استفاده از پروتئین آبکافت شده امعا و احشاء ماهی تون هوور (*Thunnus tonggol*) بعنوان محیط کشت پایه برخی از باکتری های بیماری زا در ماهی

رضا صفری*[۱]، مرجانه علی نژاد[۲]، فهیمه حبیبی کوتنایی[۳]، مژگان علی نژاد[۴]

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، تربیت مدرس نور ، ایران

۳- مسئول آزمایشگاه دانشگاه پیام نور، مرکز ساری، ایران

۴- گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

*مسئول مکاتبات:safari1351@gmail.com

چکیده

امعا و احشاء ماهی تون هوور (*Thunnus tonggol*) با استفاده از آنزیم آلکالاز در مقادیر متفاوت دما (۵۰، ۵۷/۵ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد) و pH (۸ و ۸/۲۵) آبکافت شد. نمونه های آبکافت شده، بعنوان جایگزین پپتون تجاری در محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) جهت ارزیابی میزان رشد باکتری‌های *Vibrio anguillarum* ، *Aeromonas salmonicida* و *Streptococcus iniae* مورد استفاده قرار گرفتند. بیشترین و کمترین مقدار پروتئین، بترتیب مربوط به نمونه های آبکافت شده تحت دمای ۵۷/۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH =۸ بود. میزان رشد باکتریایی در محیط های کشت حاوی پروتئین آبکافت شده در مقایسه با محیط کشت TSB بیشتر بود. بطورکلی بالاترین درصد رشد برای سه گونه از باکتری ها مربوط به محیط کشت تهیه شده از پروتئین آبکافت شده در دمای ۵۷/۵ و pH، ۸/۲۵ بود. نتیجه گیری کلی این مطالعه نشان دهنده آن است که امعاء و احشاء ماهی تون هوور ، بعنوان منبع پروتئین ارزان قیمت، قابلیت جایگزینی با پپتون های تجاری در فرمولاسیون محیط های کشت باکتریایی را دارا می باشد.

کلمات کلیدی: ماهی تون هوور، پروتئین آبکافت شده، آلکالاز، *Vibrio anguillarum*، *Aeromonas salmonicida*، *Streptococcus iniae*

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

صید سالیانه تون ماهیان در ایران حدود ۲۷۴۵۳۳ تن است که ۵۰٪ آن را ماهی هوور تشکیل میدهد (سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶). ماهی تون هوور یکی از مهمترین ماهیهای صنعتی خلیج فارس و دریای عمان میباشد که از نظر اقتصادی برای صنعت شیلات ایران بسیار با اهمیت می باشد (هاشمی جوکار و همکاران، ۱۳۹۰). میانگین ضایعات در ماهی (در گونه‌های مختلف) حدود ۵۰٪ بوده است (Kristinsson *et al.*, 2000) که با کاربرد روش‌های مناسب می‌توان از این منابع پروتئینی در جهت تولید محصولات با کیفیت و ارزش بیشتر استفاده نمود. آبکافت آنزیمی پروتئین‌های ماهی از بیوتکنیک‌هایی است که برای بازیافت پپتیدهای دارای اهمیت فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای، به‌کار می‌رود. این روش به تولید پروتئین‌های آبکافت‌شده زیست‌فعال از مواد جانبی کم ارزش یا گونه‌های غیرقابل مصرف، منتج می‌گردد. معمولاً آنزیم‌های پروتئولیتیکی متنوعی مانند آلکالاز، پاپائین، پپسین، تریپسین، آلفاکیموتریپسین، پانکراتین، فلاورزایم، پروناز، نئوتراز، پروتامکس، بروملاین، ترمولیزین و غیره برای آبکافت پروتئین‌های ماهی بکار می‌روند (Chalamaiah *et al.*, 2012). در ایران مطالعات مختلفی توسط صفری و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۱)، اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹، ۲۰۱۰ و ۲۰۱۱) و علی نژاد و همکاران (۱۳۹۱) در خصوص استفاده از آنزیم های مختلف جهت آبکافت آنزیمی ماهی و ضایعات آن، روش های مختلف آبکافت، بررسی خواص عملکردی پپتون های تولید شده، روش های خشک کردن پپتون و استفاده در پپتون های تهیه شده در فرمولاسیون محیط های کشت انجام گرفته است.

آلکالاز، آنزیم آلکالینی تولید شده از باکتری *Bacillus licheniforms* است که توسط شرکت Novozymes برای صنایع مواد شوینده و غذایی تولید می شود. آنزیم آلکالاز به صور Alcalase 2.4L FG، Alcalase AF 2.4L و Alcalase 2.5L موجود بوده که از بین آنها فقط آنزیم Alcalase 2.4L FG دارای درجه غذایی بوده و در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (اویسی پور، ۱۳۸۷). با معرفی روش‌های آنزیمی، پروتئین‌های آبکافت شده زیادی از مواد جانبی و گونه‌های کم مصرف غنی از پروتئین ماهی تولید می‌شوند (Ahn *et al.*, 2010) که دارای کاربردهای متنوع دارویی، آرایشی و بهداشتی و تغذیه حیوانات می‌باشد (Oliva-Teles *et al.*, 1999؛ Wergedah *et al.*, 2004). اگرچه مطالعات زیادی در ارتباط با تولید پروتئین آبکافت شده صورت گرفته است و تولید آن در مقیاس صنعتی نیز انجام گردیده، ولی تاکنون روش مناسبی برای کنترل فرآیند و روند انجام آن مشخص نشده است (اویسی پور، ۱۳۸۷). در مطالعه Safari و همکاران (۲۰۰۹) از پروئین آبکافت شده سر ماهی تون زردباله بعنوان محیط کشت پایه باکتریهای گروه لاکتیک استفاده گردید. این گروه از باکتریها جزء باکتریهای پرنیاز بوده و رشد خوبی از خود در محیط های معمولی نشان نمی دهند و جهت کشت آنها بایستی از محیط های مغذی و واجد پروفایل متنوع اسیدهای آمینه استفاده نمود.

ویبریو آنگوئیلاروم عامل اصلی ویبریوزیس می باشد که گونه‌های بسیار زیادی از ماهی‌ها و آبزیان آب شور و شیرین را آلوده می‌کند (O'Toole *et al.*, 2004). این باکتری برای رشد نیاز به ۲ تا ۳ درصد نمک کلرید سدیم داشته و در آب های شور و

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

شیرین و حیوانات آبزی یافت می شوند (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۱). روش شناسایی این پاتوژن از طریق کشت در محیط های کشت انتخابی و آنالیز مرفولوژیکی یا خصوصیات بیوشیمیایی می باشد. محیط های کشت انتخابی مختلفی مانند محیط کشت تیوسولفات سیترات بایل سالت آگار (TCBS) و محیط کشت *Vibrio anguillarum* (VAM) برای شناسایی این پاتوژن در آب کاربرد دارند (Frans *et al.*, 2011). آئروموناس سالمونیسیده باکتری بیماریزا در خانواده سالمونیده و سایر گونه ها می-باشد (Ringø *et al.*, 2004) و دارای پراکنش گسترده ای بوده و اثرات منفی در محیط های طبیعی و پرورشی دارد (Fernández-Álvarez *et al.*, 2016).محیط های کشت پیشنهادی برای کشت و جداسازی ، شامل TSA ، Brain Heart Infusion agar (BHI)و Blood agar می باشد (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013). استرپتوکوکوس اینیه از باکتری های مشترک بین انسان و آبزیان می باشد (Park *et al.*, 2009). برای کشت و جداسازی آن از TSA، Brain Heart Infusion agar (BHI) وCoiistin Nalidixic Acid agar (CNA) استفاده می‌گردد (Camus, 2001). بمنظور کشت و جداسازی این باکتری ها از محیط های کشت گرانقیمت استفاده می‌گردد. بنابراین تولید محیط های کشت ارزان و دارای کیفیت مطلوب با هدف جایگزینی با محیطهای مذکور ضروری بنظر می‌رسد.

در محیط‌های کشت میکروبی، پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه معمولا بعنوان منبع نیتروژنی مورد نیاز می‌باشند (De La Broise *et al.*, 1998). قیمت محیط‌های کشت معمولا بخش اصلی هزینه های تولید سلول‌های میکروبی و محصولات زیستی را در صنعت تخمیر تشکیل می‌دهد. منبع نیتروژنی غالباً گران‌ترین ترکیب محیط‌های کشت باکتری می-باشد که از پروتئین‌های گیاهی، لبنیات (مانند کازئین یا آب پنیر) و ضایعات کشتارگاه بدست می‌آیند (Dufosse *et al.*, 2001).

در تحقیق حاضر ضایعات ماهی تون هوور (امعاء و احشاء) مورد بررسی قرار گرفت زیرا ماهی تون هوور در صنعت کنسروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد و تولید پروتئین آبکافت شده از ضایعات آن، علاوه بر استفاده از این منبع ارزان قیمت در تولید محصول با ارزش، می‌تواند به نحوی گامی در جهت مدیریت ضایعات در این صنعت نیز باشد.

بنابراین هدف از تحقیق حاضر ، تولید پپتون از امعاء و احشاء ماهی تون هوور توسط آنزیم آلکالاز 2.4L و امکان استفاده از آن به عنوان محیط کشت پایه باکتری‌های *Vibrio anguillarum*، *Aeromonas salmonicida* و *Streptococcus iniae* در مقایسه با محیط کشت تجاری تریپتیک سوی براث (TSB) بوده است. از آنجائیکه نوع سوبسترا، نوع و میزان آنزیم و شرایط آبکافت بر ویژگی های پروتئین آبکافت شده موثرند (Kristinsson *et al.*, 2000) ، دما و pHهای متفاوت بر اساس مطالعات قبلی (علی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۱) انتخاب شد و امکان جایگزینی پروتئین آبکافت شده امعاء و احشاء ماهی نون هوور، جهت کشت باکتری ها انجام پذیرفت. لازم به ذکر است که باکتری‌ها جهت رشد در محیط های کشت نیاز به دو منبع نیتروژن و کربوهیدرات دارند. منبع کربوهیدرات از طریق قندهای مونو و دی ساکارید مختلف تامین شده و منبع نیتروژن نیز از

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

پروتئین های حیوانی و گیاهی تامین شده که پروفایل اسیدهای آمینه در منابع مختلف متفاوت می باشد. اگر منبع نیترژن از مواد جانبی و غیرقابل استفاده تامین گردد بالطبع قیمت تمام شده پپتون تولید شده نیز کمتر خواهد بود.

مواد و روش کار

تولید پپتون

امعا و احشاء ماهی تون هوور در دی ماه ۱۳۹۲ از کارخانه تولیدکننده کنسرو ماهی (شهرک امام علی، بهشهر- مازندران) تهیه و با قرار دادن نمونه های تازه در مجاورت یخ خرد شده، در زمان کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شده و پس از چرخ کردن، با آب مقطر (نسبت ۳:۱ وزنی/حجمی) مخلوط و در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی (AW614B،) قرار داده شد تا آنزیم های داخلی آن غیرفعال گردند. بعد از تنظیم pH مربوط به هر نمونه (۸ و ۸/۵)، آنزیم آلکالاز با نسبت ۱/۵ درصد پروتئین اولیه به نمونه ها اضافه شده و در انکوباتور متحرک (JTSL20) بمدت سه ساعت در دماهای ۵۰، ۵۷/۵ و ۶۵ قرار داده شدند. سپس نمونه ها در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند تا آنزیم اضافه شده غیرفعال گردد (Ovissipour *et al.*, 2009 ; علی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱).

نمونه ها پس از سانتریفوژ (H-103N,KOKUSAN،) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه، به روش انجمادی خشک گردیدند. سپس مقدار پروتئین نمونه ها (Layne , 1957) و درجه آبکافت (Merrite and Hoyle, 1994) اندازه‌گیری و محاسبه گردید. براساس این روش، بعد از انجام هر آزمایش، محلول ۲۰ درصد اسید تری کلرواستیک (TCA) به حجم برابری از محلول حاوی پروتئین آبکافت اضافه گردید تا محلول ۱۰ درصد اسیدتری کلرو استیک بدست آید. سپس ترکیب مذکور تحت سانتریفوژ (Hettich D-7200 (Tuttlingen, y قرار گرفت و فاز محلول جداسازی شد (Ovissipour *et al.*, 2009, Safari *et al.*, 2009).

درجه آبکافت بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

میزان نیتروژن درمحلول۱۰درصد اسید تری کلریدریک) = درجه آبکافت(/میزان نیتروژن در نمونه× ۱۰۰

آماده سازی میکروارگانیسم ها

سوش فریز درای شده باکتریهای مورد استفاده دراین تحقیق شامل ویبریو آنگوئیلاروم، آئروموناس سالمونیسیدا و استرپتوکوکوس اینیه، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت باکتریها در محیط TSBو انکوباسیون آن در دمای ۳۰ درجه به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت، به محیط کشت های تهیه شده از پروتئین آبکافت شده اضافه گردید.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

تهیه محیط کشت

بهترین تیمارها بر اساس دارا بودن بالاترین مقدار پروتئین برای تولید محیط کشت مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات محیط کشت تولید شده از امعاء واحشاء ماهی تون هوور در مقایسه با محیط کشت تجاری TSB (محیط کشت شاهد) در جدول ۱، مشخص شده است. پس از استریل کردن محیط های کشت تولیدی از امعاء و احشاء ماهی هوور، یک میلی لیتر از محلول اولیه باکتریهای ویبریو، آئروموناس و استرپتوکوکوک بترتیب با رقت های $۱/۲۵\times۱۰^{۶}$، $۳/۵\times۱۰^{۶}$ و $۷/۰۷\times۱۰^{۶}$ اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور متحرک با دور ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. جذب نوری محتوای ارلن ها با استفاده از بیوفتومتر در زمان های صفر، ۱۸و ۴۴ ساعت قرائت شد.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت TSB و محیط کشت حاوی پپتون تولید شده از امعا و احشاء ماهی تون هوور

ترکیبات	محیط کشتTSB (گرم/ لیتر)	پپتون تولیدشده از امعاء واحشاء ماهی تون هوور
سدیم کلراید	۵/۰۰	۵/۰۰
کازئین	۱۵/۰۰	–
سویا	۵/۰۰	–
پروتئین آبکافت شده ماهی تون هوور	–	۲۰

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و روش تجزیه واریانس یکطرفه (one way ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها و جهت ارزیابی اختلاف معنی دار ما بین نمونه‌ها در سطح اطمینان ۹۵، از آزمون دانکن(Duncan) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به درجه آبکافت و میزان پروتئین نمونه های آبکافت شده تحت دماها و pH های مورد بررسی، در جدول ۲ ارائه شده است. بالاترین درجه آبکافت (۵۳/۹۶ درصد) مربوط به نمونه های تولید شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH، ۸/۲۵ بوده است($p<۰/۰۵$). بیشترین مقدار پروتئین (۷۷ گرم بر لیتر) در نمونه های آبکافت شده در دمای ۵۷/۵ و pH، ۸ و کمترین مقدار پروتئین، در نمونه های تولیدشده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH، ۸ بوده است($p<۰/۰۵$). درجه آبکافت بمنظور تعیین میزان باندهای شکسته شده در تعیین خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده به منظور دستیابی به یک سیستم ایده آل آنزیمی-پروتئینی بسیار دقیق میباشد (Ovissipour *et al.*, 2009). درجه آبکافت بالاتر باعث افزایش بازیافت پروتئینی می-گردد زیرا پیوندهای پپتیدی بیشتری شکسته شده و در نتیجه پروتئین آبکافت شده با وزن مولکولی کمتر تولید می‌گردد (Slizyt *et al.*, 2009). فعالیت آنزیم های مختلف بسته به دما و pH های انتخاب شده متفاوت می باشد برخی از آنزیمها

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

نظیر آلکالاز و پروتامکس در دماهای بالاتر و pH قلیایی فعالیت بهتری از خود نشان میدهند در صورتیکه برخی دیگر مثل پپسین در pH اسیدی و دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه بیشترین فعالیت را دارند(صفری و همکاران ۱۳۹۲).

جدول ۲- درجه آبکافت و میزان پروتئین در پروتئین های آبکافت شده امعا و احشاء ماهی تون هوور

دما (°C)	pH	درجه آبکافت(٪)	پروتئین (گرم/لیتر)
۵۰/۰۰	۸/۰۰	۱۷/۸±۰/۲۵^{d}	۳۸/۵۴±۰/۶^{e}
۵۰/۰۰	۸/۲۵	۵۳/۹۶± ۰/۰۳^{a}	۵۱/۷۲± ۰/۵۳^{d}
۵۷/۵	۸/۰۰	۱۲/۶۷± ۰/۰۳^{e}	۷۷/۰۰±۰/۹۰^{a}
۵۷/۵	۸/۲۵	۲۱/۹۲± ۰/۲۷^{c}	۶۶/۵۴±۰/۸۸^{b}
۶۵/۰۰	۸/۰۰	۱۰/۵۲± ۰/۴۵^{f}	۵۷/۰۰ ±۰/۹۰^{c}
۶۵/۰۰	۸/۲۵	۳۱/۸۶± ۰/۴۶^{b}	۵۳/۰۰±۰/۵۴^{d}

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد

ارزیابی رشد باکتریها

میزان رشد باکتری ویبریو آنگوئیلاروم، آئروموناس سالمونیسیده و استرپتو کوکوس اینیه در محیط کشت تولید شده از پپتون ماهی تون هوور (pH =۷/۲ و دمای ۳۵ درجه سانتیگراد) در مقایسه با TSB، به ترتیب در جداول ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، بیشترین درصد رشد ویبریو آنگوئیلاروم و آئروموناس سالمونیسیده در محیط کشت حاوی پپتون های تولید شده در دمای ۶۵ و pH، ۸ بوده که کمترین درجه آبکافت و کمترین مقدار پروتئین را در میان تیمارهای انتخابی برای کشت داشته است ($P<0.05$) در حالیکه بیشترین درصد رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیه در محیط های حاوی پپتون‌های تولیدی تحت شرایط دمایی ۵۷/۵ و pH، ۸/۲۵ بوده ($P<0.05$) که بالاترین درجه آبکافت را در میان تیمارهای انتخابی برای کشت داشته است ($P<0.05$). این نتایج میتواند بدلیل متغیر بودن نیازهای باکترهای مورد بررسی و نیز متفاوت بودن ترکیب و ترتیب پپتیدهای تولیدی باشد. به هر حال تفاوت معنی داری در بین نمونه‌ها و در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده نشد ($P>0.05$). نتایج این تحقیق بطور کامل ارتباط مثبت بین درجه آبکافت بالا و میزان رشد باکتریایی را نشان نداد که با نتایج Aspmo و همکاران (۲۰۰۵) که روشهای مختلف تولید پروتئین آبکافت شده از امعا و احشاء ماهی کاد (*Gadus morhua*) را مورد بررسی قرار دادند، مطابقت داشت. به نظر می رسد که درجه آبکافت بالاتر در پپتون های تولیدی توسط آنزیم آلکالاز، جذب پپتون ها را از محیط کشت تسریع خواهد کرد (Gildberg *et al.*, 1989).

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

جدول ۳-تغییرات رشد باکتری ویبریو آنگوئیلاروم در محیط کشت تولید شده از پروتئین آبکافت شده ماهی تون هوور و TSB[۱]

نمونه	زمان صفر	۱۸ ساعت	۴۴ ساعت	درصد رشد
شاهد (TSB)	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۴/۴۷± ۰/۶۶^{a}	۶/۹۱± ۰/۴۲^{c}	۹۷/۵۳± ۰/۴۳^{b}
(دما[۲]:۵۷/۵، pH: ۸/۰۰)	۰/۱۷±۰/۰۱^{a}	۳/۱۷± ۰/۳۰^{b}	۶/۰۷± ۰/۳۳^{d}	۹۷/۱۹± ۰/۳۱^{b}
(دما:۵۷/۵، pH: ۸/۲۵)	۰/۱۵± ۰/۰۲^{b}	۲/۰۶± ۰/۱۵^{c}	۱۰/۵۳± ۰/۴۸^{b}	۹۸/۵۷± ۰/۴۸^{a}
(دما:۶۵/۰، pH: ۸/۰۰)	۰/۱۸± ۰/۰۱^{a}	۲/۶۲± ۰/۶۰^{bc}	۱۴/۶۸±۰/۲۴^{a}	۹۸/۷۷± ۰/۵۲^{a}

۱=تریپتیک سوی براث، ۲=دما بر حسب درجه سانتی گراد. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد

جدول ۴-تغییرات رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا در محیط کشت تولیدشده از پروتئین آبکافت شده ماهی تون هوور و TSB[۱]

نمونه	زمان صفر	۱۸ ساعت	۴۴ ساعت	درصد رشد
شاهد (TSB)	۰/۰۶± ۰/۰۰۵^{a}	۳/۵۹± ۰/۳۱^{b}	۵/۳۲± ۰/۳^{c}	۹۸/۸۷±۰/۴۴^{a}
(دما[۲]:۵۷/۵، pH: ۸/۰۰)	۰/۰۶± ۰/۰۰۶^{a}	۲/۷۴± ۰/۱۷^{c}	۴/۵۲± ۰/۳۵^{d}	۹۸/۶۷± ۰/۶۸^{a}
(دما:۵۷/۵، pH: ۸/۲۵)	۰/۰۵± ۰/۰۰۵^{b}	۱/۹۷± ۰/۲۲^{d}	۱۳/۴± ۰/۴۱^{b}	۹۹/۶± ۰/۵۴^{a}
(دما:۶۵/۰، pH: ۸/۰۰)	۰/۰۵± ۰/۰۰۴^{b}	۵/۱۷± ۰/۳۳^{a}	۱۶/۴± ۰/۳۱^{a}	۹۹/۷± ۰/۴۱^{a}

۱=تریپتیک سوی براث، ۲=دما بر حسب درجه سانتی گراد. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد

جدول ۵- تغییرات رشد باکتری *Streptococcus iniae* در محیط کشت تولیدشده از پروتئین آبکافت شده ماهی تون هوور و TSB

نمونه	زمان صفر	۱۸ ساعت	۴۴ ساعت	درصد رشد
شاهد (TSB)[۱]	۰/۰۱۹±۰/۰۰۴^{b}	۲/۷۸± ۰/۱۱^{ab}	۴/۴۸ ± ۰/۱۴^{d}	۹۹/۵۷± ۰/۱۶^{a}
(دما:۵۷/۵، pH: ۸/۰۰)[۲]	۰/۰۳±۰/۰۰۵^{a}	۳/۰۱± ۰/۱۸^{a}	۸/۲۳±۰/۱۲^{a}	۹۹/۶۳± ۰/۱۸^{a}
(دما:۵۷/۵، pH: ۸/۲۵)	۰/۰۱± ۰/۰۰۵^{b}	۲/۷۴± ۰/۱^{ab}	۷/۸۷± ۰/۱۲^{b}	۹۹/۸۷± ۰/۱^{a}
(دما:۶۵/۰، pH: ۸/۰۰)	۰/۰۲±۰/۰۰۷^{ab}	۲/۶۵± ۰/۱۹^{b}	۶/۱۱±۰/۱۹^{c}	۹۹/۶۷± ۰/۱۶^{a}

۱=تریپتیک سوی براث، ۲=دما بر حسب درجه سانتی گراد. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ما بین داده ها می باشد

نتایج مشابهی توسط Kristinsson *et al*., 2000; Ovissipour *et al*., 2009; علی نژاد و همکاران، ۱۳۹۱ بدست آمده است.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Safari و همکاران (۲۰۱۱) از پپتون‌های تولید شده از سر ماهی *Thunnus albacares* توسط آنزیم های آلکالاز و پروتامکس برای رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک (*Lactobacillus bulgaricus*، *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus delbrukii*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactococcus lactis*، *Lactobacallus sakei*) استفاده کردند، نتایج تحقیق آنها نشان داد که باکتری‌های اسیدلاکتیک در پپتونهای تولیدشده از سر ماهی، رشد بهتری را در مقایسه با محیط کشت MRS داشته است. سوبسترای مورد استفاده در مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۱)، سر ماهی تون زردباله بوده در صورتیکه در مطالعه حاضر از امعاء و احشاء ماهی هوور استفاده شده که از نظر ترکیب غذایی و پروفایل اسیدهای آمینه با یکدیگر متفاوت می باشند. از طرف دیگر باکتریهای مورد بررسی در مطالعه Safari و همکاران (۲۰۱۱) باکتریهای گروه لاکتیک بوده که باکتریهای پرنیازی بوده و در محیط های کشت عمومی که فاقد اسیدهای آمینه مورد نیاز باشد رشد نکرده در صورتیکه در مطالعه حاضر از باکتریهای بیماریزای ماهی استفاده شده که قابلیت رشد در محیطهای ساده تر را دارند. در مطالعه انجام شده توسط اصغرنیا و همکاران (۱۳۹۶) از امعاء و احشاء آبکافت شده ماهی فیتوفاگ به روش شیمیایی جهت رشد لیستریا مونوسیتوژنز استفاده گردید. نتایج نشان داد که ویژگی پپتون در نمونه های آبکافت شده در دماهای بالا تر بهتر از دماهای پائین تر بوده و نمونه های آبکافت شده به روش قلیایی بهتر از روش اسیدی بوده و باعث تقویت بیشتر رشد لیستریا در مقایسه با نمونه شاهد گردید.

یافته ترویجی

مطالعه حاضر نشان داد که قابلیت رشد باکتری های مورد بررسی در این تحقیق در محیط های کشت تولید شده از پروتئین آبکافت شده قابل مقایسه با محیط کشت تجاری TSB می باشد. با این حال بهینه سازی شرایط تولید پروتئین آبکافت شده در جهت کاربرد در محیط‌های کشت از نظر دما، pH، مقدار و نسبت آنزیم به سوبسترا در جهت کاهش هزینه های تولید و افزایش راندمان میتواند موثر باشد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

منابع

صفری ، ر.، یعقوب زاده، ز.، ملایی، ح. و غروقی، ا.، ۱۳۹۲. تولید پپتون از باقیمانده های ماهیان دریایی و پرورشی با استفاده از آنزیمهای تجاری با هدف تهیه محیط کشت باکتریایی. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۱۵۶ صفحه

اصغرنیا ، م.، یگانه، س.، جعفرپور، ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۶. استفاده از روش شیمیایی به منظور پروتئین آبکافت شده از امعاء واحشاء فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys moltirix*) و استفاده از آن به عنوان محیط کشت باکتری *Listeria monocytogenes*. مجله علمی شیلات ایران، ۱۱:۲۰-۲۳.

اویسی پور، م.ر.وقمی م. ر.، ۱۳۸۷.بیوتکنولوژی در تولید فرآورده های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن،۶۶-۶۸.

علی نژاد، م.، شعبان پور، ب.، صفری، ر.، علی نژاد، م. و نصراله زاده ساروی، ح.، ۱۳۹۱. استفاده از پروتئین آبکافت شده امعاء واحشاء ماهی هوور (*Thunnus tonggol*) به عنوان محیط کشت پایه برای باکتری*Listeria monocytogenes*. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۸: ۳۰۱-۳۰۸.

مقیمی، ا. افشارنسب، م. دشتیان نسب، ع. مصباح، م. و یگانه، و.،۱۳۹۲. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های بیماری زای جداسازی شده از مراکز تکثیر میگو در استان بوشهر. دوماهنامه طب جنوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بوشهر،۱۶:۴۶۷-۴۷۸.

هاشمی جوکار، س.، کامرانی، ا.، سالارزاده، ع. ونخبه زارع، د.، ۱۳۹۳. جداسازی کلاژن از ضایعات ماهی هوور دم دراز *Thunnus tonggol* (پوست، استخوان و باله ها). نشریه علمی پژوهشی اقیانوس شناسی، ۷۵:۸-۸۲.

Ahn, C., Lee, K. and Je, J., 2010. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. International Journal of Food Science and Technology, 45:562–568.

Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H., 2005.Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. Process Biochemstry, 40:3714-3722.

Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., and Figueras, M.J., 2013. The improved PCR of the fstA (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other Aeromonas species. Veterinary Microbiology, 166:659–663.

Camus, A.C., 2001. Pathobiology of *Streptococcus iniae* infections in cultured Tilapia. LSU Historical Dissertations .334p.

Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food chemistry, 135:3020-3038.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

De La Broise, D., Dauer, G., Gildberg, A.and Guerard, F., 1998. Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on *Escherichia coli* culture kinetics. Journal of Marine Biotechnology, 6:111–115

Fernández-Álvarez, C., Gijón, D., Álvarez, M., and Santos, Y., 2016. First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies salmonicida from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), cultured in Spain. Aquaculture Reports,4:36-41.

Frans, I., Michiels, C. W., Bossier, P., Willems, K. A., Lievens, B., and Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. Journal of fish diseases, 34:643-661.

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

Hoyle, N. T. and Merritt, J. H., 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59:76–79.

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

Layne, E., 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology. New York: Academic press.vol. 3 ,450p.

Oliva-Teles, A., Cerqueira, A.L. and Gonçalves, P., 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. Aquaculture, 179:195–201.

O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E., and Wolf-Watz, H., 2004.Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. Microbial pathogenesis, 37:41-46.

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

Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R. and Motamedzadegan, A., 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) head using Alcalase and Protamex. Internationa Aquatic Research , 2: 87-95.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food Bioprocess Technology, 2: 460-465.

Park, YK.,Nho, SW., Shin, GW and Park, SB.,(2009). Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). veterinary microbiology, 136:76–81.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Ringø, E., Jutfelt, F., Kanapathippillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J. and Olsen, R. E. 2004. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmosalar* L.). Cell and tissue research,318:305-311.

Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A. and Rasco, B., 2009, Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food and Bioprocess Technology, 5(1):73-79.

Safari, R., Nasrollahzadeh Saravi, H., Pourgholam, R., Motalebi, A.and Ghoroghi, A., 2011, Use of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) head as peptone for *Vibrio anguillarum* and optimization using response surface method (RSM). Journal of Aquatic Food Product Technology, 20:1-11.

Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad T., 2009. Functional, Bioactive and Antioxidative Properties of Hydrolysates Obtained from Cod (*Gadus morhua*) Backbones. Process Biochemistry, 44:668-677.

Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, OA., Lied, E., 2004. Fish protein hydrolyzate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. Journal of Nutrition, 134:1320–1327.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Use of hydrolysatedfrom Tuna viscera (*Thunnustonggol*) as base of culture media for some fish pathogen bacteria

Reza safari[1*], MarjanehAlinezhad[2], Fahimeh Habibi Koutenaie[3], Mozhgan Alinezhad[4]

1: Caspian Sea Ecology Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Mazandaran, Iran

2:Faculty of Marine Sciences, TarbiatModares University, Nour, Iran

3:Payame Noor University, Sari, Mazandaran, Iran

4:Qaemshahr branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

1*: Tel: 01133462499, Email: safari1351@gmail.com

Abstract

Tuna viscera (*Thunnus tonggol*) were hydrolyzed by alcalase enzyme at two ranges of temperature (50.0, 57.5 and 65.0 °C) and pH (8.00 and 8.25). Hydrolysated proteins were used, as a commercial peptone, in the culture medium of Tryptic Soy Broth (TSB) to evaluate the growth rate of *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Streptococcus iniae*. The highest and lowest amounts of protein were observed at temperatures of 57.5 and 50.0°C, and pH=8.00, respectively. The level of bacterial growth was higher in culture media containing hydrolysated protein compared to TSB medium. Generally, the highest growth rate for three species of bacteria was related to culture medium prepared from hydrolysated protein at 57.5 °C and pH = 8.25. The overall conclusion of this study is that Tuna viscera, as a source of protein, can be substituted for commercial peptone in the formulation of bacterial culture media.

Key words: *Thunnus tonggol*, Alcalase, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus inia*e,

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)