شده و در بین آنها نیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون بهتر از سایر سوبستراها (اسکوئید، قزل‌آلا) پاسخ داده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که امعا و احشای تاس‌ماهی سیبری منبع پروتئینی مناسبی برای تولید پروتئین هیدرولیز است. روش سطح پاسخ و مدل حاصل از این آزمایش از تناسب و اطمینان خوبی برای پیش‌بینی درجه هیدرولیز برخوردار است. با توجه به نتایج آزمایش میکروبی، و براورد هزینه محیط کشت تجاری و پپتون تهیه شده از ضایعات، می‌توان از آن به‌عنوان جایگزین استفاده کرد. ولی با این وجود تکمیل مطالعات مذکور از طریق انتخاب تیمارهای مختلف برای دستیابی به نتایج مستدل و منطقی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از آقایان مهندس رضا صفری و مهندس کیوان علی عسگری به‌دلیل همکاری و کمک‌های بی‌دریغشان نهایت تشکر و سپاسگزاری را می‌نمایند.

منابع

Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins (pp.57–109).Copenhagen: *Elsevier Applied Science Publishers.*

Ali Asgari, K., Yeganeh, S., Jafarpour, S,A., Safari, R. 2015. Optimization of protein hydrolysates from head and arm of cuttle fish (*Sepia pharaonis)* using Alcalase enzyme, *International conference on sust ainable development, strategies and challenges With a focus on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism24-26 Feb, Tabriz , Iran*(In Persian).

AOAC. 2005. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*, Arlington*, *Association of Official Analytical Chemists.*

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.

D'Aoust .J.Y.and Purvis.U. 1998. Isolation an identification of *salmonella* from foods. MFHPB-20.*Health Protection Branch , Health Canada, Ottawa,Canada*,145-230.

Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., and Marshall, M. R. 2011. Oxidative stability of

hydrolysates from meat industry by product by Response Surface Methodology, *Journal of Food Science and Technology*, Vol.24, No.2, 2014. (Abstracts in English)

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from *skipjack tuna*. *Food Chemistry*, 124: 1354-1362.

Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Jing, L., Wu, F.F., Yang, N., Xu, B., Jin, Z., Xu, X. 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from *Amur sturgeon* skin gelatin. *Journal of Functional Foods*, 7: 609-620.

Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Accipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour, B.2012b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and bioprocess technology,*5:460-465. DOI 10.1007/ s11947-009-0284-x.

Pyka, J and Kolman, R. 2003. Feeding intensity and growth of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii)* Brandet in pond cultivation. *Archives of Polish Fisheries*, 11: 287-294.

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, 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.

Shahidi, F., Han, X. Q., and Syniwiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 285–293.

mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124: 640–645.

Diniz, A. M., and Martin, A. M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 48: 191–200.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysate prepared from silver carp(*Hypophthalmichthys molitrix).Food Chemistry*, 107: 1485–1493.

Esmaeili, A. M. and Hovasnnisyan. H.G. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of *Beluga Huso huso* using protamex, *International Aquatic Research*, 3: 93-99.

Guerard, F. Guimas L. Binet A. 2002. Production of *tuna* waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Molec Catal. B, Enzymatic* 19–20: 489–49.

Hoyle, N.T. and Merritt, J. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science,* 59**:** 76-79.

Hsu, K. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of *tuna* dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122: 42–48.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B.A., 2000. Kinetics of enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture, proc. *Biochemistry*, submitted.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000a. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteiens hydrolyzed with varius alkaline protease. *Food chemistry*, 48: 657-666.

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

Layne, E.1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins.

Methods in enzymology, 3: 447-454.

Meshginfar, N., Sadeghi, Mahoonak, AR., Ziaiifar, AM., Ghorbani, M and Kashaninejad, M. 2014. Optimization of the production of protein

Vazquez, J. A., Gonzalez, M. P., and Murado, M. A. 2004b. 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: 385–392.

Taghiof, M., Ghomi, M., Ovissipour, M. 2010. Production of hydrolyzed protein from viscera of Beluga (*Huso huso*) by Alcalase enzyme, *Journal of fisheries*, Vol.4, No.1, p. 35-40 (Abstracts in English)

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 4, No. 3, Autumn 2015

Protein hydrolysates from viscera of cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and its use for bacterial (*Salmonella typhi*) culture medium

Roghayeh Jafari Taraji[1], Alireza Alishahi[2], Seyed Mahdi Ojagh[2*], Abbas Esmaeili Molla[3]

1- M.Sc. Graduate, Department of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

2- Assistant Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

3- Assistant Professor, Department of Aquatic Physiology, Non- Profit Institution of Higher Education, Rudaki, Tonekabon

Received: 07.06.2015 Accepted: 18.10.2015

[*]Corresponding author: mahdi_ojagh@yahoo.com

Abstract:

Protein hydrolysate (PH) from viscera of cultured Siberian sturgeon (Acipenser baerii) was produced. To optimize the production conditions, Response Surface Method (RSM) was employed to examine the effects of three different operating conditions, including time, pH, and enzymatic concentration (Alcalase) on the degree of hydrolysis.The mathematical model showed acceptable fitness of the experimental data as R2 equaled 0.97, which indicated that major part of the variability within the range of values could be explained by the model. The results showed that the highest degree of hydrolysis (58.21%) was related to the treatment which happened at the enzymatic concentration of 2%, 60 minutes time, and pH=8. Treatment under hydrolysis condition (i.e., E/S = 2%, Time = 45 min, and pH = 8.5) had the highest protein content (42.37g/l), which was used as an alternative to commercial peptone medium (Triptic soy broth) to assess the growth of Salmonella typhi bacteria from 0 to 48 hours. Although there was an upward trend in growth rate of S. typhi both in control and No. 15 (Alcalase) treatments, the log growth of control treatment was found to be better than that of Alcalase treatment. However, there existed no significant difference between the two treatments.

Keywords: Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), *Salmonella typhi*, Protein hydrolysates, Alcalase