استفاده از روش شیمیایی به منظور تولید پروتئین آبکافت‌شده از امعاء و احشاء فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys moltirix*) و استفاده از آن به عنوان محیط کشت *Listeria monocytogenes*

ماریا اصغرنیا[۱]، سکینه یگانه[۱*]، سید علی جعفرپور[۱]، رضا صفری[۲]

*skyeganeh@gmail.com

۱-دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری
۲- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹٦

چکیده

هدف از این تحقیق آبکافت شیمیایی (اسیدی و قلیایی) امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys moltirix*) و استفاده از پپتون‌های تولیدشده به عنوان منبع ازت برای کشت باکتری *Listeria monocytogenes* بوده است. برای این منظور، امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ، از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ساری تهیه شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از انجمادزدایی امعاء و احشاء در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، آبکافت اسیدی و قلیایی به ترتیب در pH ۳/۳ و ۱۲ در دو دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در پایان آبکافت، درجه آبکافت و میزان پروتئین محلول تعیین گردید. سپس از پپتون‌های تهیه‌شده از این ۴ تیمار (هر کدام با ۳ تکرار) به عنوان محیط کشت باکتری در مدت ۴۸ ساعت استفاده و با محیط کشت تجاری BHI مقایسه شد. بیشترین و کمترین مقدار پروتئین به‌ترتیب مربوط به آبکافت قلیایی در دمای ۸۵ درجه سانتی-گراد و آبکافت اسیدی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود ($p<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین درجه آبکافت به ترتیب مربوط به آبکافت قلیایی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و آبکافت قلیایی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد بود ($p<۰/۰۵$). رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در تیمارهای اسیدی و قلیایی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به جز زمان ۴۸ ساعت، با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$)، اما در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در تمام زمان‌های مورد بررسی، آبکافت اسیدی و قلیایی با تیمار شاهد (BHI) اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). با توجه به تحقیق انجام‌شده می‌توان گفت که آبکافت قلیایی در دمای بالا بهتر از آبکافت اسیدی می‌باشد و رشد باکتری‌ها در پپتون تولیدی به خوبی رشد آن در محیط کشت تجاری می‌باشد و با توجه به استفاده از امعاء و احشاء ماهی و کم‌هزینه‌بودن روش قلیایی، از نظر اقتصادی مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: روش شیمیایی، پروتئین آبکافت‌شده، امعا و احشا، فیتوفاگ، محیط کشت

* نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

مقدمه

افزایش تقاضای پروتئین در سطح جهانی سبب تمرکز روی منابع پروتئینی غیرقابل استفاده شده است (Ovissipour *et al*., 2009b). مقدار زیادی از پروتئین موجود در محصولات جانبی غیرخوراکی صنعت غذائی آبزی‌پروری بدون اینکه بازیابی شوند دور ریخته می‌شوند (Kristinsson & Rasco, 2000c؛ حسینی و همکاران، ۱۳۹۱). این مواد به عنوان منبع پروتئین و اسیدهای آمینه ضروری با ارزش غذائی بالا به شمار می‌روند (Benhabiles *et al*., 2012). امعاء و احشاء ماهی یکی از محصولات جانبی هستند که غنی از پروتئین و چربی‌های غیراشباع هستند (Raa *et al*., 1983). جهت تبدیل ضایعات دریایی به محصولات مفیدتر و بازارپسندتر روش‌های فرآوری نوین نیاز است (Ovissipour *et al*., 2009b). شاید بتوان اذعان نمود که یکی از بهترین راه‌ها برای تولید محصولاتی باارزش افزوده بالا، تولید پروتئین آبکافت‌شده از این مواد خام کم‌ارزش می‌باشد (Møretrø *et al*., 1998). عمل آبکافت، شکسته‌شدن شیمیایی یا آنزیمی پروتئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی مختلف می‌باشد (He *et al*., 2013). به‌کارگیری فرآیند تغییر pH با شرایط اسیدی و قلیایی برای افزایش بازیابی پروتئین، روش مناسبی برای استفاده از این نوع مواد خام و تولید پروتئین آبکافت‌شده می‌باشد (Hultin & Kelleher, 2000, 2001). لذا یکی از کاربردهای مهم پروتئین آبکافت‌شده به‌ویژه به روش شیمیایی، استفاده از آن در محیط کشت برخی از باکتری‌ها است (Clausen *et al*., 1985؛ Dufosseé *et al*., 2001؛ He *et al*., 2013؛ یاسمی و همکاران، ۱۳۹۲). باکتری‌ها میکروارگانیزم‌هائی هستند که برای رشد در محیط‌های مصنوعی، نیاز به مواد معدنی، منبع کربن و ازت دارند، از طرف دیگر صنعت تخمیر بیوتکنولوژیکی، افزایش تقاضای محیط کشت میکروبی را نشان می‌دهد. یکی ازگرانترین اجزای محیط کشت باکتری‌ها، منبع ازت می‌باشد (Aspmo *et al*., 2005a؛ Martone *et al*., 2005؛ Safari *et al*., 2012). لیستریا جزء باکتری‌های غنی‌دوست و پرنیاز (۷ آمینواسید لوسین، ایزولوسین، والین، متیونین، آرژینین، سیستئین و گلوتامین و ۴ ویتامین ریبوفلاوین، تیامین، بیوتین و تیوکتیک‌اسید) بوده و در محیط‌های معمولی قادر به رشد نمی‌باشند، برای جداسازی آن‌ها از محیط‌های کاملاً افتراقی استفاده می‌شود (Premaratne *et al*., 1991؛ Jones & D'Orazio, 2013؛ شیمی، ۱۳۷۶). از محیط‌های کشت مورد استفاده جهت جداسازی جنس لیستریا خصوصاً گونه مونوسیتوژنز می‌توان به Gum base-nalidixid acid- tryptone-soya agar (GNT)، McBride agar (MLA)، Oxford agar و... اشاره نمود (Martin *et al*., 1984؛ Varnam, 1991). قیمت تمام‌شده این محیط‌ها بسیار گران بوده و زمان جداسازی باکتری نیز نسبتاً طولانی می‌باشد. از طرف دیگر جداسازی لیستریا مونوسیتوژنز نیاز به غنی‌سازی اولیه داشته و از محیط‌های مایع نظیر University of Vermond broth(UVB) و FDA براث استفاده می‌گردد (Varnam, 1991). بنابراین استفاده از منابع ارزان‌قیمت مانند امعاء واحشاء ماهی می‌تواند از طریق عدم دور ریختن آن از یک سو کاهش آلودگی زیست‌محیطی را به‌دنبال داشته باشد و از سوی دیگر تولید یک پپتون ارزان‌قیمت و با عملکرد حتی بهتر از پپتون‌های تجاری را سبب گردد (Safari *et al*., 2012).

بر اساس آمار ارائه‌شده توسط FAO تولیدات جهانی شیلاتی (صید و آبزی‌پروری) در سال ۲۰۱۴، ۱۶۷۲۲۸۹۵۹ (۷۳۷۸۳۷۲۵ تن آبزی‌پروری و ۹۳۴۴۵۲۳۴ تن صید) تن است و ایران دارای سهم ۹۴۷۳۵۴ تن می‌باشد که ۳۲۰۱۷۴ تن آن مربوط به آبزی‌پروری است (FAO, 2014) و در سال ۱۳۹۲ پرورش ماهیان گرمابی میزان ۱۶۷۸۸۳ تن (کل آبزی‌پروری سال ۱۳۹۲، ۳۷۰۸۷۶ تن) بوده است (آمارنامه دریایی ایران، ۱۳۹۴). تولید ماهی کپورنقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) ۸۵۱۷۱ می‌باشد و این نشان‌دهنده‌ی تولید نسبتاً بالای این ماهی در ایران می‌باشد (FAO, 2014)، اما از آنجایی‌که این ماهی در رقابت با ماهیان خوش‌خوراک‌تر، ماهی کم‌مصرفی محسوب می‌گردد، بنابراین تولید فرآورده‌های متنوع از این ماهی برای ترویج مصرف آن ضروری به نظر می‌رسد (وثوقی و مستجیر، ۱۳۸۸). مطالعاتی در ارتباط با تولید پروتئین آبکافت‌شده با روش‌های مختلف آنزیمی (Hoyle & Merritt, 1994؛ Kristinsson & Rasco, 2000a, b, c؛ Ovissipour *et al*,

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

Benhabiles *et al*., 2012 ؛2009b, 2010) و بررسی خصوصیات ایزوله پروتئین ماهی تولیدشده با روش شیمیایی اسیدی-قلیایی (Palafox *et al*., 2008؛ Jafarpour *et al*., 2013) و استفاده از پپتون تولیدشده از ضایعات برخی ماهیان در محیط کشت باکتریایی انجام شده است (Clausen *et al*., 1985؛ Gildberg *et al*., 1989؛ Aspmo *et al*., 2005a ؛Dufosseé *et al*., 2001؛ Horn *et al*., 2007 ؛Vázquez *et al*., 2004, 2007؛ Souissi *et al*., 2009 ؛Ovissipour *et al*., 2009a؛ Safari *et al*., 2012؛ Soltanmoradi & Hedayatifard, 2015). اما با توجه به اینکه، طبق بررسی‌های انجام‌شده، تحقیقی در ارتباط با تولید پپتون از طریق آبکافت اسیدی و قلیایی امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ و استفاده از آن به عنوان منبع ازت محیط کشت باکتریایی، انجام نشده است، لذا هدف از تحقیق کنونی بررسی اثر pH اسیدی و قلیایی بر آبکافت پروتئین امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ و به‌دنبال آن، بررسی عملکرد پپتون‌های تولیدشده، به عنوان منبع ازت محیط کشت باکتری *Listeria monocytogenes* می‌باشد.

مواد و روش ها

مواد خام اولیه و تولید پروتئین آبکافت‌شده از امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ: این تحقیق در بهار سال ۱۳۹۲ پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انجام شد. امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ به عنوان ماده خام اولیه، از بازار ماهی فروشان شهرستان ساری تهیه شده و در مجاورت یخ (با نسبت ۳ به ۱) به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جلوگیری از فرآیند اتولیز آنزیمی و میکروبی، نمونه‌های اخذشده در ظرف پلاستیکی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع آزمایش، نگه‌داری شدند. برای انجام آزمایش نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی گردیدند.

ابتدا امعاء و احشاء در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی شدند. مقدار ۱۰۰ گرم از امعاء و احشاء در مولینکس (SANIA، ایران) کاملا خرد و به نسبت ۱ به ۲ (w/v) سوبسترا به آب) با آب مقطر مخلوط شدند. سپس برای غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. واکنش‌ها در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شدند. آبکافت اسیدی و قلیایی در دو pH ۳/۳ و ۱۲ و در دو دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای انجام آبکافت اسیدی از هیدروکلریک اسید(HCL، مرک آلمان) و برای پایان دادن به این واکنش از هیدروکسید سدیم (NaOH، مرک آلمان) ۲ نرمال استفاده شد. برای انجام آبکافت قلیایی از هیدروکسیدسدیم و برای پایان دادن به این واکنش از هیدروکلریک‌اسید ۲ نرمال استفاده شد. واکنش‌ها در ظرف‌های شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری در حمام بخار لرزان به مدت ۱۸ ساعت انجام شدند. بعد از خنثی‌سازی و پایان‌دادن به واکنش‌ها، نمونه‌ها در سانتریفیوژ (Hermle abortechnic, GmbH Z206A، آلمان) در دورrpm ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند و سوپرناتانت جمع‌آوری شد. سوپرناتانت در آون (SHIMAS، ایران) با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار داده شد و پروتئین آبکافت‌شده به صورت پودر حاصل شد (Ovissipour *et al*., 2009b).

تعیین مقدار پروتئین: میزان کل پروتئین مواد خام به روش کلدال (AOAC, 2005) و میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت به روش بیورت اندازه‌گیری شد و سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد به کار برده شد (Layne, 1957). برای تعیین غلظت پروتئین محلول، بعد از آبکافت و قبل از سانتریفیوژ، ۱ سی‌سی از نمونه در میکروسانتریفیوژ (EPENDORF، آلمان) با دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سوپرناتانت جمع‌آوری شده و ۰/۵ سی‌سی از آن با ۴/۵ سی‌سی معرف بیورت مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس در اسپکتروفتومتر (Jenway,6305، انگلستان) در طول موج ۵۴۰nm قرائت شد. از مخلوط ۰/۵ سی‌سی آب مقطر و - ۴/۵ سی‌سی معرف بیورت به عنوان نمونه شاهد در دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. غلظت پروتئین مستقیما از منحنی استاندارد محاسبه شد (Layne, 1957).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

درجه آبکافت: درجه آبکافت با استناد بر روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) و بر مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰٪ به کل پروتئین‌های موجود در نمونه محاسبه شد. برای این منظور بعد از انجام آبکافت مخلوط ۰/۵ سی‌سی نمونه با ۰/۵سی‌سی تری‌کلرواستیک‌اسید در میکروسانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۰/۵ سی‌سی از نمونه حاصل با ۴/۵ سی‌سی معرف بیورت مخلوط و در اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰nm خوانده شد. از مخلوط ۰/۵ سی‌سی آب مقطر و ۴/۵ سی‌سی معرف بیورت به عنوان نمونه شاهد در دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

درجه آبکافت طبق رابطه زیر به دست آمد:

$$DH\% = (10\%TCA\ soluble\ N_2\ in\ the\ sample / Total\ N_2\ in\ the\ sample) \times 100$$

که در آن TCA soluble N_2 in the sample: نیتروژن محلول در تری‌کلرواسیتیک‌اسید ۱۰٪ و Total N_2 in the sample: کل نیتروژن موجود در نمونه می‌باشد.

استفاده از پروتئین آبکافت‌شده در محیط کشت باکتری

آماده‌سازی میکروارگانیسم و تهیه محیط کشت: باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق به صورت انجماد خشک از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردید. پس از کشت اولیه باکتری‌ها در محیط BHI و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه به مدت ۱۸ ساعت و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، شستشوی متوالی با سرم فیزیولوژی و متعاقب آن سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شده و در نهایت تعداد مشخصی ($۱/۳ cfu/g۱۰^۵$) از باکتری به محیط‌های تجاری و تهیه شده از ضایعات ماهی فیتوفاگ اضافه شد. جهت ارزیابی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در زمان‌های مختلف از دستگاه اسپکتوفتومتر (Jenway,6305، انگلستان) و قرائت جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm استفاده شد (Safari *et al.*, 2012). ترکیبات محیط کشت‌های BHI و محیط کشت حاوی پپتون تهیه‌شده از امعاء و احشاء فیتوفاگ در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول ۱: ترکیب محیط کشت BHI و محیط کشت تهیه‌شده از پپتون امعاء و احشاء فیتوفاگ (گرم بر لیتر)

Table 1: Composition of BHI media and a media prepared from Silver carp viscera pepton

ترکیبات	محیط کشت BHI	محیط کشت حاوی پپتون تهیه شده از امعاء و احشاء فیتوفاگ
Dextrose	۲	۲
Sodium Chloride	۵	۵
Beef Heart Infusion	۱۰	۱۰
Disodium Phosphate	۲/۵	۲/۵
Calf Brain Infusion	۷/۵	۷/۵
Gelatin peptone	۱۰	–
Silver carp visceral peptone	–	۱۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد، تجزیه و تحلیل آماری داده‌های بدست آمده پس از بررسی همگنی واریانس‌ها با آزمون لون در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه (برای درجه آبکافت اسیدی و قلیایی در دو دمای مختلف و جذب نوری لیستریا در محیط کشت‌ها و زمان‌های مختلف) انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها به کمک آزمون t-test و دانکن با درصد خطای ۵ درصد انجام شد.

نتایج

محتوای پروتئین: میزان کل پروتئین در نمونه امعاء و احشاء فیتوفاگ ۰/۴۱±۱۸درصد بوده است. نتایج‌حاصل از محتوای پروتئین در آبکافت شیمیایی امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ، در جدول ۲ نشان داده شده است. بیشترین مقدار پروتئین مربوط به آبکافت قلیایی و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۴۳±۴۲/۳۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر) بود و کمترین مقدار آن مربوط به آبکافت اسیدی و دمای ۷۰درجه سانتی‌گراد به‌دست‌آمد (۰/۸۱±۳۳/۵۴ میلی‌گرم-بر میلی‌لیتر)($p<۰/۰۵$). تفاوت دما در میزان پروتئین حاصل از هر کدام از آبکافت اسیدی یا قلیایی تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد و اثر متقابل دما در pH نیز معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$).

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

جدول ۲: میزان پروتئین امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ (میلی-گرم‌بر میلی‌لیتر) آبکافت‌شده به روش اسیدی و قلیائی در دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد

Table 2: Protein content of Silver carp viscera hydrolysate prepared by using acidic and basic method at temperature of 70 and 85°C

دما (درجه سانتی‌گراد)	درجه آبکافت	
	آبکافت اسیدی (pH ۳/۳)	آبکافت قلیایی (pH ۱۲)
۷۰	۳۳/۵۴±۰/۸۱ ^{*Aa}	۳۵/۹۷±۰/۲۲ ^{Aa}
۸۵	۳۸/۴۳±۰/۸۱ ^{Ba}	۴۲/۳۰±۰/۴۳ ^{Ba}

*داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ متفاوت به‌ترتیب نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

درجه آبکافت: نتایج‌حاصل از درجه آبکافت در آبکافت شیمیایی امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ در جدول ۳ نشان داده شده است. بیشترین مقدار درجه آبکافت مربوط به آبکافت قلیایی و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد بود (۲۱/۳۰±۰/۳۷ درصد) و کمترین مقدار آن مربوط به آبکافت قلیایی و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد (۱۵/۹۲±۰/۴۰ درصد) بود ($p<۰/۰۵$). تفاوت دما در درجه آبکافت حاصل از آبکافت قلیایی تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$)، اما در آبکافت اسیدی، افزایش دما موجب افزایش معنی‌دار درجه آبکافت گردید ($p<۰/۰۵$). اثر متقابل دما در pH نیز معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳: درجه آبکافت (درصد) امعاء و احشاء در آبکافت به روش اسیدی و قلیائی در دمای ۷۰ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد

Table 3: Hydrolysis degree of viscera by using acidic and basic method at temperature of 70 and 85°C

دما (درجه سانتی‌گراد)	نوع آبکافت	
	آبکافت اسیدی (pH ۳/۳)	آبکافت قلیایی (pH ۱۲)
۷۰	۱۶/۲۹±۰/۳۵ ^{*Aa}	۱۵/۹۲±۰/۴ ^{Aa}
۸۵	۱۹/۵۱±۰/۲۶ ^{Bb}	۲۱/۳۰±۰/۳۷ ^{Ba}

*داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ متفاوت به‌ترتیب نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

رشد لیستریا مونوسیتوژنز در محیط کشت حاوی پپتون: نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط حاوی پروتئین آبکافت‌شده به روش اسیدی و قلیایی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و مقایسه آن با محیط کشت تجاری BHI در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در زمان صفر تا ۴۸ ساعت در هر ۳ تیمار ذکرشده، روند صعودی داشته، ولی این روند در تیمار قلیایی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد بهتر از دو تیمار دیگر بود (۴/۴۱۱±۰/۱۵). نتایج روند افزایشی باکتری در تیمارهای اسیدی و قلیایی به جز در زمان ۲۴ ساعت، اختلاف معنی-داری با هم نداشت ($p>۰/۰۵$)، اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). اثر متقابل نوع محیط کشت در زمان معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۴: جذب نوری لیستریا مونوسیتوژنز در محیط حاوی پروتئین آبکافت‌شده امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ به روش اسیدی و قلیایی در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت BHI

Table 4: Optical density of *Listeria monocytogenes* in media containing Silver carp protein hydrolysate prepared by using acidic and basic method at temperature of 85°C and BHI media

زمان (ساعت)	آبکافت اسیدی	آبکافت قلیائی	شاهد (BHI)
صفر *	۰/۰۳۵±۰/۰۱۴ ^{aE}	۰/۰۳۶±۰/۰۱۶ ^{aE}	۰/۰۲۵±۰/۰۱۲ ^{aE}
۱۲	۰/۴۸۲±۰/۰۳۲ ^{aD}	۰/۵۳۲±۰/۰۳ ^{aD}	۰/۲۱۱±۰/۰۰۵ ^{bD}
۲۴	۲/۱۲۴±۰/۱۱ ^{bC}	۲/۲۱۸±۰/۱۱ ^{aC}	۱/۵۲۱±۰/۰۱۴ ^{cC}
۳۶	۲/۸۶۱±۰/۱۴ ^{aB}	۳/۰۲۳±۰/۱۸ ^{aB}	۲/۶۵۷±۰/۰۴۲ ^{bB}
۴۸	۳/۹۶±۰/۱۲ ^{aA}	۴/۱۱۴±۰/۱۵ ^{aA}	۳/۶۵±۰/۰۵۴ ^{bA}

* داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ متفاوت به‌ترتیب نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج تغییرات جذب نوری‌لیستریا مونوسیتوژنز در محیط حاوی پروتئین آبکافت‌شده به روش اسیدی و قلیایی در دمای ۷۰درجه سانتی‌گراد و مقایسه آن با محیط کشت تجاری BHI در جدول ۵، نشان داده شده است. نتایج تغییرات جذب نوری لیستریا مونوسیتوژن از زمان صفر تا ۴۸ ساعت در هر ۳ تیمار ذکرشده، روند صعودی داشته، ولی این روند در تیمار قلیایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد بهتر از

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

دو تیمار دیگر بود (۰/۰۵۶±۳/۸۴۶). نتایج روند افزایشی باکتری در تیمارهای اسیدی و قلیایی اختلاف معنی‌داری با هم نداشت (P>۰/۰۵) و در زمان‌های ۳۶ و ۴۸ ساعت با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). اثر متقابل نوع محیط کشت در زمان معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول ۵: جذب نوری‌لیستریا مونوسیتوژنز در محیط حاوی پروتئین آبکافت‌شده امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ به روش اسیدی و قلیایی در دمای۷۰ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت BHI

Table 5: Optical density of *Listeria monocytogenes* in media containing Silver carp protein hydrolysate prepared by using acidic and basic method at temperature of 70°C and BHI media

زمان (ساعت)	آبکافت اسیدی	آبکافت قلیائی	شاهد (BHI)
صفر	۰/۰۴۸±۰/۰۱۳^{aE}	۰/۰۴۱±۰/۰۰۳^{aE}	۰/۰۱۳±۰/۰۰۱^{aE}
۱۲	۰/۴۶۱±۰/۰۶۴^{aD}	۰/۵۲۹±۰/۰۰۸^{aD}	۰/۱۶۶±۰/۰۰۸^{aD}
۲۴	۱/۹۶۲±۰/۰۲۴^{aC}	۱/۹۲۵±۰/۰۳۱^{aC}	۱/۷۴۶±۰/۰۱۶^{aC}
۳۶	۲/۷۳۶±۰/۱۱۷^{aB}	۲/۸۴۳±۰/۰۹۶^{aB}	۲/۳۶۳±۰/۰۵۵^{bB}
۴۸	۳/۷۲±۰/۰۶۵^{aA}	۳/۸۴۶±۰/۰۵۶^{aA}	۳/۳۴±۰/۰۸۵^{bA}

* داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ متفاوت به‌ترتیب نشان از وجود اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و ستون می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث

تولید پروتئین آبکافت‌شده: این مطالعه، اولین مطالعه در مورد آبکافت اسیدی و قلیایی امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ و تاثیر پپتون تولیدشده به‌عنوان منبع ازت در محیط کشت باکتری لیستریا مونوسیتوژنز می‌باشد. مطالعات بسیار اندکی در ارتباط با استفاده از روش‌های شیمیایی جهت تهیه پروتئین آبکافت‌شده از امعاء و احشاء ماهی انجام شده است.

در مطالعه‌ی Soltanmoradi و Hedayatifard (۲۰۱۵)، درجه آبکافت اسیدی امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵۵±۴۳/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بیشترین محتوای پروتئین (۲/۷۶±۳۲/۶۱ درصد) و درجه آبکافت (۰/۰۱±۳/۴۷ درصد) امعاء و احشاء تاس-ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) در pH ۳/۳ و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (Ovissipour *et al.*, 2009b). در تحقیق حاضر نیز با افزایش دما محتوای پروتئین و درجه آبکافت افزایش یافت، اما pH قلیایی موثرتر بود و بیشترین محتوای پروتئین (۰/۴۳±۴۲/۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین درجه آبکافت (۰/۳۷±۲۱/۳۰ درصد) مربوط به pH قلیایی و دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد بود. تهیه‌ی ایزوله پروتئین ماهی مرکب (*Dosidicus gigas*) با تغییر pH نشان داد که ۸۵٪ از پروتئین اولیه عضله در pH ۳ و ۱۱ به صورت محلول درآمد و صرف نظر از pH مورد استفاده، در حدود ۹۰٪ پروتئین بعد از ته‌نشینی در pH ۵/۵ به دست آمد. حلالیت پروتئین با باردار شدن پروتئین‌ها (مثبت یا منفی) در pH اسیدی یا قلیایی اتفاق و ته‌نشینی آن در pH ایزوالکتریک به دلیل باردار نبودن پروتئین اتفاق می‌افتد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فرآوری با اسید و قلیا می‌تواند برای حصول ایزوله پروتئین قابل استفاده باشد (Palafox *et al.*, 2008). در مطالعه‌ی Jafarpour و همکاران (۲۰۱۳)، مشخص شد که روش تغییر pH قابلیت جایگزینی با روش‌های معمول بازیابی پروتئین از عضله را دارد. Kristinsson و Demir (۲۰۰۳)، محتوای پروتئین را در آبکافت اسیدی ماهی ماکرل اسپانیایی (۷۳/۶ درصد) بیشتر از قلیایی (۶۹/۳ درصد) به دست آوردند که مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های این مطالعه مطابقت ندارد. محتوای پروتئین حاصل از آبکافت اسیدی *Oreochromis niloticus*، ۵۶-۶۱ درصد و *Salmo salar*، ۷۱/۵ درصد به دست آمد (Kristinsson & Rasco, 2000a, b). مقدار پروتئین بازیابی‌شده از آبکافت گوشت جوجه در pH های ۱۱/۵ و ۱۲ بیشتر از pH های ۱۰/۵ و ۱۱ بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Omana *et al.*, 2009). میزان

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

پروتئین به‌دست‌آمده از آبکافت اسیدی و قلیایی گوشت بوقلمون در pH های ۲/۵، ۱۰/۵ و ۱۱/۵ تفاوت چندانی نداشت و در pH ۳/۵ از همه کمتر بود (Hrynets *et al*., 2010). آبکافت اسیدی پروتئین‌ها در مقایسه با آبکافت قلیایی رایج‌تر است. اگرچه استفاده از pH قلیایی جهت آبکافت، منجر به تولید پروتئین با خصوصیات کارکردی و ارزش مغذی ضعیف می‌گردد، اما این روش جهت بازیابی پروتئین و افزایش حلالیت در دامنه وسیعی از پروتئین‌ها در صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طول آبکافت قلیایی پروتئین‌های ماهی، شکست سریع پرونئین-ها به پلی‌پپتیدهای بزرگ محلول در آب اتفاق می‌افتد (Nolsøe & Undeland, 2009)، لذا ممکن است تاثیر بیشتر شرایط قلیایی در مطالعه‌ی حاضر نیز، به دلیل ذکرشده باشد. هم‌چنین تفاوت نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف در ارتباط با شرایط قلیایی و اسیدی ممکن است به خصوصیات ماده اولیه مورد آبکافت از جمله محتوای بافت پیوندی مرتبط باشد (Ovissipour *et al*., 2009b). هم‌چنین در مطالعه‌ی Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹b)، بیشترین میزان درجه آبکافت و محتوای پروتئین توسط آبکافت آنزیمی امعاء و احشاء تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با آلکالاز به دست آمد (به-ترتیب ۰/۱۷±۲/۷، ۲/۳±۷۳/۳۴ درصد) و کمترین میزان درجه آبکافت و محتوای پروتئین به ترتیب مربوط به استفاده از آنزیم‌های تریپسین و فلاورزایم (به‌ترتیب ۰/۱۲±۰/۶۷، ۰/۷۶±۶۹/۰۷ درصد) بود. محتوای پروتئین در روش آنزیمی بیشتر از روش شیمیایی (اسیدی و قلیائی) بوده است. یکی از علل محتوای پایین پروتئین در آبکافت شیمیایی، توانائی پایین بازیابی پروتئین در آبکافت شیمیایی مواد با پیوستگی بالای بافتی مانند امعاء و احشاء است (Ovissipour *et al*., 2009). مقدار کم درجه آبکافت به دست آمده در مطالعه حاضر ممکن است علاوه بر تفاوت در نمونه مورد استفاده به دمای پایین‌تر مورد استفاده، مرتبط باشد. Ovissipour و همکاران (۲۰۱۰)، بیشترین محتوای پروتئین را از آبکافت آنزیمی سر ماهی تن زردباله با آلکالاز در زمان ۲۴ ساعت (۱/۵±۸۰/۲ درصد) و کمترین مقدار آن را با پروتامکس در زمان ۴ ساعت به دست آوردند (۱/۷±۷۲/۳۲درصد). درجه آبکافت آلکالاز در زمان‌های مشابه بیشتر از پروتامکس بود. اگرچه پروتئین آبکافت‌شده حاصل از روش آنزیمی دارای خصوصیات کارکردی بهتری می‌باشد، اما هزینه‌ی زیاد به دلیل استفاده از آنزیم، مدت بالای آبکافت حدود دو ساعت (در مقابل زمان ۲۰ دقیقه در روش شیمیایی) و بازیابی کم پروتئین در مقایسه با روش شیمیایی (در زمان مشابه) از ویژگی‌های این روش می‌باشد، در مقابل اگرچه در روش شیمیایی امکان کنترل کیفیت پروتئین آبکافتی وجود ندارد و پروتئین آبکافتی حاصل از این روش، خصوصیات شیمیایی و کارکردی متغیر (Blenford, 1994) و ضعیف-تری دارد، اما بازیابی بالای پروتئین، فرآوری سریع و هزینه‌ی کم، این روش را برای تولید پروتئین آبکافتی به منظور استفاده در فرآورده‌های با ارزش کمتر مانند کودها و منبع نیتروژن جهت رشد باکتری ها مناسب ساخته است (He *et al*., 2013).

رشد باکتری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پپتون‌های تولیدشده از آبکافت اسیدی و قلیایی در هر دو دمای ۷۰ و ۸۵ درجه-سانتی‌گراد در زمان ۴۸ ساعت رشد بیشتری نسبت به محیط کشت تجاری BHI نشان داد. Horn و همکاران (۲۰۰۷) دلیل رشد بهتر باکتری‌های اسیدلاکتیک را به محتوای مواد مغذی بالاتر (آمینواسیدهای مورد نیاز) در پپتون‌ها مرتبط دانستند که ممکن است رشد بیشتر لیستریا در این مطالعه را نیز توجیه کند. استفاده از منابع پپتونی تولیدشده از ماهیان مختلف (کاد، تون و سالمون) در کشت ۶ گونه باکتری *Escherichia coli*، *Lactobacillus casei*، مخمر *Saccharomyces cerevisiae*، *Sporobolomyces odorus* و قارچ *Penicillium roqueforti* و *Aspergillus nige* نشان داد که در اکثر موارد، استفاده از پپتون‌های تولیدشده از ماهی نتایج خوبی به همراه داشته است (Dufosseé *et al*., 2001). نتایج آزمایشات Vázquez و همکاران (۲۰۰۴)، در کاربرد پپتون‌های تولیدشده از ماهی در رشد باکتری‌های بیماریزا و پروبیوتیک (سودوموناس، ویبریو و روزتوباکتر) نیز مشخص نمود که باکتری‌ها در پپتون‌های تولیدشده از امعاء ماهی تون، در مقایسه با محیط‌های کشت تجاری معمول، رشد بیشتری نشان دادند. Souissi و همکاران

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

(۲۰۰۹)، مشاهده نمودند که باکتری *Staphylococcus simulans* در محیط کشت حاوی پروتئین آبکافت‌شده‌ی ماهی ساردین به خوبی رشد می‌کند. محیط کشت‌های حاوی پروتئین آبکافت‌شده بر رشد باکتری‌های گروه لاکتیک‌اسید تاثیر زیادی داشتند (Vázquez *et al*., 2007). Aspmo و همکاران (۲۰۰۵b)، مشاهده کردند که پروتئین آبکافت‌شده نسبت به پپتون‌های تجاری، اثر بیشتری روی رشد باکتری‌های لاکتیک‌اسید دارد. Martone و همکاران (۲۰۰۵)، استفاده از پروتئین آبکافتی ضایعات حاصل از فیله‌کردن ماهی هیک (*Merluccius hubssi*) با اندازه‌ی پپتید ۱/۵ تا ۲۰ کیلودالتون را به عنوان منبع مواد مغذی (نیتروژن و کربن آلی) در محیط کشت باکتری‌های *Halobacterium salinarum*، *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus epidermidis* مناسب دانستند. همچنین مشخص شد که استفاده از پپتون حاصل از آبکافت آنزیمی (آلکالاز و پروتامکس) سر ماهی نون زردباله (*Thunnus albacares*) در محیط‌کشت باکتری‌ها (*Pseudomonas putida*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Streptococcus faecium*، *Listeria monocytogenes* و...) برای رشد باکتری‌ها موثرتر بود، همچنین پپتون حاصل از درجه آبکافت بالاتر (آلکالاز) موجب رشد بیشتر باکتری‌ها شد، بنابراین عنوان شد که انتخاب روش مناسب برای تولید پپتون در استفاده از آن در محیط کشت باکتریایی موثر است (Ovissipour *et al*., 2009a). در مطالعه‌ی Safari و همکاران (۲۰۱۲)، رشد باکتری‌ها (انواعی از لاکتوباسیلوس) در محیط کشت (MRS) حاوی پپتون تولیدشده از سر ماهی تن با آلکالاز و پروتامکس نسبت به محیط کشت تجاری بهتر بود. در این مطالعه نیز نتایج Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹a) در ارتباط با تاثیر بیشتر پپتون حاصل از درجه آبکافت بالاتر در رشد باکتری‌ها و انتخاب روش مناسب برای تولید پپتون در استفاده از آن در محیط کشت باکتریایی مورد تایید قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده از این محققین با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر در ارتباط با رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنا در محیط کشت حاوی پپتون نیز مطابقت دارد. به نظر می‌رسد درجه آبکافت بالاتر موجب جذب بهتر پپتون‌ها از محیط کشت می‌گردد.

Gildberg و همکاران (۱۹۸۷) گزارش کردند که باکتری‌های لاکیتک‌اسید در پپتون حاصل از درجه آبکافت بالاتر، رشد بیشتری داشتند. نوع ماده خام اولیه در تولید پپتون موثر بوده و درجه آبکافت پپتون مناسب برای رشد هر باکتری متفاوت است. هم‌چنین وجود نیتروژن زیاد دلیلی بر رشد باکتری نخواهد بود، بلکه عوامل غیرنیتروژنه مانند مواد معدنی، عناصر کمیاب، ویتامین‌ها نوکلئوتیدها و لیپیدها نیز موثرند، لذا ممکن است پپتون‌ها علاوه بر نیتروژن، محتوی عوامل غیر نیتروژنه موثر بر رشد باکتری‌ها نیز باشند (Dufosseé *et al*., 2001). Clausen و همکاران (۱۹۸۵)، رشد بهتر باکتری‌ها را در محیط کشت باکتریایی (*Proteus* sp.، *Vibrio anguillarum*) حاوی پپتون تولیدشده از آبکافت اتولتیک امعاء و احشاء ماهی گزارش نمودند. نتایج Soltanmoradi و Hedayatifard (۲۰۱۵) در استفاده از پپتون تولیدشده از آبکافت اسیدی امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان محیط کشت باکتری *Staphylococcus aureus* مشخص کرد که باکتری در محیط کشت محتوی پپتون رشد کمتری از محیط کشت تجاری دارد. بنابراین عنوان کردند که باکتری نمی‌تواند به خوبی از پپتون حاصله استفاده کند، چرا که وزن مولکولی و طول زنجیره پپتیدی پپتون برای استفاده توسط باکتری مناسب نیست. اما با این وجود در این مطالعه استفاده از پپتون به عنوان یک محصول با ارزش افزوده و ارزان‌قیمت پیشنهاد شد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اگرچه آبکافت اسید و قلیایی نسبت به آبکافت آنزیمی امعاء و احشاء گزارش‌شده در مطالعات مختلف بازدهی کمتری دارد، اما با توجه هزینه‌ی پایین‌تر آن از نظر اقتصادی قابل استفاده می‌باشد، البته با توجه به اینکه در مطالعه حاضر فقط دو دما و pH مد نظر قرار گرفت، پیشنهاد می‌شود آبکافت در دامنه‌ی وسیع‌تری از دما و pH انجام شود. همچنین مشخص شد که پپتون‌های تولیدشده از آبکافت شیمیایی امعاء و احشاء ماهی کپور نقره‌ای قابل استفاده در محیط کشت BHI می‌باشد. بنابراین استفاده از ضایعات ماهی برای تولید پپتون‌ها علاوه بر این‌که می‌تواند از آلودگی محیط‌زیست جلوگیری نماید، می‌تواند به عنوان منبعی قابل استفاده در محیط‌های کشت باکتریایی باشد.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

منابع

آمارنامه دریایی ایران، ۱۳۹۴. معاونت علمی و فناوری، ستاد توسعه فناوری و صنایع دانش بنیان‌دریایی. ۱۰۶ صفحه.

حسینی، ش.، غرقی، ا.، جمالزاده، ح.، صفری، ر. و حسینی، ش.، ۱۳۹۱. مقایسه پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم های داخلی بافت. مجله علمی شیلات ایران، سال ۲۱، شماره ۳، صفحات ۶۲ تا ۵۵.

شیمی، الف.، ۱۳۷۶. باکتری‌شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی. چاپ اول. موسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی. فصل چهارم: صفحات ۱۳۰ تا ۱۲۳، فصل نهم: صفحات ۱۸۸ تا ۱۸۶.

وثوقی، غ. و مستجیر، ب.، ۱۳۸۸. ماهیان آب شیرین (چاپ هشتم). انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۴ صفحه.

یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.ح.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب. و امینی، ه.، ۱۳۹۲. مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین های موجود در امعاء و احشای ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با استفاده از آنزیم. مجله علمی شیلات ایران سال ۲۲، شماره ۱، صفحات ۱۵۶ تا ۱۴۹.

AOAC, 2005. Official methods of analysis. sixteenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H., 2005a. Use of hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 248: 65–68. doi.10.1016/j.femsle.2005.05.021.

Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H., 2005b. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.*)* viscera as components of microbial growth media. Process Biochemistry, 40: 3714–3722. doi.org/10.1016/j.procbio.2005.05.004.

Benhabiles, M.S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M.F.A. and Mameri, N., 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. Materials Science and Engineering, 32: 922–928. doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013.

Blenford, D.E., 1994. Protein hydrolysates: Functionalities and uses in nutritional products. International Food Ingredients, 3, 45.

Clausen, E., Gildberg, A. and Raa, J., 1985. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. Applied Environmental Microbiology, 50: 1556–1557. doi. 0099-2240/85/121556-02$02.00/0.

Dufosseé, L., De la Broise, D. and Guérard, F., 2001. Evaluation of nitrogenous substrates such as peptones from fish: a new method based on Gompertz modeling of microbial growth. Current Microbiology, 42: 32-38. doi.10.1007/s002840010174.

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture, Opportunities and challenges. 243 p.

Gildberg, A., Batista, I. and Strøm, E., 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnology Applied Biochemistry, 11: 413–423.

He, S., Franco, C. and Zhang, W., 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

compared to traditional repared Surimi. Ecopersia under review. 3: 315-327

Jones, G.S. and D'Orazio, S.E.F., 2013. *Listeria monocytogenes:* Cultivation and Laboratory Maintenance. Current Protocols in Microbiology, 5; 31: 9B.2.1–9B.2.7. doi: 10.1002/9780471729259.mc11a01s00.

Kristinsson, H. and Demir, N., 2003. Functional fish protein ingredients from fish species of warm and temperate waters: Comparison of acid- and alkali-aided processing vs. conventional surimi processing. In P. J. Bechtel (Ed.), Advances in Seafood Byproducts 2002 Conference Proceedings. Anchorage: Alaska Sea Grant College Program University of Alaska. pp: 277–295.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000a. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48: 657–666.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000b. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(1): 43–81. doi. 10.1080/10408690091189266.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000c. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. Process Biochemistry, 36: 131–139. doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00195-3.

co-products (FPCP) (review). Food Research International, 50: 289–297.

Horn, S.J., Aspmo, S.I. and Eijsink, V.G.H., 2007. Evaluation of different cod viscera fractions and their seasonal variation used in a growth medium for lactic acid bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 40: 1328–1334. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.007.

Hoyle, N.T. and Merritt, J.H., 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Sciencem, 59: 76–79. doi. 10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x.

Hrynets, Y., Omana, D.A., Xu, Y. and Betti, M., 2010. Comparative study on the effect of acid- and alkaline-aided extractions on mechanically separated turkey meat (MSTM), Chemical characteristics of recovered proteins. Process Biochemistry, 46: 335–343. doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.006.

Hultin, H.O. and Kelleher, S.D., 2001. Process for Isolating a Protein Composition from Muscle Source and Protein Composition. U.S. patent, 6: 188-216.

Hultin, H.O. and Kelleher, S.D., 2000. Surimi processing from dark muscle fish.In Park JW, Surimi and Surimi Seafood. Marcel Dekker Inc New York: 59–77.

Jafarpour, A., Shabanpour, B. and Shirvani, S., 2013. Biochemical properties of fish protein isolate (FPI) from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by application of acid-alkali processes

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

Alcalase and Protamex. International Aquatic Research, 2: 87-95.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E. and Esmaeili Mulla A., 2009a. Use of hydrolysates from Yellow fin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-products as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research, 1: 73–77.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2009b. Chemical and biochemical hydrolysis of persian storgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food Bioprocess Technology, 5: 460-465. doi. 10.1007/s11947-009-0284-x

Palafox, H., Cordova, M., Julio, H., Navarretedel, T., Marıa, A., and GarcıaCarreno, L., 2008. Protein isolates from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by pH-shift processing. Process Biochemistry, 44: 584–587. doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.011

Premaratne, R.J., Lin, W.J. and Johnson, E.A., 1991. Development of an Improved Chemically Defined Minimal Medium for *Listeria monocytogenes*. Applied Environmental Microbiology, 57: 3046–3048. doi.0099-2240/91/103046-03$02.00/0.

Raa, J., Gildberg, A. and Strøm, T., 1983. Silage production—theory and practice. Agricultural Science, 36: 117–132. Upgrading Waste for Feeds and Food, Proceedings of Previous Easter Schools in

Layne, E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology, Vol. 3, 450 p. New York. Academic Press, Inc.

Martin, R.S., Sumarah, R.K. and MacDonald, M.A., 1983. A synthetic based medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Clinical and investigative medicine. Medecine Clinique et Experimentale, 7(4): 233-237.

Martone, C.B., Borla, O.P. and Sanchez, J.J., 2005. Fishery by product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. Bioresource Technology, 96: 383–387. doi.org/10.1016/j.biortech.2004.04.008.

Møretrø, T., Hagen, B.F. and Axelsson, L., 1998. A new, completely defined medium for meat lactobacilli. Journal of Applied Microbiology, 85: 715–722. doi.10.1111/j.1365-2672.1998.00583.x

Nolsøe, H. and Undeland, I., 2009. The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: State of the art. Food and Bioprocess Technology, 2: 1–27. doi. 10.1007/s11947-008-0088-4.

Omana, D.A., Xu,Y., Moayedi,V. and Betti, M., 2009. Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: Chemical and functional properties of recovered proteins. Process Biochemistry, 45: 375–381. doi.org/10.1016/j.procbio.2009.10.010

Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R. and Motamedzadegan, A., 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *(Thunnus albacores)* head using

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

Agricultural Science, 1st edition by Ledward, D., Taylor A. J. and Lawrie R. A., 1983. Butterworth-Heinemann, 332 p.

Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A. and Rasco, B., 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food and Bioprocess Technology, 5: 73-79. doi.10.1007/s11947-009-0225-8.doi. 10.1007/s11947-009-0225-8

Soltanmoradi, F. and Hedayatifard, M., 2015. Tracing Growth of *Staphylococcus aureus* in a Medium Containing Peptone Derived from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Viscera. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences, 5(4): 156-160.

Souissi, N., Bougatef, A., Trikiellouz, Y. and 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.

Tannenbaum, S.R., Ahern, M. and Bates, R.P., 1970a. Solubilization of fish protein concentrate. I. An alkaline process. Food Technology, 24(5): 604.

Varnam, A.H., 1991. Foodborn pathogens. Wolf Publishing Ltd, England, pp: 327-353.

Vázquez, J.A., Docasal, S.F., Prieto, M.A., Gonzalez, M.P. and Murado, M.A., 2007. Growth and metabolic features of lactic acid bacteria in media with hydrolysed fish viscera. Bio resource Technology, 99: 6246–6257. doi.10.1016/j.biortech.2007.12.006.

Vázquez, J.A., Gonzalez, M.P. and Murado, M.A., 2004. A new marine medium-use of different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria. Enzyme Microb. Technol., 35(5): 385–392. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.02.007

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

Use of chemical method for preparing of protein hydrolysate from Silver carp (*Hypophthalmichthys moltirix*) viscera and its application as culture media for *Listeria monocytogenes*

Asgharnia M.[1]; Yeganeh S.[1]*; Jafarpour S.A.[1]; Safari R.[2]

*skyeganeh@gmail.com

1-Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari

2-Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1396.26.3.2.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.113518]

Abstract

The aim of this study is to chemically hydrolyze of silver carp (*Hypophthalmichthys moltirix*) viscera and the effect of obtained peptones as a nitrogen source for culture of *Listeria monocytogenes*. Silver carp viscera were provided by a local market in Sari, Northern Iran. After freeze-thawing of Viscera at 4°C was used for hydrolysis. Acidic and alkaline hydrolysis was done at two pH 3.3 and 12, and two temperatures of 70 and 85°C. At the end of hydrolysis DH% (hydrolysis degree) and protein content were measured. Then obtained peptones from these 4 treatments (three replicates for each treatment) used as *Listeria monocytogenes* culture media at 48 hours and compared with BHI culture media. Results showed that maximum and minimum protein concentration were related to alkaline hydrolysis at 85 °C and acidic hydrolysis at 70 °C, respectively ($p<0.05$). The highest DH% was related to alkaline hydrolysis at 85 °C and the lowest of it was related to alkaline hydrolysis at 70 °C ($p<0.05$). Growth of *Listeria monocytogenes* in acidic and alkaline produced treatments at 70 °C had no significant differences compared to control (BHI) except at 36 and 48h. But at 85 °C had differences at all hours significantly ($p<0.05$). This study showed that alkaline hydrolysis in higher temperature is better than acidic hydrolysis and growth of bacteria in fish peptone could be done as well as commercial cultured media. Due to usage of fish viscera and alkaline method with low processing cost, it‘s economically suitable.

Keywords: Chemical method, Protein hydrolysate, Viscera, Silver carp, Culture media

*Corresponding author