استفاده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris*) به عنوان منبع پپتون در محیط کشت پایه باکتری های (*Vibrio anguillarum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*)

زهرا درواج[۱]، سید روح الله جوادیان[۱]*، محمودرضا اویسی پور[۲]، ماهرخ نعمتی[۳]

Ro.javadian@gmail.com

۱-دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، گروه شیلات، قائم شهر، مازندران.

۲- استادیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه ایالتی واشنگتن، واشنگتن، ایالات متحده.

۳-دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، قائم شهر، ایران.

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۲

چکیده

در تحقیق حاضر پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا (*Clupeonella cultiventris*) در زمان ۹۰ دقیقه، با استفاده از آنزیم های تجاری پروموود و بروملاین در pH ۷ (pH بهینه فعالیت آنزیم پروموود و بروملاین) و به نسبت ۱ درصد آنزیم به پروتئین نمونه اولیه، در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروموود به صورت معنی داری از لحاظ بازیافت نیتروژنی(۸۶/۱۵ درصد) و درجه هیدرولیزاسیون(۲۱/۸۹) بالاتر از پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم بروملاین(به ترتیب ۶۸/۱۵، ۱۳/۳۵ درصد) بود ($p<۰/۰۵$) و همچنین طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروموود (۴/۵۸) به طور معنی داری کمتر از آنزیم بروملاین (۷/۵۳) بود($p<۰/۰۵$). پپتون بدست آمده از هیدرولیز آنزیمی به جای پپتون استاندارد در محیط کشت تجاری استفاده شد و به عنوان محیط کشت برای رشد ۳ سویه باکتری *Bacillus subtilis*، *Bacillus licheniformis* و *Vibrio anguillarum* مورد بررسی قرار گرفتند، همه باکتری ها در محیط کشت تجاری استاندارد (شاهد) و در محیط کشت حاوی پپتون کیلکا رشد کردند و رشد آنها با هم مقایسه شد. نتایج نشان داد که محیط کشت حاوی پپتون کیلکا تاثیر بیشتری بر روی رشد باکتری ها نسبت به محیط کشت تجاری (TSA) داشت ($p<۰/۰۵$). در حالی که پپتون تولیدی به وسیله آنزیم پروموود تاثیر بیشتری نسبت به آنزیم بروملاین داشت ($p<۰/۰۵$). با توجه به نتایج می توان از پپتون ماهی کیلکا به عنوان منبع نیتروژن در محیط کشت میکروارگانیزم ها مورد استفاده قرار داد.

واژگان کلیدی: پپتون، ماهی کیلکا، محیط کشت باکتری، هیدرولیز آنزیمی

*نویسنده مسئول

۱.مقدمه

هیدرولیز پروتئین های مواد غذایی تاریخچه طولانی دارد که اساسا در مورد پروتئین های گیاهی و شیر بوده است(۹). بیشترین تحقیقات روی پروتئین های هیدرولیز شده ماهی در دهه ۱۹۶۰ به انجام رسید و برخی از آماده سازی پروتئین هیدرولیز شده ماهی در آن زمان کاملا موفقیت آمیز بود. طی دهه ۱۹۶۰ بررسی بیشتر روی تولید منابع پروتئینی خوراکی ارزان قیمت معطوف گردید که بیشتر آنها روی کنسانتره پروتئین ماهی بود در واقع تولید کنسانتره یکی از تلاش های اولیه بود تا پروتئین ماهی را از پسماند فرآیند عمل آوری بازیابی کند و بخش پروتئینی را از نمونه های بی مصرف جدا کند. فرآیند غلیظ سازی پروتئین ماهی صورت اولیه در زمینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین های ماهی بود(۹).

شناخت منابع بیولوژیک محدود و افزایش آلودگی محیطی نیاز به استفاده بهتر وایجاد ارزش افزوده بیشتر از ماهی و محصولات جانبی را در صنایع شیلاتی تاکید دارد (۷). اگر چه مقادیری از ضایعات ماهی بعنوان خوراک دام استفاده می شود اما مقادیر عظیمی از محصولات جانبی غنی از پروتئین در کارخانجات فرآوری ماهی، بدون اینکه هیچ تلاشی برای بازیافت آنها صورت بگیرد، دور ریخته می شود (۳، ۶). در حالیکه بسیاری از تولید کنندگان مجاز به دور ریختن این ضایعات در دریا نبوده و باید قبل از دور ریختن با صرف هزینه بالا اقدام به تصفیه این ضایعات کنند(۱۲). تولید پروتئین هیدرولیز شده یکی از موارد استفاده بهینه از این ضایعات و ایجاد ارزش افزوده می باشد.

ماهیان کم مصرف وضایعات آبزیان منبع مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده هستند و فرآیند هیدرولیزاسیون طراحی شده تا ماهیان کم مصرف و ضایعات آبزیان را قابل بهره برداری کند که می تواند به جای استفاده در غذای دام یا استفاده به شکل کود، مورد مصرف غذای انسانی واقع گردد (۵).

تحقیقات بسیاری روی هیدرولیز آنزیمی قسمت های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم های تجاری انجام شده است. بسیاری از این تحقیقات، اثر آنزیم های مختلف را مورد بررسی قرار داده اند که از آن جمله می توان به آنزیم های پاپاین و بروملاین با منشاء گیاهی (۸)، آنزیم تریپسین و کموتریپسین با منشاء جانوری (۱۸)، آنزیم های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئو تراز و پرومود با منشاء میکروبی اشاره نمود (۲). به طور کلی، آنزیم های با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم‌ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می توان به پایداری بیشتر در حرارت ها و pH های بالا و خصوصیات مناسب پروتئولتیکی اشاره نمود (۴).

استفاده از منابع ارزان قیمت و اصلاح آنزیمی این منابع، می تواند صرفه اقتصادی داشته باشد، یعنی از یک سو 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 (۱۷). یکی دیگر از مهمترین کاربردهای پروتئین هیدرولیز شده، استفاده از این منابع پروتئینی در تهیه محیط های کشت باکتری هایی است که عامل بیماری های مهمی در ماهیان هستند. باکتری ها برای رشد در محیط های مصنوعی نیاز به مواد معدنی، منبع کربن و ازت دارند. گران ترین اجزای محیط کشت باکتری ها، منبع ازت آنها میباشد که تحت عنوان پپتون های گوشت، پپتون های کازئین و عصاره مخمر با قیمت بالا به فروش می رسند. بنابراین، تولید یک پپتون ارزان قیمت و با عملکرد حتی بهتر از پپتون های تجاری صرفه اقتصادی بهتری خواهد داشت. یکی از این راه ها، استفاده از پپتون با منشاء آبزیان در محیط های مذکور می باشد. به نظر می رسد که پپتون ماهی به لحاظ داشتن اسید های آمینه ضروری جهت رشد باکتری ها، قادر به افزایش رشد باکتری های مذکور می باشد و در مقایسه با محیط تجاری مشابه نتایج بهتری را به همراه داشته باشد (۱۷). و همچنین با توجه به آمار بالای صید کیلکا (حدود ۲۰ هزار تن در

سال ۸۹) که جزء ماهیان کم مصرف است، می توان از پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا به عنوان منبع پپتون در محیط کشت استفاده نمود.

با توجه به اینکه ویژگی های پروتئین هیدرولیز شده با توجه به نوع سوبسترا، نوع و میزان آنزیم و شرایط هیدرولیز متفاوت می باشد در این تحقیق از آنزیم های پرومود (با منشا میکروبی) و بروموملاین (با منشا گیاهی) استفاده خواهد شد. با توجه به مطالب بیان شده تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر آنزیم پرومود و بروملاین بر درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی، طول زنجیره پپتیدی و استفاده از پپتون حاصل از این آنزیم ها به عنوان محیط کشت باکتری ها و تاثیر آن بر رشد باکتری های *Bacillus subtilis* , *Bacillus licheniformis* , *Vibrio anguillarum* در ماهی کیلکا انجام شد.

۲. مواد و روش ها

ماده خام اولیه و آنزیم

میزان ۳ کیلوگرم ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) با میانگین وزنی ۰/۶±۷، از سواحل جنوبی دریای خزر (زمستان ۱۳۸۹) صید شد و با ظروف یونولیتی و رعایت شرایط صحیح به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر منتقل شد و بلافاصله پس از شست و شو با دستگاه چرخ گوشت صنعتی کاملاً چرخ شد. سپس نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد منجمد شده و تا شروع آزمایش در همین حالت نگه داری شدند. برای انجام آزمایش نمونه ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز انجماد زدایی گردیدند. آنزیم پرومود و بروملاین (جدول ۱) از شرکت کاسپین زیست فناوران، نمایندگی شرکت نووازیم (دانمارک) در ایران تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۳).

جدول ۱:آنزیم های مورد استفاده در آزمایش

نام تجاری	منبع	دامنه pH	دامنه دما
Bromelain	آناناس (*Ananas Comosus*)	۵ -۸	۲۰-۶۵
Promod	*Bacillus subtilis*	۵/۵-۷/۵	۵۵-۶۵

تولید پروتئین هیدرولیز شده

۵۰ گرم نمونه پس از خروج از یخچال و انجمادزدایی، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتیگراد به منظور غیر فعال سازی آنزیم های داخلی قرار داده شد (۱۲، ۱۴،۱۵، ۱۶). سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH ۷ که pH بهینه یکسان برای فعالیت آنزیم های پرومود و بروملاین است، رسانیده شد. نمونه ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و در پایان آزمایش (زمان ۹۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۱۲، ۱۴،۱۵، ۱۶). پروتئین های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع میانی جمع آوری شد و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد و سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی بصورت پودر درآمد (۱۲، ۱۴،۱۵، ۱۶).

تعیین ترکیب شیمیایی

میزان پروتئین محلول در نمونه محلول به روش بیورت (۱۰) تعیین شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شد. قرائت در طول موج ۵۴۰

نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر مدل T80 ساخت کشور انگلستان انجام شد.

درجه هیدرولیزاسیون

درجه هیدرولیز براساس روش Hoyle وMerritt (۸) به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه گیری شد و از طریق معادله زیر محاسبه گردید.

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیزاسیون

طول زنجیره پپتیدی

برای اندازه گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم مورد نظر از روش Alder- Nissen و Olsen (۱) استفاده شد.

درجه هیدرولیزاسیون /۱۰۰= طول زنجیره پپتیدی

بازیافت پروتئینی

در تحقیق حاضر میزان بازیافت پروتئینی از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۲)

۱۰۰× (میزان پروتئین موجود در نمونه / میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیزشده) = بازیافت پروتئینی

تهیه محیط کشت حاوی پپتون تولید شده

پپتون های به دست آمده با آنزیم های بروملاین و پروموד به عنوان محیط کشت برای باکتری های مورد بررسی استفاده شدند. محیط کشت TSA نیز به عنوان شاهد برای هر یک از باکتری ها تهیه شدند. مواد تشکیل دهنده محیط کشت تجاری TSA شامل ۵ گرم سدیم کلرید، ۱۵ گرم آگار ، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم پودر پپتون سویا است که این میزان را با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ سی سی رساندیم. در محیط کشت حاوی پپتون به جای پودر پپتون سویا از پپتونی که توسط آنزیم های بروملاین و پروموד تهیه شده است استفاده شد. محیط کشت آماده شده را در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه قراردادیم (۱۷).

تلقیح باکتری

در این مرحله باکتری های *V. anguillarum* و *B.subtilis* *B.licheniformis* که مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران (PTTC) انتخاب شدند به محیط کشت های موجود به میزان ۱ میلی لیتراضافه شد و سپس هر یک از نمونه ها در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانو متر قرار گرفته شد تا درجه کدورت OD (تراکم اولیه باکتری در محیط کشت) مشخص شود و به وسیله آن بتوان تعداد باکتری ها را محاسبه کرد سپس محیط کشت ها را در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۶ ساعت قرار داده و شد و سپس هر یک از نمونه ها در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانو متر قرار گرفته شد تا درجه کدورت OD (تراکم ثانویه باکتری در محیط کشت) مشخص شود و به وسیله آن بتوان میزان رشد باکتری ها را محاسبه کرد همه آزمایش ها در ۶ بار تکرار انجام شد (۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور مقایسه خصوصیات پروتئینهای هیدرولیز شده توسط آنزیمهای مورد آزمایش (با ۶ بار تکرار)، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS (Release 16.0) برای آنالیز آماری استفاده شد.

۳. نتایج

بازیافت پروتئینی

نتایج بازیافت پروتئینی (جدول ۲) نشان می دهد که بازیافت نیتروژنی به طور معنی داری تحت تاثیر نوع آنزیم است. میزان بازیافت نیتروژنی توسط پروموד به طور معنی داری بیشتر از آنزیم بروملاین بود ($p<۰/۰۵$) .

درجه هیدرولیزاسیون

نتایج درجه هیدرولیزاسیون (جدول ۲) نشان می دهد که درجه هیدرولیزاسیون به طور معنی داری تحت تاثیر نوع آنزیم است. میزان درجه هیدرولیزاسیون توسط پرومود به طور معنی داری بیشتر از آنزیم بروملاین بود($p<۰/۰۵$).

طول زنجیره پپتیدی

نتایج طول زنجیره پپتیدی (جدول ۲) نشان می دهد که طول زنجیره پپتیدی به طور معنی داری تحت تاثیر نوع آنزیم است. طول زنجیره پپتیدی توسط پرومود به طور معنی داری کمتر از آنزیم بروملاین بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: نتایج میزان درجه هیدرولیز، بازیافت پروتئینی و طول زنجیره پپتیدی ماهی کیلکا[۱و۲]

آنزیم	درجه هیدرولیز(٪)	بازیافت پروتئینی(٪)	طول زنجیره پپتیدی
بروملاین	۱۳/۳۵±۱/۰۵^{b}	۶۸/۱۵±۳/۲۰^{b}	۷/۵۳±۰/۵۹^{a}
پرومود	۲۱/۸۹±۱/۴۹^{a}	۸۶/۱۵±۳/۱۳^{a}	۴/۵۸±۰/۳۰^{b}

[۱] همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (انحراف معیار ± میانگین)

[۲] اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.

مقایسه تاثیر آنزیم های مختلف در رشد باکتری ها

باکتری *Vibrio* در محیط کشت حاوی پپتون آنزیم پرومود به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) رشد بیشتری را نسبت به محیط کشت تجاری TSA و محیط کشت حاوی پپتون پرومود نشان داده است اما محیط کشت حاوی پپتون بروملاین اختلاف معنی داری با محیط کشت تجاری TSA نداشت ($p>۰/۰۵$) (جدول ۳). باکتری *B.licheniformis* در محیط کشت حاوی پپتون (آنزیم پرومود و بروملاین) به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) رشد بیشتری را نسبت به محیط کشت تجاری TSA نشان داده است و همچنین رشد این باکتری در محیط کشت حاوی پپتون پرومود به طور معنی داری از محیط کشت حاوی پپتون بروملاین بیشتر است($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

باکتری*B.subtilis* در محیط کشت حاوی پپتون (آنزیم پرومود و بروملاین) به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) رشد بیشتری را نسبت به محیط کشت تجاری TSA نشان داده است و همچنین رشد این باکتری در محیط کشت حاوی پپتون پرومود به طور معنی داری از همه محیط کشت حاوی پپتون برو ملاین بیشتر است ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳: رشد باکتری در محیط کشت های مختلف بعد از ۳۶ ساعت [۱و۲]

نوع آنزیم	نوع باکتری (OD)		
	Vibrio	*B.licheniformis*	*B.subtilis*
بروملاین	۳/۶۱۴±۰/۰۲۹^{b}	۳/۵۱۰±۰/۰۱۵^{b}	۳/۵۲۴±۰/۰۱۴^{b}
پرومود	۳/۷۱۱±۰/۰۱۹^{a}	۳/۵۷۴±۰/۰۱۲^{a}	۳/۵۷۲±۰/۰۱۱^{a}
محیط کشت پایه TSA	۳/۵۹۰±۰/۰۱۷^{b}	۳/۴۳۹±۰/۰۲۴^{c}	۳/۴۷۹±۰/۰۲۵^{c}

[۱] همه اعداد بر حسب log بیان شده است (انحراف معیار ± میانگین)

[۲] اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند

۴. بحث

درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت پروتئینی:

نتایج درجه هیدرولیزاسیون نشان می دهد که درجه هیدرولیزاسیون به طور معنی داری تحت تاثیر نوع آنزیم است. میزان درجه هیدرولیزاسیون توسط آنزیم پرومود به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از آنزیم بروملاین بود.

بازیافت پروتئینی نشان دهنده توانایی جداسازی پروتئین ها از سوبسترا و محلول سازی آنها در فاز مایع می باشد. لذا کاملا مشخص است که درجه هیدرولیزاسیون یک فاکتور مهم و تعیین کننده در میزان بازیافت پروتئینی است.

نتایج بازیافت پروتئینی نشان داد که میزان بازیافت پروتئینی توسط آنزیم پرومود به صورت معنی داری بیشتر از آنزیم بروملاین است .

نتایج تحقیق حاکی از ارتباط بین بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیزاسیون بود. این یافته حاکی از آن بود که افزایش درجه هیدرولیزاسیون، میزان بازیافت پروتئینی افزایش پیدا می کند. مشخص شده است که ارتباط زیادی بین درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت پروتئینی وجود دارد.

Shahidi و همکاران طی تحقیقی تاثیر ۳ آنزیم پروتئازهای آلکالاز و نئوتراز و آنزیم های پروتئولتیک را روی ماهی آتلانتیک کاپلین (*Mallotus villosus*) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که بیشترین بازیافت پروتئینی مربوط به آنزیم آلکلاز بود و کمترین ان مربوط به نئوتراز بود(۱۸). طبق یافته های ما آنزیم پرومود که یک آنزیم میکروبی است نسبت به آنزیم بروملاین با منشا گیاهی بازیافت پروتئینی بیشتری داشت که با نتایج تحقیق حاضر مشابه است.

طول زنجیره پپتیدی:

نتایج طول زنجیره پپتیدی نشان می دهد که طول زنجیره پپتیدی به طور معنی داری تحت تاثیر نوع آنزیم است. طول زنجیره پپتیدی توسط پرومود به طور معنی داری ($p<۰/۰۵$) کمتر از آنزیم بروملاین بود نتایج تحقیق حاکی از ارتباط بین طول زنجیره پپتیدی و درجه هیدرولیزاسیون بود. این یافته حاکی از آن بود که افزایش درجه هیدرولیزاسیون، طول زنجیره پپتیدی کاهش پیدا می کند.

محیط کشت باکتری:

در تحقیق حاضر رشد ۳ سویه باکتری شامل *V. angullarium* و *B.subtilis* و *B.licheniformis* در محیط کشت حاوی پپتون تولید شده با آنزیم های بروملاین و پرومود بررسی شد که در تمامی موارد رشد باکتری در محیط حاوی پپتون بیشتر از محیط کشت تجاری بود با نتایج سایر محققین تطابق داشت آنها یافتند که رشد باکتری در محیط کشت حاوی پپتون های دریایی به طور معنی داری از محیط کشت تجاری بیشتر بوده است (۲، ۱۶، ۱۷،۱۹، ۲۰).

بیشترین رشد باکتری مربوط به محیط کشت حاوی پپتون تولیدی با آنزیم پرومود بود. به طور کلی، آنزیم های با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می توان به پایداری بیشتر در حرارت ها و pH های بالا و خصوصیات مناسب پروتئولتیکی اشاره نمود (۴).

Oveissipour و همکاران رشد باکتری های *B.subtilis* و *B.licheniformis* در محیط کشت تجاری و محیط کشت حاوی پپتون تولیدی با آنزیم پروتامکس و آلکالاز بررسی نمودند و رشد در محیط کشت حاوی پپتون به طور معنی داری بیشتر از محیط کشت تجاری بود(۱۴).

Martone و همکاران رشد باکتری های *B.subtilis* در محیط کشت تجاری و محیط کشت حاوی پپتون تولیدی ماهی (*M. hubbsi*) برسی نمودند و رشد در محیط کشت حاوی پپتون به طور معنی داری بیشتر از محیط کشت تجاری بود(۱۱).

درمطالعه حاضر پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا با استفاده از آنزیم های تجاری تولید شد .با توجه به نتایج، آنزیم پرومود می تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت

پروتئینی بالاتری تولید کند و در مقایسه نتایج حاصل از رشد باکتری ها درمحیط کشت حاوی پپتون و محیط کشت تجاری بیشترین رشد برای هر سه باکتری در محیط کشت حاوی پپتون تولید شده توسط آنزیم پرومود می باشد.

منابع

1- Alder-Nissen, J. and Olsen., 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *food chemistry*, Pour-E1, A., Ed American Chemical Society, Washington, DC.

2- Asmpo, S., Horn, S., Eijsink, V., 2005 . Use of hydrolysates from Atlantic cod *(Gadus morhua L.*) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Microbiology Letters. 248, 65-68

3-Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R. G., 2007. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, In Press.

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

5-Gildberg, A., 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology, 91B, 425–435.

6- Gildberg, A., Aresen, J.A., and Carlehog, M., 2002. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. *J. Proc. Biochem*., 38: 475-480.

7-Guerard, F., Guimas, L., Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic ., 19-20 , 489-498 .

8-Hoyle, N. and Merritt, J.H., 1994., Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*), J. Food Sci., 59- 76.

9-Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A., 2000., Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition., 40(1),43–81.

10- Layne, E. 1957., Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymology*. 3. New York: Academic press, Ind.

11-Martone, erez Borla, anchez, 2005., Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. Bioresource Technology., 96 383–387.

12-Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H., 2009a., The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from persiansturgeon (*Acipenser Persicus)* viscera. Food chemistry., 115, 238-242.

13-Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., 2009b., Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste protein of beluga Sturgeon Huso using alcalase. International Aquatic Research, 1:31–38.

14-Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, e., Esmaeili molla, a., 2009 c., Use of hydrolysates from yellowfin tuna thunnus albacares fisheries by –product as a nitrogen source for bacteria growth media. International aquatic research.,1: 73-77.

15-Oveissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour, B., 2012a., Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*. 5:460–465.

16-Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Nazari, R. M. 2012b.

Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioproccess Technology*. 5:696–705.

17-Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, Regenstein JM, Gildberg A, Rasco B. 2012, Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food Bioprocess Technol, 5:73–79.

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

19-Vazquez JA, Murado MA. 2008. Enzymatic hydrolysates from food wastewater as a source of peptones for lactic acid bacteria productions. Enzyme Microbial Technol 43: 66–72.

20-Vazquez JA, Docasal SF, Prieto MA, Gonzalez MP, Murado MA. 2008. 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.

Use of protein hydrolysates from Caspian sea sprat (*Clupeonella cultiventris*) as a nitrogen source for bacteria growth media (*Vibrio anguillarum*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*)

Dorvaj Z.[(1)], Javadian S. R. [(1)*], Mahmoudreza Oveissipour[2], Mahrokh Nemati[3]

Ro.javadian@gmail.com

1-Department of fisheries science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

2- School of Food Science, Washington State University, Pullman, WA, USA.

3-Young Researchers Club, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

Received: May2012 Accepted: September 2013

Abstract

Protein hydrolysates were produced from Caspian Sea sprat (*Clupeonella Cultiventris*) at time 90 min, pH 7, using commercial enzyme Promod and bromelain and an enzyme to substrate ratio of 1% raw material protein at 55°C. The results indicated that, protein hydrolysate from Promod, had significantly higher protein recovery (86.15%) and degree of hydrolysis (21.89%) than bromelain (68.15%, 13.35% respectively) ($P<0.05$), peptide chain length of protein hydrolysate from promod (4.58) significantly lower (7.53) from bromelain. Peptones from the enzymatic hydrolysis were used instead of standard peptones used in commercial media, Triptic Soy Agar (TSA). They were tested as growth media for the bacterial strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Vibrio anguillarum* as an alternative to commonly used complex sources (peptones). All bacteria were cultured on traditional standard media as controls, and their growth was compared to ones grown on experimental media containing peptone instead of the standard peptone. The results showed that all the bromellain and promod peptones were more effective at promoting bacterial growth than the standards used in traditional media, while the peptone from promod, was more effective than bromelain, the result suggested that fish protein hydrolysate can be used as an alternative substrate for microorganism culture purposes.

Keywords: Peptone, Caspian Sea sprat, Growth media, Enzymatic hydrolysis.

*Corresponding author