View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان :

تولید پپتون از باقیمانده های ماهیان پرورشی و دریایی با استفاده از آنزیمهای تجاری با هدف تهیه محیط کشت باکتریایی

مجری :
رضا صفری

شماره ثبت
۴۸۶۱۳

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

عنوان پروژه : تولید پپتون از باقیمانده های ماهیان پرورشی و دریایی با استفاده از آنزیمهای تجاری با هدف تهیه محیط کشت باکتریایی
شماره مصوب پروژه : ۸۹۰۱۴-۱۲-۷۶-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : رضا صفری
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : عباسعلی مطلبی- حسن نصراله زاده ساروی -محمود رضا اویسی پور- احمد غرقی- زهرا یعقوب زاده- حسن ملایی-زهرا بانکه‌ساز- احترام السادات علوی- محب علی پورغلام-مهدی یوسفیان
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : Asbjorn Gildberg – Barbara Rasco- **علی معتمدزادگان**
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : رضا پورغلام
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۸۹/۴/۱
مدت اجرا : ۳ سال
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تولید پپتون از باقیمانده های ماهیان پرورشی و دریایی با استفاده از آنزیمهای تجاری با هدف تهیه محیط کشت باکتریایی

کد مصوب : ۸۹۰۱۴-۱۲-۷۶-۲

شماره ثبت (فروست) : ۴۸۶۱۳ تاریخ : ۹۴/۱۱/۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای رضا صفری دارای مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته تکثیر و پرورش می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فنآوری و فرآوری آبزیان مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده اکولوژی دریای خزرمشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۱-۱- مشخصات کپور ماهیان ۴
۱-۲- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق ۵
۱-۳- انتخاب ماده اولیه ۶
۱-۴- هیدرولیز پروتئین ها: ۷
۱-۵- انواع آنزیم ۸
۱-۶- درجه هیدرولیزاسیون ۱۱
۱-۷- طول زنجیر پپتیدی ۱۱
۱-۸- باکتریهای مورد استفاده ۱۱
۱-۹- تعاریف واژه ها ۱۹
۱-۱۰- اهداف پژوهش ۲۰
۱-۱۱- سئوالات تحقیق ۲۰
۱-۱۲- فرضیه‌های تحقیق ۲۰
۲- پیشینه تحقیق ۲۱
۲-۱-استفاده از پروتئین هیدرولیز شده آبزیان بعنوان منبع پروتئین در فرمولاسیون محیط های کشت.. ۲۱
۲-۲ - درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین ۲۵
۳- مواد و روشها ۲۸
۳-۱- مواد وتجهیزات مورد استفاده ۲۸
۳-۲- مواد خام اولیه ۲۹
۳-۳ - آنزیم ها ۲۹
۳-۴- روش کار ۳۰
۴- نتایج ۳۳
۴-۱- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی بیگ هد (*Silver carp*) با pH و دمای اول ۳۳
۴-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات کپور معمولی با pH و دمای اول ۳۴
۴-۳- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور نقره ای یا فیتوفاگ با pH و دمای اول ۳۵
۴-۴ - تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور علفخوار یا آمور با pH و دمای اول ۳۶

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴-۵- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی بیگ هد باpH و دمای دوم ۳۷
۴-۶-تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات کپور معمولی با pH و دمای دوم..... ۳۸
۴-۷- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپورنقره ای یا فیتوفاگ در pH و دمای دوم ۳۹
۴-۸- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور علفخوار یا آمور در pH و دمای دوم..... ۴۰
۴-۹- ارزیابی کیفی محصولات تولید شده ۴۱
۴-۱۰- ارزیابی رشد باکتریهای شاخص در محیط های تهیه شده از پپتون ماهیان گرمابی..... ۴۴
۵- بحث..... ۷۰
۵-۱- درجه هیدرولیز و میزان پروتئین هیدرولیز شده و تاثیر pH، دما و زمان بر آنها ۷۰
۵-۲- بررسی تاثیر محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از ماهیان گرمابی بر رشد باکتریهای گروه لاکتیک و مقایسه آن با محیط کشت MRS..... ۷۳
۵-۳- بررسی تاثیر محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از ماهیان گرمابی بر سایر باکتریهای مورد استفاده و مقایسه آن با محیط کشت TSB ۷۵
۶- نتیجه گیری ۷۹
پیشنهادها ۸۰
منابع ۸۱
چکیده انگلیسی..... ۸۵

چکیده

ضایعات ماهی بین ۳۰ تا ۴۵ درصد از کل ماهی را شامل میگردند. با استفاده از روشهای مختلف هیدرولیز، میتوان پروتئین وجود در ضایعات را مجددا بازیافت نموده و میزان راندمان پروتئینی را افزایش داد. در این مطالعه از چهار آنزیم آلکالاز، پروتامکس، پپسین و تریپسین به منظور هیدرولیز ضایعات چهار گونه از ماهیان گرمابی شامل کپور معمولی، فیتوفاگ ، آمور و بیگ هد استفاده شده است. تاثیر پارامترهای pH ، دما و زمان هیدرولیز بر میزان پروتئین محلول و درجه هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت(مرحله اول). در مرحله دوم آنالیز کیفی پپتونهای خشک مورد ارزیابی قرار گرفته و در نهایت بعنوان جایگزین پپتون تجاری در محیطهای MRS (لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس کازئیی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس) و TSB (لیستریا مونوسیتوژنز، دو گونه سودوموناس، دو گونه باسیلوس، استرپتوکوکوس فسیوم)مورد استفاده قرار گرفته و رفتار باکتریها در زمانهای مختلف از طریق جذب نوری با نمونه شاهد مقایسه گردید. نتایج نشان داد که بیشترین پروتئین محلول و درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز بوده و آنزیمهای تریپسین، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. بیشترین میزان هیدرولیز ، در تمامی تیمارها، مربوط به ضایعات ماهی آمور بوده و ماهیان فیتوفاگ، کپور معمولی و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند. بهترین pH و دما به ترتیب برای آنزیمهای آلکالاز، پروتامکس، پپسین و تریپسین ۸/۵ و ۵۵ ، ۷/۵ و ۵۵، ۳/۵ و ۳۷ ، ۷ و ۳۷ بوده است. بهترین زمان جهت دستیابی به بالاترین میزان پروتئین محلول و درجه هیدرولیز ، ۹۰ دقیقه بود. نتایج آنالیز کیفی پپتونهای فریزدرایر شده (Freeze dried) نشان داد که بیشترین میزان پروتئین و کمترین مقدار چربی در تیمار مربوط به آلکالاز بوده (در حدود ۷۰ درصد پروتئین و کمتر از ۰/۵ درصد چربی)و آنزیمهای پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج کشت باکتریهای مختلف نشان داد که در بین باکتریهای لاکتیک بیشترین درصد رشد مربوط به استرپتوکوکوس ترموفیلوس بوده و کمترین میزان رشد نیز مربوط به لاکتوباسیلوس کازئیی بوده است. در بین تیمارهای آنزیمی بهترین شرایط مربوط به آنزیم آلکالاز بوده و بعد از آن تیمارهای پروتامکس(بجز لاکتوباسیلوس کازئیی)، پپسین و تریپسین قرار داشتند. در خصوص سایر باکتریها ، بیشترین درصد رشد مربوط به گونه های سودوموناس و باسیلوس بوده و استرپتوکوکوس فسیوم و لیستریا مونوسیتوژنز در مرحله بعدی قرار داشتند. در تمامی تیمارها، آنزیم آلکالاز بهترین نتیجه را بهمراه داشته و در بین پپتونهای مورد استفاده نیز پپتون تهیه شده از ضایعات ماهی آمور از ویژگی خاصی برخوردار بوده و قادر به تقویت رشد تمامی باکتریهای مورد استفاده بوده است. به نظر می رسد نوع سوبسترای اولیه ، پارامترهای مورد استفاده نظیر دما، pH ، زمان هیدرولیز و نوع آنزیم، تاثیر معنی داری بر کیفیت پپتون تولید شده داشته و درصد پروتئین در محصول نهایی، ارزش پپتون تولید شده جهت کشت میکروبی را تعیین می کند.

کلمات کلیدی: ماهیان پرورشی گرمابی، آنزیمهای پروتئاز، باکتری، درجه هیدرولیز، میزان پروتئین ، ضایعات ماهی، پپتون

۱- مقدمه

بر اساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان در سال ۲۰۱۲ بالغ بر ۱۵۸ میلیون تن بوده است (FAO, 2013) که فقط ۵۰٪ از آنها قابلیت مصرف انسانی دارند . از میلیون ها تن ماهی صید شده ، تقریبا ۲۹/۵٪ از آن تبدیل به خوراک دام می گردد که حدود ۵۰٪ از مقدار ذکر شده مربوط به ضایعات کارخانجات فراوری ماهی می باشد (Baca et al., 1991; Pigott and Tucker 1990) 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 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 (Bhaskar , 2008). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو احسن مورد استفاده قرار بگیرند، از یک سمت باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر به لحاظ داشتن پروتئین های با ارزش قابل بازیافت میباشند . (اویسی پور و قمی, ۱۳۸۷ Rustad (2003;

در دهه ۱۹۶۰ 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 . شیوع جنون گاوی در سال های اخیر، محققین را بر آن داشته که پروتئین های دریایی هیدرولیز شده را جایگزین پروتئین های حیوانی کرده و به مردم معرفی نمایند(Bhaskar et al., 2007) .

مقدار زیادی از پروتئین ها با کیفیت بالا می توانند از طریق فرآورده های دریایی در اختیار انسان قرار گیرند. نقش تغذیه ای این پروتئین ها را در رژیم غذایی انسان می توان با استفاده بهتر از فراورده های صید شده نظیر استفاده از ضایعات آنها، تقویت نمود. با توجه به پیشرفت تکنولوژی، افزایش جمعیت در جهان و افزایش میزان صید فراورده های دریایی و به دنبال آن افزایش میزان ضایعات، پژوهشگران به دنبال روشهایی برای استخراج مواد با ارزش از ضایعات می‌باشند(Bhaskar et al., 2007). 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 میشود(Kristinsson & Rasco, 2000).

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 پروتئینها در اثر واکنشهایی مشابه با آنچه که در واکنشهای شیمیایی نامطلوب اتفاق می افتد، می شود.اصلاح پروتئولیتیک پروتئین های غذایی جهت بهبود خواص و افزایش زمان نگهداری یک روش قدیمی و مرسوم می باشد.

هیدرولیز پروتئین های غذایی تاریخچه طولانی دارد که اساساً در مورد پروتئین های گیاهی و شیر بوده است. اولین پروتئین هیدرولیز شده تجاری در سالهای حدود ۱۹۴۰ به بازار آمد (Kristinsson et al.,2000). ولی بیشترین پژوهشها برای

تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی در دهه ۱۹۶۰ انجام گرفته اند و برخی از آماده سازی های پروتئین هیدرولیز شده ماهی در آن زمان کاملاً موفقیت آمیز بود. هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی بدست آوردن حداکثر بازیافت اجزای قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا در آنهاست(Bhaskar et al.,2007).

آنزیم های مورد استفاده به منظور هیدرولیز آنزیمی، از منابع مختلف گیاهی مانند آنزیم پاپائین (Shahidi et al., 1995) یا جانوری مانند تریپسین و پپسین و یا میکروبی مانند آلکالاز(Alcalase)، پروتامکس (Protamex)، نئوتراز(Neutrase) بوده که به طور گسترده مورد استفاده قرارمی گیرند. در این میان آنزیم های میکروبی در مقایسه با آنزیمهای گیاهی و جانوری، دارای مزایای بیشتری هستند، از آن جمله می توان به تنوع فعالیت تجزیه ایی و پایداری بیشتر در pH و دما اشاره نمود (تقی اف و همکاران ۱۳۸۹، Diniz & Martin, 1997). بر اساس مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، آنزیم های آلکالاز و پروتامکس در اکثر موارد نتایج بهتری را نشان دادند.

هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی بدست آوردن حداکثر بازیافت مواد با ارزش با حفظ کیفیت بالا در آنهاست. انجام تحقیق به منظور بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده به دلیل کاربردهای فراوان آن در صنایع غذایی، پزشکی و ... حائز اهمیت است (Chalamaiah et al., 2012; Chen et al., 2007; Coello et al., 2000; Dong et al., 2008).

ضایعات آبزیان در سال حدود ۲۰ میلیون(۲۵٪ کل محصول) برآورد شده است (Bhaskara et al., 2007). استفاده از تکنولوژی آنزیمی برای بازیافت پروتئین ماهی، واکنش های قابل کنترل تری را فراهم کرده و منجر به تولید طیف وسیعی از مواد به عنوان افزودنی غذای دام ، طیور و آبزیان و یا فرآورده هایی برای کاربردهای صنعتی و دارویی فراهم میشود.(Kristinsson& Rasco, 2000a; Gildberg et al., 1989; Gildberg 1993; Gildberg et al., 1995)

تحقیقات نشان می دهد که خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده بستگی زیادی به نوع سوبسترا ماده خام اولیه(، شرایط هیدرولیز) دما و نوع آنزیم دارد (Kristinsson& Rasco, 2000). به طوری که با تغییر نوع آنزیم، pH و زمان می توان پروتئین هیدرولیز شده ای با خصوصیات مختلف از لحاظ درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت نیتروژنی و ترکیب اسیدهای آمینه انتظار داشت et al., 2005 Ovissipour et al., 2010; Ovissipour et al., 2012; Pascal and (Ovissipour etal.,2009b ; Šližyte Francoise 2003). معمولا گرانترین ترکیب در محیطهای کشت میکروبی، منبع نیتروژن بوده که از ترکیبات مختلف نظیرکازئین، سویا، گوشت گوساله و گوشت خوک تهیه میشود. برخی از باکتریها نظیر باکتریهای گروه لاکتیک جهت رشد خود نیاز به محیط های کشت واجد مواد مغذی داشته که حاوی انواع ویتامینها، اسیدهای آمینه، املاح معدنی و سایر فراسنجه های رشد باشد ولی با این وجود برخی دیگر از میکروارگانیسم ها 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 و گاو، اندامهای داخلی، ژلاتین، شیر، گیاهان و مخمرها تامین می

شوند (Hom et al., 2005; Kimoto Nira et al., 2012; Kurbanoglu and Kurbanoglu 2002; Kurbanoglu 2004a,b,c; Liu et al., 2010)). استفاده از گوشت خوک به لحاظ شیوع بیماری انسفالوپاتی خوکی (Pig Encephalophaty) و حرام بودن استفاده از آن، محدودیتهای مختلفی وجود دارد. استفاده از ماهی بعنوان منبع غذایی برای رشد میکروبها اولین بار درسال ۱۹۴۹گزارش شده است.از آن زمان به بعد، تحقیقات مختلفی در خصوص استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی بعنوان جزء اصلی در محیطها کشت میکروبی انجام شده است. پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH)منبع غنی از اسید های آمینه ضروری، مواد معدنی شامل پتاسیم و منیزیم، ویتامین های گروه B و آمین های بیوژنیک می باشد . از اینرو قادر به فراهم نمودن احتیاجات غذایی میکروبهای پرنیاز بوده و باکتریهای مذکور بخوبی در محیطهای تهیه شده از پپتون آبزیان رشد می کنند. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولید شده تعیین می شود و این موارد بستگی به ویژگی پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز بویژه دما و pH دارد Aspmo et al 2005; Quaglia and Orban (1987a ; Quaglia and Orban 1987b).

۱-۱- مشخصات کپور ماهیان

ماهیان گرم آبی (کپورماهیان) از مهمترین گروه ماهیان پرورشی بوده که در استخرهای خاکی و آببندانها پرورش داده میشوند. در این گروه چهار جنس از ماهیان پرورشی شامل ماهی آزاد پرورشی (فیتوفاگ یا کپور نقره ای) (با نسبت ۶۰ تا ۶۵ درصد)، ماهی کپور معمولی (با نسبت ۱۵ تا ۲۰ درصد)، ماهی سفید پرورشی ، آمور یا کپور علفخوار (با نسبت ۱۰ تا ۱۵ درصد) و ماهی کپور سرگنده یا بیگ هد (با نسبت ۵ درصد) قرار دارند(ولی الهی ۱۳۷۰). میزان صید کپور ماهیان پرورشی در سال ۱۳۹۱ بالغ بر ۱۲۰ هزار تن بوده است(معاونت تولید و بهره برداری شیلات ایران ۱۳۹۲). با توجه به رغبت مردم به محصولات فرآوری شده از کپورماهیان نظیر فیش برگر، فیش فینگر، فیش بال، کراکر و ... ، کارخانجات مختلف اقدام به فرآوری این گروه از آبزیان نموده که متعاقب آن ضایعات قابل ملاحظه ای تولید میشود. اگر میزان ضایعات ماهیان گرمابی را بطور متوسط ۳۰ تا ۳۵ درصد بگیریم میزان متوسط ضایعات در سال ۱۳۹۱ ، بین ۳۶ تا ۴۲ هزار تن برآورد میگردد. بنابراین حجم قابل توجهی از ضایعات قابل بازیافت به فرآورده های باارزش وجود خواهد داشت.

درصد اعضای تشکیل دهنده ماهی در جدول ۱-۱ ارائه شده است(Leo and Pam 2011) .

جدول۱ -۱ درصد اعضای تشکیل دهنده ماهی(Leo and Pam 2011)

ردیف	درصد بخشهای مختلف ماهی	ماهی کامل	ماهی شکم خالی شده	درصد پروتئین
۱	سر	۲۱	۲۵	۱۳-۱۷
۲	امعا واحشا	۷ (۵-۸)	-	۱۴-۱۷
۳	جگر	۵(۲-۷)	-	۱۸-۲۲
۴	اشپل / خاویار	۴(۱-۷)	-	۲۱-۲۵
۵	ستون فقرات واستخوان	۱۴	۱۶	۶-۱۰
۶	باله ها وآبششها	۱۰	۱۲	۵-۱۱
۷	پوست	۳	۱۴	۱۲-۱۵
۸	فیله پوست کنده	۳۶	۴۳	۱۷-۲۲

۲-۱- اهمیت و ضرورت انجام تحقیق

ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که باعث تسریع فساد در آنها می گردد (Bhaskar et al., 2007) و همچنین یک سوبسترای مناسب برای تخمیر اسید لاکتیکی و منبع باکتری های تولید کننده آنزیم پروتئاز می باشد (Bhaskar et al., 2007).

نظر به اینکه تنها حدود ۵۰٪ از لاشه ماهی خوراکی است و در حال حاضر حدود نیمی از گوشت ماهی توسط انسان مصرف می شود همواره مقدار قابل توجهی از بخش خوراکی ماهی بدون استفاده باقی می ماند. در نیم قرن گذشته تلاشهای زیادی برای افزایش قابلیت استفاده از منابع محدود دریایی انجام گرفته است. یکی از این موارد، استخراج پروتئین از ماهی کامل، ماهی تمیز شده و فیله ماهی به وسیله حلال می باشد که منجر به تولید کنسانتره پروتئینی ماهی با درصد پروتئین بالا می گردد. همچنین تلاشهای زیادی برای اصلاح آنزیمی پروتئینها انجام شده است (Aspmo et al., 2005).

یکی از مهمترین کاربردهای پروتئین هیدرولیز شده، استفاده از این منابع مهم پروتئینی در تهیه محیط های کشت باکتری است. محیط های کشت استانداردی که برای رشد انواع میکروبها استفاده میشوند دارای پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده از کازئین، گوشت، سویا و مخمر (بعنوان منبع نیتروژن) و فاکتورهای رشد (ویتامین ها، اسیدهای چرب، پورین، پیریمیدین واسیدهای آمینه) می باشند. برخی از ترکیبات مورد استفاده در محیط های کشت میکروبی مثل عصاره مخمر بسته به شرکتهای تولید کننده متفاوت بوده و نسبتهای مختلفی از آن، مورد استفاده قرار میگیرد (Horn et al., 2007). باکتری ها، میکروارگانیزم هایی هستند که برای رشد در محیط های

مصنوعی، نیاز به مواد معدنی، منبع کربن و ازت دارند. معمولا یکی از گران ترین اجزای محیط کشت باکتریها، منبع ازت آنها می باشد که تحت عنوان پپتون های گوشت، پپتون های کازئین و عصاره مخمر با قیمت های بالا، به فروش می رسند. بعنوان مثال برای کشت باکتریهای گروه لاکتیک از پروتئینهای با منشاء کازئین، گوشت، عصاره مخمراستفاده میشود . بایستی توجه نمود که برای کشت انبوه باکتریهای لاکتیک استفاده از پپتونهای مذکور مقرون به صرفه نمی باشد. در تولید فرآوردهای بیولوژیکی نظیر پروبیوتیکها، باکتریوسینها و اسیدهای آلی نظیراستیک و لاکتیک نیاز به پپتونهایی حاوی اسیدهای آمینه ضروری و قیمت ارزانتر می باشد. پپتونها که بطور گسترده در محیطهای کشت میکروبی مورد استفاده قرار میگیرند، پروتئینهای محلول در آب و غیر قابل انعقاد بوده که حاوی پپتید، تریپتون و اسیدهای آمینه آزاد می باشند. مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از ضایعات ماهی قزل آلا، اسوردفیش (Swordfish)، تون و سرپایان(Cephalopods) ، به منظور استفاده در فرمولاسیون محیطهای کشت میکروبی انجام گرفته است ((Vazquez et al., 2008c. بنابراین، استفاده از منابع ارزان قیمت و اصلاح آنزیمی این منابع، می تواند از یک سمت کاهش آلودگی زیست محیطی را به دنبال داشته باشد و از سوی دیگر، تولید یک پپتون ارزان قیمت و با عملکرد حتی بهتر از پپتون های تجاری را سبب گردد. قیمت پپتونهای تجاری که هم اکنون در بازار عرضه میگردد به ازای هر ۵۰۰ گرم بسته به شرکت تولید کننده بین ۱۵۰ تا ۲۵۰ هزار تومان بوده در صورتیکه پپتون تولید شده با روش آنزیمی با استفاده از سوبستراهای مذکور بین ۶۰ تا ۶۵ هزار تومان خواهد بود

۳-۱- انتخاب ماده اولیه

به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده از آبزیان ، می توان از منابع مختلف مانند ضایعات امعاء و احشاء ، پوست ، سر ، استخوان ، صید ضمنی و حتی ماهی کامل استفاده نمود . تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است که شامل عضله و پوست ماهی کاپلین (*Malottus villosus*)(Gildberg and Raa,(1993 و (1995)Shahidi et al.,، هرینگ (*Clupea harengus*) Hoyle and Merritt,(1994)، پروتئین کوسهDiniz and Martin (1997)، ضایعات ماهی تون با استفاده از آنزیم Umamizyme(2002)Guerard etal.,ماهیچه و امعاء و احشای آزاد ماهیان (2005)Sathivel et al., (Kirstinsson and Rasco 2000) ، ماهی ساردین کامل وامعاء و احشاء ساردین(2007)., Souissi et al Quaglial and ، (Bhaskar et al.,2008) و کپور هندی Wasswa et al., (2007) ،پوست ماهی کپور علفخوار orban. , (1987,1990), احشاء ماهی خاویار ایرانی Ovissipour et al., (2009) و احشاء ماهی آزاد(Atlantic salmon)و ماهی کاد دریای آتلانتیک (Atlantic cod) می باشد(Aspmo et al., 2005).

۴-۱- هیدرولیز پروتئین ها

هیدرولیز پروتئین ها در واقع شامل تجزیه هیدرولیتیکی باندهای پپتیدی است که به صورت آنزیمی و شیمیایی صورت می گیرد.

هیدرولیز شیمیایی پروتئین ها به وسیله گسستگی پیوندهای پپتیدی هم با اسید و هم با باز حاصل می شود. این روش بدلیل ارزانی و آسان بودن در گذشته به عنوان روش انتخابی در صنایع غذایی مطرح بوده است (Zayas,1997) . اما از معایب اصلی این روش میتوان به خواص کارکردی محصول تولید شده و عدم کنترل فرآیند هیدرولیز می باشد(Blenford, 1994; Kristinsson and Rasco, 2000)

در طی هیدرولیز قلیایی، برخی از اسیدهای آمینه مثل سیستئین، سرین، ترئونین از بین رفته و اجزای نامطلوب مثل لایزینو آلانین ممکن است تشکیل شود.

امروزه به کار بردن هیدرولیز اسیدی پروتئین ها به علت خطر تشکیل کلرو پروپانول (Chloro propanol)در طول هیدرولیزمحدودشده است. هیدرولیز اسیدی همچنین باعث تخریب تریپتوفان شده که یک اسید آمینه مهم وضروری برای بدن است (Kristinsson and Rasco,2000a).

بازیافت پروتئین ها از ضایعات به روش هیدرولیز آنزیمی می تواند از میزان ضایعات بکاهد. امروزه هیدرولیز آنزیمی پروتئینها با بکار بردن آنزیمهای پروتئولیتیک جهت شکستن باندهای پپتیدی خاص، در سطح وسیعی از صنایع غذایی کاربرد دارد(Kristinsson & Rasco, 2000).

هیدرولیز آنزیمی پروتئینها یکی از روشهای بهبود خصوصیات پروتئین هااست. تجزیه پروتئین قابلیت حل شدن پروتئین را افزایش می دهد. هیدرولیز آنزیمی فرآیندی نسبتاً ساده، موثر و کارا است که مانع از تخریب پروتئینها در اثر واکنشهایی مشابه با آنچه که در واکنشهای شیمیایی نامطلوب اتفاق می افتد، می شود. هیدرولیز آنزیمی اختصاصی عمل می کند اما هیدرولیز اسیدی و قلیایی اختصاصی عمل نمی کنند. یکی از محدودیتهای استفاده از پروتئینهای هیدرولیز آنزیمی، شکل گیری طعم تلخ است. گفته می شود، نمونه های پروتئینی تهیه شده از پروتئینهای حیوانی فاقد طعم تلخ می باشد. درک چگونگی تلخ شدن هیدرولیزهای پروتئینی مشکل است. به نظر می رسد علت اصلی ایجاد طعم تلخ، شکل گیری پپتیدهای آب گریز کوچک می باشد(Van derv, 2002). ایجاد طعم تلخ به نوع پروتئین و فعالیت اختصاصی آنزیم نیز بستگی دارد.(Sathivel et al., 2005)

در حال حاضر از روشهای آنزیمی به طور پراکنده استفاده می شود. ولی به نظر می رسد استفاده از این روش در آینده رو به افزایش باشد چرا که ارزش تغذیه ای پروتئین ها در طی هیدرولیز آنزیمی حفظ شده یا افزایش می یابد. هیدرولیز آنزیمی منجر به از بین رفتن آمینو اسیدها نمی شود.(Alder_Nissen, 1986)

هیدرولیز پروتئینهای غذایی برای بهبود قابلیت نگهداری و دلپذیری منابع پروتئینی قابل دسترسی یک تکنولوژی قدیمی است(Alder-Nissen, 1986).

۱-۴-۱- پروتئین هیدرولیز شده ماهی

آنزیمهای پروتئازی با شکستن پیوندهای پپتیدی، پروتئین های ماهی را به پپتیدهایی با اندازه کوچکتر تبدیل می کنند که بدین ترتیب پروتئین هیدرولیز شده ماهی (Fish Protein Hydrolysate) تولید می شود که به طور گسترده درصنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد(Kristinsson& Rasco, 2000)

پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH)منبع غنی از اسید های آمینه ضروری، مواد معدنی شامل پتاسیم و منیزیم، ویتامین های گروه B و آمین های بیوژنیک می باشد FPH ماهی سالمون غنی از ویتامین های B شامل نیاسین و پنتوتنیک اسید میباشد (Liaset & Espe, 2008) روشهای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی تماما مبتنی بر کاربرد آنزیم ها بوده واین روشهای هیدرولیز پروتئین ماهی بر اساس نوع آنزیم و پروسه تولید، به دو دسته تقسیم می شوند: گروه اول گروهی است که منحصرا از آنزیم های داخلی (Endogenous Enzyme) برای تولید آنها استفاده می شود، مانند سیلاژ ماهی (Fish silage) و سس ماهی (Fish sauce)، و گروه دوم گروهی است که از آنزیم های خارجی برای هیدرولیز پروتئین استفاده می شود. کاربرد آنزیم های دستگاه گوارش به عنوان آنزیم های داخلی به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده یک روش سنتی در تولید این محصول می باشد که هنوز نیز به صورت گسترده در آسیای جنوب شرقی مورد استفاده است. به طوری که میزان تولید سس ماهی در آسیای جنوب شرقی بالغ بر ۲۵۰۰۰۰ تن در سال می باشد (Gildberg, 2001). خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولید شده تعیین می شود و این موارد بستگی به ویژگی پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز بویژه دما و pH دارد.

۱-۵- انواع آنزیم

انتخاب آنزیم یکی از فاکتورهای مؤثر روی خصوصیات محصول است، انتخاب آنزیم بوسیله پارامترهایی مثل مقدار آمینو اسیدهای آزاد مورد نیاز و درجه هیدرولیز تعیین می شود، آنزیم هایی که در هضم پروتئین ها شرکت دارند پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می کنند و به دو گروه تقسیم می شوند

۱- اگزوپپتیدازها (Exopeptidase) که اسید آمینه های انتهائی را جدا کرده و خود به دو دسته تقسیم می شوند:

الف) آمینو پپتیدازها (Aminopeptidase)که اسید آمینه N انتهایی را از بقیه زنجیر پلی پپتید جدا می کنند.

ب) کربوکسی پپتیداز (Carboxypeptidase)که اسید آمینه C انتهایی را از زنجیر پلی پپتید جدا می سازد.

۲- اندوپپتیداز ها (Endopeptidase)که پیوندهای پپتیدی را در داخل یک زنجیر پلی پپتیدی هیدرولیز می کنند.

تحقیقات زیادی روی هیدرولیز آنزیمی قسمتهای مختلف ماهی با استفاده از آنزیمهای تجاری انجام شده است . بسیاری از این تحقیقات، اثر آنزیمهای مختلف را مورد بررسی قرار داده اند که از آن جمله می توان به آنزیم پاپاین با منشاء گیاهی(Hoyle& Merritt, 1994) ، آنزیم تریپسین و کموتریپسین با منشاء جانوری و Simpson &) (Nayeri, 1998آنزیمهای آلکالاز(Benjakulet et al., 1997,) پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز با منشاء میکروبی

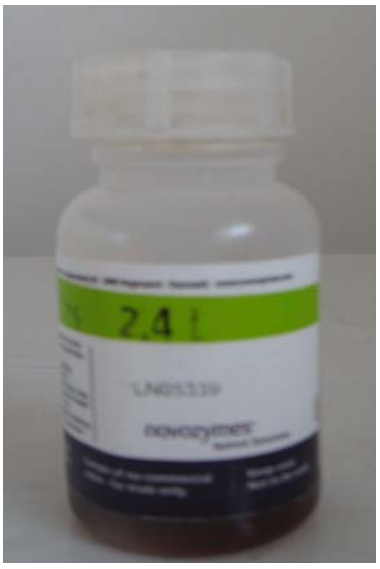
(Aspmo et al, 2005)اشاره نمود .به طور کلی، آنزیمهای با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می توان به فعالیتهای بالا ، خصوصیات مناسب pH ، پایداری حرارتی و تنوع فعالیت های کاتالیتیکی و پروتئولیتیکی اشاره نمود.(Diniz& martin, 1997).

۱-۵-۱ -آنزیم آلکالاز

در مقایسه با سایر آنزیم ها بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز می باشد. این آنزیم در زمان نسبتا کوتاه و در شرایط pH قلیایی می تواند درجه هیدرولیز بالایی را ایجاد نماید. همچنین پپتون های تولید شده توسط این آنزیم دارای نیتروژن بیشتری می باشند(Ovissipour et al., 2009). آنزیم آلکالاز(۲.۴L)(L نشاندهنده فعالیت آنزیمی است) یک پروتئاز باکتریایی قلیایی است که توسط باسیلوس لیکنوفورمیس *Bacillus licheniformis* تولید می شود. فعالیت آنزیمی و چگالی آن به ترتیبAu/Kg ۲.۴ و g/ml ۱.۸ می باشدکه ثابت شده یکی از بهترین آنزیم های مورد استفاده برای تولید پروتئین های هیدرولیز شده ی پروتئین ماهی است (Kristinsson& Rasco, 2000).

به طور کلی آنزیم آلکالاز به دلیل عملکرد مناسب در pH قلیایی ، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیزاسیون بالاتر، تولید پروتئین با طول زنجیره پپتیدی کوتاهتر بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است(Aspmo et al, 2005).

آنزیم آلکالاز، همان طور که در شکل(۱-۱) نشان داده شده است، به دو صورت مایع و پودر وجود دارد که در این تحقیق آنزیم مایع مورد استفاده قرار گرفته است(Gupta and Lorenz 2002; Sumanatha et al 2005).



شکل۱-۱-آنزیم آلکالاز مورد استفاده

۲-۵-۱- آنزیم پروتامکس

پروتامکس یک پروتئاز باکتریایی بوده و از باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)استخراج میشود. این آنزیم در شرایط خنثی تا قلیایی فعالیت داشته و دامنه حرارتی فعالیت این آنزیم مشابه آنزیم آلکالاز می باشد. فعالیت پروتئاز و قدرت هیدرولیز این آنزیم کمتر از آلکالاز بوده ولی نسبت به سایر پروتئازهای میکروبی نظیر نئوتراز و آنزیمهای حیوانی نظیر پپسین و تریپسین بیشتر می باشد. فعالیت آنزیمی آن Au/Kg ۱.۵ می باشد (Gupta and Lorenz 2002; Sumanatha et al 2005).

۳-۵-۱- آنزیم پپسین

پپسین اولین آنزیم گوارشی است که کشف شده و بصورت پروآنزیم پپسینوژن از سلولهای اصلی معده ترشح میشود. این آنزیم در pH ۲ تا ۳/۵ فعال بوده و دمای اپتیم برای فعالیت آن ۳۰ تا ۳۵ درجه می باشد اما با این وجود پپسین قادر به فعالیت در شرایط متفاوت می باشد. مطالعات نشان داده که آنزیم پپسین در مقایسه با آنزیمهای میکروبی از کارآیی کمتری برخوردار بوده و میزان پروتئین تولید شده در حضور پپسین به مراتب کمتر از آنزیمهای میکروبی می باشد. این آنزیم یک اندوپپتیداز بوده و پروتئینها را از وسط به پلی پپتیدها تجزیه میکند. آنزیم پپسین بصورت پپسینوژن که فاقد فعالیت گوارشی است در داخل سلولهای معده ساخته می‌شود. ولی این پیش آنزیم با ورود به معده در حضور اسید کلریدریک بلافاصله فعال شده و بشکل پپسین در می‌آید. پپسین در محیط با اسیدیته بالا آنزیم پروتئولیتیک بسیار فعالی است و بخصوص پیوند بین اسیدآمینه های آروماتیک و هیدروفوبیک را میشکند. اما اگر PH محیط از ۵ تجاوز نماید (با ورود غذا به روده)، اثر پروتئولیتیک پپسین بسیار ضعیف شده و ممکنست کاملاً غیرفعال گردد. پپسین فقط در هضم پروتئینها نقش دارد و در هضم کربوهیدرات و چربی تاثیری ندارد(Shahidi 1995).

۴-۵-۱- آنزیم تریپسین

تریپسین یک اندوپپتیداز بوده و پروتئینها را از وسط به پلی پپتید تجزیه میکند. تریپسین یک سرین پروتئاز است. این آنزیم باعث شکسته شدن پیوندهای لیزین و آرژنین میگردد. این آنزیم از پانکراس و در اثر تحریک کوله سیستوکینین، به دئودنوم ترشح میشود. چون تریپسین در فرم فعال میتواند سلولهای لوزالمعده را نیز تخریب کند در داخل این سلولها به شکل غیر فعال تریپسینوژن نگهداری میشود. هنگام ترشح به داخل روده بصورت پروآنزیم ترشح و در دئودنوم توسط اننروپتیداز فعال میشود. تریپسین علاوه بر هضم پپتیدها، سایر پروآنزیمهای لوزالمعده را نیز فعال میکند. pH اپتیمم این آنزیم ۷ بوده و دمای مناسب جهت فعالیت آن نیز ۳۷ درجه میباشد(Shahidi 1995).

۶-۱- درجه هیدرولیزاسیون

یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیزاسیون می باشد که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می کند و باید کنترل گردد .این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسید های آمین های آزاد ، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیزاسیون می باشد .از طرف دیگر، هیدرولیز شدید آنزیمی که باعث از بین رفتن خواص حساسیت زایی پروتیئنها شده و کاربرد آنها را در تغذیه کودکان دچار حساسیت، ممکن می سازد، با بررسی درجه هیدرولیزاسیون، تخمین زده می شود(Kristinsson& Rasco, 2000).

۷-۱- طول زنجیر پپتیدی

طول زنجیر پپتیدی به میزان هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئین هیدرولیز شده بستگی دارد.بهنگام استفاده از پروتئینها در محیط کشت میکروبی ، هر طول زنجیره پپتیدی کوتاهتر و وزن مولکولی پروتئینهای هیدرولیز شده کمتر باشد سوبسترای مناسب تری برای باکتری خواهد بود. PCL از روی درجه هیدرولیز به روش زیر محاسبه می شود(Aspmo et al., 2005).

$$PCL = \frac{100}{\%DH}$$

درجه هیدرولیز= DH طول زنجیره پپتیدی= PCL

۸-۱- باکتریهای مورد استفاده

۱-۸ -۱ - باکتریهای لاکتیک

به منظور ارزیابی رشد باکتریها، در این تحقیق از سویه های مختلف میکروبی استفاده گردید. علت انتخاب این گروه از باکتریها، پرنیاز بودن آنها بوده و اینکه این گروه از باکتریها در محیطهای کشت عمومی قادر به رشد نمی باشند. سایر باکتریهای انتخاب شده نیز جزء باکتریهای متداول در صنایع غذایی بوده و جزء باکتریهای مولد فساد و بیماری می باشند. برپایه استفاده ای که محیط کشته یک گروه از باکتریها باکتریهای گروه لاکتیک که از گونه های مورد استفاده میتوان به لاکتوباسیلوسها(لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس کازئیی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس)اشاره نمود. محیط های کشت مورد استفاده برای این گروه از باکتریها کاملا افتراقی بوده و دارای ترکیبات پیچیده می باشد. MRS (De Man Rogosa & Sharp agar) و M17 از مهمترین محیطهای کشت مورد استفاده می باشند(Safari et al 2009).

این گروه از استارترها در تولید فرآورده هایی همچون ماست ، پنیر و ... نقش بسیار مهم و اساسی دارند . آنها با تولید اسید لاکتیک اثر بسیار مهمی در کیفیت فرآورده از لحاظ بافت ، محتوای رطوبت ، عاری بودن از

میکروب های پاتوژن و سموم ناشی از آنها و نیز مزه دارند . میزان تولید اسید لاکتیک توسط این مایه های میکروبی در تولید برخی از فرآورده ها همچون پنیر چدار بسیار مهم می باشد(Safari et al 2009).

- **لاکتوباسیلوس دلبروکی** (*Lactobacillus delbrukii*)

لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس بشکل گسترده ای بهمراه استرپتوکوکوس ترموفیلوس (*Streptococcus therrmophius*) بعنوان کشت آغازگر(Starter Culture) ماست مورد استفاده قرار می گیرد . این زیر گونه جور تخمیر (Homofermentative) بوده و تولید ۲ درصد (وزنی به حجمی در شیر) اسید لاکتیک می نماید . بهینه دمای رشد ای گونه ۴۲ درجه بوده ولی در دمای ۴۵ درجه و بالاتر نیز رشد می کند . در غلظت های کم نمک رشد نکرده و به نمک های صفراوی نیز حساس می باشد(Safari et al ., 2009).

- **لاکتوباسیوس کازئیی**(*L.casei*)

لاکتوباسیوس کازئی فلور طبیعی روده کوچک بوده و به صفرا مقاوم است . بعنوان یک پروبیوتیک استفاه می گردد که البته در دسته ای از کشت آغازگر وجود داشته و عموماً بعنوان یکی از باکتری های لاکتیک غیر آغازگر یافت شده در پنیر چدار شناخته شده است. این باکتری جور و ناجور تخمیر (Homofermentative and Heterofermentative) می باشد. متداولترین محیط کشت مورد استفاده برای جداسازی آن MRS Agar است (Safari et al 2009).

از ویژگیهای باکتری می توان به موارد زیر اشاره نمود:

- تولید اسید لاکتیک L (+)
- تولید مقدار زیادی اسید لاکتیک
- تحت کنترل در آوردن ناحیه روده‌ای
- چسبنده به غشاء مخاط روده
- ایجاد محیط مناسب برای سنجش میکروبی مطلوب
- محدود کردن فشار روده‌ای از قبیل کنترل سموم و سایر اثرات زیان آور بر روی اندام‌های حیاتی و سلولهای بدن
- ممانعت از فعالیت باکتری‌های پاتوژن و جلوگیری از بیماری‌های عامل عفونت روده‌ای
- کاهش بیماری عدم تحمل لاکتوز
- کمک به ایمنی (مصونیت)(Granito &Alvarez ,2006).

-لاکتو باسیلوس پلانتاروم(*L. plantarum*)

باکتریهای لاکتیک اسید در طبیعت – در خاک، سبزیجات، گوشت، شیر و بدن انسان گسترده هستند بسیاری از آن ها در مایهٔ محصولات لبنی استفاده شده اند. آن ها به عنوان محصول اصلی، اسید لاکتیک تولید می کنند.

لاکتوباسیلوس پلانتاروم باسیل کوتاه گرم مثبت، میکروآئروفیل، غیر متحرک، کاتالاز منفی، غیر بیماری زا، بدون اسپور و یکی از باکتریهای مفید بوده که به طور طبیعی در بزاق و دستگاه گوارش انسان وجود دارد. به عنوان یک عضو از خانواده باکتری های اسید لاکتیکی بوده و معمولا در صنایع تخمیری استفاده می شود.

لاکتوباسیلوس پلانتاروم همچنین به عنوان پروبیوتیک و مهار کننده رشد انواع باکتریها در صنایع مختلف (غذایی و آبزی پروری) مورد استفاده قرار می گیرد(Safari et al 2009).

- استرپتوکوکوس ترموفیلوس(*Streptococcus thermophilus*)

استرپتوکوکوس ترموفیلوس تنها گونه این جنس است که در استارتر کالچرهای لبنی وجود دارد . این باکتری بعنوان ترموفیلی که در دمای۴۵ درجه سانتیگراد و بالاتر رشد می نماید بطور گسترده ای در تولید ماست ، پنیر موزارلر و برخی از سایر پنیرها استفاده می شود . از اواسط دهه ۱۹۹۰ از آن در تولید پنیر چدار نیز استفاده شده است . این باکتری در کنار لاکتوکوکسیها در برخی استارترهای(Direct DVS/DVI Vat Set/ Direct Vat Inoculation) بکار رفته و در مرحله حرارت دهی باعث تولید اسید می گردد و البته ممکن است بعنوان عامل کاهش دهنده آلودگی به باکتریوفاژی نیز از این کشت آغازگر استفاده شود. استرپتوکوکوس ترموفیلوس به مقادیر کم نمک و همینطور به محیطی با قدرت اسمتیک بالا حساس است.

M17 اگر چه بشکل گسترده ای برای کشت آن استفاده می شود ولی محیط ایده آلی برای آن نیست مگر اینکه اصلاحاتی در ویژگیهای این محیط نظیر کاهش قدرت اسموتیک و کاهش محتوای گلیکوفسفات انجام شده تا محیط مذکور جهت رشد باکتری مورد استفاده قرار گیرد (Pascal& Francoise,2003).

۲-۸-۱- باسیلوسها

- باسیلوس لیکنوفورمیس(*B. licheniformis*)

این باکتری جزء باکتریهای گرم مثبت اسپور دار بوده و کاملا هوازی می باشد. این جنس از باکتری به لحاظ تولید آنزیمهای پروتئاز استفاده بسیار گسترده ای در صنعت داشته و از آنزیمهای تهیه شده از این باکتری در صنایع غذایی، چرم سازی ، شویند ها و مواد دترجنت استفاده میشود. از مهمترین آنزیمهای پروتئاز که از این باکتری ترشح میشود میتوان به آلکالاز اشاره نمود که در تجزیه پروتئین به منظور تولید پروتئینهای محلول کاربرد دارد. محیطهای کشت مورد استفاده برای این باکتری بسیار ساده و عمومی می باشد (Gupta and Lorenz 2002; Sumanatha et al 2005).

- باسیلوس سوبتی لیس(*B. subtilis*)

این باکتری نیز از گروه باکتریهای اسپوردار هوازی بوده و از جمله باکتریهایی است که تولید کننده آنزیمهای مختلف پروتئولیتیک می باشد. علاوه بر آنزیمهای پروتئازی، انواع آنزیمهای لیپاز، کیتیناز و آمیلاز نیز از این باکتری ترشح میشود. آنزیم سابتی سیلین (Subticilin) ترشح شده از این باکتری در هضم پروتئینهای مختلف کاربرد دارد. این جنس از باسیلوس در محیطهای عمومی قادر به رشد بوده و نیاز به ترکیبات پیچیده ندارد) Gupta and Lorenz 2002; Sumanatha et al 2005).

۳-۸-۱- سودوموناسها

سودوموناسها باسیلهای گرم منفی هوازی بوده که پراکنش بسیار بالایی داشته و در محیطهای مختلف وجود دارند. به لحاظ تولید طیف وسیعی از آنزیمها ، این باکتریها قادر به تحمل شرایط نامناسب محیطی بوده و به همین دلیل از این باکتریها به منظور تجزیه آلاینده های زیست محیطی از جمله ترکیبات نفتی استفاده میشود. دو گونه شاخص در این گروه آئروجینوزا و پوتیدا (*P. putida, P. aeroginosa*) می باشند. محیط کشت های تجاری که برای جداسازی سودوموناسها استفاده میشوند شامل ستریمید آگار(Cetrimide agar)، کینگ آگار بیس (King agar base)و برخی از محیطهای عمومی و انتخابی می باشند.

۴-۸-۱- لیستریا مونوسیتوژنز(*Listeria monocytogenes*)

یکی از مهمترین باکتریهای بیماریزا در انسان لیستریا مونوسیتوژنز می باشد. پراکنش این باکتری در محیط بسیار بالا بوده و تقریباً درتمامی مواد خام یافت می شود. بیماری ناشی از لیستریا مونوسیتوژنز(لیستریوزیس) بیشتر در افراد مستعد مثل زنان باردار، نوزادان، سالمندان دیده می شود(Miettinen، ۲۰۰۱). لیستریوزیس یکی از عفونت های غذایی با شیوع کم ولی مرگ و میر بالا (۳۰٪)است(Rocourtوهمکاران؛ ۲۰۰۱). به لحاظ اینکه باکتری های جنس لیستریا جزء باکتریهای غنی دوست و پرنیاز بوده و در محیطهای معمولی قادر به رشد نمی باشند، برای جداسازی آنها از محیط های کاملاً افتراقی استفاده می شود. از محیط های 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 محیط ها بسیار گران بوده و و زمان جداسازی باکتری نیز نسبتاً طولانی می باشد. از طرف دیگر جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز نیاز به غنی سازی اولیه داشته و از محیط های مایع نظیر University of Vermond broth(UVB) و FDA براث استفاده می گردد(Varnam، ۱۹۹۱). بنابراین انتخاب محیط های کشت ارزان قیمت ولی با کیفیت بالا بمنظور جایگزین نمودن محیطهای مذکور لازم و ضروری به نظر می رسد. پپتونهای تولید شده از آبزیان بواسطه داشتن پپتیدهایی با زنجیره کوتاه و همچنین اسیدهای آمینه ضروری، می توانند بعنوان یکی از مواد پروتئینی با ارزش بمنظور جداسازی باکتریهای سخت رشد در نظر گرفته شوند.

۵-۸-۱- استرپتوکوکوس فسیوم(*S. faceium*)

استرپتوکوکها از گروه کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی بوده که برخی از گونه های آن در انسان بیماریزا بوده و برخی نیز در حیوانات مختلف از جمله آبزیان باعث بروز بیماریهای مختلف می باشند. از مهمترین گونه های بیماریزا در انسان و دام میتوان به استرپتوکوکوس پایوژنز(*S. pyogenes*)، آگالاکتیه(*S. agalactiae*)، اینیه (*S. iniae*)، فکالیس (*S. fecalis*) ، فسیوم(*S.faceium*) دیسآگالاکتیه (*S. disagalactiae*)، یوبریس (*S. uberis*)و پارایوبریس (*S. parauberis*) اشاره نمود. فسیوم از جمله باکتریهای فرصت طلب بیماریزا در ماهی بوده و پورغلام و همکاران تاثیرات حاد آنرا بر شاخصهای هماتولوژی قزل آلا مورد ارزیابی قرار دادند(پورغلام و همکاران ۱۳۸۹).

محیط کشت مورد استفاده برای این باکتری دارای ترکیباتی نظیر خون بوده و باکتری جهت جهت رشد نیاز به ترکیبات مغذی دارد.

در جدول ذیل استفاده از ضایعات مختلف ماهی به منظور تهیه پپتون و استفاده نهایی از آن در جهت رشد باکتریهای مختلف نشان داده شده است.

جدول۱-۲-فراورده های جانبی مطالعه شده برای ساخت محیط کشت.براساس نوع هیدرولیز انجام شده روی ماهی و پساب دریایی و نوع تولید زیستی به دست آمده(Vazquez &Murado,2010b).

ردیف	فرآورده جانبی	منبع	نوع هیدرولیز	میکرو ارگانیسم
۱	کل بدن	Lingcod سالمون Starry flounder Lemon sole	آنزیمی: تریپسین	Streptococcus clostridiume
۲	کل بدن	نا معلوم	اتولیز	*Escherichi coli* *Bacillus subtilis*
۳	فاضلاب	سالمون	نا معلوم	*Clostridium botulinum*
۴	سر،پوست	گربه ماهی	سیلاژاسیدی آنزیمی	*Aspergillus oryzae* *Escherichi coli* *Bacillus subtilis* *Saccharomyces cerevisiae*
۵	آب هدر رفت(غذای ماهی)	نا معلوم	نا معلوم	Geotrichum candidum Candida lipolytica
۶	سر،پوست	میگو prawn	اتولیز	*Aspergillus oryzae* *Escherichi coli* *Bacillus subtilis* *Rizhopus oligasporus* *Salmonella Indiana* *Streptococcus faecalis*

ادامه جدول۱-۲-فراورده های جانبی مطالعه شده برای ساخت محیط کشت.براساس نوع هیدرولیز انجام شده روی ماهی و پساب دریایی و نوع تولید زیستی به دست آمده(Vazquez &Murado,2010b).

ردیف	فرآورده جانبی	منبع	نوع هیدرولیز	میکرو ارگانیسم
۷	سر،پوست، ماهیچه	فراورده های جانبی شیلاتی	نا معلوم	*Staphylococcus aureus ,lactobabacillus casei, lactobabacillus plantarum*
۸	امعای و احشای	کاد	سیلاژاسیدی هیدرولیز اسیدی	*Proteus sp. Vibrio anguillarum*
۹	سر،استخوان، باله ها	نا معلوم	آنزیمی: تریپسین	*Aspergillus nidulans Aspergillus niger Bacillus subtilis Byssochlamys fula Klebsiella pneumonia Saccharomyces cerevisiae Schizophyllum commune Serratia marcescens…*
۱۰	فاضلاب صنایع ماهی	کاد	نا معلوم	*Proteus vulgaris Bacillus sphaericus Salmonella typhi Gibberlla fujikuroi Bacillus thuringiensis Serratia marcescens*
۱۱	نا معلوم	پپتون تجاری	نا معلوم	*Azotobacter vinelandii*
۱۲	معده	کاد	سیلاژاسیدی: اسید فسفریک وهیدرکلریک	*Escherichi coli*
۱۳	سر،کارپاس	میگو	اتولیز	*lactobabacillus plantarum*
۱۴	سر،باله ها، خرده اسکلت	ساردین Blackrim cuskeel Horse mackerel	سیلاژاسیدی: اسید های فرمیک و سولفوریک	*Corynebacterium glutamicum*
۱۵	معده، فاضلاب صنایع ماهی	کاد سالمون تن	آنزیمی: آلکالاز	*Escherichi coli Saccharomyces cerevisiae Aspergillus niger Sporobolomyces odorus Penicillium roqueforti lactobabacillus casei*
۱۶	سر، امعای و احشای،گوشت	ساردین	بدون هیدرولیز	*Bacillus subtilis*

ادامه جدول۱-۲-فراورده های جانبی مطالعه شده برای ساخت محیط کشت.براساس نوع هیدرولیز انجام شده روی ماهی و پساب دریایی و نوع تولید زیستی به دست آمده(Vazquez &Murado,2010b).

ردیف	فرآورده جانبی	منبع	نوع هیدرولیز	میکرو ارگانیسم
۱۷	سر،فرم،پوست	Cowtail ray	سیلاژاسیدی: اسید های فرمیک و پروپیونیک	*Aspergillus flavus* *Escherichi coli* *Bacillus subtilis* *Saccharomyces cerevisiae* *Staphylococcus aureus*
۱۸	سر،سینه	میگو	سیلاژاسیدی وبازی	*lactobabacillus plantarum*
۱۹	سر، امعای و احشای،گوشت	ساردین	آنزیمی:آلکالاز	*Pseudomonas aeruginosa*
۲۰	سر	میگو	بیو –سیلاژ: باکتری های لاکتیک اسید	*Verticillum locaii*
۲۱	امعای و احشای	ماهی مرکب ماهی زردباله شمشیر ماهی قزل آلای رنگین کمانی	اتولیز	*Lactobabacillus lactis* *Pediococcus acidilactici*
۲۲	امعای و احشای	ماهی مرکب ماهی زردباله شمشیر ماهی قزل آلای رنگین کمانی	اتولیزآنزیمی: پپسین	*Vibro anguillarum* *Vibrosplendidus* *Vibro sp.* *Roseobacter sp.* *Pseudomonas fluorescens*
۲۳	گوشت(غذای ماهی)	ساردین	آنزیمی:آلکالاز نئوتراز	*Rizhopus oryzea*
۲۴	دم،ماهیچه، کارپاس	Lobster میگو piavicroake	اتولیز	*Escherichi coli*
۲۵	امعای و احشای	کاد سالمون	آنزیمی: آلکالاز پاپایین، اندونوکلئاز سیلاژاسیدی: اسید فرمیک	*Lactobabacillushelveticus* *Lactobabacillusacidophilus* *Lactobabacillus saki* *Lactobabacilluslactis* *Pediococcus pentosaceus*

ادامه جدول۱-۲-فراورده های جانبی مطالعه شده برای ساخت محیط کشت.براساس نوع هیدرولیز انجام شده روی ماهی و پساب دریایی و نوع تولید زیستی به دست آمده(Vazquez &Murado,2010b).

ردیف	فرآورده جانبی	منبع	نوع هیدرولیز	میکرو ارگانیسم
۲۶	امعای و احشای	کاد	آنزیمی:آلکالاز، پاپایین، اندونوکلئاز	*Lactobabacillus saki* *Escherichi coli* *Bacillus subtilis* *Saccharomyces cerevisiae* *Aspergillus niger*
۲۷	امعای و احشای	کاد	آنزیمی:آلکالاز، پاپایین، اندونوکلئاز	*lactobabacillus plantarum*
۲۸	ماهیچه،پساب	hake	اتولیز	ماهیچه،پساب
۲۹	پولک	Red crab	اتولیز	پولک
۳۰	امعای و احشای ماهیچه	ماهی مرکب شمشیر ماهی قزل آلای رنگین کمانی	اتولیزآنزیمی: پپسین	امعای و احشای ماهیچه
۳۱	امعای و احشای	زردباله شمشیر ماهی قزل آلای رنگین کمانی	اتولیز	امعای و احشای
۳۲	سر،استخوان	فاضلاب فرایندساسمی	سیلاژاسیدی: اسید هیدرو کلریک	سر،استخوان
۳۳	پولک	میگو	اتولیز	*Bacillus subtili*
۳۴	پساب فرایندغذای ماهی	نا معلوم	نا معلوم	*Rizhopus oryzea*
۳۵	کل بدن	آنچووی	نا معلوم	Virgibacillus sp.
۳۶	سر، امعای و احشای	ساردین	نا معلوم	Aspergillus clavatus

ادامه جدول۱-۲-فراورده های جانبی مطالعه شده برای ساخت محیط کشت.براساس نوع هیدرولیز انجام شده روی ماهی و پساب دریایی و نوع تولید زیستی به دست آمده(Vazquez &Murado,2010b).

ردیف	فرآورده جانبی	منبع	نوع هیدرولیز	میکرو ارگانیسم
۳۷	امعای و احشای	Shark Thornbackray شمشیر ماهی	نا معلوم	*Leuoconostoc mesenteroides lactobabacillus plantarum Lactobabacillus bucnerii Lactobabacilluscasei Lactobabacillus lactis Pediococcus acidilactici*
۳۸	فاضلاب فرایند	هشت پا	آنزیمی:پپسین، تریپسین،پاپائین	
۳۹	سر، امعای و احشای پولک،پوست، ماهیچه،استخوان،دم	ساردین تن میگو گاو ماهی[1]	نا معلوم	
۴۰	پولک	میگو	نا معلوم	
۴۱	روده، فاضلاب،معده	هشت پا میگو گاو ماهی	نا معلوم	
۴۲	هپاتوپانکراس	Snow crap	آنزیمی: پروتامکس	
۴۳	امعای و احشای	Shark Thornbackray	نا معلوم	

۹-۱- تعاریف واژه ها

آنزیم آلکالاز(۲.۴L) یک پروتئاز باکتریایی قلیایی است که توسط *Bacillus licheniformis* تولید می شود. فعالیت آنزیمی و چگالی آن به ترتیبAu/Kg ۲.۴ و g/ml ۱.۸ می باشد که شرایط مطلوب برای فعالیت آن: دمای **بهینه فعالیت:** (55-75˚C) ، Phبهینه فعالیت 8/5- 6/5 ، میزان فعالیت (واحد آنسون به ازای یک میلی لیتر آنزیم):L ۲.۴ می باشد(Kristinsson& Rasco, 2000).

یک آنسون یونیت(Anson unit) به مقدار آنزیمی که یک میلی اکی والان تیروزین را از هموگلوبین منعقد شده در شرایط خاص (دمای 25 درجه سانتی گراد و pH =7/5) آزاد می کند تعریف می شود (Aspmo et al ., 2004).

پروتئین هیدرولیز شده ماهی: آنزیمهای پروتئازی با شکستن پیوندهای پپتیدی، پروتئین های ماهی را به پپتیدهایی با اندازه کوچکتر تبدیل می کنند که بدین ترتیب پروتئین هیدرولیز شده ماهی(FPH) تولید می شود که به طور گسترده درصنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد(Kristinsson& Rasco, 2000)

۱۰-۱- اهداف پژوهش

۱- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهیان گرمابی(کپور معمولی، کپور علفخوار یا آمور، کپور نقره ای یا فیتوفاگ و کپور سرگنده یا بیگ هد).

۲- استفاده از پروتئین هیدرولیز شده به عنوان منبع پروتئین در فرمولاسیون محیط کشت به منظور کشت باکتریهای لاکتیک و برخی از باکتریهای فرصت طلب، عامل فساد و بیماریزای انسان و ماهی .

۱۱-۱- سئوالات تحقیق

۱- آیا پروتئین تولید شده از ضایعات ماهیان گرمابی قابلیت استفاده بعنوان محیط کشت پایه باکتریهای شاخص را دارا می باشد؟

۲- آیا تفاوت معنی داری مابین پارامترهای مورد استفاده نظیر pH ، دما ، نوع آنزیم و نوع سوبسترا وجود دارد؟

۳- آیا اختلاف معنی داری ما بین رشد باکتریهای مورد استفاده در زمانهای مختلف وجود دارد؟

۱۲-۱- فرضیه‌های تحقیق

۱- پروتئین تولید شده از ضایعات ماهیان گرمابی قابلیت استفاده بعنوان محیط کشت پایه باکتریهای شاخص را دارا می باشد.

۲- تفاوت معنی داری مابین پارامترهای مورد استفاده نظیر pH ، دما ، نوع آنزیم و نوع سوبسترا وجود دارد.

۳- اختلاف معنی داری ما بین رشد باکتریهای مورد استفاده در زمانهای مختلف وجود دارد.

۲- پیشینه تحقیق

۱-۲- استفاده از پروتئین هیدرولیز شده آبزیان بعنوان منبع پروتئین در فرمولاسیون محیط های کشت

در ایران چند مطالعه توسط اویسی پور و صفری انجام گرفته ولی در سایر کشورها از جمله نروژ و اسپانیا مطالعات متعددی توسط محققین در خصوص استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی بعنوان منبع پروتئین در محیط های کشت میکروبی انجام گرفته که در ذیل به آن اشاره میگردد.

۱-۱-۲- مطالعات انجام شده در داخل کشور

در مطالعه انجام شده توسط Safari و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ضایعات تون ماهیان بعنوان منبع نیتروژن در جهت کشت باکتریهای گروه لاکتیک استفاده گردید. نتایج نشان داد که پپتون مورد استفاده قابل مقایسه با محیط کشت تجاری MRS (محیط کشت اختصاصی باکتریهای لاکتیک) بوده و باعث تقویت رشد باکتریهای مورد استفاده (لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis*)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئیی، باکتوباسیلوس بولگاریکوس) می‌شود.

در مطالعه انجام شده توسط Safari و همکاران در سال ۲۰۱۰ از ضایعات تون ماهیان بعنوان منبع نیتروژن در جهت ارزیابی روند رشد برخی از باکتریهای عمومی و پرنیاز استفاده گردید. باکتریهای مورد استفاده سودوموناس آئروجینوزا، سودوموناس پوتیدا، باسیلوس سوبتی لیس، باسیلوس لیکنوفورمیس، لیستریا مونوسیتوژنز(*Listeria monocytogenes*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)و اشرشیا کلی (*Escherichia coli*)بودند. نتایج نشان داد که روند رشد باکتریهای مورد استفاده در برخی از تیمارها بهتر از محیط کشت تجاری تریپتیک سوی براث (Tryptic Soy broth) بوده و رشد برخی از باکتریهای مورد استفاده نظیر لیستریا مونوسیتوژنز که نیاز به محیطهای کاملا افترافی جهت رشد دارند(نظیر پالکام آگار(Palcam agar) ، لیستریا سلکتیو آگار(Listeria Selective agar) UVM1 و UVM2) نیز تقویت میگردد.

در مطالعات انجام شده توسط Safari و همکاران در سال ۲۰۱۰ از کیلکا ماهیان (ماهی بصورت کامل) در جهت کشت باکتریهای مختلف (باکتریهای گروه لاکتیک و باکتریهای عمومی و پرنیاز) استفاده شده و نتایج نشان داد که استفاده از پروتئین هیدرولیز شده کیلکا ماهیان باعث تقویت رشد تمامی باکتریهای مورد استفاده شده و روند رشد در برخی از تیمارها، بیشتر از محیط های تجاری مورد استفاده بوده است. در برخی از تیمارهای مورد استفاده در این مطالعه، غلظت پپتون مورد استفاده نصف پپتون تجاری بوده ولی با این وجود نتایج رشد باکتریها قابل مقایسه با محیطهای کشت تجاری بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط اویسی پور و همکاران در سال ۲۰۱۰ از زائدات تون ماهیان در جهت رشد برخی از مخمرها استفاده شده است. مخمرهای مورد استفاده شامل ساکارومیسس سرویزیه(*Saccharomyces cerevisiae*)، رودوتورولا گلوتیلیس (*Rhodotorula glutis*)، کلاورومایسس ماریکسانوس (*Klyveromyces marixianus*)،

ساکارومایسس کارلزبرجنسیس (*Saccharomyces carlsbergensis*)، زیگو ساکارومیس روکسیی (*Zygosaccharomyces roxii*) و کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) بودند. نتایج نشان داد که هرچند در فرمولاسیون محیط کشت تجاری پوتیتو دکستروز آگار (Potato Dextrose agar)از منبع پروتئین استفاده نشده و از عصاره سیب زمینی جهت رشد کپک یا مخمر استفاده میشود ولی رشد مخمرهای مورد استفاده در تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده تون ماهیان، افزایش یافته و قابل مقایسه با محیط کشت تجاری (پوتیتو دکستروز آگار) بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Safari و همکاران در سال ۲۰۱۱ از مدل (RSM(Response Surface Methodology به منظور اپتیمم نمودن رشد ویبریو آنگوئیلاروم از محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی فیتوفاگ استفاده گردید. نوع آنزیم مورد استفاده در این مطالعه آنزیم آلکالاز بوده است. نتایج نشان داد که با افزایش درصد پروتئین در محیط کشت مورد استفاده، باکتری سریعتر وارد فاز رشد لگاریتمی شده و رشد آن تقویت میگردد.

در تحقیق انجام شده توسط Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۰۹ از آنزیم آلکالاز به منظور هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء نوعی ماهی خاویاری استفاده گردید. نتایج نشان داد که ترکیب اسیدآمینه ضروری FPH بیشتر از پروتئین های مرجع (Food FAO/WHO Agriculture Organization/ World Health Organization) که برای یک انسان بزرگسال توصیه شده است بوده و در این میان فنیل آلانین ، اولین آمینو اسید محدود کننده آن بوده و پتانسیل لازم را برای کاربرد به عنوان یک جزء از ماده غذایی را دارا می باشد.

در بررسی انجام شده توسط Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثر چهار آنزیم تجاری (آلکالاز ، پروتامکس، نئو تراز و تریپسین) بر هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی کپور نقره ای مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان دادکه با افزایش زمان هیدرولیزاسیون بعد از ۱۲۰دقیقه ، شدت هیدرولیز افزایش پیدا می کند، ولی بعد از زمان ۱۲۰ دقیقه، روند هیدرولیز ثابت میگردد. کاهش شدت هیدرولیز با افزایش زمان احتمالا به دلیل محدود شدن فعالیت آنزیمی به دنبال شکل گیری فراورده های خاص بوده است. بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۱۰ روند هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی تون زردباله با استفاده از آنزیمهای آلکالاز(Alcalase)، پروتامکس (Protamex)و فلاورزایم(Flavourzyme) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به صورت معنی داری از لحاظ میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز بالاتر از سایر پروتئینهای هیدرولیز شده می باشد. ترکیب اسیدهای آمینه در نمونه های هیدرولیز شده نیز نشان داد که پروتئینها هیدرولیز شده با آنزیمهای مختلف دارای ترکیب نسبتا مشابهی هستند. همچنین نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئینها نیز حاکی از تشابه آنها و بالا بودن ارزش غذایی بود. شاخص شیمیایی نشان داد که هر سه پروتئین هیدرولیز شده، به خوبی می توانند نیاز یک انسان بالغ به

اسیدهای آمینه را مرتفع سازند، در حالی که در مقایسه با نیازهای ماهی کپور، از لحاظ اسیدهای آمینه متیونین، لایزین و فنیل آلانین، دارای محدودیت هستند. با توجه به نتایج ،آنزیم آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر، ارجحیت داشته است. همچنین با توجه به ارزش غذایی بالای پروتئین هیدرولیز شده، می توان کاربرد آن را در جیره غذایی توصیه نمود.

۲-۱-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

Ellouz و همکاران در سال ۲۰۰۱ ، تولید پروتئاز توسط باسیلوس سوبتی لیس رشد یافته بر روی امعاء و احشاء و سر ماهی تون را مورد ارزیابی قرار دادند. پروتئازها یکی از مهمترین آنزیمهای صنعتی بوده که بطور گسترده در فرآوری چرم، صنعت مواد شوینده و صنایع غذایی مورد استفاده قرار میگیرند. نتایج نشان داد که مخلوط تهیه شده از سر و امعاء و احشاء ماهی تون واجد پارامترهای تقویت کننده تولید پروتئاز می باشند. بیشترین فعالیت پروتئازی بهنگام استفاده از ۱۰ گرم در لیتر از پپتون تولید شده در محیط کشت بوده است. نتیجه گیری کلی آنکه با تبدیل ضایعات مذکور به پپتونهای محلول در آب و استفاده از آنها در فرمولاسیون محیطهای کشت به منظور تولید متابولیتهای اختصاصی نظیر آنزیمهای پروتئاز، میتوان آنزیمهای اختصاصی با قیمت تمام شده پائین تولید نمود.

Aspmo و همکارانش در سال ۲۰۰۵ از پروتئین هیدرولیز شده امعاء احشاء ماهی کاد آتلانتیک به منظور رشد انواع میکروبها استفاده نمودند. سه نوع پروتئین هیدرولیز شده از امعاء احشاء ماهی کاد بعنوان منبع نیتروژن برای رشد انواع باکتری ها مورد استفاده قرارگرفتند. پنج میکروب مورد استفاده شامل اشرشیا کلی، باسیلوس سوبتی لیس، لاکتوباسیلوس کازئیی، ساکارومایسس سرویزیه و آسپرژیلوس نیجر (*Aspergillus niger*)بوده اند. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی باعث تقویت رشد باکتری پرنیاز لاکتوباسیلوس کازئیی شده و میکروبهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند دو فاکتور مورد بررسی جهت ارزیابی رشد میکروبها تولید بیوماس و ماکزیمم رشد میکروبها بوده است. آنها در مطالعه خود از سه نوع پروتئین هیدرولیز شده جهت ارزیابی رشد میکروبها استفاده کردند. محصول اول حاصل از هیدرولیز توسط آنزیم های داخلی بوده در حالیکه دو محصول دیگر ناشی از هیدرولیز توسط آنزیمهای خارجی (پاپایین و آلکالاز) بوده اند. یکی از دلایل افزایش رشد لاکتو باسیلوس کازئی در محیط حاوی پپتون ماهی غلظت بالای اسیدهای آمینه های ضروری والین،لوسین و ایزولوسین بوده که ازاسیدهای آمینه های مورد نیاز و ضروری این باکتری می باشند. کارآیی پپتون ماهی مورد استفاده برای باکتری های گروه لاکتیک به پارامترهای مختلفی نظیر طول پپتید، سکانس پپتید و مقداراسیدهای آمینه آزاد بستگی دارد.

Aspmo و همکاران در سال ۲۰۰۵ تاثیر پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی کاد آتلانتیک را بعنوان منبع نیتروژن بر روند رشد باکتریهای گروه لاکتیک مورد بررسی قرار دادند. آنها در مطالعه خود از آنزیمهای داخلی

به منظور هیدرولیز امعاء و احشاء ماهی کاد استفاده کردند (PH=۷). در برخی از تیمارها نیز از آنزیمهای آلکالاز و پاپایین (Papain) بطور مجزا استفاده نمودند. میزان مورد استفاده پپتون تهیه شده از ماهی ۵گرم در لیتر (بجای ۲۲گرم در لیتر در محیط کشت MRS) بود. در کنار پپتون ماهی، از پپتون های تجاری دیگری نظیر باکتوتریپتون، پپتون سویا، عصاره مخمر، پپتون ماهی آزاد، و پپتون باکتریولوژیL37 نیز استفاده گردید. در محیط MRS بجای Triton از توین ۲۰ به میزان یک میلی لیتر در لیتر استفاده گردید. سویه های مورد بررسی لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(*L. acidophilus*)، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس(*L. helveticus*)، لاکتوباسیلوس کازئیی، پدیوکوکوس پنتاسئوس (*Pediococcus pentosaceus*)و لاکتوباسیلوس ساکی (*L. sakai*)بودند. نتایج نشان داد که آنزیم آلکالاز به مراتب بهتر از دو آنزیم دیگر عمل کرده است.

(خصوصا برای کازئیی، ساکی و هلوتیکوس). علت تاثیر بیشتر آلکالاز احتمالا بخاطر تولید پپتیدهایی با زنجیره کوتاهتر، جذب بهتر اسیدهای آمینه قابل دسترس، عدم تولید پپتیدهای مهار کننده رشد باکتریها توسط آنزیم آلکالاز می باشد.

در تحقیقات انجام شده توسط Horn و همکارانش در سال۲۰۰۷ از امعاء احشاء ماهی کاد استفاده شده است. آنها در مطالعه خود تاثیر تغییرات فصلی را بر روند تولید پروتئین هیدرولیز شده نیز مورد ارزیابی قرار دادند. تاثیر تغییرات فصلی با استفاده از آنالیز شیمیایی پروتئین تولید شده و تاثیر آن بر روند رشد باکتریایی انجام شد. دو باکتری مورد استفاده جهت کشت میکروبی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس ساکی بودند. نتایج نشان داد که بهترین رشد باکتریها درنمونه های تخم، معده و گناد ماهی نر مشاهده گردید. روند رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم بهتر از لاکتوباسیلوس ساکی بوده است. نتایج جذب نوری بعد از ۴۴ ساعت قرائت گردید. روند رشد لاکتو باسیلوس ساکی در محیط شاهدMRS بهتر از نمونه های هیدرولیز شده بوده است در صورتیکه این روند در خصوص لاکتوباسیلوس پلانتاروم صادق نبوده است. تغییرات فصلی تاثیر چندانی در رشد باکتریهای مورد استفاده نداشته اند.

لاکتو باسیلوس پلانتاروم احتیاج به برخی از اسیدهای امینه نظیرآرژینین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین و پانتونتیک اسید دارد. لاکتو باسیلوس ساکی نیاز به پارامترهای اضافی نظیر لیزین، میتونین، ریبوفلاوین و نیکوتینیک اسید دارد. از آنجایکه برخی از پارامترهای ذکر شده، در پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد وجود ندارند رشد لاکتوباسیلوس ساکی به مراتب کمتر از لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده است. بعنوان مثال از آنجائیکه نمونه گناد ماهی نر دارای اسید آمینه لیزین کمتری نسبت به سایر نمونه های هیدرولیز شده می باشد بالطبع رشد ساکی در آن نیز کمتر می باشد. در صورتیکه نمونه هیدرولیز شده تخم دارای درصد بیشتری از پانتوتنیک اسید و ریبوفلاوین بوده و رشد ساکی را تقویت می کند.

در مطالعه انجام شده توسط Vazquez و همکاران در سال ۲۰۰۸، رشد و تولید متابولیتهای مختلف از باکتریهای گروه لاکتیک در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی swordfish و کوسه مورد ارزیابی قرار

گرفت. نتایج نشان داد که از ضایعات ماهیان مختلف میتوان بعنوان پپتون پایه در جهت کشت باکتریهای لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئیی، لاکتوکوکوس لاکتیس، لوکونوستوک مزانتروئیدس (*Loconostoc mesenteroides*)، لاکتوباسیلوس باچنری (*L buchneri*)، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی(*P. acidilactici*) استفاده نمود. نتیجه گیری کلی که از تحقیقات Vazquez حاصل شد آنست که اگر پپتون تهیه شده از منابع مختلف شیلاتی با کمی عصاره مخمر غنی گردد، می تواند بعنوان ماده بسیار مغذی در جهت کشت انواع باکتریهای پرنیاز از جمله باکتریهای گروه لاکتیک عمل نماید. با تولید و کشت باکتریهای گروه لاکتیک میتوان از آنها بعنوان استارتر در تولید فرآورده های بیولوژیک نظیر سیلاژ، سس و همچنین متابولیتهای میکروبی استفاده نمود.

در مطالعه انجام شده دیگری توسط Vazquez و همکاران در سال ۲۰۰۸ ، کشت و تولید متابولیتهای باکتریهای گروه لاکتیک در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات مواد غذایی، بعنوان منبع پپتون، مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتریهای گروه لاکتیک کاربرد گسترده ای در تولید فرآوردهای تخمیری داشته و از آنها بعنوان نگهدارنده های بیولوژیک در انواع مواد غذایی استفاده میگردد. متابولیتهای تولید شده از باکتریهای لاکتیک مثل لاکتیک اسید، استیک اسید، اتانل، دی استیل ۲ و ۳ بوتان دیول و باکتریوسینها دارای خواص ضد میکروبی بوده و از اینرو خالص سازی متابولیتهای مذکور از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. در مطالعه مذکور از پروتئین هیدرولیز شده اختاپوس در جهت کشت و تولید باکتریوسین نایسین و همچنین کشت باکترهای گروه لاکتیک لاکتوکوکوس لاکتیس و پدیوکوکوس acidilactici استفاده شده است. نتایج نشان داد که بیشترین بیوماس لاکتوکوکوس لاکتیس و متابولیت آن(نایسین) در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده بوده است(بهنگام استفاده از آنزیم پاپایین درطی۲۴ ساعت). در مورد باکتریوسین پدیوسین، بیشترین تولید در محیط کشت حاوی پپتونهای هیدرولیز شده توسط آنزیم پپسین(درطی۴ ساعت) بوده است.

۲-۲ - درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین

در مطالعه انجام شده توسط Shahidi در سال ۱۹۹۵ اثر آنزیم آلکالاز در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه بر درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی پروتئین های ماهی کاپلین (*Mallotus villosus*) در دمای ثابت ۵۵ درجه سانتی گراد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از افزایش دو فاکتور درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی، متناسب با افزایش زمان بود.

در یک بررسی انجام گرفته توسط Shahidi و همکاران در سال ۱۹۹۵، پروتئین های ماهی کاپلین (Mallotus villosus) تحت تاثیر دو آنزیم آلکالاز و نیوتراز هیدرولیز شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، آنزیم نیوتراز فعالیت کمتری نسبت به آنزیم آلکالاز برخوردار بوده و برای زمانی که درجه هیدرولیز پایین باشد ترجیح داده می شود. بازیافت پروتئین بدست آمده برای آنزیم آلکالاز بیشتر از نئوتراز بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Shahidi در سال ۱۹۹۵ اثر دماهای ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۶۵ درجه سانتی گراد بر درجه هیدرولیز پروتئین های ماهی کاپلین (Mallotus villosus) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین میزان درجه هیدرولیز در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد مشاهده گردید.

در تحقیق انجام شده توسط Diniz & Martin در سال ۱۹۹۷ که بر روی پروتئین های هیدرولیز شده کوسه ماهی انجام گرفت ، تأثیر شدت هیدرولیز بر خواص عملکردی این پروتئین ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز های مختلف بر خواص عملکردی پروتئین ها موثر بوده اما تفاوت بین درجه هیدرولیزهای نزدیک به هم زیاد نیست.

در مطالعه انجام شده توسط Kristinsson & Rasco در سال ۲۰۰۰ اثر آنزیم Alcalase بر درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی پروتئین های عضله ماهی آزاد دریای آتلانتیک(*Salmo salar*) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۱۸۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان دهنده افزایش میزان درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی بود.

در پژوهش انجام شده توسط Gilberd و همکاران در سال ۲۰۰۲ در خصوص هیدرولیز اسکلت ماهی کاد توسط ۵ نوع آنزیم آلکالاز باکتریایی، نیوتراز، پروتامکس، تریپسین خوک و تریپسین کاد مشخص گردید که پروتئازهای باکتریایی راندمان بیشتری در محلول سازی پروتئین ها داشته و اندازه مولکولی پپتیدهای به دست آمده کوچک تر می باشند. پروتئینهای بدست آمده به دلیل کاهش وزن مولکولی معمولاً ضریب هضم و جذب بالاتری نسبت به پروتئین اولیه دارند.

Geurard و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثر آنزیم Umamizyme را بر درجه هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی تن زرد باله (*Thunnus albacares*) مورد ارزیابی و مطالعه قرار دادند (در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۲۵۰ دقیقه). نتایج نشان داد که بیشترین درجه هیدرولیز در مدت زمان ۲۵۰ دقیقه (معادل ۲۴ درصد) مشاهده گردید.

در تحقیق انجام گرفته توسط Aspmo و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر پروتئازهای آلکالاز و نیوتراز و آنزیم های پروتئولتیک بر هیدرولیز ماهی آتلانتیک کاد (*Gadus morhual*) مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه آنزیم های تجاری و آنزیم پروتئولتیک گیاهی نشان داد که آنزیم های تجاری بازده هیدرولیز را افزایش می دهند.

در بررسی انجام شده توسط Slizyte در سال ۲۰۰۵ در خصوص ویژگیهای کاربردی پروتئین های هیدرولیز شده استخوان ستون مهره ماهی کاد مشخص گردید که با افزایش زمان هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده بیشتری تولید شده و درجه هیدرولیز نیز افزایش می یابد.

در مطالعه انجام شده توسط Nilsang و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر آنزیم های تجاری Kojizyme و Flavourzyme بر درجه هیدرولیز پروتئین های تغلیظ شده ماهی در زمان های مختلف و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد مورد ارزیابی

قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین درصد درجه هیدرولیز در زمان ۶ ساعت با درجه هیدرولیز معادل ۶۵ و ۶۰٪ برای آنزیم های فوق بود.

Souissi و همکاران در سال ۲۰۰۷ اثر آنزیم Alcalase را بر درجه هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی ساردین

(*Sardinalla aurita*) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین درجه هیدرولیز در زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده گردید.

در پژوهش انجام گرفته توسط Bhaskar و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر سه دمای ۳۵، ۴۵، ۵۵ درجه سانتی گراد را بر درجه هیدرولیزاسیون امعاء و احشاء ماهی کپور هندی کاتلا (*Catle catla*) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، اپتیمم شرایط برای هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و

زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۲۵٪ بود. میزان بازیافت پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده بیشتر از ماده خام بوده است.

۳- مواد و روشها

۱-۳- مواد وتجهیزات مورد استفاده

جدول ۳-۱ - لیست مواد شیمیایی مورد استفاده

نام ماده شیمیایی	شرکت سازنده
منو سدیم فسفات	شرکت مرک آلمان
دی سدیم فسفات	شرکت مرک آلمان
یدید پتاسیم	شرکت مرک آلمان
تارتارات سدیم- پتاسیم	شرکت مرک آلمان
سولفات مس پنج آبه	شرکت مرک آلمان
استاندارد پروتئین BSA[1]	زیست شیمی
تری کلرو استیک اسید	پانرک ایتالیا
آنزیم آلکالاز	نوو آنزیم دانمارک
آنزیم پروتامکس	نوو آنزیم دانمارک
آنزیم پپسین	مرک آلمان
آنزیم تریپسین	مرک آلمان
هیدروکسید سدیم	شرکت مرک آلمان
اسید کلریدریک	شرکت مرک آلمان
تریپتیک سوی براث	شرکت مرک آلمان
تریپتیک سوی آگار	شرکت مرک آلمان
MRS آگار	شرکت مرک آلمان

[1]BSA= Bovin serom Albumin

جدول۳-۲- لیست تجهیزات مورد استفاده

لوازم و دستگاهها	مدل	شرکت سازنده	کشور سازنده
ترازوی آزمایشگاهی	GF-300	A & D	ژاپن
بن ماری	W614-B	فاطرریز پرداز	ایران
بن ماری شیکردار	BSL22	اختریان	ایران
pH متر	827	Metrohm	سوئیس
اسپکتوفتومتر	6305	Jenway	انگلستان
سانتریفوژ یخچال دار	GmbH Z206A	Hermle labortechnic	آلمان
خشک کن انجمادی (فریز درایر)	Epu-7012	Operon	کره جنوبی
بن ماری شیکردار	Ivymen system	Comecta	اسپانیا
ورتکس	Labinco	L46	ایران
هات پلیت	HS6000	فاطرریز پرداز	ایران
چرخ گوشت	-	jaltajhiz	ایران
فریزر (۸۰-)	UPUL580	Dairei	اتریش
آون	DNV	بهداد	ایران
کوره	Sanee V.S.Co	آلمان	ایران

۲-۳- مواد خام اولیه

سوبسترای مورد استفاده جهت هیدرولیز آنزیمی، امعاء و احشاء ماهیان گرمابی بوده اند. چهار گونه از کپورماهیان شامل کپور معمولی، فیتوفاگ، آمور و بیگ هد مورد ارزیابی قرار گرفتند. ضایعات مذکور از بازار ماهی فروشان شهرستان ساری تهیه شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شدند. به منظور جلوگیری از فرایند اتولیز آنزیمی و میکروبی، نمونه های اخذ شده در ظرف پلاستیکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، تا شروع آزمایش، نگهداری شدند. برای انجام آزمایشات، انجماد زدایی نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام گرفت.هیچ کدام از نمونه ها بصورت تازه کار نشدند زیرا نمونه برداری و انتقال نمونه ها بصورتی بود که عملا در یک روز امکان انجام فرآیند هیدرولیز نبود. به همین دلیل نمونه ها در فریز ۲۰- درجه قرار داده می شدند تا با کمترین تغییرات مورد بررسی قرار گیرند.

۳-۳ - آنزیم ها

آنزیمهای میکروبی مورد استفاده شامل Alcalase 2.4 L استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* با فعالیت آنزیمی 2.4 AU/Kg و چگالی 1.18 g/ml و Protamex استخراج شده از باسیلوس بوده که از شرکت Novozymes تهیه شده و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند(Wasswa et al., 2007).

آنزیمهای حیوانی شامل پپسین و تریپسین بوده که از شرکت مرک خریداری شده و تا زمان شروع آزمایش در دمای کمتر از ۲۵ درجه نگهداری شدند. واحد فعالیت آنزیم آلکالاز آنسون یونیت بر کیلوگرم بوده که در مبحث آنزیم گفته شده است.

۴-۳- روش کار

۱-۴-۳- آماده سازی نمونه به منظور هیدرولیز آنزیمی

به منظور آماده سازی نمونه، ابتدا، نمونه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، انجماد زدایی و با استفاده از دستگاه خرد کن کاملا مخلوط شده و پس از اضافه نمودن آب مقطر به نسبت ۲ به ۱ (آب به سوبسترا) ، به منظور غیر فعال شدن آنزیم های داخلی، برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد (Wasswa et al., 2007). بعد از خنک شدن، چهار آنزیم آلکالاز، پروتامکس، پپسین و تریپسین طبق شرایط ذیل مورد استفاده قرار گرفتند.

۱- آنزیم آلکالاز: دما (۵۰ و ۵۵ درجه)، pH (۸ و ۸/۵)، زمان هیدرولیز(۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه).

۲-آنزیم پروتامکس: دما (۵۰ و ۵۵ درجه)، pH (۷/۵ و ۷)، زمان هیدرولیز(۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه).

۳-آنزیم پپسین: دما (۳۰ و ۳۷ درجه)، pH (۲ و ۳/۵)، زمان هیدرولیز(۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه).

۴-آنزیم تریپسین: دما (۳۰ و ۳۷ درجه)، pH (۷ و ۷/۵)، زمان هیدرولیز(۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه).

پس از بهینه نمودن شرایط در تیمارهای مختلف، فرآیند هیدرولیز انجام شده و جهت غیر فعال نمودن فعالیت آنزیمهای مورد استفاده در فواصل زمانی تعریف شده، نمونه ها مجددا در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و بعد از آن نمونه گیری در فواصل زمانی مشخص و همچنین در پایان آزمایش انجام شد. بعد از نمونه گیری، به منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین های محلول، عمل سانتریفوژ در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار، در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور g × ۸۰۰۰ برای مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. پس از پایان آزمایش، مایع رویی جدا شده و درصد پروتئین و درجه هیدرولیز آن اندازه گیری شد. نمونه های تهیه شده فریز درای شده و از نظر درصد پروتئین کل نیز آزمایش شدند (Kristinsson and Rasco, 2000; Nilsang et al., 2005; Bhaskar et al., 2007; Souissi et al., 2007; Wasswa et al., 2007).

۲-۴-۳- ارزیابی رشد باکتری

باکتریهای مورد استفاده در این تحقیق شامل باکتریهای گروه لاکتیک(لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس کازئیی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس) ، باسیلوسها(لیکنوفورمیس و سوبتی لیس)، سودوموناس(آئروجینوزا و پوتیدا) ، لیستریا مونوسیتوژنز و استرپتوکوکوس فسیوم بوده که همه بجز استرپتوکوکوس فسیوم از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. سوش اخیر از ماهی بیمار جدا

شده و در نهایت با روش PCR تائید گردید. به منظور مقایسه رشد باکتریهای لاکتیک از محیط MRS براث ، جهت ارزیابی رشد سایر باکتریها نیز از محیط کشت TSB (Tryptic Soy broth) استفاده گردید. جهت ارزیابی رشد باکتریهای مورد استفاده، ابتدا پپتون تهیه شده از ضایعات چهار گونه مورد استفاده، جایگزین مقدار پپتون در محیطهای تجاری شده و در نهایت محیط کشت مصنوعی بر پایه پپتون ماهی تهیه گردید. پس از تهیه محیطهای کشت، عمل استریل با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و بمدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. مقدار پپتون در محیط TSB و MRS به ترتیب ۲۰ و ۱۸ گرم بوده که با ۱۵ گرم از پروتئین هیدرولیز شده نمونه ها جایگزین گردید. پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده در تلقیح باکتریها، همان محصول نهایی فرآیند هیدرولیز (زمان ۹۰ دقیقه) بوده که پیش بینی گردید که بیشترین مقدار پروتئین را دارا بوده و سوبسترای مناسبی جهت کشت باکتریها خواهد بود.

جهت تهیه کشت تازه از سوشهای میکروبی ، ابتدا کشت اولیه از نمونه فریز درایر شده(Freez Dryer) آنها به ترتیب در محیط MRS (برای باکتریهای گروه لاکتیک) و TSB (سایر باکتریها) انجام شده و پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه بمدت ۱۸ ساعت و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی (برای باکتریهای لاکتیک از جار بی هوازی و گاز پک نوع C استفاده شد)، شستشو متوالی با سرم فیزیولوژی انجام شده(۳ مرتبه) و متعاقب آن سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ بمدت ۲۰ دقیقه صورت پذیرفت. پس از دستیابی به رسوب باکتری، مقداری سرم فیزیولوژی به آن اضافه شده و جذب نوری باکتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شده و ۳ درصد از سوسپانسیون به محیط های تهیه شده از پروتئین هیدرولیز شده نمونه ها و محیطهای کشت MRS و TSB، تلقیح شده و جذب نوری باکتری در زمانهای صفر ، ۶ ، ۱۲ و ۱۸ قرائت شده و مورد مقایسه قرار گرفتند (Safari et al., 2009; Safari et al., 2010; Safari et al ., 2011).

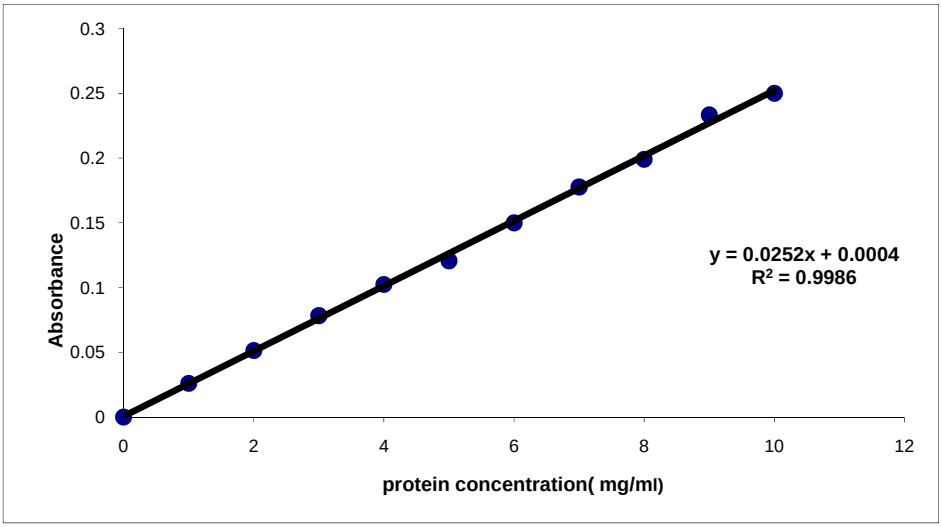
۳-۴-۳ - اندازه گیری شیمیایی

میزان کل پروتئین در مواد خام(N×6/25) به روش کجلدال، مقدار چربی با روش سوکسله، مقدار رطوبت با خشک کردن رسوب در آون ۱۰۵ درجه و مقدار خاکستر با خشک کردن رسوب در کوره ۵۵۰ درجه انجام شد. (AOAC, 2005)

۴-۴-۳- تعیین غلظت پروتئین محلول

برای تعیین غلظت پروتئین محلول و میزان پروتئین خارج شده بصورت درصد هیدرولیز محلول به روش بیورت (Biuret method) layne,(1957) اقدام شد. به ۰/۵ میلی لیتر مایع رویی در لوله آزمایش ۴/۵ میلی لیتر معرف بیورت اضافه و بالافاصله با دستگاه شیکر لوله مخلوط شدند، مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ۵۴۰–nm، قرائت و

غلظت پروتئین مستقیما از منحنی استاندارد (شکل۳-۱) محاسبه شد، منحنی استاندارد با رقیق سازی محصول استوک آلبومین سرم گاوی با غلظت mg/ml ۶۰، ترسیم شد.



۳- ۱- منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی جهت تعیین میزان پروتئین به روش بیورت

۳-۴-۵- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز بر اساس مطالعات Fonkwe و Singh در سال ۱۹۹۶ و یا kristinsson و Rasco در سال ۲۰۰۰ و به روش تری کلرواستیک اسید(TCA) محاسبه گردید. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئینهای محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ (TCA) به کل پروتئینهای موجود در نمونه بوده است. برای این منظور ۷۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۷۵۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ با سمپلر برداشته شد و در میکروتیوپ ریخته و پس از بهم زدن به مدت ۵ دقیقه، با دور ۵۰۰۰rpm و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بیورت اندازه گیری و درجه هیدورلیز از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید (Ovissipour et al 2009) :

$$\%DH = \frac{(\text{پروتئین حل شده در } \%۱۰ \text{ TCA})}{\text{پروتئینهای کل درنمونه}} \times ۱۰۰$$

۳-۴-۶- تجزیه و تحلیل داده ها

تجزیه تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۸ انجام شد. به منظور مقایسه میانگین تیمارها و بررسی روند رشد باکتری در فواصل زمانی مختلف از روش آنالیز واریانس یک طرفه (Anova) و آزمون دانکن (Duncan) استفاده شده و ارزش P با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات مورد بررسی در این تحقیق رشد باکتری ، درجه هیدرولیز و درصد پروتئین بوده است. جهت ارتباط معنی دار ما بین تیمارهای مختلف (بین گروهی)از آنالیز واریانس و جهت ارتباط بین تیمارهای در هر گروه بطور مجزا (درون گروهی)از آزمون دانکن استفاده میشود.

۴- نتایج

۴-۱- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی بیگ هد (*Silver carp*) با pH و دمای اول

میزان پروتئین کل در ضایعات ماهی بیگ هد ۱۶/۴۵ درصد بوده است. نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵ و دمای ۵۵ درجه)، پروتامکس(pH=۷/۵ و دمای ۵۵ درجه)، تریپسین (pH=۷/۵ و دمای ۳۷ درجه)و پپسین (pH=۳/۵ و دمای ۳۷ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۱ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۳۹/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۶۷/۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۶/۹۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۴۶/۴۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۲۵/۰۷ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۶/۹۵ رسید. این میزان برای پپسین ۲۴/۰۲ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۴۱/۴۸ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۲۰/۹۷ درصد بوده که به ۴۱/۳۸ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۰/۱۹ درصد و ۲۹/۱۴ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۰/۰۷ و ۱۲/۸۹ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۱۸/۳۱ و ۲۳/۸۲ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است.

جدول ۴-۱: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمانهای مختلف

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۲۰.۹۷±۱.۵۴cA	۳۹.۶۳±۱.۴۵cA	۱۰.۱۹±۱.۳۵cB	۲۶.۹۹±۱.۳۱cB	۱۰.۰۷±۰.۲۶bB	۲۵.۰۷±۱.۷۳cC	۱۲.۸۹±۰.۶۸cB	۲۴.۰۲±۰.۵۸cC
۶۰	۳۲.۳۸±۱.۴۵bA	۴۵.۷۲±۱.۶۷bA	۱۹.۳۵±۱.۲۳bB	۳۵.۲۶±۰.۷۳bB	۱۳.۴۱±۱.۰۳bD	۳۰.۴۵±۱.۴۲bC	۱۸.۹۶±۱.۵bC	۳۳.۹۱±۱.۲۴bC
۹۰	۴۱.۳۸±۱.۲۳aA	۶۷.۳۸±۱.۵۸aA	۲۹.۱۴±۱.۷۸aB	۴۶.۴۱±۱.۵۸aB	۱۸.۳۱±۱.۳۱aD	۳۶.۹۵±۱.۷۶aD	۲۳.۸۲±۱.۶۹aC	۴۱.۴۸±۱.۷۹aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۲-۴- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات کپور معمولی با pH و دمای اول

میزان پروتئین کل در ضایعات کپور معمولی ۱۴/۵ درصد بوده است. نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات کپور معمولی که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵ و دمای ۵۵ درجه)، پروتامکس(pH=۷/۵ و دمای ۵۵ درجه)، تریپسین (pH=۷/۵ و دمای ۳۷ درجه)و پپسین (pH=۳/۵ و دمای ۳۷ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۲ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۳۷/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۶۷/۹۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۸/۴۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۵۶/۶۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۱۶/۶۶ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۰/۶۳ رسید. این میزان برای پپسین ۱۸/۴۴ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۴/۷۷ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۱۹/۲۶ درصد بوده که به ۳۷/۶۴ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۵/۲۳ درصد و ۳۵/۶۸ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۱/۱۵ و ۱۳/۲۳ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۰/۲۴ و ۳۳/۲۵ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است. بطور کلی روند تجزیه پروتئینها توسط آنزیمهای پپسین و تریپسین در ماهی کپور ضعیف تر از ماهی بیگ هد بوده ولی آنزیم پروتامکس قادر به هیدرولیز بهتر ماهی کپور در مقایسه با ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات آنزیم آلکالاز ، در زمانهای ابتدائی، در ماهی کپور اندکی بهتر از ماهی بیگ هد بوده است.

جدول ۴-۲: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی کپور توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمانهای مختلف

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۹.۲۶±۱.۶۵cA	۳۷.۲۵±۱.۴۵cA	±۱.۴۵cB ۱۵.۲۳	۲۸.۴۲±۱.۸۴cB	۱۱.۱۵±۱.۵۶bB	۱۶.۶۶±۱.۲۵cCB	۱۳.۲۳±۱.۸۹cB	۱۸.۴۴±۱.۳۲cCB
۶۰	۲۵.۷۱±۱.۲۱bA	۴۴.۹۱±۱.۳۵bA	±۱.۶۵bB ۲۱.۳۲	۳۷.۵۳±۱.۴۵bB	۱۷.۶۷±۱.۴۵bB	۲۲.۴۱±۱.۱۲bD	۱۹.۴۳±۱.۵۴bB	۲۵.۶۸±۱.۵۱bC
۹۰	۳۷.۶۴±۱.۲۹aA	۶۷.۹۲±۱.۲۴aA	±۱.۴۱aA ۳۵.۶۸	۵۶.۶۸±۱.۵۸aB	۳۰.۲۴±۱.۴۵aB	۳۰.۶۳±۱.۵۱aD	۳۳.۲۵±۱.۷۱aB	۳۴.۷۷±۱.۴۵aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۳-۴- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور نقره ای یا فیتوفاگ با pH و دمای اول

میزان پروتئین کل در ضایعات ماهی فیتوفاگ ۱۷/۸۸ درصد بوده است. نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی فیتوفاگ که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵ و دمای ۵۵ درجه)، پروتامکس(pH=۷/۵ و دمای ۵۵ درجه)، تریپسین (pH=۷/۵ و دمای ۳۷ درجه)و پپسین (pH=۳/۵ و دمای ۳۷ درجه) انجام گرفته در جدول ۴-۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۴۱/۳۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۷۰/۴۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۸/۱۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۵۰/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۲۶/۱۷ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۷/۹۱ رسید. این میزان برای پپسین ۲۷/۰۴ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۴۵/۵۱ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۱۷/۳۱ درصد بوده که به ۴۰/۱۷ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۲/۳۶ درصد و ۳۱/۵۴ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۱/۳۶ و ۱۲/۱۱ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۲۱/۵۴ و ۲۷/۰۶ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در

تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است. میزان پروتئین و درجه هیدرولیز (جز در چند مورد استثنا) در ماهی فیتوفاگ در تیمارهای مختلف بهتر از دو گونه بیگ هد و کپور معمولی بوده و میزان پروتئین محلول در محصول نهایی نیز بیشتر از دو گونه دیگر بوده است.

جدول ۴-۳: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی فیتوفاگ توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمانهای مختلف

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۷.۳۱±۱.۴۵cA	۴۱.۳۶±۱.۳۵cA	۱۲.۳۶±۱.۵۲cB	۲۸.۱۱±۱.۲۷cB	۱۱.۳۶±۱.۵۳bB	۲۶.۱۷±۱.۳۴cBC	۱۲.۱۱±۱.۶۵cB	۲۷.۰۴±۱.۲۵cBC
۶۰	۳۴.۲۵±۱.۳۹bA	۴۹.۲۵±۱.۳۱bA	۲۰.۲۷±۱.۹۲bB	۳۹.۴۸±۱.۵۱bB	۱۵.۳۷±۱.۶۱bC	۳۳.۲۵±۱.۱۶bD	۱۷.۲۵±۱.۷۸bB	۳۶.۱۷±۱.۴۶bBC
۹۰	۴۰.۱۷±۱.۳۱aA	۷۰.۴۶±۱.۲۹aA	۳۱.۵۴±۱.۸۷aA	۵۰.۴۵±۱.۸۴aB	۲۱.۵۴±۱.۲۹aC	۳۷.۹۱±۱.۸۴aD	۲۷.۰۶±۱.۸۲aB	۴۵.۵۱±۱.۳۲aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۴-۴ - تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور علفخوار یا آمور با pH و دمای اول

میزان پروتئین کل در ضایعات ماهی آمور ۱۸/۴۵ درصد بوده است. نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی آمور که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵ و دمای ۵۵ درجه)، پروتامکس(pH=۷/۵ و دمای ۵۵ درجه)، تریپسین (pH=۷/۵ و دمای ۳۷ درجه)و پپسین (pH=۳/۵ و دمای ۳۷ درجه) انجام گرفته در جدول ۴-۴ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۴۳/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۷۷/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۳۵/۱۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۶۶/۹۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی مانند تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۳۱/۲۷ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۶۳/۲۶ رسید. این میزان برای پپسین ۳۸/۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۶۹/۴۵ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۲۲/۱۳ درصد بوده که به ۴۵/۳۰ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۸/۳۶ درصد و ۴۱/۲۴ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۲/۲۵ و ۲۰/۴۶ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۳/۱۵ و ۴۱/۱۷ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج

حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز نسبت به پروتامکس ، تریپسین و پپسین معنی دار بوده است ($p<0.05$) . میزان پروتئین و درجه هیدرولیز در ماهی آمور در تیمارهای مختلف بهتر از سه گونه دیگر بوده و هر چهار آنزیم دارای عملکرد خوبی بودند و میزان پروتئین محلول در محصولات تولید شده بیشتر از سه گونه دیگر بوده است.

جدول ۴-۴: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی آمور توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمانهای مختلف

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۲۲.۱۳±۱.۳۷cA	۴۳.۴۵±۱.۲۰cA	۱۸.۳۶±۱.۲۵cB	۳۵.۱۷±۱.۴۵cB	۱۲.۲۵±۱.۶۵bB	۳۱.۲۷±۱.۷۳cD	۲۰.۴۶±۱.۵۵cAB	۳۸.۲۰±۱.۲۱cC
۶۰	۳۵.۸۱±۱.۲۷bA	۶۹.۶۳±۱.۳۵bA	۳۲.۱۹±۱.۴۸bB	۴۹.۱۸±۱.۳۴bB	۲۱.۱۷±۱.۲۱bC	۴۵.۹۱±۱.۲۸bD	۳۴.۱۴±۱.۶۵bAB	۵۵.۲۹±۱.۷۶bC
۹۰	۴۵.۳۰±۱.۲۳aA	۷۷.۲۵±۱.۳۹aA	۴۱.۲۴±۱.۵۵aA	۶۶.۹۳±۱.۳۸aB	۳۳.۱۵±۱.۳۴aD	۶۳.۲۶±۱.۳۱aBD	۴۱.۱۷±۱.۴۳aC	۶۹.۴۵±۱.۹۲aBC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۴-۵- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی بیگ هد باpH و دمای دوم

نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸ و دمای ۵۰ درجه)، پروتامکس(pH=۷ و دمای ۵۰ درجه)، تریپسین (pH=۷ و دمای ۳۰ درجه)و پپسین (pH=۲ و دمای ۳۰ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۵ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز کماکان در حال افزایش می باشد. درصد درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در pH و دمای انتخاب شده در این مرحله کمتر از تیمارهای انتخاب شده در مرحله اول بوده ولی با این وجود اختلاف معنی داری مشاهده نشد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۳۷/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۶۴/۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۴/۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۴۳/۲۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۲۳/۱۱ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۳/۱۹ رسید. این میزان برای پپسین ۲۳/۱۵ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۷/۴۵ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۱۷/۳۳ درصد بوده که به ۳۷/۵۴ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۲/۱۱ درصد و ۲۵/۱۸ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۱/۱۹ و ۱۱/۵۴ درصد بوده که در زمان

۹۰ دقیقه به ۱۷/۷۸ و ۲۲/۶۴ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است(شبیه تیمارهای انتخاب شده در مرحله اول). نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است.

جدول ۴-۵: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمان ، pH و دمای مشخص

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۷.۳۳±۱.۲۱cA	۳۷.۲۵±۱.۲۵cA	۱۲.۱۱±۱.۳۲cB	۲۴.۳۲±۱.۳۵cB	۱۱.۱۹±۱.۲۰bB	۲۳.۱۱±۱.۳۲cB	۱۱.۵۴±۱.۶۷cB	۲۳.۱۵±۱.۲۳cB
۶۰	۲۷.۲۰±۱.۳۰bA	۴۲.۱۱±۱.۵۵bA	۱۶.۳۵±۱.۲۷bB	۳۴.۱۷±۰.۱۱bB	۱۵.۳۴±۱.۱۷bB	۲۷.۳۲±۱.۳۸bD	۱۷.۴۵±۱.۳۲bBC	۳۱.۲۸±۱.۲۹bBC
۹۰	۳۷.۵۴±۱.۳۸aA	۶۴.۲۴±۱.۶۸aA	۲۵.۱۸±۱.۵۴aB	۴۳.۲۹±۱.۴۶aB	۱۷.۷۸±۱.۴۵aD	۳۳.۱۹±۱.۱۱aD	۲۲.۶۴±۱.۵۷aC	۳۷.۴۵±۱.۳۷aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۴-۶- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات کپور معمولی با pH و دمای دوم

نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸ و دمای ۵۰ درجه)، پروتامکس(pH=۷ و دمای ۵۰ درجه)، تریپسین (pH=۷ و دمای ۳۰ درجه)و پپسین (pH=۲ و دمای ۳۰ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۶ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. نتایج همچنین نشان داد که pH و دمای انتخاب شده در این مرحله قادر به افزایش درصد پروتئین و درجه هیدرولیز نبوده و نسبت به تیمار مرحله در سطح پائین تری قرار دارند. pH و دمای اختصاصی برای هر آنزیم که در مرحله اول انتخاب شده بود به مراتب بهتر از مرحله دوم بوده است. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۳۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۶۴/۲۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۵/۱۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۵۰/۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۱۵/۱۱ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۲۸/۶۶ رسید. این میزان برای پپسین ۱۷/۴۳ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۷/۴۹ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۱۷/۵۴ درصد بوده که به ۳۵/۳۴ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۳/۳۸ درصد و ۳۳/۳۲ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۰/۴۳ و ۱۲/۲۲ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۲۷/۱۳ و ۳۰/۸۷ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است. بطور کلی روند تجزیه پروتئینها توسط آنزیمهای پروتئولیتیک در ماهی کپور شبیه تیمار مرحله اول بوده با این تفاوت که تغییرات کمتر از مرحله اول بوده است.

جدول ۴-۶: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی کپور توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در زمان ، pH و دمای مشخص

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۷.۵۴±۱.۶۵cA	۳۶.۲۵±۱.۴۵cA	۱۳.۳۸±۱.۴۵cB	۲۵.۱۷±۱.۸۴fcB	۱۰.۴۳±۱.۵۶bCD	۱۵.۱۱±۱.۲۵cC	۱۲.۲۲±۱.۸۹cCB	۱۷.۴۳±۱.۳۲cC
۶۰	۲۳.۶۵±۱.۲۱bA	۴۰.۵۶±۱.۳۵bA	۱۸.۴۵±۱.۶۵bB	۳۳.۵۶±۱.۴۵bB	۱۴.۸۷±۱.۴۵bC	۱۹.۵۶±۱.۱۲bD	۱۶.۴۳±۱.۵۴bC	۲۲.۳۸±۱.۵۱bC
۹۰	۳۵.۳۴±۱.۲۹aA	۶۲.۳۴±۱.۲۴aA	۳۳.۳۲±۱.۴۱aA	۵۰.۵۴±۱.۵۸aB	۲۷.۱۳±۱.۴۵aC	۲۸.۶۶±۱.۵۱aC	۳۰.۸۷±۱.۷۱aB	۳۱.۴۹±۱.۴۵aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۴-۷- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپورنقره ای یا فیتوفاگ در pH و دمای دوم

نتایج میانگین و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی بیگ هد که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸ و دمای ۵۰ درجه)، پروتامکس(pH=۷ و دمای ۵۰ درجه)، تریپسین (pH=۷ و دمای ۳۰ درجه)و پپسین (pH=۲ و دمای ۳۰ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۷ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۳۸/۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که به ۶۶/۳۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۲۵/۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۴۷/۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی برای تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۲۴/۳۸ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به

۳۴/۴۷ رسید. این میزان برای پپسین ۲۳/۳۴ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۴۲/۹۲ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۱۵/۵۵ درصد بوده که به ۳۶/۴۳ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۱/۱۲ درصد و ۲۸/۴۳ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۰/۳۳ و ۱۱/۱۷ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۱۹/۶۴ و ۲۴/۳۴ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نسبت به تریپسین و پپسین معنی دار بوده ($p<0.05$) ولی با این وجود تغییرات مذکور در تیمارهای حاوی آنزیمهای باکتریایی و حیوانی ، هر کدام بطور مجزا، معنی دار نبوده است.

جدول ۴-۷: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی فیتوفاگ توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در pH ، دمای و زمانهای مشخص

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۵.۵۵±۱.۲۲cA	۳۸.۲۱±۱.۴۰cA	۱۱.۱۲±۱.۳۹cB	۲۵.۲۰±۱.۴۳cB	۱۰.۳۲±۱.۵۵bB	۲۴.۳۸±۱.۵۲cB	۱۱.۱۷±۱.۴۳cB	۲۳.۳۴±۱.۲۹cB
۶۰	۳۱.۳۲±۱.۷۲bA	۴۵.۱۶±۱.۳۵bA	۱۸.۲۱±۱.۸۷bB	۳۶.۵۴±۱.۵۵bB	۱۴.۸۷±۱.۳۰bC	۳۰.۱۲±۱.۲۸bC	۱۴.۹۸±۱.۶۵bC	۳۳.۵۶±۱.۴۲bC
۹۰	۳۶.۴۳±۱.۴۱aA	۶۶.۳۵±۱.۵۶aA	۲۸.۴۳±۱.۶۵aB	۴۷.۵۰±۱.۷۷aB	۱۹.۶۴±۱.۲۵aC	۳۴.۴۷±۱.۷۶aD	۲۴.۳۴±۱.۳۷aB	۴۲.۹۶±۱.۳۶aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۸-۴- تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور علفخوار یا آمور در pH و دمای دوم

نتایج میانیگن و انحراف میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی کپور علفخوار که توسط چهار آنزیم آلکالاز (pH=۸ و دمای ۵۰ درجه)، پروتامکس(pH=۷ و دمای ۵۰ درجه)، تریپسین (pH=۷ و دمای ۳۰ درجه)و پپسین (pH=۲ و دمای ۳۰ درجه)انجام گرفته در جدول ۴-۸ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۹۰ دقیقه میزان پروتئین هیدورلیز شده و متعاقب آن درجه هیدرولیز افزایش می یابد. روند کاهشی پارامترهای مورد بررسی در ماهی آمور نیز مشابه سایر نمونه ها بوده و در تیمار دوم میزان پروتئین و درجه هیدرولیز کمتر از تیمارهای مرحله اول بوده ولی با این وجود، تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور نسبت به نمونه های دیگر بیشتر بوده است. میزان پروتئین در زمان ۳۰ دقیقه برای آنزیم آلکالاز ۴۳/۴۵ میلی گرم در میلی‌لیتر بود که به ۷۷/۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این در حالیست که

میزان پروتئین برای آنزیم پروتامکس ۳۵/۱۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده که به ۶۶/۹۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۹۰ دقیقه رسید. میزان پروتئین برای آنزیمهای حیوانی مانند تریپسین در زمان ۳۰ دقیقه ۳۱/۲۷ میلی گرم در لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۶۳/۲۶ رسید. این میزان برای پپسین ۳۸/۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۶۹/۴۵ رسیده بود.

درجه هیدرولیز برای آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه ۲۲/۱۳ درصد بوده که به ۴۵/۳۰ در زمان ۹۰ دقیقه رسید. این روند برای آنزیم پروتامکس در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب ۱۸/۳۶ درصد و ۴۱/۲۴ بوده است. درجه هیدرولیز برای دو آنزیم تریپسین و پپسین در زمان ۳۰ دقیقه به ترتیب ۱۲/۲۵ و ۲۰/۴۶ درصد بوده که در زمان ۹۰ دقیقه به ۳۳/۱۵ و ۴۱/۱۷ درصد رسیده بود. همانطوریکه نتایج نشان می دهد روند درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمار حاوی آلکالاز به مراتب بیشتر از تیمارهای حاوی پروتامکس، پپسین و تریپسین بوده و نتایج حاصله نیز معنی‌دار بوده است. نتایج افزایش میزان پروتئین و درجه هیدرولیز از زمان ۳۰ به ۹۰ برای هر چهار آنزیم معنی دار بوده است ($p<0.05$) . تغییرات درجه هیدرولیز و میزان پروتئین در تیمارهای حاوی آنزیمهای آلکالاز نسبت به پروتامکس ، تریپسین و پپسین معنی دار بوده است ($p<0.05$) . میزان پروتئین و درجه هیدرولیز در ماهی آمور در تیمارهای مختلف بهتر از سه گونه دیگر بهتر بوده و هر چهار آنزیم دارای عملکرد خوبی بوده و میزان پروتئین محلول در محصولات تولید شده بیشتر از سه گونه دیگر بوده است.

جدول ۴-۸: نتایج میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ضایعات ماهی آمور توسط ۴ آنزیم آلکالاز ، پروتامکس، تریپسین و پپسین در pH ، دما و زمان مشخص

آنزیم	آلکالاز		پروتامکس		تریپسین		پپسین	
زمان (دقیقه)	*درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)	درجه هیدرولیز (درصد)	پروتئین (mg/ml)
۳۰	۱۹.۵۴±۱.۲۱cA	۴۰.۲۳±۱.۳۵cA	۱۶.۲۵±۱.۵۶cB	۳۲.۶۴±۱.۵۵cB	۱۱.۲۱±۱.۶۵bB	۲۹.۳۲±۱.۹۵cBD	۱۷.۵۵±۱.۵۱cA	۳۵.۲۵±۱.۲۶cC
۶۰	۳۱.۶۳±۱.۲۸bA	۶۵.۱۱±۱.۲۸bA	۲۹.۷۷±۱.۸۵bA	۴۴.۶۱±۱.۷۱bB	۱۹.۵۴±۱.۲۶bC	۴۱.۷۶±۱.۲۸bD	۳۱.۵۳±۱.۷۲bAB	۵۱.۶۸±۱.۱۸bC
۹۰	۴۱.۲۸±۱.۲۲aA	۷۳.۶۷±۱.۷۶aA	۳۷.۳۳±۱.۹۲aB	۶۱.۴۸±۱.۷۲aB	۳۰.۱۵±۱.۲۹aD	۵۷.۵۴±۱.۷۳aD	۳۸.۵۲±۱.۴۳aC	۶۵.۲۱±۱.۷۳aC

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر تیمار در زمانهای مختلف می باشد. حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بطور جداگانه) نشان دهنده تفاوت معنی دار ما بین چهار آنزیم می باشد.

۹-۴- ارزیابی کیفی محصولات تولید شده

پس از پایان فرآیند، پروتئینهای هیدرولیز شده هر ماهی بطور مجزا فریز درای شده و پودر خشک شده تا انجام آزمایشات کیفی در یخچال نگهداری می شد. آنالیز نمونه ها فقط برای زمان ۹۰ دقیقه انجام شد زیرا در این زمان بیشترین میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بدست آمد.

۱-۹-۴- ماهی بیگ هد

جدول ۴-۹ تغییرات آنالیز کیفی را در نمونه خام و هیدرولیز شده ضایعات ماهی بیگ هد نشان میدهد. بیشترین درصد پروتئین مربوط به نمونه دارای آنزیم آلکالاز بوده و آنزیمهای پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. بنابراین با هیدرولیز پروتئین ، میزان بازیافت پروتئین نیز افزایش می یابد. هیدرولیز آنزیمی باعث کاهش چربی شده و میزان آن از ۴/۴۶ به ۱/۶۷ تا۳/۱۱ درصد در نمونه های هیدرولیز شده کاهش می دهد. کمترین مقدار چربی نیز مربوط به نمونه آلکالاز بوده است. با خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده، درصد رطوبت کاهش یافته و از ۷۵/۳۲ به ۷/۴۵ درصد (تیمار آلکالاز) کاهش می یابد. میزان خاکستر با فرآیند هیدرولیز افزایش نسبی یافته و از ۲/۴۳ به ۱۳/۶۵ (تیمار تریپسین) افزایش می یابد.

جدول ۴-۹ : آنالیز کیفی ضایعات خام و هیدرولیز شده ماهی بیگ هد در زمان ۹۰ دقیقه

پارامتر / نمونه	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
خام	۱۶.۴۵±۲.۳۴d	۴.۴۶±۱.۵۶a	۷۵.۳۲±۳.۶۵a	۲.۴۳±۱.۷۸c
آلکالاز	۷۸.۳۱±۴.۵۱a	۱.۶۷±۰.۶d	۷.۴۵±۱.۹۸b	۹.۵۴±۲.۴۳c
پروتامکس	۷۰.۵۴±۳.۳۴b	۲.۵۴±۰.۶۵c	۸.۹۸±۱.۶۷b	۱۱.۳۴±۱.۵۴b
پپسین	۶۳.۸۷±۳.۵۷c	۲.۲۸±۰.۵۶c	۹.۶۷±۱.۶۴b	۱۳.۲۸±۲.۷۶a
تریپسین	۵۸.۶۵±۳.۵۴c	۳.۱۱±۰.۷۶b	۹.۹۷±۱.۵۵b	۱۳.۶۵±۱.۶۵a

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر فاکتور در تیمارهای مختلف می باشد.

۲-۹-۴- ماهی کپور معمولی

جدول ۴-۱۰ تغییرات آنالیز کیفی را در نمونه خام و هیدرولیز شده ضایعات ماهی کپور معمولی نشان میدهد. بیشترین درصد پروتئین مربوط به نمونه دارای آنزیم آلکالاز بوده و آنزیمهای پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. بنابراین با هیدرولیز پروتئین ، میزان بازیافت پروتئین نیز افزایش می یابد. هیدرولیز آنزیمی باعث کاهش چربی شده و میزان آن از ۴/۲۳ به ۱/۵۹ تا۳/۴۵ درصد در نمونه های هیدرولیز شده کاهش می دهد. کمترین مقدار چربی نیز مربوط به نمونه آلکالاز بوده است. با خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده، درصد رطوبت کاهش یافته و از ۷۷/۴۵ به ۸/۱۱ درصد (تیمار آلکالاز) کاهش می یابد. میزان خاکستر با فرآیند هیدرولیز افزایش نسبی یافته و از ۳/۱۱ به ۱۲/۴۵ (تیمار تریپسین) افزایش می یابد.

جدول ۴-۱۰ : آنالیز کیفی ضایعات خام و هیدرولیز شده ماهی کپور معمولی در زمان ۹۰ دقیقه

پارامتر / نمونه	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
خام	۱۴.۵۰±۲.۲۵c	۴.۳۲±۱.۳۴a	۷۷.۴۵±۶.۴۵a	۳.۱۱±۰.۶۵c
آلکالاز	۷۹.۲۱±۳.۴۵a	۱.۵۹±۰.۶d	۸.۱۱±۱.۲۱b	۱۰.۳۴±۲.۳۲c
پروتامکس	۷۵.۴۱±۳.۴۷a	۲.۱۱±۰.۳۲c	۹.۴۵±۱.۷۸b	۱۲.۲۷±۱.۱۱b
پپسین	۶۴.۴۱±۴.۲b	۲.۹۴±۰.۸۴c	۱۰.۱۱±۱.۲b	۱۱.۶۷±۱.۹۸a
تریپسین	۶۱.۵۵±۳.۵۴b	۳.۴۵±۰.۵۵b	۹.۴۵±۱.۸۵b	۱۲.۴۵±۱.۳۹a

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر فاکتور در تیمارهای مختلف می باشد.

۴-۹-۳- ماهی فیتوفاگ

جدول ۴-۱۱ تغییرات آنالیز کیفی را در نمونه خام و هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ نشان میدهد. بیشترین درصد پروتئین مربوط به نمونه دارای آنزیم آلکالاز (۸۱/۵۶ درصد) بوده و آنزیمهای پروتامکس(۷۴/۶۴ درصد)، پپسین (۶۶/۴۳ درصد) و تریپسین (۶۱/۳۲ درصد)در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج نشاندهنده آنست که هیدرولیز آنزیمی باعث افزایش راندمان بازیافت پروتئین میشود. فرآیند هیدرولیز باعث کاهش چربی موجود در ضایعات ماهی شده و میزان آن از ۴/۳۴ به ۱/۲۳ تا۲/۲۵ درصد در نمونه های هیدرولیز شده کاهش می دهد. کمترین مقدار چربی نیز مربوط به نمونه آلکالاز بوده است. با خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده، درصد رطوبت کاهش یافته و از ۷۵/۴۵ به ۶/۱۱ درصد (تیمار آلکالاز) کاهش می یابد. میزان خاکستر با فرآیند هیدرولیز افزایش نسبی یافته و از ۲/۳۲ به ۱۲/۸۳ (تیمار تریپسین) افزایش می یابد. پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده از ضایعات ماهی فیتوفاگ، از نظر پارامترهای کیفی، نسبت به دو گونه کپور معمولی و بیگ هد بهتر بوده است.

جدول ۴-۱۱ : آنالیز کیفی ضایعات خام و هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ در زمان ۹۰ دقیقه

پارامتر / نمونه	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
خام	۱۷.۸۸±۲.۱۱d	۴.۳۴±۱.۱۱a	۷۵.۴۵±۳.۳۰a	۲.۳۳±۰.۵۴c
آلکالاز	۸۱.۵۶±۵.۳۲a	۱.۲۳±۰.۳۴d	۶.۱۱±۱.۲۵b	۹.۲۵±۱.۱۲b
پروتامکس	۷۴.۶۴±۳.۶۷b	۱.۸۷±۰.۴۳c	۷.۳±۱.۲۸b	۱۰.۳۹±۱.۲۹b
پپسین	۶۶.۴۳±۳.۳۲c	۲.۰۷±۰.۲۳c	۸.۵۳±۱.۱۲b	۱۲.۲۶±۱.۰۳a
تریپسین	۶۱.۳۲±۳.۱۷c	۲.۲۵±۰.۳۹b	۸.۳۴±۱.۱۸b	۱۲.۸۳±۱.۲۵a

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر فاکتور در تیمارهای مختلف می باشد.

۴-۹-۴- ماهی آمور

جدول ۴-۱۲ تغییرات آنالیز کیفی را در نمونه خام و هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور نشان میدهد. بیشترین درصد پروتئین مربوط به نمونه دارای آنزیم آلکالاز (۸۴/۲ درصد) بوده و آنزیمهای پروتامکس(۷۵/۳ درصد)، پپسین (۶۹/۵۶

درصد) و تریپسین (۶۵/۷۴ درصد)در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج نشاندهنده آنست که هیدرولیز آنزیمی باعث افزایش راندمان بازیافت پروتئین میشود. فرآیند هیدرولیز باعث کاهش چربی موجود در ضایعات ماهی آمور شده و میزان آن از ۴/۴۱ به ۱/۹۷ تا ۳/۴۳ درصد در نمونه های هیدرولیز شده کاهش می دهد. کمترین مقدار چربی نیز مربوط به نمونه آلکالاز بوده است. با خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده، درصد رطوبت کاهش یافته و از ۷۴/۲۱ به ۵/۳۶ درصد (تیمار آلکالاز) کاهش می یابد. میزان خاکستر با فرآیند هیدرولیز افزایش نسبی یافته و از ۲/۱۱ به ۱۱/۹۵ (تیمار تریپسین) افزایش می یابد. پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده از ضایعات ماهی آمور، از نظر پارامترهای کیفی، بهترین وضعیت را داشته و ارزش غذایی آن از سه گونه دیگر بهتر بوده است.

جدول ۴-۱۲ : آنالیز کیفی ضایعات خام و هیدرولیز شده ماهی آمور در زمان ۹۰ دقیقه

پارامتر / نمونه	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
خام	۱۷.۸۸±۲.۱۱d	۴.۴۱±۱.۱۷a	۷۴.۲۱±۳.۳۴a	۲.۱۱±۰.۲۸b
آلکالاز	۸۴.۲۳±۶.۵۶a	۱.۹۷±۰.۲۱d	۵.۳۶±۱.۵۶c	۸.۳۳±۱.۳۴a
پروتامکس	۷۵.۳۴±۳.۸۹b	۲.۱۳±۰.۶۷c	۶.۱۷±۱.۷۷b	۹.۳۸±۱.۴۱a
پپسین	۶۹.۵۶±۵.۲۱c	۲.۳۲±۰.۱۴c	۸.۱۱±۱.۱۸b	۱۱.۸۹±۱.۳۲a
تریپسین	۶۵.۴۷±۴.۴۳c	۳.۴۳±۰.۲۳b	۸.۷۶±۱.۲۳b	۱۱.۹۵±۱.۶۵a

* حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار هر فاکتور در تیمارهای مختلف می باشد.

۴-۱۰- ارزیابی رشد باکتریهای شاخص در محیط های تهیه شده از پپتون ماهیان گرمابی

به منظور ارزیابی رشد باکتریهای انتخاب شده در این تحقیق، ابتدا پپتون از محیطهای تجاری حذف شده و پپتون تولید شده از چهار گونه ماهیان گرمابی (پپتون تولید شده در زمان ۹۰ دقیقه)جایگزین آن شده و پس از اضافه نمودن سایر پارامترها و اتوکلاو نمودن محیطهای کشت در دمای ۱۲۱ درجه ، فشار ۱۵ اتمسفر و زمان ۱۵ دقیقه ، جهت کشت باکتریها آماده شدند. باکتریهای مورد استفاده شامل باکتریهای گروه لاکتیک(لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس کازئیی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس) ، باسیلوسها(لیکنوفورمیس و سوبتی لیس)، سودوموناس(آئروجینوزا و پوتیدا) ، لیستریا مونوسیتوژنز و استرپتوکوکوس فسیوم بودند. جهت کشت باکتریهای گروه لاکتیک از محیط کشت MRS براث و جهت کشت سایر باکتریها از محیط کشت تریپتیک سویا براث استفاده گردید. محیط کشت مذکور یک محیط مناسب جهت کشت باکتریهایی نظیر سودوموناس، باسیلوس و لیستریا می باشد. البته میتوان از محیطهای دیگر نظیر آبگوشت عصاره قلب و مغز گاو (Brain Heart Infusion broth) نیز استفاده نمود.

۱-۱۰-۴- باکتریهای گروه لاکتیک

-لاکتوباسیلوس پلانتاروم

نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری MRS در جداول ۴-۱۳ تا ۴-۱۶ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۱۳ نشان میدهد که رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۱۳ تا ۴-۱۶).

جدول۴-۱۳ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۲±۰.۰۴dA	۰.۵۴±۰.۰۴dA	۰.۴۵±۰.۰۲dA	۰.۵۲±۰.۰۲dA	۰.۵۱±۰.۰۲dA
۶	۲.۳۰±۰.۰۷cA	۲.۲۱±۰.۰۴cA	۱.۸۷±۰.۰۳cB	۱.۶۵±۰.۰۴cB	۲.۲۶±۰.۰۶cA
۱۲	۴.۴۱±۰.۰۵bA	۴.۷۸±۰.۰۵bA	۳.۶۶±۰.۰۲bB	۳.۲۳±۰.۰۳bB	۴.۳۰±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۱۱±۰.۰۶aA	۵.۸۶±۰.۰۹aA	۵.۴۲±۰.۰۱aB	۵.۲۵±۰.۰۷aB	۵.۸۱±۰.۰۷aAB

*حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۱۴ تغییرات رشد پلانتاروم را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول

بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۱۴ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۴۵±۰.۰۳dA	۰.۵۱±۰.۰۶dA	۰.۴۸±۰.۰۲dA	۰.۵۲±۰.۰۲dA	۰.۴۵±۰.۰۲dA
۶	۲.۷۵±۰.۰۵cA	۲.۶۵±۰.۰۵cA	۲.۱۱±۰.۰۴cB	۱.۸۹±۰.۰۵cB	۲.۱۵±۰.۰۷cA
۱۲	۴.۸۹±۰.۰۴bA	۴.۴۵±۰.۰۴bA	۳.۸۹±۰.۰۵bB	۳.۶۴±۰.۰۳bB	۴.۳۰±۰.۰۵bA
۱۸	۶.۷۸±۰.۰۴aA	۵.۹۸±۰.۰۵aA	۵.۶۷±۰.۰۶aB	۵.۵۱±۰.۰۴aB	۵.۸۶±۰.۰۶aAB

*حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۱۵ تغییرات رشد پلانتاروم را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۱۵ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۷±۰.۰۴dA	۰.۵۶±۰.۰۲dA	۰.۵۵±۰.۰۲dA	۰.۴۵±۰.۰۷dA
۶	۳.۱۵±۰.۰۶cA	۲.۸۵±۰.۰۵cA	۲.۳۶±۰.۰۸cB	۲.۱۴±۰.۰۶cB	۲.۳۶±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۱۱±۰.۰۵bA	۴.۸۵±۰.۰۵bA	۴.۳۴±۰.۰۴bB	۳.۱۱±۰.۰۵bB	۴.۳۸±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۹۸±۰.۰۲aA	۶.۲۲±۰.۰۳aA	۵.۸۴±۰.۰۶aB	۵.۷۲±۰.۰۷aB	۵.۹۲±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۱۶ تغییرات رشد پلانتاروم را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز

بیشترین فعال را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۱۶ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۴۵±۰.۰۲dA	۰.۵۲±۰.۰۳dA	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۱±۰.۰۲dA	۰.۵۶±۰.۰۲dA
۶	۳.۴۵±۰.۰۲cA	۳.۲۲±۰.۰۷cA	۲.۶۵±۰.۰۵cB	۲.۵۱±۰.۰۶cB	۲.۷۴±۰.۰۳cA
۱۲	۵.۵۸±۰.۰۴bA	۵.۱۴±۰.۰۵bA	۴.۷۹±۰.۰۴bB	۳.۶۷±۰.۰۳bB	۴.۸۵±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۱۱±۰.۰۵aA	۶.۷۵±۰.۰۶aA	۶.۱۲±۰.۰۳aB	۵.۹۲±۰.۰۴aB	۵.۹۵±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- لاکتوباسیلوس کازئیی

نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری MRS در جداول ۴-۱۷ تا ۴-۲۰ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای شاهد، پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پروتامکس (برخلاف پلانتاروم)، پپسین ، تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. نتایج مقایسه رشد کازئیی در تیمارهای مختلف نشان داد که روند رشد این گونه نسبت به پلانتاروم ضعیف تر بوده و اینگونه پرنیاز تر از پلانتاروم می باشد.جدول ۴-۱۷ نشان میدهد که رشد لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. در خصوص لاکتوباسیلوس کارئیی، پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد لاکتوباسیلوس کازئیی بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۱۷ تا ۴-۲۰)

جدول۴-۱۷ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۴۵±۰.۰۲dA	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۳dA	۰.۵۳±۰.۰۷dA	۰.۵۴±۰.۰۵dA
۶	۲.۳۵±۰.۰۵cA	۱.۸۵±۰.۰۷cA	۱.۳۲±۰.۰۴cB	۱.۱۷±۰.۰۳cB	۲.۱۲±۰.۰۶cA
۱۲	۳.۵۷±۰.۰۳bA	۳.۱۱±۰.۰۳bA	۲.۸۵±۰.۰۲bB	۲.۵۵±۰.۰۳bB	۳.۴۱±۰.۰۵bA
۱۸	۵.۷۶±۰.۰۶aA	۵.۲۳±۰.۰۴aA	۴.۷۵±۰.۰۳aB	۴.۳۲±۰.۰۴aB	۵.۶۷±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۱۸ تغییرات رشد کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و شاهد و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پروتامکس و پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۱۸ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۴±۰.۰۳dA	۰.۵۶±۰.۰۶dA	۰.۵۱±۰.۰۶dA	۰.۵۳±۰.۰۲dA	۰.۴۵±۰.۰۷dA
۶	۲.۵۵±۰.۰۵cA	۲.۲۳±۰.۰۷cA	۲.۰۳±۰.۰۸cB	۱.۲۴±۰.۰۶cB	۲.۲۳±۰.۰۶cA
۱۲	۳.۸۵±۰.۰۶bA	۳.۵۶±۰.۰۴bA	۳.۲۲±۰.۰۵bB	۳.۱۴±۰.۰۴bB	۴.۳۵±۰.۰۵bA
۱۸	۵.۹۵±۰.۰۴aA	۵.۵۶±۰.۰۶aA	۴.۴۵±۰.۰۴aB	۴.۳۶±۰.۰۴aB	۵.۷۵±۰.۰۴aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۱۹ تغییرات رشد کازئیی را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعال را داشته است. آنزیم پروتامکس و آنزیمهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۱۹ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۱±۰.۰۶dA	۰.۵۲±۰.۰۶dA	۰.۵۸±۰.۰۷dA	۰.۵۵±۰.۰۳dA
۶	۲.۸۹±۰.۰۶cA	۲.۴۶±۰.۰۸cA	۲.۳۲±۰.۰۷cB	۲.۲۱±۰.۰۳cB	۱.۸۵±۰.۰۴cA
۱۲	۴.۶۵±۰.۰۷bA	۴.۲۵±۰.۰۵bA	۴.۰۳±۰.۰۴bB	۳.۷۰±۰.۰۵bB	۴.۰۶±۰.۰۵bA
۱۸	۶.۲۱±۰.۰۵aA	۵.۸۵±۰.۰۵aA	۵.۲۱±۰.۰۶aB	۵.۰۷±۰.۰۳aB	۵.۸۸±۰.۰۴aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۰ تغییرات رشد کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. آنزیم پروتامکس و آنزیمهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۲۰ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس کازئیی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۱±۰.۰۸dA	۰.۵۵±۰.۰۲dA	۰.۵۶±۰.۰۸dA	۰.۵۴±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA
۶	۳.۳۲±۰.۰۲cA	۳.۱۱±۰.۰۵cA	۲.۴۰±۰.۰۵cB	۲.۳۲±۰.۰۵cB	۲.۵۸±۰.۰۷cA
۱۲	۵.۳۵±۰.۰۳bA	۴.۹۰±۰.۰۵bA	۴.۳۵±۰.۰۶bB	۴.۱۴±۰.۰۷bB	۴.۴۶±۰.۰۳bA
۱۸	۶.۸۵±۰.۰۷aA	۶.۲۳±۰.۰۶aA	۵.۷۵±۰.۰۳aB	۵.۳۵±۰.۰۳aB	۵.۹۵±۰.۰۴aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

-لاکتوباسیلوس دلبروکی

نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری MRS در جداول ۴-۲۱ تا ۴-۲۴ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ،

تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۲۱ نشان میدهد که رشد لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد لاکتوباسیلوس دلبروکی بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۲۱ تا ۴-۲۴). نتایج رشد لاکتوباسیلوس دلبروکی در تیمارهای مختلف مشابه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده است.

جدول۴-۲۱ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۳±۰.۰۴dA	۰.۵۲±۰.۰۴dA	۰.۵۲±۰.۰۲dA	۰.۵۰±۰.۰۲dA	۰.۵۳±۰.۰۲dA
۶	۲.۲۵±۰.۰۷cA	۲.۱۷±۰.۰۴cA	۱.۸۱±۰.۰۳cB	۱.۵۷±۰.۰۴cB	۱.۸۵±۰.۰۶cA
۱۲	۴.۳۵±۰.۰۵bA	۳.۷۱±۰.۰۵bA	۳.۵۶±۰.۰۲bB	۳.۱۸±۰.۰۳bB	۴.۱۰±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۰۷±۰.۰۶aA	۵.۷۹±۰.۰۹aA	۵.۳۶±۰.۰۱aB	۵.۲۰±۰.۰۷aB	۵.۷۳±۰.۰۷aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۲ تغییرات رشد دلبروکی را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۲۲ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۵±۰.۰۷dA	۰.۵۲±۰.۰۳dA	۰.۵۱±۰.۰۲dA	۰.۵۲±۰.۰۲dA
۶	۲.۶۵±۰.۰۴cA	۲.۴۵±۰.۰۳cA	۲.۰۱±۰.۰۷cB	۱.۷۶±۰.۰۷cB	۱.۹۵±۰.۰۵cA
۱۲	۴.۶۵±۰.۰۶bA	۴.۴۰±۰.۰۴bA	۳.۷۵±۰.۰۴bB	۳.۵۵±۰.۰۶bB	۴.۱۰±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۶۰±۰.۰۷aA	۵.۸۵±۰.۰۶aA	۵.۶۰±۰.۰۵aB	۵.۴۵±۰.۰۴aB	۵.۷۱±۰.۰۸aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۳ تغییرات رشد دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعال را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۲۳ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۴۵±۰.۰۳dA	۰.۵۲±۰.۰۷dA	۰.۵۱±۰.۰۵dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۳±۰.۰۳dA
۶	۳.۰۱±۰.۰۵cA	۲.۷۰±۰.۰۳cA	۲.۲۶±۰.۰۴cB	۲.۰۲±۰.۰۶cB	۲.۱۲±۰.۰۴cA
۱۲	۴.۹۱±۰.۰۸bA	۴.۶۸±۰.۰۵bA	۴.۲۵±۰.۰۴bB	۴.۰۶±۰.۰۷bB	۴.۳۰±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۸۵±۰.۰۵aA	۶.۱۰±۰.۰۸aA	۵.۷۳±۰.۰۵aB	۵.۶۵±۰.۰۴aB	۵.۷۵±۰.۰۶aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۴ تغییرات رشد دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعال را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۲۴ : نتایج جذب نوری لاکتوباسیلوس دلبروکی در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۱±۰.۰۲dA	۰.۴۵±۰.۰۳dA	۰.۴۵±۰.۰۴dA	۰.۴۵±۰.۰۲dA	۰.۵۵±۰.۰۲dA
۶	۳.۲۳±۰.۰۲cA	۳.۱۱±۰.۰۷cA	۲.۵۰±۰.۰۵cB	۲.۴۵±۰.۰۶cB	۲.۴۵±۰.۰۳cA
۱۲	۵.۴۵±۰.۰۴bA	۵.۰۳±۰.۰۵bA	۴.۶۵±۰.۰۴bB	۳.۵۸±۰.۰۳bB	۴.۳۶±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۰۲±۰.۰۵aA	۶.۶۵±۰.۰۶aA	۶.۰۲±۰.۰۳aB	۵.۸۵±۰.۰۴aB	۵.۷۶±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- استرپتوکوکوس ترموفیلوس

نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری MRS در جداول ۴-۲۵ تا ۴-۲۸ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۲۵ نشان میدهد که رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۲۵ تا ۴-۲۸). نتایج رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس در تیمارهای مختلف مشابه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده است.

جدول۴-۲۵ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۵±۰.۰۳dA	۰.۵۵±۰.۰۷dA	۰.۵۰±۰.۰۷dA	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۳±۰.۰۷dA
۶	۲.۴۱±۰.۰۱cA	۲.۳۰±۰.۰۳cA	۲.۱۵±۰.۰۶cB	۲.۰۸±۰.۰۵cB	۲.۸۵±۰.۰۶cA
۱۲	۴.۶۰±۰.۰۴bA	۴.۳۲±۰.۰۳bA	۳.۹۰±۰.۰۴bB	۳.۶۵±۰.۰۶bB	۴.۲۶±۰.۰۳bA
۱۸	۶.۷۵±۰.۰۶aA	۶.۲۵±۰.۰۴aA	۵.۸۵±۰.۰۱aB	۵.۶۳±۰.۰۷aB	۶.۱۲±۰.۰۴aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۶ تغییرات رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۲۶ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۵±۰.۰۷dA	۰.۵۲±۰.۰۳dA	۰.۵۰±۰.۰۱dA	۰.۵۶±۰.۰۲dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA
۶	۲.۷۵±۰.۰۴cA	۲.۵۲±۰.۰۴cA	۲.۱۷±۰.۰۴cB	۱.۸۳±۰.۰۳cB	۲.۱۵±۰.۰۴cA
۱۲	۴.۷۰±۰.۰۴bA	۴.۵۶±۰.۰۴bA	۳.۹۳±۰.۰۵bB	۳.۶۲±۰.۰۹bB	۴.۱۶±۰.۰۳bA
۱۸	۶.۷۳±۰.۰۳aA	۵.۹۱±۰.۰۶aA	۵.۷۵±۰.۰۵aB	۵.۶۰±۰.۰۴aB	۵.۸۵±۰.۰۸aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۷ تغییرات رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر

آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۲۷ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۲±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۳±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA
۶	۳.۱۷±۰.۰۶cA	۲.۸۰±۰.۰۵cA	۲.۳۵±۰.۰۷cB	۲.۱۵±۰.۰۷cB	۲.۲۴±۰.۰۶cA
۱۲	۴.۹۸±۰.۰۵bA	۴.۷۹±۰.۰۷bA	۴.۳۷±۰.۰۴bB	۴.۱۸±۰.۰۵bB	۴.۴۳±۰.۰۴bA
۱۸	۶.۹۶±۰.۰۷aA	۶.۲۱±۰.۰۳aA	۵.۸۵±۰.۰۴aB	۵.۷۲±۰.۰۴aB	۵.۹۰±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۲۸ تغییرات رشد استرپتوکوکوس ترموفیلوس را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۲۸ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس ترموفیلوس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت MRS

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۵۵±۰.۰۲dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۲±۰.۰۲dA	۰.۵۳±۰.۰۲dA
۶	۳.۳۵±۰.۰۲cA	۳.۲۲±۰.۰۷cA	۲.۷۵±۰.۰۵cB	۲.۶۰±۰.۰۶cB	۲.۷۰±۰.۰۳cA
۱۲	۵.۵۷±۰.۰۴bA	۵.۲۳±۰.۰۵bA	۴.۸۵±۰.۰۴bB	۳.۷۱±۰.۰۳bB	۴.۹۵±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۱۲±۰.۰۵aA	۶.۸۵±۰.۰۶aA	۶.۲۳±۰.۰۳aB	۶.۰۷±۰.۰۴aB	۶.۳۵±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- باسیلوس لیکنوفورمیس

نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۲۹ تا ۴-۳۲ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۲۹ نشان میدهد که رشد باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد باسیلوس لیکنوفورمیس بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۲۹ تا ۴-۳۲). نتایج رشد باسیلوس لیکنوفورمیس در تیمارهای مختلف بهتر از باکتریهای گروه لاکتیک بوده و این نشان از عدم نیاز بالای باسیلوی لیکنوفورمیس می باشد.

جدول۴-۲۹ : نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	MRS
صفر	۰.۶۱±۰.۰۷dA	۰.۶۵±۰.۰۳dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۶±۰.۰۵dA
۶	۳.۵۵±۰.۰۵cA	۳.۳۵±۰.۰۶cA	۲.۹۵±۰.۰۳cB	۲.۵۶±۰.۰۳cB	۳.۱۱±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۶۵±۰.۰۶bA	۵.۴۰±۰.۰۷bA	۴.۸۵±۰.۰۵bB	۴.۴۵±۰.۰۷bB	۵.۲۶±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۲۶±۰.۰۴aA	۶.۸۵±۰.۰۳aA	۶.۵۵±۰.۰۸aB	۶.۳۵±۰.۰۳aB	۶.۶۰±۰.۰۸aAB

• حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۰ تغییرات رشد باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۰: نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۱±۰.۰۷dA	۰.۶۵±۰.۰۴dA	۰.۶۳±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۸dA
۶	۳.۵۵±۰.۰۶cA	۳.۴۳±۰.۰۵cA	۳.۲۰±۰.۰۶cB	۳.۱۲±۰.۰۷cB	۳.۳۵±۰.۰۶cA
۱۲	۵.۷۲±۰.۰۶bA	۵.۵۱±۰.۰۶bA	۴.۹۲±۰.۰۷bB	۴.۷۲±۰.۰۵bB	۵.۳۰±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۴۲±۰.۰۳aA	۶.۸۲±۰.۰۳aA	۶.۶۲±۰.۰۸aB	۶.۴۷±۰.۰۵aB	۶.۷۶±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۱ تغییرات رشد باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۱: نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۵±۰.۰۷dA	۰.۶۳±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA
۶	۳.۶۸±۰.۰۵cA	۳.۵۰±۰.۰۶cA	۳.۳۱±۰.۰۳cB	۳.۴۵±۰.۰۳cB	۳.۳۶±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۸۰±۰.۰۶bA	۵.۶۵±۰.۰۷bA	۵.۳۶±۰.۰۵bB	۴.۹۳±۰.۰۷bB	۵.۴۶±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۵۰±۰.۰۴aA	۶.۹۵±۰.۰۳aA	۶.۷۰±۰.۰۸aB	۶.۵۱±۰.۰۳aB	۶.۸۰±۰.۰۸aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۲ تغییرات رشد باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۳۲: نتایج جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۳±۰.۰۶dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA
۶	۳.۸۰±۰.۰۶cA	۳.۶۵±۰.۰۴cA	۳.۵۵±۰.۰۴cB	۳.۵۱±۰.۰۷cB	۳.۷۰±۰.۰۶cA
۱۲	۵.۹۶±۰.۰۶bA	۵.۷۳±۰.۰۶bA	۵.۵۰±۰.۰۸bB	۵.۲۵±۰.۰۵bB	۵.۵۵±۰.۰۷bA
۱۸	۷.۶۵±۰.۰۳aA	۷.۲۲±۰.۰۴aA	۶.۹۱±۰.۰۵aB	۶.۷۳±۰.۰۴aB	۶.۹۵±۰.۰۶aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- باسیلوس سوبتی لیس

نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۳۳ تا ۴-۳۶ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۳۳ نشان میدهد که رشد باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد باسیلوس سوبتی لیس بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۳۳ تا ۴-۳۶). نتایج رشد باسیلوس سوبتی لیس در تیمارهای مختلف مشابه باسیلوس لیکنوفورمیس بوده و هیچگونه اختلاف معنی داری مابین آنها وجود نداشته است.

جدول۴-۳۳ : نتایج جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۱±۰.۰۳dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۳±۰.۰۸dA	۰.۶۱±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA
۶	۳.۵۲±۰.۰۴cA	۳.۴۱±۰.۰۵cA	۲.۸۸±۰.۰۶cB	۲.۴۵±۰.۰۳cB	۳.۱۷±۰.۰۵cA
۱۲	۵.۶۷±۰.۰۵bA	۵.۳۶±۰.۰۷bA	۴.۷۶±۰.۰۶bB	۴.۵۲±۰.۰۵bB	۵.۳۵±۰.۰۷bA
۱۸	۷.۳۲±۰.۰۵aA	۶.۸۰±۰.۰۷aA	۶.۶۰±۰.۰۸aB	۶.۴۱±۰.۰۶aB	۶.۷۵±۰.۰۸aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۴ تغییرات رشد باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۴ : نتایج جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۰±۰.۰۶dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA	۰.۶۱±۰.۰۴dA	۰.۶۱±۰.۰۶dA	۰.۶۳±۰.۰۸dA
۶	۳.۵۹±۰.۰۷cA	۳.۶۰±۰.۰۶cA	۳.۲۵±۰.۰۵cB	۳.۲۵±۰.۰۴cB	۳.۳۵±۰.۰۵cA
۱۲	۵.۶۵±۰.۰۳bA	۵.۶۵±۰.۰۶bA	۴.۹۸±۰.۰۷bB	۴.۸۶±۰.۰۵bB	۵.۳۴±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۵۵±۰.۰۱aA	۶.۹۰±۰.۰۸aA	۶.۷۵±۰.۰۷aB	۶.۶۰±۰.۰۵aB	۶.۷۸±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۵ تغییرات رشد باسیلوس سوبتی لیس را در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۵ : نتایج جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۱±۰.۰۳dA	۰.۶۲±۰.۰۳dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۰±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۶dA
۶	۳.۷۲±۰.۰۵cA	۳.۵۵±۰.۰۸cA	۳.۳۵±۰.۰۷cB	۳.۲۰±۰.۰۷cB	۳.۴۵±۰.۰۷cA
۱۲	۵.۸۵±۰.۰۸bA	۵.۷۱±۰.۰۵bA	۵.۵۵±۰.۰۵bB	۵.۱۳±۰.۰۶bB	۵.۶۵±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۵۵±۰.۰۴aA	۷.۱۲±۰.۰۳aA	۶.۸۵±۰.۰۶aB	۶.۳۵±۰.۰۳aB	۶.۹۲±۰.۰۵aAB

• حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۶ تغییرات رشد باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۳۶ : نتایج جذب نوری باسیلوس سوبتی لیس در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۱±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۶dA	۰.۶۱±۰.۰۳dA	۰.۶۲±۰.۰۵dA	۰.۶۵±۰.۰۵dA
۶	۳.۸۵±۰.۰۴cA	۳.۷۵±۰.۰۷cA	۳.۶۴±۰.۰۷cB	۳.۶۰±۰.۰۴cB	۳.۷۰±۰.۰۶cA
۱۲	۶.۱۲±۰.۰۵bA	۵.۸۵±۰.۰۵bA	۵.۶۵±۰.۰۶bB	۵.۴۱±۰.۰۵bB	۵.۷۰±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۷۵±۰.۰۷aA	۷.۳۲±۰.۰۶aA	۶.۹۸±۰.۰۷aB	۶.۸۱±۰.۰۳aB	۷.۱۰±۰.۰۵aAB

• حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- سودوموناس آئروجینوزا

نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۳۷ تا ۴-۴۰ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس آئروجینوزا از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه

بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۳۷ نشان میدهد که رشد سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است (p<۰/۰۵). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد سودموناس آئروجینوزا بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۳۷ تا ۴-۴۰). نتایج رشد سودموناس آئروجینوزا در تیمارهای مختلف در مقایسه با باسیلوسها و باکتریهای لاکتیک، بهتر بوده و پپتونهای مختلف باعث تقویت رشد آن شده اند.

جدول۴-۳۷ : نتایج جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۷±۰.۰۶dA	۰.۶۵±۰.۰۶dA	۰.۶۵±۰.۰۴dA	۰.۶۳±۰.۰۳dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA
۶	۳.۸۲±۰.۰۴cA	۳.۶۰±۰.۰۴cA	۳.۲۳±۰.۰۳cB	۳.۱۵±۰.۰۵cB	۳.۴۱±۰.۰۶cA
۱۲	۵.۷۳±۰.۰۳bA	۵.۶۰±۰.۰۵bA	۵.۲۲±۰.۰۴bB	۵.۱۱±۰.۰۶bB	۵.۴۵±۰.۰۴bA
۱۸	۷.۴۵±۰.۰۵aA	۷.۲۵±۰.۰۳aA	۶.۸۰±۰.۰۴aB	۶.۶۵±۰.۰۷aB	۷.۱۴±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۸ تغییرات رشد سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۸ : نتایج جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۷±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۴dA	۰.۶۳±۰.۰۳dA	۰.۶۳±۰.۰۳dA	۰.۶۲±۰.۰۴dA
۶	۳.۹۵±۰.۰۹cA	۳.۷۵±۰.۰۶cA	۳.۳۵±۰.۰۵cB	۳.۲۱±۰.۰۷cB	۳.۴۵±۰.۰۵cA
۱۲	۵.۸۶±۰.۰۵bA	۵.۷۲±۰.۰۷bA	۵.۳۵±۰.۰۴bB	۵.۱۷±۰.۰۶bB	۵.۴۲±۰.۰۷bA
۱۸	۷.۶۲±۰.۰۵aA	۷.۵۰±۰.۰۶aA	۶.۹۲±۰.۰۶aB	۶.۷۵±۰.۰۳aB	۷.۱۷±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۳۹ تغییرات رشد سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۳۹ : نتایج جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۵±۰.۰۵dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۵±۰.۰۷dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA
۶	۴.۱۲±۰.۰۴cA	۳.۹۱±۰.۰۳cA	۳.۵۰±۰.۰۴cB	۳.۴۵±۰.۰۳cB	۳.۴۶±۰.۰۶cA
۱۲	۵.۹۳±۰.۰۶bA	۵.۸۲±۰.۰۴bA	۵.۵۵±۰.۰۸bB	۵.۳۶±۰.۰۶bB	۵.۶۰±۰.۰۳bA
۱۸	۷.۷۵±۰.۰۵aA	۷.۶۵±۰.۰۶aA	۷.۱۱±۰.۰۶aB	۶.۹۱±۰.۰۹aB	۷.۲۰±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۰ تغییرات رشد سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۴۰ : نتایج جذب نوری سودموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۲±۰.۰۵dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۱±۰.۰۷dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA
۶	۴.۲۵±۰.۰۴cA	۳.۹۸±۰.۰۳cA	۳.۶۵±۰.۰۴cB	۳.۵۵±۰.۰۳cB	۳.۵۶±۰.۰۶cA
۱۲	۶.۱۲±۰.۰۶bA	۵.۹۵±۰.۰۴bA	۵.۷۰±۰.۰۸bB	۵.۴۶±۰.۰۶bB	۵.۷۵±۰.۰۳bA
۱۸	۷.۹۴±۰.۰۵aA	۷.۷۲±۰.۰۶aA	۷.۲۳±۰.۰۶aB	۷.۱۲±۰.۰۹aB	۷.۲۵±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- سودوموناس پوتیدا

نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس پوتیدا در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۴۱ تا ۴-۴۴ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس پوتیدا از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۴۱ نشان میدهد که رشد سودموناس پوتیدا در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد سودموناس پوتیدا بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۴۱ تا ۴-۴۴). نتایج رشد این گونه از سودموناس نسبت به آئروجینوزا ضعیف تر بوده است ولی با این وجود اختلاف معنی داری وجود نداشته است.

جدول۴-۴۱ : نتایج جذب نوری سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۵±۰.۰۳dA	۰.۶۱±۰.۰۶dA	۰.۶۱±۰.۰۴dA	۰.۶۵±۰.۰۶dA	۰.۶۵±۰.۰۸dA
۶	۳.۷۰±۰.۰۴cA	۳.۵۲±۰.۰۶cA	۳.۱۸±۰.۰۸cB	۳.۰۶±۰.۰۳cB	۳.۳۵±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۶۵±۰.۰۷bA	۵.۴۹±۰.۰۵bA	۵.۱۵±۰.۰۳bB	۴.۸۹±۰.۰۴bB	۵.۳۵±۰.۰۴bA
۱۸	۷.۳۶±۰.۰۶aA	۷.۱۸±۰.۰۷aA	۶.۶۵±۰.۰۷aB	۶.۴۵±۰.۰۷aB	۷.۰۸±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۲ تغییرات رشد سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس پوتیدا در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۴۲ : نتایج جذب نوری سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۵±۰.۰۴dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۰±۰.۰۸dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA	۰.۶۲±۰.۰۶dA
۶	۳.۷۲±۰.۰۷cA	۳.۶۵±۰.۰۴cA	۳.۳۶±۰.۰۵cB	۳.۱۴±۰.۰۵cB	۳.۳۶±۰.۰۸cA
۱۲	۵.۷۵±۰.۰۶bA	۵.۶۴±۰.۰۸bA	۵.۲۱±۰.۰۶bB	۵.۰۶±۰.۰۸bB	۵.۳۵±۰.۰۳bA
۱۸	۷.۵۷±۰.۰۳aA	۷.۳۸±۰.۰۶aA	۶.۸۱±۰.۰۶aB	۶.۶۲±۰.۰۳aB	۷.۱۰±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۳ تغییرات رشد سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس پوتیدا در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۴۳ : نتایج جذب نوری سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۰±۰.۰۵dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۵±۰.۰۴dA	۰.۶۳±۰.۰۵dA	۰.۶۲±۰.۰۸dA
۶	۴.۰۱±۰.۰۶cA	۳.۸۰±۰.۰۴cA	۳.۳۶±۰.۰۴cB	۳.۳۴±۰.۰۶cB	۳.۴۲±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۸۰±۰.۰۸bA	۵.۶۷±۰.۰۸bA	۵.۴۵±۰.۰۶bB	۵.۲۸±۰.۰۶bB	۵.۴۸±۰.۰۳bA
۱۸	۷.۶۳±۰.۰۵aA	۷.۵۹±۰.۰۲aA	۶.۹۸±۰.۰۶aB	۶.۷۳±۰.۰۹aB	۷.۰۶±۰.۰۸aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۴ تغییرات رشد سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری سودموناس پوتیدا در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۴۴ : نتایج جذب نوری سودموناس پوتیدا در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۶۰±۰.۰۲dA	۰.۶۱±۰.۰۵dA	۰.۶۵±۰.۰۳dA	۰.۶۶±۰.۰۴dA	۰.۶۴±۰.۰۳dA
۶	۴.۱۰±۰.۰۱cA	۳.۷۶±۰.۰۵cA	۳.۵۴±۰.۰۸cB	۳.۴۲±۰.۰۳cB	۳.۴۸±۰.۰۴cA
۱۲	۶.۰۶±۰.۰۹bA	۵.۷۳±۰.۰۶bA	۵.۵۵±۰.۰۶bB	۵.۳۴±۰.۰۵bB	۵.۵۴±۰.۰۳bA
۱۸	۷.۷۵±۰.۰۵aA	۷.۶۱±۰.۰۶aA	۷.۱۳±۰.۰۶aB	۶.۸۷±۰.۰۷aB	۷.۱۷±۰.۰۲aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- استرپتوکوکوس فسیوم

نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۴۵ تا ۴-۴۸ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه

بوده و تیمارهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. جدول ۴-۴۵ نشان میدهد که رشد استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد استرپتوکوکوس فسیوم بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۴۵ تا ۴-۴۸). نتایج رشد استرپتوکوکوس فسیوم مشابه باکتریهای گروه لاکتیک خصوصا استرپتوکوکوس ترموفیلوس بوده ولی با این وجود روند رشد فسیوم در تیمارهای مورد استفاده بیشتر بوده است.

جدول۴-۴۵ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۶±۰.۰۴dA	۰.۵۸±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۴dA
۶	۲.۵۵±۰.۰۶cA	۲.۴۶±۰.۰۵cA	۲.۳۲±۰.۰۴cB	۲.۲۱±۰.۰۴cB	۲.۹۲±۰.۰۵cA
۱۲	۴.۷۲±۰.۰۴bA	۴.۴۵±۰.۰۳bA	۴.۱۱±۰.۰۵bB	۳.۸۲±۰.۰۶bB	۴.۳۶±۰.۰۳bA
۱۸	۶.۹۱±۰.۰۴aA	۶.۴۸±۰.۰۶aA	۵.۹۲±۰.۰۷aB	۵.۷۳±۰.۰۳aB	۶.۳۵±۰.۰۵aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۶ تغییرات رشد استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۴۶ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۶±۰.۰۳dA	۰.۵۳±۰.۰۷dA	۰.۵۴±۰.۰۶dA	۰.۵۱±۰.۰۲dA	۰.۵۶±۰.۰۷dA
۶	۲.۹۰±۰.۰۶cA	۲.۶۵±۰.۰۴cA	۲.۳۵±۰.۰۶cB	۱.۹۵±۰.۰۴cB	۲.۴۲±۰.۰۵cA
۱۲	۴.۸۲±۰.۰۴bA	۴.۶۳±۰.۰۱bA	۴.۲۱±۰.۰۵bB	۳.۸۹±۰.۰۳bB	۴.۲۶±۰.۰۳bA
۱۸	۶.۹۱±۰.۰۴aA	۶.۱۱±۰.۰۶aA	۵.۹۳±۰.۰۸aB	۵.۸۴±۰.۰۴aB	۶.۲۳±۰.۰۷aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۷ تغییرات رشد استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۴۷ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۵±۰.۰۵dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۱±۰.۰۲dA
۶	۳.۴۵±۰.۰۶cA	۲.۹۶±۰.۰۷cA	۲.۵۷±۰.۰۲cB	۲.۳۰±۰.۰۵cB	۲.۳۸±۰.۰۴cA
۱۲	۵.۲۶±۰.۰۳bA	۴.۹۵±۰.۰۳bA	۴.۶۰±۰.۰۹bB	۴.۴۵±۰.۰۴bB	۴.۷۰±۰.۰۲bA
۱۸	۷.۱۱±۰.۰۴aA	۶.۴۲±۰.۰۳aA	۶.۱۲±۰.۰۴aB	۵.۸۵±۰.۰۳aB	۶.۲۱±۰.۰۲aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۴۸ تغییرات رشد استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است.

جدول۴-۴۸ : نتایج جذب نوری استرپتوکوکوس فسیوم در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۶±۰.۰۳dA	۰.۵۲±۰.۰۳dA	۰.۵۲±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA	۰.۵۵±۰.۰۵dA
۶	۳.۵۰±۰.۰۸cA	۳.۳۵±۰.۰۳cA	۳.۱۲±۰.۰۴cB	۲.۸۵±۰.۰۴cB	۳.۲۵±۰.۰۸cA
۱۲	۵.۶۸±۰.۰۵bA	۵.۴۱±۰.۰۵bA	۵.۲۳±۰.۰۸bB	۳.۹۰±۰.۰۳bB	۵.۴۳±۰.۰۵bA
۱۸	۷.۳۰±۰.۰۴aA	۶.۹۸±۰.۰۵aA	۶.۴۲±۰.۰۳aB	۶.۲۷±۰.۰۸aB	۶.۶۰±۰.۰۶aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

- لیستریا مونوسیتوژنز

نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین از چهار ماهی بیگ هد، کپور معمولی ، فیتوفاگ و آمور و مقایسه آن با محیط کشت تجاری TSB در جداول ۴-۴۹ تا ۴-۵۲ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز از زمان صفر تا ۱۸ ساعت انکوباسیون در هر پنج تیمار آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین ، تریپسین و نمونه شاهد روند صعودی داشته ولی به غیر از زمان صفر، این افزایش در تیمار آلکالاز بهتر از بقیه بوده و تیمارهای شاهد، پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. تیمارهای پروتامکس پپسین ، تریپسین ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند. نتایج مقایسه رشد لیستریا مونوسیتوژنز در تیمارهای مختلف نشان داد که روند رشد این گونه نسبت به باکتریهای دیگر ضعیف تر بوده و اینگونه پرنیاز تر از سایر باکتریها می باشد.جدول ۴-۴۹ نشان میدهد که رشد لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت شاهد و حاوی آنزیم در زمانهای مختلف معنی دار بوده و روند صعودی داشته است ($p<۰/۰۵$). مقایسه آنزیمها با یکدیگر و نمونه شاهد حاکی از عدم اختلاف معنی دار ما بین آلکالاز و پروتامکس و همچنین پپسین و تریپسین بوده ولی با این وجود بین آنزیمهای میکروبی و آنزیمهای حیوانی در زمانهای مختلف اختلاف معنی دار وجود داشته و در زمان آخر این اختلاف مشهودتر بوده است. پپتون تهیه شده از ماهی آمور دارای اثرات بهتری بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز بوده و پپتونهای ماهی فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند (جداول ۴-۴۹ تا ۴-۵۲)

جدول۴-۴۹ : نتایج جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیگ هد تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۱±۰.۰۲dA	۰.۵۳±۰.۰۴dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA	۰.۵۲±۰.۰۷dA	۰.۵۳±۰.۰۵dA
۶	۲.۲۵±۰.۰۵cA	۱.۷۶±۰.۰۷cA	۱.۲۱±۰.۰۴cB	۱.۰۶±۰.۰۳cB	۲.۱۷±۰.۰۶cA
۱۲	۳.۴۲±۰.۰۳bA	۳.۰۴±۰.۰۳bA	۲.۷۰±۰.۰۲bB	۲.۳۵±۰.۰۳bB	۳.۲۵±۰.۰۵bA
۱۸	۵.۵۰±۰.۰۶aA	۵.۱۱±۰.۰۴aA	۴.۶۲±۰.۰۳aB	۴.۱۵±۰.۰۴aB	۵.۴۵±۰.۰۳aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۵۰ تغییرات رشد لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کپور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در ماهی کپور بهتر از ماهی بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی کپور مشابه تغییرات ماهی بیگ هد بوده و کماکان آنزیم آلکالاز در رتبه اول بوده و شاهد و آنزیمهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. پروتامکس و پپتونهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۵۰ : نتایج جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۳±۰.۰۶dA	۰.۵۳±۰.۰۵dA	۰.۵۳±۰.۰۶dA	۰.۵۱±۰.۰۴dA	۰.۵۱±۰.۰۵dA
۶	۲.۴۱±۰.۰۵cA	۲.۱۲±۰.۰۴cA	۱.۸۶±۰.۰۵cB	۱.۱۳±۰.۰۸cB	۲.۱۴±۰.۰۳cA
۱۲	۳.۷۲±۰.۰۲bA	۳.۴۲±۰.۰۴bA	۳.۱۲±۰.۰۴bB	۳.۰۴±۰.۰۶bB	۴.۲۶±۰.۰۵bA
۱۸	۵.۷۶±۰.۰۶aA	۵.۳۷±۰.۰۵aA	۴.۳۰±۰.۰۵aB	۴.۲۱±۰.۰۴aB	۵.۵۶±۰.۰۶aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۵۱ تغییرات رشد لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در ماهی فیتوفاگ بهتر از ماهیان کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی فیتوفاگ مشابه دو گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. آنزیم پروتامکس و آنزیمهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۵۱ : نتایج جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی فیتوفاگ تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۱±۰.۰۶dA	۰.۵۶±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۶dA	۰.۵۵±۰.۰۷dA	۰.۵۱±۰.۰۳dA
۶	۲.۷۱±۰.۰۶cA	۲.۲۶±۰.۰۸cA	۲.۱۴±۰.۰۷cB	۲.۱۳±۰.۰۳cB	۱.۷۲±۰.۰۴cA
۱۲	۴.۵۱±۰.۰۷bA	۴.۱۵±۰.۰۵bA	۳.۸۵±۰.۰۴bB	۳.۴۵±۰.۰۵bB	۴.۲۰±۰.۰۵bA
۱۸	۶.۱۲±۰.۰۵aA	۵.۷۰±۰.۰۵aA	۵.۱۱±۰.۰۶aB	۴.۸۷±۰.۰۳aB	۵.۷۵±۰.۰۴aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

جدول ۴-۵۲ تغییرات رشد لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آمور را نشان میدهد. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در ماهی آمور بهتر از ماهیان فیتوفاگ ، کپور و بیگ هد بوده است. تغییرات مشاهده شده در ماهی آمور مشابه سه گونه دیگر بوده و کماکان آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت را داشته است. نتایج همچنین حاکی از کارآیی بالاتر آنزیمهای باکتریایی نسبت به آنزیمهای حیوانی بوده است. آنزیم پروتامکس و آنزیمهای حیوانی نسبت به تیمار شاهد نیز ضعیف تر بودند.

جدول۴-۵۲ : نتایج جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آمور تهیه شده از چهار آنزیم آلکالاز ، پروتامکس ، پپسین و تریپسین و مقایسه آن با محیط کشت TSB

زمان	آلکالاز	پروتامکس	پپسین	تریپسین	TSB
صفر	۰.۵۲±۰.۰۵dA	۰.۵۲±۰.۰۵dA	۰.۵۲±۰.۰۴dA	۰.۵۵±۰.۰۴dA	۰.۴۵±۰.۰۴dA
۶	۳.۲۱±۰.۰۴cA	۲.۹۱±۰.۰۶cA	۲.۲۶±۰.۰۵cB	۲.۱۲±۰.۰۶cB	۲.۳۶±۰.۰۶cA
۱۲	۵.۲۳±۰.۰۳bA	۴.۷۵±۰.۰۵bA	۴.۲۴±۰.۰۶bB	۴.۰۳±۰.۰۵bB	۴.۲۴±۰.۰۷bA
۱۸	۶.۷۰±۰.۰۶aA	۵.۷۵±۰.۰۴aA	۵.۵۴±۰.۰۴aB	۵.۲۲±۰.۰۳aB	۵.۸۰±۰.۰۶aAB

- حروف کوچک و بزرگ متفاوت به ترتیب در ستون و ردیف نشاندهنده وجود اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

۵- بحث

۵-۱- درجه هیدرولیز و میزان پروتئین هیدرولیز شده و تاثیر pH ، دما و زمان بر آنها

در این مطالعه، در تیمارهای دارای آنزیم آلکالاز بیشترین درصد پروتئین مشاهده شده و تیمارهای دارای آنزیم پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. بهترین pH ، دما و زمان برای آنزیم آلکالاز ۸/۵، ۵۵ درجه و زمان ۹۰ دقیقه بود. این شرایط برای آنزیمهای پروتامکس، پپسین و تریپسین به ترتیب ۷/۵، ۵۵ و زمان ۹۰ دقیقه ، ۳/۵، ۳۷ درجه و زمان ۹۰ دقیقه و ۷، ۳۷ درجه و زمان ۹۰ دقیقه بود. بنابراین با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت آنزیم نیز افزایش یافته و درصد پروتئین محلول نیز بیشتر خواهد بود. البته این فرآیند برای آنزیمهای مختلف متفاوت بوده و برخی از آنزیمها نظیر آلکالاز در زمانهای اولیه بیشترین فعالیت را نشان داده و بعد از آن شرایط ثابتی پیدا می کنند. آنزیم آلکالاز در حضور سوبستراهای مختلف واکنشهای متفاوتی نشان میدهد. در این مطالعه بیشترین فعالیت آنزیمها در دقیقه ۹۰ بوده است. مطالعات انجام شده توسط Dong و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Guerard و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت آنزیم آلکالاز در ۲۰ دقیقه اول هیدرولیز بوده و در زمان اولیه بیشترین تجزیه پروتئینی رخ داه و بعد از آن روند هیدرولیز بصورت بطئی افزایش می‌یابد. نتایج این مطالعه حاکی از افزایش فعالیت آنزیم و متعاقب آن افزایش میزان پروتئین برای چهار آنزیم بوده و بیشترین افزایش نیز در زمان ۹۰ دقیقه بوده است.

مطالعات انجام شده توسط Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دهنده آنست که با افزایش زمان هیدرولیز امعاءو احشاء ماهی قره برون از ۳۰ دقیقه به ۲۰۵ دقیقه روند هیدرولیز افزایش نسبی پیدا می‌کند ولی این روند در دماهای مختلف متفاوت بوده بطوریکه برای دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد درجه هیدرولیز در زمان ۳۰ دقیقه به ۱۰/۵ درصد افزایش یافته و تا زمان ۲۰۵ دقیقه در همین دامنه ثابت می‌ماند. در دمای ۴۵ درجه روند افزایش سریعتر بوده و از ۱۰/۲۵ در زمان ۳۰ دقیقه به ۳۵/۲۷ درصد افزایش می یابد. با افزایش دما به ۵۵ درجه این روند افزایش معنی‌داری داشته و به ۶۴/۱۳ در زمان ۲۰۵ دقیقه می رسد. نتایج نشان دهنده آنست که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز بسته به دمای مورد استفاده تغییرات معنی‌داری کرده و افزایش آن به دمای مورد استفاده بستگی دارد. در مطالعه حاضر بهترین دما برای آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس ۵۵ درجه بوده که با مطالعه فوق همخوانی دارد.

نتایج مطالعات Kristinsson & Rasco, 2000b درخصوص هیدرولیز ماهی آزاد نشان می‌دهد که روند هیدرولیز با افزایش طولانی تر زمان کاهش یافته و ثابت باقی می‌ماند. آنها علت این امر را کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم، مهار آنزیم و غیر فعال شدن آن بیان کردند. بدلیل نبود سوبسترای لازم جهت هیدرولیز فراتر، بالطبع فعالیت آنزیمی کاهش و روند هیدرولیز ثابت می‌ماند. مطالعه فوق با مطالعه حاضر همخوانی ندارد. شاید با طولانی تر کردن زمان هیدرولیز نتایج مشابه نتایج فوق حاصل گردد. با ادامه هیدرولیز تا ۹۰ دقیقه ، به

نظر می رسد که در این زمان، هنوز سوبسترای لازم جهت هیدرولیز در اختیار آنزیمها قرار داشته و آنزیمهای مورد استفاده کماکان به فعالیت خود جهت تجزیه فراتر زنجیره های پپتیدی ادامه میدهند.

مطالعات Shahidi و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان داده که درجه هیدرولیز با افزایش دما افزایش یافته بطوریکه درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی کاپلین در دمای ^{o}۶۵ با استفاده از آنزیم آلکالاز ۲۲ درصد بوده‌است. در خصوص آنزیم آلکالاز بایستی اشاره نمود که بهترین دما برای فعالیت این آنزیم بین ۵۰ تا ۵۷ درجه بوده ولی این آنزیم قادر به فعالیت در دماهای پایین‌تر و بالاتر و همچنین دامنه pH ۸/۵-۷ نیز می‌باشد.

در مطالعه حاضر کارآیی آنزیم آلکالاز بیشتر از آنزیم پروتامکس بوده است. آلکالاز باعث تولید اسیدهای آمینه قابل دسترسی بیشتری شده و به نوعی مکمل فعالیت پروتئازی باکتری مورد استفاده در جهت هیدرولیز فراتر پپتیدها و متعاقب آن تولید اسیدهای آمینه‌های آزاد می‌باشد. مطالعات Aspmo و همکاران در سال ۲۰۰۵b نشان می‌دهد که پپتیدهای تولید شده از فعالیت پروتئازی آنزیم آلکالاز دارای پپتیدهایی با زنجیره کوتاهتر بوده و از این رو سوبسترای مناسبی برای تجزیه میکروبی می باشند این در حالیست که آنزیم پروتامکس دارای فعالیت پروتئازی کمتری نسبت به آنزیم آلکالاز برخوردار بوده و پپتیدهای تولید شده بصورت پپتیدهای با زنجیره بلندتر می‌باشند. وزن مولکولی پپتیدهای تولید شده از فعالیت آنزیمی الکالاز دارای وزن مولکولی پایین‌تری بوده و از این‌رو سریعتر تحت تاثیر تجزیه قرار می‌گیرند. از طرفی با توجه به وزن مولکولی پایین، حلالیت آنها نیز افزایش می یابد. (Kristinsson and Rasco, 2000).

Liast و همکاران (2000)، ماهی های Atlantic salmon, Atlantic cod را با استفاده از ۳ آنزیم نوتراز ، آلکالاز و پپسین به مدت ۱ ،۱۵ ،۳۰ ،۴۵، ۶۰ ،۹۰ ،۱۲۰ دقیقه هیدرولیز کردند. نتایج نشان داد که میزان بازیافت پروتئین(بعد از ۱۲۰ دقیقه) از ۳۰ به ٪۷۰-۶۰ رسید و دو برابر میشود. آنها به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان آنزیم آلکالاز بازیافت پروتئینی بالاتری نسبت به آنزیم ها و زمانهای دیگر دارد. در واقع سینیتیک بازیافت پروتئین در طی هیدرولیز آنزیمی به دو قسمت تقسیم می شود یک واکنش اولیه سریع که در آن زنجیره های پلی پپتیدی با باندهای ضعیف از ذرات پروتئینی نامحلول جدا می شوند و یک واکنش آهسته تر که در آن پروتئین های مرکزی زنجیره شکسته می شوند. بنابراین کل بازیافت پروتئین مربوط به کاهش فعالیت آنزیمی، اشباعیت سوبسترا یا بازداری محصول می باشد. با گذشت بیش از حد زمان روند هیدرولیز کاهش پیدا میکند. در واقع بخشی از پروتئینهای هیدرولیز شده محلول در طول فاز اولیه هیدرولیز می شوند اما پس ازمدتی غلظت زیاد این پپتیدهای محلول در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش می دهد (shahidi et al.,1995). احتمالا علت آن مربوط به کاهش فعالیت آنزیمی و اشباعیت سوبسترا می باشد .(Diniz & Martin ,1995; Mutilang et al., 1995).

از دلایل کاهش سرعت هیدرولیز میتوان به مواردشاره نمود:

با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می کند، همچنین، از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاسته می شود .از طرف دیگر، شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می تواند در این امر دخیل باشد (Guerard et al., 2005).

در مطالعه حاضر از چهار آنزیم پروتئولیتیکی به منظور هیدرولیز ضایعات ماهیان گرمابی استفاده گردید. آنزیمهای مورد استفاده به دو گروه باکتریایی و حیوانی تقسیم شدند. آلکالاز و پروتامکس جزء آنزیمهای باکتریایی بوده که به ترتیب از باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس استخراج میشوند. آنزیمهای مذکور جزء پروتئازهای قلیائی بوده و در pH و دمای بالا ، بیشترین فعالیت آنزیمی را نشان می دهند. پپسین و تریپسین نیز جزء آنزیمهای حیوانی بوده که به ترتیب در pH اسیدی و خنثی بیشترین فعالیت را نشان می دهند. آنزیم های مذکور جزء آنزیم های گوارشی بوده و در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه بیشترین فعالیت را دارا می باشند. نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت آنزیمهای باکتریایی بیشتر از آنزیمهای حیوانی بوده و میزان پروتئین و درجه هیدرولیز ناشی از فعالیت آنزیمهای باکتریایی بیشتر از آنزیمهای حیوانی (در زمانهای مختلف و همچنین ۴ گونه ماهی) بوده است. نتایج مشابه در مطالعات Klomklao et al 2008 مشاهده شده است.

در مطالعات انجام شده در سال (۲۰۰۹) اپتیمم شرایط هیدرولیز ضایعات ماهی (*Huso huso*) beluga sturgeon به منظور رسیدن به درجه هیدرولیز ۳۰٪ ، دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و زمان ۱۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم آلکالاز ۳۴ آنسون یونیت بر کیلوگرم بوده است(Ovissipour et al.,2009a) .

در پژوهشی در سال ۲۰۰۸ بهینه شرایط هیدرولیز برای ضایعات پروتئینی هیدرولیز شده از (*Catla catla*) Indian Carp به منظور دست یافتن به درجه هیدرولیز ۵۰٪، دمای ۱۳۵ دقیقه، دمای oC ۵۵ و غلظت آنزیم آلکالاز ۳۴ آنسون یونیت بر کیلوگرم بوده است(Bhaskar et al., 2008) . درجه بالای هیدرولیز تلخی را کاهش می دهد (Alder- Nissen 1984).

در تحقیقی در سال (۲۰۰۵) که بر روی کنسانتره محلول ماهی توسط دو آنزیم فلاورزیم (Flavourzyme) و کوجیزیم (Kojizyme) انجام گرفت بیشترین ضریب رگرسیون در میان متغیرهای خطی مربوط به زمان بود و تاثیر متقابل در آنزیم فلاورزیم بین آنزیم و زمان معنی دار بود و در آنزیم کوجیزیم اثر متقابل بین هیچکدام از متغیرها معنی دار نبود و نتایج بدست آمده نشان داد درجه هیدرولیز با افزایش زمان افزایش می یابد بالاترین مقدار درجه هیدرولیز ۶۲٪ و در شرایط بهینه دمایی oC ۴۵ و زمان ۶ ساعت و غلظت آنزیمی LAPu/gr ۵۰ برای آنزیم فلاورزیم، درجه هیدرولیز ۶۸٪ و شرایط بهینه دمایی ۵۰ درجه سانتیگراد و زمان ۶ ساعت و غلظت آنزیمی LAP/gr ۴۰ برای آنزیم کوجیزیم گزارش شد (Nilsang et al.,2005).

در بین ماهیان مورد بررسی ماهی آمور از وضعیت بهتری برخوردار بوده و میزان پروتئین و درجه هیدرولیز در تیمارهای مختلف حاوی پروتئین هیدرولیز شده این ماهی در مقایسه با سایر ماهیان مورد بررسی بیشتر بوده و ماهیان فیتوفاگ، کپور معمولی و بیگ هد در مراحل بعدی قرار داشتند. علت این امر ممکن است به نوع رژیم

غذایی ماهی آمور ، میزان و نوع پروتئینهای موجود در ضایعات و طول زنجیره های پپتیدی موجود بستگی داشته باشد.

پروتئین تولید شده از چهار گونه از ماهیان گرمابی، فریز درای شده و از نظر آنالیز کیفی مورد بررسی قرار گرفتند. خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده در مرحله پایانی یکی از پرهزینه ترین مراحل تولید پروتئین می باشد. برای خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده از دستگاه اسپری درایر (Spray Dryer) و یا فریز درایر استفاده میشود. فریز درایر به منظور تولید پروتئین در شرایط آزمایشگاهی و اسپری درایر جهت تولید در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار میگیرند. مطالعات نشان داده که میزان پروتئین کل در محصول نهایی بین ۶۰ تا ۹۱ درصد بوده و بالاترین مقدار را بخود اختصاص میدهد. میزان چربی بین ۲ تا ۱۱/۲ درصد، میزان رطوبت بین ۳/۹ تا ۸/۵ درصد و میزان خاکستر بین ۶ تا ۱۲/۵ درصد می باشد. بسته به نوع ماهی و نوع و درصد آنزیم، پارامترهای کیفی حاصله متغیر بوده و دارای مقادیر متفاوتی می باشند. مطالعات نشان داده که به منظور کاهش تلخی و افزایش زمان ماندگاری پروتئین هیدرولیز شده، میزان چربی بایستی کمتر از ۰/۵ درصد باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان پروتئین کل در محصول نهایی در تیمار حاوی آنزیم آلکالاز بیشترین مقدار را بخود اختصاص داده و تیمارهای حاوی آنزیمهای پروتامکس، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. میزان پروتئین در نمونه خام در چهار گونه مورد بررسی بین ۱۵ تا ۱۸ بوده که بعد از هیدرولیز میزان بازیافت پروتئینی افزایش یافته و به بالاتر از ۶۰ درصد رسید. مطالعات نشان میدهد که میزان پروتئین در محصول نهایی به نوع آنزیم و سوبسترای مورد استفاده بستگی دارد. با توجه به نتایج بدست آمده میزان پروتئین در تیمار دارای آنزیم آلکالاز و ماهی آمور دارای بالاترین مقدار پروتئین بوده و ماهیان فیتوفاگ ، کپور معمولی و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشته و در هر کدام از سوبستراهای مذکور آنزیم آلکالاز دارای بهترین نتایج بوده است. در مطالعه انجام شده توسط Ovissipour et al 2009 در ارتباط با ماهی قره برون ، مشخص گردید که میزان پروتئین در محصول نهایی خشک شده حدود ۶۵ درصد بوده و میزان چربی آن نیز زیر ۰/۵ درصد بوده است

۲-۵- بررسی تاثیر محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از ماهیان گرمابی بر رشد باکتریهای گروه لاکتیک و مقایسه آن با محیط کشت MRS

نتایج آنالیز جذب نوری در مورد باکتری های لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس دلبروکی،لاکتوباسیلوس پلانتاروم،لاکتوباسیلوس کازئیی و استرپتوکوکوس ترموفیلوس نشان داد که در اکثر موارد ، تیمارهای حاوی آنزیم آلکالاز و پروتامکس در سطح معنی داری بهتر از محیط کشت MRS بوده (بجز لاکتوباسیلوس کازئیی) ولی پپتونهای تولید شده از تیمارهای پپسین و تریپسین ضعیف تر از محیط کشت MRS بودند. در بین باکتریهای مورد استفاده ، استرپتوکوکوس ترموفیلوس در مقایسه با باکتریهای دیگر دارای بهترین رشد بوده و لاکتوباسیلوس دلبروکی، پلانتاروم و کازئیی در مرحله بعد قرار داشتند. علت رشد متغیر باکتریهای لاکتیک

بدلیل نیازمندیهای غذایی متفاوت بوده و وجود یا عدم وجود اسیدهای آمینه بر روند رشد باکتریهای مورد استفاده تاثیر گذار می باشد.

در مطالعه انجام شده توسط کاظمی تبار و همکاران در سال ۱۳۹۱ از ضایعات ماهی کیلکا به منظور کشت برخی از باکتریهای لاکتیک (باکتریهای استارتر در صنایع لبنی) استفاده شد. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که پروتئین تولید شده از ماهی کیلکا باعث تقویت رشد باکتریهای آغازگر شده و نسبت به نمونه شاهد دارای اختلاف معنی دار بوده است. نتایج تحقیقات کاظمی تبار مشابه مطالعه حاضر بوده است. آنزیمهای مورد استفاده نیز آلکالاز بوده است.

در تحقیقی مشابه از پروتئین هیدرولیز شده به روش آنزیمی ضایعات حاصل از صنایع فرآوری هشت پا به عنوان منبع پپتون جهت رشد باکتری های اسید لاکتیکی (لاکتوکوکوس لاکتیس و پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی) برای تولید نایسین و پدیوسین استفاده گردید. نتایج نشان داد که میتوان از پپتون های دریایی بعنوان جایگزین مناسب و قابل دسترسی برای محیط کشت های تجاری رایج و گران قیمت استفاده نمود (Vazquez et al., 2008b). در یک بررسی که با مطالعه حاضر مطابقت دارد،از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی تون با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پروتامکس به منظور کشت گونه‌های مختلف باکتری‌های گروه لاکتیک استفاده شد.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 ۱۰ گرم در مقایسه با ۱۸ گرم (پپتون در محیط کشت تجاری MRS) بوده است (Safari et al, 2009). مقدار پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده در این تحقیق ۱۵ گرم در لیتر بوده است.

محققان اثر امعاء و احشاء ماهی کاد و تغییرات فصلی را بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس ساکای بررسی کردند. نتایج نشان داد که که لاکتوباسیلوس پلانتاروم بدون در نظر گرفتن نوع پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده و اندک تغییرات فصلی، رشد بسیار خوبی از خود نشان داد. نتایج مطالعه فوق با تحقیق حاضر مطابقت دارد. اما با این وجود لاکتوباسیلوس ساکای بخاطر دارا بودن نیازهای غذایی بیشتر نسبت به پلانتاروم، رشد کمتری را نشان داد و رشد این باکتری به هر دو فاکتور پروتئین هیدرولیز شده و تغییرات فصلی وابسته می باشد. این نتایج نشان می دهد که در تهیه پپتون های میکروبی از امعاء و احشاء، تغییرات فصلی بایستی مورد توجه قرار گیرد، به طوری که پپتون تهیه شده برای باکتری های پرنیاز، از نظر تغذیه ای، قابل استفاده باشد (Horn et al., 2007). ترکیب اسیدهای آمینه یکی از عوامل تعیین کننده رشد این گروه از باکتریها می‌باشد. لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیاز به اسید آمینه آرژنین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین و پانتونیک اسید داشته ولی لاکتوباسیلوس ساکی نیاز به اسیدهای آمینه اضافی نظیر لیزین، میتونین، ریبوفلاوین و نیکوتنیک اسید دارد. به لحاظ کمبود و یا نبود برخی از اسیدهای آمینه ذکر شده در پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون، رشد لاکتوباسیلوس ساکی کمتر از سایر گونه‌ها می‌باشد. این گونه پر نیازترین گونه جنس لاکتوباسیلوس بوده و اگر

این گونه در محیط کشت خاصی رشد مطلوب داشته باشد می‌توان پیش‌بینی نمود که سایر گونه‌ها براحتی در محیط مورد استفاده رشد خوبی خواهند داشت (Lauret et al., 1996, Moretro et al., 1998).

مطالعه انجام شده در مورد اثر سیلاژ بیولوژیک تهیه شده از امعاء واحشای میگو و شمشیر ماهی بر رشد برخی از باکتری لاکتیک، نشان داد که باکتریهای لاکتیک کشت داده شده در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده میگو و شمشیر ماهی دارای بالاترین رشد بوده و متابولیتهای مختلفی از خود تولید می کنند (Vazquez et al., 2011). مطالعه حاضر نیز نشان دهنده تقویت رشد باکتریهای لاکتیک در حضور پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهیان گرمابی بوده و در این میان ماهی آمور دارای بهترین شرایط بوده و سوبسترای مناسبی جهت رشد باکتریهای گروه لاکتیک می باشد.

در مطالعه انجام شده توسط Beaulieu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی هرینگ و ماکرل به عنوان محیط کشت جدید برای ۶ گونه باکتری(۳ باکتری لاکتیک و ۳ باکتری غیر لاکتیک) باعث تقویت رشد باکتریهای مورد استفاده شده که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در مطالعه انجام شده توسط Aspmo و همکاران در سال ۲۰۰۵ از ۵ گرم پپتون تهیه شده از **ماهی کاد آتلانتیک** بجای ۲۲ گرم از پپتون تجاری به منظور کشت باکتری‌های گروه لاکتیک استفاده شد. نتایج نشان داد که هر چند غلظت ۵ گرم باعث تقویت رشد باکتری‌های این گروه می شود ولی در مقایسه با ۲۲ گرم از پپتون تجاری پایین‌تر می‌باشد.Gildberg و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش کردند که روند رشد باکتریهای لاکتیک در حضور دو سوبسترای اختصاصی، متفاوت می باشد. نتایج نشان داد که باکتری‌های گروه لاکتیک در حضور سوبسترای حاوی پروتئین هیدرولیز شده ماهی Blue whiting بهتر از ماهی کاپلین رشد داشته‌اند.

۳-۵- بررسی تاثیر محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از ماهیان گرمابی بر سایر باکتریهای مورد استفاده و مقایسه آن با محیط کشت TSB

نتایج آزمایشات انجام گرفته در این تحقیق نشان داد که بهترین میزان رشد در جنس سودوموناس (دو گونه آئروجینوزا و پوتیدا) مشاهده شده و بعد از آن جنس باسیلوس (لیکنوفورمیس ، سوبتی لیس) استرپتوکوکوس فسیوم و لیستریا مونوسیتوژنز قرار داشتند. در تیمارهای مربوط به آنزیم آلکالاز بهترین رشد مشاهده شده و تیمارهای مربوط به پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین در مرحله بعد قرار داشتند. در مقایسه ضایعات مورد استفاده نیز ماهی آمور دارای بهترین شرایط جهت رشد باکتریهای مورد استفاده بوده و ماهیان فیتوفاگ ، کپور معمولی و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند. جنس سودموناس بعلت تولید آنزیمهای مختلف قادر به رشد در شرایط متفاوت بوده و توانایی رشد در محیطهای حداقل را نیز دارا می باشد. بنابراین رشد این باکتری در محیط دارای ۱۵ گرم در لیتر از پپتون ماهی بخوبی صورت گرفته (در مقایسه با ۲۰ گرم در لیتر پپتون در محیط تجاری TSB) و باکتری دارای حداقل زمان برای فاز سکون بوده و به سرعت وارد فاز رشد لگاریتمی شده و بیوماس آن

افزایش می یابد. در مقایسه دو گونه سودوموناس، گونه پوتیدا پرنیازتر از گونه آئروجینوزا بوده و جذب نوری آن در زمانهای مختلف اندکی کمتر بوده ولی با این وجود اختلاف معنی داری مابین آنها وجود نداشته است.

باکتری بعدی باسیلوس بوده که از نظر رشد در محیط حاوی پپتون ماهی در مرحله دوم قرار داشته است. تیمارهای مربوط به آنزیم آلکالاز و همچنین ضایعات ماهی آمور از جمله بهترین تیمارهای مورد استفاده بوده و آنزیمهای پروتامکس، شاهد، پپسین و تریپسین و همچنین ماهیان فیتوفاگ، کپور معمولی و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند. باسیلوسها از جمله باکتریهای اسپور دار بوده و قادر به رشد در محیطهای مختلف می باشند. این گروه از باکتریها جزء باکتریهای عمومی بوده و نیازی به ترکیبات پیچیده جهت رشد نمی باشند. در صورت نامناسب شدن شرایط محیطی، سلولهای رویشی به اسپور تبدیل شده و مجددا با فراهم شدن شرایط از نظر غذایی ، اسپورها به سلول رویشی تبدیل میشوند. دو گونه مورد استفاده در این تحقیق لیکنوفورمیس و سوبتی لیس بوده که به ترتیب تولید کننده آنزیمهای آلکالاز و پروتامکس نیز می باشند. رشد دو گونه فوق در محیط سنتتیک تهیه شده از ضایعات ماهیان گرمابی اختلاف معنی داری با هم نداشتند. بنابر این از محیطهای مذکور میتوان به منظور تولید پروتئین تک یاخته از جنس باسیلوس جهت استفاده در تحقیقات بیوتکنولوژی از جمله تولید آنزیمهای پروتئولیتکی استفاده کرده و قیمت تمام شده محیط کشت را تا حد قابل توجهی کاهش داد.

استرپتوکوکوس فسیوم یکی دیگر از جنسهای باکتریایی بوده که در محیط حاوی پپتونهای تولید شده از ضایعات ماهیان گرمابی کشت داده شد. این باکتری یکی از گونه های بیماریزای فرصت طلب در حیوانات از جمله ماهی محسوب شده و بهمراه گونه های دیگر از جمله اینیه ، آگالاکتیکه، اوبریس و دیس گالاکتیکه از ماهیان سردآبی جدا شده است. این باکتری جهت رشد نیاز به محیط کشت نسبتا مغذی از جمله آگار خوندار و یا تریپتیک سوی آگار دارد. در این مطالعه جهت کشت فسیوم از محیط TSB استفاده شده و نتایج نشان داد که رشد آن در مقایسه با باکتریهای عمومی مثل باسیلوس و سودوموناس بهتر بوده ولی در مقایسه با باکتریهای لاکتیک کندتر بوده و مشابه استرپتوکوکوس ترموفیلوس عمل کرده و از نظر نیازمندیهای غذایی مشابه این گونه می باشد. مشابه سایر باکتریها تیمار مربوط به آنزیم آلکالاز و ماهی آمور بهترین نتایج را نشان دادند.

آخرین باکتری که از نظر رشد در محیط حاوی پپتون ماهیان گرمابی مورد استفاده قرار گرفت لیستریا مونوسیتوژنز بود. این باکتری یکی از باکتریهای بیماریزای اجباری بوده و عامل مسمومیت غذایی و سقط جنین می باشد. نیازمندیهای رشد لیستریا بسیار بالا بوده و جهت رشد نیاز به محیط های بسیار مغذی دارد. از مهمترین محیطهای کشت مورد استفاده میتوان به Palcam agar ، Listeria selective agar ، UVM1 و UVM2 و Listeria Chrome agar اشاره نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که رشد لیستریا در محیط حاوی پپتونهای ماهیان گرمابی متغیر بوده و در تیمارهای دارای آنزیم آلکالاز و پروتامکس قویتر از تیمارهای دارای پپسین و تریپسین بوده و در تیمارهای تهیه شده از ماهی آمور بهتر از سایر گونه ها بوده است.

در مطالعه انجام شده توسط Safari و همکاران در سال ۲۰۱۰ ، از سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ گرم از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی فیتوفاگ به منظور کشت ویبریوآنگوئیلاروم استفاده شده و تاثیر میزان پپتون مورد استفاده، بر روند رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رشد ویبریو آنگوئیلاروم در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ گرم در لیتر از پپتون کمتر از محیط کشت تجاری بوده است. در مطالعه حاضر از غلظت ۱۵ گرم در لیتر پپتون استفاده شد و نتایج حاکی از رشد بهینه باکتریهای مورد استفاده در تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی فیتوفاگ (تیمارهای آلکالاز و پروتامکس) داشته و رشد در تیمارهای مربوط به پپسین و تریپسن ضعیف تر از نمونه شاهد بوده که با مطالعه مذکور مغایرت دارد. علت این امر نیازمندیهای متفاوت ویبریو بوده که در حضور غلظتهای بیشتر پپتون ، رشد خوبی از خود نشان می دهد. ترکیب متفاوت اسیدهای آمینه امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ ممکن است باعث تقویت رشد باکتریهای مورد استفاده در مطالعه حاضر ، در مقایسه با پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی فیتوفاگ، گردد که نیاز به مطالعه بیشتر و آنالیز پروفایل اسیدهای آمینه می‌باشد

در مطالعه دیگر از محیط کشت حاوی پپتون ماهی به منظور رشد باکتری های بیماریزا و پروبیوتیک (ویبریو، روزئوباکتر و سودوموناس) استفاده گردید. نتایج 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 (Vazquez et al., 2004b) .

در تحقیقی که بر روی تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاد توسط آنزیم های مختلف به منظور استفاده از آن در محیط کشت باکتری به عنوان منبع نیتروژن، آمینو اسید و ویتامین ها انجام شد نتایج مشابه مطالعه حاضر بدست آمده و مشخص گردید که پروتئین هیدرولیز شده میتواند بعنوان جایگزین مناسب نیتروژن جهت رشد میکروارگانیسم های مختلف مورد استفاده قرار گیرد(Aspmo et al., 2005).

مطالعه Ellouz و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که به هنگام استفاده از پودر سر و امعاء واحشاء ماهی ساردین جهت تولید آنزیم پروتئاز از باکتری باسیلوس سوبتی لیس، میزان تولید آنزیم در مقایسه با محیطهای کشت تجاری ، افزایش ۱۰۰ درصدی داشته است.

نتایج تحقیقات Vazquez و همکاران در سال ۲۰۰۴a نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده آبزیان (۱۵ مورد از پروتئین هیدرولیز شده انواع ماهیان) نه تنها باعث تقویت رشد باکتری مورد استفاده می شود(برخی از باکتریهای گرم منفی و مثبت) بلکه بعنوان محیط کشت در جهت تولید انواع متابولیسم‌های میکروبی (باکتریوسین‌ها) و همچنین پروتئین تک یاخته نیز مناسب می‌باشد.

در مطالعه انجام شده توسط پورکیا و همکاران در سال ۱۳۹۱ از ضایعات سر ماهی بیگ هد به عنوان محیط کشت میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید. نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز بالا در پپتون تولید شده از آنزیم آلکالاز باعث تسریع جذب پپتون در محیط کشت مورد استفاده شده و از اینرو روند رشد

استافیلوکوکوس اورئوس در پپتون مربوط به تیمار آلکالاز بهتر از پروتامکس بوده است زیرا پپتون‌های تولید شده در این تیمار از نظر وزن مولکولی و طول زنجیره پپتیدی در وضعیت مناسب تری (بعنوان سوبسترای باکتریایی) قرار داشتند. نتایج همچنین نشان داد که ۱۵ گرم از پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی بیگ هد باعث تقویت رشد استافیلوکوکوس اورئوس شده و بهتر از محیط کشت تجاری پاسخ داده که با مطالعه حاضر کاملا همخوانی دارد.

در مطالعه انجام شده توسط والاتبار و همکاران در سال ۱۳۹۰ از امعاء و احشاء ماهی کپور جهت رشد دو باکتری بیماریزای ماهی استفاده گردید. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور معمولی باعث تقویت رشد ویبریو آنگوئیلاروم (Vibrio anguillarum) و آئروموناس سالمونیسیدا (Aeromonas salmonicida) شده و تیمار مربوط به آلکالاز بهتر از پروتامکس جواب داده که با مطالعه حاضر در خصوص ضایعات ماهی کپور معمولی و تاثیر آن بر رشد باکتریهای شاخص همخوانی دارد.

در مطالعه انجام شده توسط صفدری و همکاران در سال ۱۳۹۰ از امعاء و احشاء ماهی بیگ هد به منظور ارزیابی رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده گردید. آنزیمهای مورد استفاده در تحقیق مذکور پاپائین، پپسین و تریپسین بوده که در زمانهای مختلف با نمونه شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که آنزیم پاپائین نسبت به دو آنزیم دیگر و شاهد بهتر عمل کرده و نمونه شاهد نیز نسبت به آنزیمهای پپسین و تریپسین دارای عملکرد بهتری بوده است. در مطالعه حاضر از آنزیم پاپائین استفاده نشده ولی تیمارهای مربوط به پپسین و تریپسین مطالعه صفدری و همکاران مشابه مطالعه حاضر بوده و ضعیف تر از نمونه شاهد عمل کردند.

۶- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که با استفاده از هیدرولیز آنزیمی، میتوان پروتئین موجود در ضایعات ماهی گرمابی را مجددا بازیابی نموده و در جهت تهیه محیطهای کشت میکروبی مورد استفاده قرار داد. در بین آنزیمهای مورد استفاده، آلکالاز دارای بالاترین کارآیی بوده و تیمارهای مربوط به این آنزیم دارای بیشترین میزان پروتئین محلول و درجه هیدرولیز در زمانهای مختلف بوده اند. آنزیمهای پروتامکس ، پپسین و تریپسین در رتبه های بعدی قرار داشته اند. در بین ماهیان مورد بررسی ، ماهی آمور با داشتن بیشترین پروتئین محلول و درجه هیدرولیز (به دنبال استفاده از آنزیمهای پروتئازی باکتریایی و حیوانی) بهترین نتایج را بهمراه داشته و ماهیان فیتوفاگ ، کپور معمولی و بیگ هد در مرحله بعد قرار داشتند. درصد فاکتورهای کیفی در محصولات فریز درایر شده نشان داد که در تیمارهای مربوط به آنزیم آلکالاز و پروتامکس بیشترین درصد پروتئین مشاهده گردید. میزان چربی در تیمار مربوط به آلکالاز کمتر از ۰/۵ بوده و میتوان از آن در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود. نتایج آنالیز کیفی حاکی از درصد بالای بازیافت پروتئینی در تیمارهای آنزیمی می باشد.

نتایج ارزیابی رشد باکتریهای شاخص در محیط حاوی پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که رشد سودموناسها و باسیلوسها بهتر از سایر باکتریها صورت گرفته که حاکی از عدم نیاز غذایی پیچیده این گروه از باکتریها می باشد. لیستریا مونوسیتوژنز، استرپتوکوکوس فسیوم و باکتریهای گروه لاکتیک در مرحله بعد قرار داشتند. باکتریهای گروه اخیر بعلت پرنیاز بودن، دارای رشد ضعیف تری بوده ولی با این وجود رشد باکتریها در تیمارهای مربوط به آلکالاز و پروتامکس بهتر از نمونه شاهد بوده است (بجز لاکتوباسیلوس کازئیی). لازم به ذکر است در تیمارهای مربوط به آنزیم آلکالاز و همچنین ضایعات ماهی آمور ، بیشترین رشد باکتریایی مشاهده گردید.

با مدیریت صحیح جمع آوری ضایعات آبزیان، میتوان از ضایعات دور ریختنی مذکور، ماده با ارزش پروتئینی با درصد پروتئین بالا تولید کرده و از آن در فرمولاسیون محیطهای کشت میکروبی استفاده نمود. با تولید انواع محیطهای میکروبی، جلوی واردات محیط های کشت میکروبی با قیمت بسیار بالا به کشور گرفته شده و سالانه مبالغ بسیار بالایی صرفه جویی میگردد. تهیه پپتون آبزیان با دو منظور قابل استفاده بوده که اول بعنوان پپتون تنها و خالص با درجه خلوص بالا تهیه شده از ضایعات ماهی و دوم بعنوان منبع نیتروژن در فرمولاسیون انواع محیطهای کشت عمومی و انتخابی.

پیشنهادها

۱- استفاده از آنزیمهای پروتئاز به منظور تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهیان مختلف دریایی و پرورشی

۲- مقایسه آنزیمهای حیوانی، گیاهی و میکروبی در جهت هیدرولیز سوبستراهای مختلف

۳- ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و کاربردی پروتئین هیدرولیز شده

۴- مقایسه محصولات مختلف در جهت کشت میکروبهای عمومی و پرنیاز

۵- ارزیابی اقتصادی پروتئین هیدرولیز شده از منابع مختلف آبزیان و مقایسه قیمت آن با پپتونهای تجاری و تجاری سازی محصولات تولید شده

۶- مقایسه درصد های تولیدی پروتئین ضایعات ماهیان دریایی و پرورشی

منابع

- آمار آبزیان . ۱۳۹۰. معاونت تولید و بهره برداری . سازمان شیلات ایران.
- اویسی پور م.، قمی م.ر۱۳۸۷ . بیوتکنولوژی در تولید فرآوردههای دریایی .انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن .۱۰۴ ۳۷.
- پورکیا، م. قبادی، ح. صفری، ر. ۱۳۹۱. استفاده از ضایعات سر ماهی بیگ هد به عنوان محیط کشت میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس. پایان نامه کارشناسی ارشد.
- پورغلام، ر. مکرمی، ع. سعیدی، ع. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر استرپتوکوکوس فسیوم بر شاخصهای هماتولوژی ماهی قزل آلا. مجله علمی شیلات ایران.۲. ۷۱.
- تقی اف،م.،قمی، م.ر.،اویسی پور،م.(۱۳۸۹).تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعای واحشای فیل ماهی(*Huso huso*)بااستفاده از آنزیم آلکالاز.مجله شیلات،سال چهارم،شماره اول،بهار ۸۹
- صفدری، م. سعیدی اصل، م. صفری، ر. ۱۳۹۰. استفاده از ضایعات امعاء و احشاء ماهی بیگ هد به عنوان محیط کشت میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم . پایان نامه کارشناسی ارشد.
- کاظمی تبار، ض. معتمدزادگان، م.ع. صفری ، ر. ۱۳۹۱. طراحی محیط کشت جدید بر پایه پروتئین تهیه شده از ماهی کیلکا به منظور کشت برخی از باکتری های استارتر در مواد غذایی. پایان نامه کارشناسی ارشد.
- والاتبار، س. حضایی، ر. صفری ، ر. ۱۳۹۰. استفاده از امعاء و احشاء ماهی کپور پرورشی جهت کشت دو باکتری ویبریو آنگوئیلاروم و آئروموناس هیدروفیلا. پایان نامه کارشناسی ارشد.

- AOAC 2005. Official Methods of Analysis. Sixteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VGH. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. Process Biochem 40: 1957–1966.
- 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
- Baca, D. R., Pena-Vera, M. T., & Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases: yield and nutritional value. Journal of Food Science, 56, 309–314.
- Beaulieu,L., Desbiens,M., Thibodeau,J., Sharon Thibault.SH. (2009).pelagic fish hydrolysates as peptones for bacterial culture media. Canadian Journal of Microbiology,55,11,1240-1249.
- Benjakul B, Morrissey MT. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. J Agric Food Chem 45: 3423–3430.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & 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 Technolo5gy, 99(2), 335–343
- Bhaskar, N., Sathisha, A.D., Sachindra, N.M., Sakhare., P.Z andMahendrakar, N.S. 2007. Effect of acid ensiling on the stability of visceral wast prorease of Indian major carp Labeo rohita. J. Aquat. Food Prod.Technol. 16, 73-86
- Blenford, D. E. (1994). Protein hydrolysates: Functionalities and uses in nutritional products. International Food Ingredients, 3, 45.
- Chalamaiah,M., Dinesh kumar,B., Hemalatha,R., Jyothirmayi,T.(2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition,antioxidant activities and applications: A review. Food Chemistry, 135, 3020–3038.

- Chen, Y.C., Tou, J.C., Jaczynski,J.(2007). Amino Acid, Fatty Acid, and Mineral Profiles of Materials Recovered from Rainbow Trout *(Oncorhynchus mykiss*) Processing By-Products Using Isoelectric Solubilization/Precipitatio. Journal of Food Science, 72, 9,527-535.
- Coello,N., Brito,L.,Nonus,M.(2000). Biosynthesis of L-lysine by Corynebacterium glutamicum grown on fish silage. Bioresource Technology,Volume 73, Issue 3, 221-225.
- Diniz FM, Martin AM. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. Int J Food Sci Technol 48: 191–200.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chem. 107: 1485–1493.
- Dufosse,L., De la Broise,D., Guérard, F.(2001). Evaluationof nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modelling of microbial growth. Curr. Microbiol, 42, 32–38.
- Ellouz,y.,Bayoudh,A.,Kammoun,s.,Gharsallah,n.,Nasri,M.(2001).production of sardinelle heads and viscera flour.Bioresoureetechnology,80,49-51.
- FAO 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome, Italy
- Fonkwe, L. G., & Singh, R. K. (1996). Protein recovery from enzymatically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. Process Biochemistry, 31(6), 605.
- Gao,M-T., Hirata,M., Toorisaka,E., Hano,T. (2006) . Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. Bioresource Technology, 97, 2414–2420.
- Ghorbel,S., Souissi,N.,T-ellouz,Y., Dufosse,L., Uerard,F., Nasri,M.(2005). Preparation and testing of Sardinella protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular ipase production by Rhizopus oryzae. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 33–38.
- Gildberg A, Batista I, Strøm E. 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnol Appl Biochem 11: 413– 423.
- Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials, Process Biochemistry. 28, 1-15.
- Gildberg, A., 2001. Utilisation of male Arctic capelin and Atlantic cod intestines for fish sauce production _ evaluation of fermentation conditions. Bioresource Technology. 119-123
- Gildberg,A., Johansen,A., Bogwald,J.(1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with Aeromonas salmonicida. Aquaculture, 138, 23-34.
- Granito,M., Álvarez,G. (2006). Lactic acid fermentation of black beans (Phaseolus vulgaris): microbiological and chemical characterization. Journal of the Science of Food and Agriculture ,86 ,8,1164–171.
- Guerard, F. Guimas, L. Binet, A. 2002. Prouction of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation, Jorunal of Molecular Catalysis B: Enzymatic: 489-498
- Gupta, R. Lorenz, Q.K. 2002. Bacterial alkaline roteases: molecular approaches and industrial applications.Appl Microbiol Biotechnol 59:15–32
- Horn SJ, Aspmo SI, Eijsink VGH. 2007. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. Enzyme Microbial Technol 40: 1328–1334.
- Horn, S. J., Aspmo, S. I., Eijsink, V. G. H. (2005). Growth of Lactobacillus plantarum in media containing hydrolysates of fish viscera. Journal of Applied Microbiology, 99, 1082–1089.
- Hoyle NT, Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (Clupea harengus). J Food Sci 59: 76–79.
- Kimoto-Nira,H., Aoki,R. , Mizumachi,K.,Sasaki,K.,Naito,H.,Sawada,T.,Suzuki,C. (2012). Interaction between lactococcus lactis and lactococcusrafinolactis during growth in milk: Development of a new starter culture. J. Dairy Sci, 95 ,4,2176–2185.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000a. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Crit Rev Food Sci Nutr 40 (1): 43–81.
- Kristinsson HG, Rasco BA. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. J Agric Food Chem 48: 657–666
- Kurbanoglu,E., Kurbanoglu,N.I.(2002).Anew process for the utilization as pepton of Ram Horn waste .Journal of Bioscience and Bioengineering,94,3,202-206.
- Kurbanoglu,E.B.(2004a).Enhancement of lactic acid production with ram horn pepton by Lacto bacillus casei.World Journal of Microbiology,20,37-42.
- Kurbanoglu,E.B., Algur,O.F.(2004b). A New Medium from Ram Horn Hydrolysate forEnumeration of Aerobic Bacteria, Turk J Vet Anim Sci., 28, 343-350.
- Kurbanoglu,E., Kurbanoglu,N.I.(2004c). Utilization as peptone for glycerol production of ram horn waste with a new process. Energy Conversion and Management ,45 , 225–234.

- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology, Vol. 3 p. 450. New York. Academic Press, Inc
- Leo Nico and Pam Fuller. 2011. Hypophthalmichthys nobilis. USGS Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL.
- Liaset, B. & Espe, M. 2008. Nutritional composition of soluble and insouloble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials, Process Biochemistry, 43: 42-48.
- Liaset, B., Lied, E., & Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of byproducts from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 560–581
- Liaset, B., Nortvedt,R., Lied,E., Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmosalar, L.) frames by Protamex MT protease.Process Biochem, 37,1263–1269.
- Liu,B., Yang,M., Qi,B., Chen,X., Su,Z., Wan,Y.(2010). Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile Lactobacillus plantarum As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. Biochemical Engineering Journal, 52 , 212–219.
- Martone, C. B., Borla, O. P., Sanchez, J. J. (2005). Fishery byproduct as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. Bioresource Technology, 96, 383–387.
- Microbiology, 85, 715–722
- Moretro,T., Hagen,B.F., Axelsson, L.(1998). A new, completely defined medium for meat lactobacilli. Journal of Applied Microbiology, 85, 715–722.1998.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering, 70, 571– 578.
- 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 Chem 115: 238-242.
- Ovissipour M, Safari R, Motamedzadegan A, Shabanpour B. 2009b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food Biopro Technol DOI 10.1007/ s11947-009-0284-x.
- Ovissipour,M., Benjakul,S., Safari,R., Motamedzadegan,A.(2010). Fish proteinydrolysates production from yellowfin tuna Thunnus albacares head using Alcalase and Protamex. Int Aquat Res , 2,87-95.
- Ovissipour,M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour,B.(2012). Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Visceral Protein. Food Bioprocess Technol , 5, 2, 460-465.
- Pascal, C., Françoise,R. (2003). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. Le Lait, 84, 125–134.
- Pigott, M., and Tucker, B.W. 1990. Seafood effects of technology on nutrition. Marcel Dekker INC. New York.
- Poernomo,A., Buckle,K.A.(2002). Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18,333–340.
- Quaglia, G.B., and Orban, E. (1987b). Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). J Sci Food Agic 38:271.
- Quaglia, G. B. and Orban, E. (1987a). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases, J. Sci. Food Agric., 38, 263.
- Rustad,T.(2003).Utillization of marin byproducts.Electronnic J.Enuviron.Agri.Food chem.,2,4,458-463.
- Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, Regenstein JM, Gildberg A, Rasco B. 2009. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food Bioprocess Technol, DOI 10.1007/s11947-009-0225-8.
- Safari,R.,Nasrollahzadeh,H.,pourgholam,R.,mtalebi,A.,Ghoroghi,A.(2010).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.
- Sathivel, S., Smiley, S., prinyawiwatkul, W., and Bechtel, P.G. 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates, Journal of Food Science , 70(6):401–406
- Shahidi, F., Han, X. Q., & Syniwiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chemistry, 53, 285–293.
- Simpson BK, Nayeri G, Yaylayan V, Ashie NA. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chem 61(1/2): 131–138.
- Šližytė R, Daukšas E, Falch E, Storrø I, Rustad T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Process Biochem 40: 2021–2033.

- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella By- Product hydrolysate. Food Technol. Biotechnol. 45 (2): 187- 194.
- Souissi,N., Bougatef,A.,Triki-ellouz,Y.,Nasri,M.(2009). Production of lipase and biomass by Staphylococcus simulans grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. African Journal of Biotechnology , 8 ,3, 451-457.
- Sumantha, A. Larroche, C. Pandey, A. 2006.Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. Food Technol. Biotechnol. 44 (2) 211–220 .
- Van derv en, C. 2002. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlation between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Ph.D. thesis. Wageningen University. The Netherlands
- Vazquez JA, Docasal SF, Prieto MA, Gonzalez MP, Murado MA. 2008a. 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.
- Vazquez JA, Murado MA. 2008b. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. Enzyme Microbial Technol 43: 66–72.
- Vazquez,J.A., Murado,M.A.(2008c). Mathematical tools for objective comparison of microbial culturesApplication to evaluation of 15 peptones for lacticacid bacteria productions. Biochemical Engineering Journal, 39 , 276–287.
- Vazquez, J. A., Gonzalez, M. P., & Murado, M. A. (2004a). Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production.Journal of Biotechnology, 112, 299–311.
- Vazquez, J. A., Gonzalez, M. P., & 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.
- Vazquez, J.,A.Nogueira,M.,Duran,A.,Prieto,M.A.,RodriguezAmado,I.,Rial,D.,Gonzalez,M.P.,Murado,M.A. (2011). Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. Journal of Food Engineering, 103 , 442–448.
- Vazquez,J.A., Docasal,S.F., Gonz´alez, M.P., Murado,M.A.(2006). Proteases production by two Vibrio species on residuals marine media. J Ind Microbiol Biotechnol , 33,661–668.
- Vazquez,J.A., I. Montemayor,M., Fraguas,J., Murado,M.A.(2009). High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishingby-products. Biochemical Engineering Journal, 44 , 125–130.
- Vazquez,J.A., I. Montemayor,M., Fraguas,J., Murado,M.A.(2010 a).Hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. Microbial Cell Factories,9,46.
- Vazquez,J.A.,Murado,M.A. (2010b). Marine pepton fromfishing by-products as nitrogen source for microorganism culture media. A review. Transworld Research Network 37/661 (2), Fort P.O.Trivandrum-695 023 Kerala, India.
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. H., Yuan, X. Q., (2007). Influence of the extent of enzymatichydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry, 104 ,4, 1698-1704.

Abstract:
Thirty to 40% of total fish catch is converted to waste. Using different methods of hydrolysis of the protein can be recovered of fish waste and increase the amount of protein efficiency. In this study, the four enzymes Alcalase , protamex , pepsin and trypsin were used for hydrolysis of four fish species including common carp (*Cyprinus carpio*) , silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix)* , grass carp *(Ctenopharyngodon idella)* and the Big head *(Hypophthalmichthys nobilis).* The effects of pH, temperature and hydrolysis time on the rate of hydrolysis were studied on soluble proteins and degree of hydrolysis (phase I). In the second step, proximate factors of peptone been evaluated and eventually replace commercial peptone media MRS (*Lactobacillus plantarum , Lactobacillus delberuki , Lactobacillus casei , Streptococcus thermophilus) and TSB (Listeria monocytogenes, two species of Bacillus and Pseudomonas, Streptococcus faecium*) and the optical density of bacteria at different times were compared with control samples . Results showed that the highest degree of hydrolysis and soluble proteins were referred to alcalase and protamex, pepsin and trypsin respectively. The highest value of hydrolysis, in all treatments, was attributed to grass carp and silver carp, common carp and big head respectively. The best pH and temperature for alcalase, protamex, pepsin and trypsin 8.5and 55, 7.5 and 55, 3.5, 37, 7 and 37 respectively. Best time to achieve the highest degree of hydrolysis and soluble protein was 90 minutes. Qualitative analysis showed that the highest and lowest amounts of protein and fat in the treatment of alcalase (about 70 % protein and less than 0.5 % fat) and protamex, pepsin and trypsin was then . The results of bacteria culture showed that the highest percentage growth of lactic acid bacteria was referred to *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* had the lowest rate of growth. In other bacteria, Pseudomonas and Bacillus species were the highest percentage of growth and Listeria monocytogenes and Streptococcus faecium respectively. In all treatments, alcalase had the best results and the peptone prepared from fish waste grass carp had the best condition for growth of used bacteria. It seems that the initial substrate , the parameters used such as temperature, pH, and enzyme hydrolysis time , have a significant effect on the quality of peptone and protein content in the final product is determined value of protein for culture of bacteria.

Key words: Warm water, Protease enzymes, Bacteria, Degree of hydrolysis, soluble proteins. Fish waste, pepton

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Peptone production from marine and culture wastes by commercial enzymes for bacterial culture media
Apprpved Number: 2-76-12-89014
Author: Reza Safari
Project leader/Researcher : Reza Safari
Collaborator(s) : Advisor(s):Oveysipour, M., Ghoroghi, A., Yaghobzade, Z., Mollaei, H., Bankesaz, Z., Alavi, E., Pourgholam, M.A., Gildberg ,A., Rasco, B., Mtallebi, A.A., Motamedzadegan, A., Nasrollahzade saravi, H.
Supervisor:
Location of execution : Caspian Sea Ecology Research Center
Date of Beginning : 2009-2013
Period of execution : 3
Publisher : Iranian Fisheries Research Organization
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute -Caspian Sea Ecology Research Center

Project Title :

Peptone production from marine and culture wastes by commercial enzymes for bacterial culture media

Project Researcher :

Reza Safari

Register NO.

48613