



مقاله پژوهشی

Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>



## مقایسه تاثیر سیلاژ ماهی کیلکا آنچوی (*Clupeonella engrauliformis* Svetovidov, 1941) با تخمیر در ماده زمینه جامد با شش نوع میکروارگانسیم بر خصوصیات کیفی، فعالیت آنزیمی و قابلیت هضم مواد مغذی

آی ناز خدانظری<sup>۱\*</sup>، عبدالمجید حاجی مرادلو<sup>۲</sup>، رسول قربانی<sup>۲</sup>

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.
۲. گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

\* نویسنده مسؤل، پست الکترونیک: [khodanazary@yahoo.com](mailto:khodanazary@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۰۱

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2019.158271.2230

### چکیده

هدف از این تحقیق، مطالعه بر روی تاثیر تخمیر با ماده زمينه جامد روی خصوصیات کیفی، فعالیت آنزیمی و قابلیت هضم مواد مغذی پودر ماهی کیلکای آنچوی بود. پودر ماهی کیلکا آنچوی با ۲۵ درصد آرد گندم مخلوط و سپس با میکروارگانسیمها (۱۰<sup>۸</sup>) سلول در هر میلی لیتر) تلقیح گردید و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری شد. مقایسه شاخص های اکسیداسیون و هیدرولیز چربی در سیلاژ ماهی کیلکا آنچوی تلقیح شده با میکروارگانسیمها نشان داد که *S. cerevisiae* دارای کمترین میزان اسیدهای چرب آزاد (۷/۶۲ میکرو مول بر گرم ماهی) و پراکسید (۱۲/۴۷ میلی اکی والان بر ۱۰۰۰ گرم روغن) بود. کمترین میزان نیتروژن غیر پروتئینی در سیلاژ ماهی کیلکا آنچوی تلقیح شده با *L. plantarum* و *B. subtilis* مشاهده شد. کمترین میزان تیوباربتوریک اسید (۸/۱۰ میلی گرم مالون آلدهید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه) در سیلاژ ماهی تلقیح شده با قارچ *A. niger* مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت آنزیمهای آلفا آمیلاز و پروتئاز اسیدی به ترتیب در سیلاژ ماهی تلقیح شده با قارچ *A. niger* و مخمرها (*S. carlesbergensis* و *S. cerevisiae*) مشاهده گردید. قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام در شرایط آزمایشگاهی با افزایش میزان سیلاژ ماهی، افزایش نشان دادند. بیشترین قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام در شرایط آزمایشگاهی مربوط به *S. cerevisiae* بود ( $P > 0.05$ ). در مجموع نتایج نشان داد که *S. cerevisiae* بهترین خصوصیات کیفی، فعالیت آنزیمی و قابلیت هضم مواد مغذی سیلاژ تخمیری را در مقایسه با دیگر سیلاژ ماهی تلقیح شده با سایر میکروارگانسیمها داشت.

**واژگان کلیدی:** ماهی کیلکا آنچوی، تخمیر با ماده زمينه جامد، میکروارگانسیم، خصوصیات کیفی، قابلیت هضم مواد مغذی، فعالیت آنزیمی.

## ۱. مقدمه

تخمیر، پدیده‌ای است ناشی از مجموعه فعالیت‌های زیستی، که در آن ترکیبات آلی درشت مولکول به ترکیبات دارای مولکول‌های کوچک‌تر و ساده‌تر شکسته شده (Subramaniyam and Vimala, 2012) که علاوه بر مولکول‌های با ذرات کوچک، دی اکسید کربن و انرژی نیز آزاد می‌شوند. به عبارت دیگر، تخمیر، تجزیه ناقص ترکیبات آلی به ترکیبات ساده‌تر به همراه آزاد سازی انرژی است. به طور کلی فرآیند تخمیر را می‌توان به سه گروه متفاوت شامل هیدرولیز اسیدی، هیدرولیز آنزیمی و تخمیر میکروبی طبقه‌بندی کرد. انتخاب هر کدام از روش‌های تخمیر، بستگی به مواد خام در دسترس و شرایط دارد (Hasan, 2003). همچنین تخمیر را از نظر میزان رطوبت مورد استفاده، می‌توان به دو نوع مختلف تقسیم بندی کرد:

۱) تخمیر با ماده زمینه جامد (Solid-State Fermentation): این نوع تکنولوژی تخمیر، شامل مراحل است که به ترتیب شامل تهیه ماده جامد (فراهم کردن کربن، نیتروژن، مواد معدنی و انرژی)، استریله کردن آن، کشت میکروارگانیسم‌های مناسب، تامین رطوبت کافی، نگهداری در انکوباتور، حفظ شرایط بهینه (دما، pH، اکسیژن و ...)، خشک نمودن محصول و در صورت نیاز تبخیر محصول می‌باشند (Prabhakar et al., 2005).

۲) تخمیر غوطه‌ور (Submerged Fermentation): در این نوع تکنولوژی تخمیر، از مواد مایع همچون ملاس، به عنوان محیط کشت میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌گردند (Subramaniyam and Vimala, 2012). مواد مایع در فرآیند تخمیر به سرعت مصرف می‌گردند که بایستی با مواد مغذی دیگر جایگزین گردند (Subramaniyam and Vimala, 2012). تخمیر غوطه‌ور، روش مناسبی برای کشت باکتری‌ها در مقایسه با قارچ و مخمر می باشد که

علت آن را می‌توان به نیاز بیشتر باکتری‌ها به آب جهت رشد خود در مقایسه با دیگر میکروارگانیسم‌ها دانست (Subramaniyam and Vimala, 2012).

ماهی نیاز به خوراکی با میزان بالای پروتئین دارد که عمدتاً از پودر ماهی به دست می‌آید. پودر ماهی در ایران اکثراً از ماهی کیلکا به دست می‌آید. کیلکا جزء ماهیان پلاژیک و کوچک است که چرب و استخوانی می‌باشند (Malekpour et al., 2016; Parafkandeh Haghighi and Kaymaram, 2012). ماهی کیلکا، بخش بزرگی از ماهیان دریای خزر را تشکیل می‌دهد و بیش از ۹۰ درصد این جمعیت متعلق به ماهی کیلکا آنچوی می‌باشد. پودر ماهی منبع خوراکی مهمی است که دارای ارزش تغذیه‌ای قابل توجهی از نظر میزان پروتئین، انرژی، مواد معدنی و ویتامین‌ها برای دام، طیور و ماهی پرورشی می‌باشد (NRC, 1993). فرآوری سنتی پودر ماهی از جمله پختن، پرس کردن، خشک کردن و آسیاب کردن، پرهزینه و دارای فرآیند پیچیده‌ای است و حرارت مورد استفاده جهت خشک کردن پودر ماهی منجر به کاهش قابلیت هضم پودر ماهی می‌شود (Faid et al., 1997). مرحله خشک کردن در فرآیند تولید پودر ماهی پر هزینه، نیاز به مصرف انرژی بالا و تکنولوژی پیشرفته می‌باشد (Rahmi et al., 2008). سیلاژ ماهی یک فرآورده مایع حاصل مخلوط نمودن ماهی کم مصرف و یا ضایعات ماهی با مواد آلی یا غیر آلی است که می‌توان به عنوان جایگزین مناسب پودر ماهی معرفی گردد. سیلاژ ماهی یک منبع جایگزین خوبی به جای پودر ماهی در خوراک حیوان معرفی شد (Mach and Nortvedt, 2009). سیلاژ ماهی یکی از بهترین منابع پروتئینی برای ماهیان شناخته شده است. در سال‌های اخیر، در مورد استفاده از ضایعات حیوانی نه چندان گران در فرمولاسیون خوراک ماهی به جای پودر ماهی تاکید شده است (Mondal et al., 2008). تولید تجاری سیلاژ در کشورهای اسکانداویا مانند دانمارک از دهه

## ۲. مواد و روش ها

میکروارگانیسم‌های زیر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند:

*Lactobacillus plantarum* ATCC8014  
*Bacillus subtilis* ATCC6633  
*Aspergillus niger* ATCC9142  
*Aspergillus awamori* ATCC16877  
*Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763  
*Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080

میکروارگانیسم‌ها در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات (Nutrient Broth) محصول شرکت Merck KGaA, Germany برای ۷۲ ساعت در دمای ۳۷±۱ در انکوباتور رشد کردند. سلول‌ها از طریق سانتریفیوژ کردن با سرعت ۳۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردیدند. سلول‌های استخراجی دو بار با سرم فیزیولوژیک استریل شسته و سپس در ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژیک به حالت معلق نگهداری شدند. تعداد میکروارگانیسم‌ها از طریق استانداردهای مک فارلند بر روی محیط کشت (MRS :Mann, Rogosa and Sharp) Merck KGaA, Germany (آگار) محصول Merck KGaA, Germany (Nutrient Agar) محصول Germany به ترتیب در باکتری‌های *L. plantarum* و *B. subtilis* و محیط کشت مخمر- قارچ آگار محصول Laboratories Conda, Madrid, Spain در *A. niger*، *A. awamori* و *S. carlsbergensis* و *S. cerevisiae* مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد میکروارگانیسم‌های مورد تلقیح شده  $10^8$  cell/ml بودند (Vijayan et al., 2009). ماهی کیلکای آنچوی دریای خزر (*Clupeonella engrauliformis*) با میانگین وزن  $12 \pm 0.1$  گرم به صورت تازه از بازارچه ماهی شهرستان گرگان خریداری و نمونه‌های ماهی و یخ به نسبت ۱ به ۲ (وزنی/وزنی) با جعبه‌های عایق (یونولیتی) در مدت زمان ۱ ساعت به آزمایشگاه فراوری گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردیدند. همه ماهیان به مدت

۶۰ میلادی به منظور تولید مواد غذایی مناسب برای تغذیه دام، طیور و ماهیان شروع شده است. et al. (2018) Ozyurt و Shabani et al. (2018) در مطالعه‌ای به بررسی خصوصیات کیفی سیلاژ تخمیری از ماهی و ضایعات ماهی با استفاده از باکتری اسید لاکتیک و قارچ به ترتیب جهت تغذیه ماهی و طیور کردند. سیلاژ ماهی به شکل صنعتی در هلند و دانمارک از دهه ۶۰ برای تولید خوراک دام، طیور و ماهی به عنوان مکمل پروتئینی تولید می‌شود. در فرانسه پودر ماهی هیدرولیز شده ماهی به میزان ۹۰ درصد پروتئین با قیمت ۱۵۰۰۰۰۰ دلار به ازای هر تن تولید می‌گردد (Arruda et al., 2000). در اندونزی، سیلاژ ماهی در واحد آزمایشگاهی تولید می‌شود که به صورت مخلوط با کنجاله سویا در خوراک دام، طیور و ماهی استفاده می‌گردد (Ovissipouer and Ghomi, 2009). گزارش‌های مختلف تاثیر مثبت سیلاژ تخمیری بر خصوصیات کیفی پودر ماهی را تایید می‌کند (Yamamoto et al., 2005; García-Gómez et al., 2009; Ozyurt et al., 2018). اگر چه مطالعات اندکی بر تاثیر سیلاژ تخمیری با سه نوع میکروارگانیسم شامل باکتری، قارچ و مخمر بر خصوصیات کیفی، قابلیت هضم مواد مغذی و فعالیت آنزیمی و همچنین مقایسه خصوصیات ذکر شده در سیلاژ تخمیری تولیدی انجام شده است. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، تاثیر نوع میکروارگانیسم مورد استفاده شامل باکتری (*Lactobacillus plantarum*) و قارچ (*Bacillus subtilis*)، مخمر (*Aspergillus niger*) و *Aspergillus awamori* و *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces carlsbergensis* در سیلاژ تخمیری ماهی کیلکا آنچوی بر خصوصیات کیفی، قابلیت هضم مواد مغذی و فعالیت آنزیمی بود.

طول ۱۴ روز فرایند تخمیر انجام شد (Vijayan et al., 2009).

اندازه‌گیری بازهای ازته فراربه روش کلدال و با تیتراسیون عصاره بدست آمده از آن انجام گرفت. بدین منظور ۱۰ گرم نمونه به همراه ۲ گرم اکسید منیزیم با افزودن ۵۰۰ میلی-لیتر آب مقطر به بالن کلدال متصل شد و عصاره مورد نظر به محلول متشکل از اسید بوریک ۲٪ و ۱-۲ قطره متیل رد به عنوان شاخص وارد شد. محلول زرد رنگ حاصله با اسید سولفوریک تا حاصل شدن رنگ ارغوانی تیتراژ شد و به صورت میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه ماهی بیان شد (Goulas and Kontominas, 2005).

میزان بازهای ازته فرار از رابطه ۱ محاسبه گردید:

رابطه (۱) بازهای ازته فرار = حجم اسید سولفوریک مصرفی  $\times 14$

برای اندازه‌گیری پراکسید، از روش یدومتری چربی استخراج شده از ۵۰ گرم نمونه گوشت با استفاده از روش کلروفورم/متانول استفاده شد (Woyewoda et al., 1986). یدید پتاسیم در محیط اسیدی منجر به احیای پراکسید روغن استخراج شده از نمونه می‌شود. ید آزاد شده با افزودن معرف نشاسته تازه تهیه شده و تیتراسیون بوسیله تیوسولفات سدیم اندازه‌گیری شد. با استفاده از رابطه ۲ میزان پراکسید نمونه بر حسب میلی‌اکیوالان پراکسید بر ۱۰۰۰ گرم روغن (m.eq.peroxide/1000goil) بدست می‌آید:

$$\text{POV} = \frac{V \times N \times 1000}{W} \quad \text{رابطه (۲)}$$

$V$  = میلی لیتر تیوسولفات مصرفی برای تیتراسیون

$N$  = نرمالیت تیوسولفات سدیم

$W$  = وزن چربی (گرم)

شاخص تیوباربتوریک اسید طبق روش Siripatrawan و Noipha (2012) با افزودن ۹۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و

۱ هفته در فریزر با دمای  $18^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شدند. پس از یک هفته نگهداری ماهی آنچوی در فریزر، نمونه‌ها در یخچال دمای  $4^{\circ}\text{C}$  در مدت زمان ۱۲ ساعت انجماد زدایی و بلافاصله با چرخ گوشت به مدت ۵ دقیقه چرخ شدند و سپس در فریزر درایر (Freeze dryer) مدل ALPHA 1-2 LD plus خشک گردیدند. نمونه خشک شده با ۲۵٪ آرد گندم مخلوط گردیدند. میکروارگانیسم‌ها برای رشد نیاز به میزان مشخص رطوبت دارند. برای تامین رطوبت مورد نیاز میکروارگانیسم‌ها، ۵۰٪ آب مقطر به ۵۰ گرم نمونه ماهی و آرد گندم تهیه شده افزوده شد. محیط کشت پایه آماده شده برای میکروارگانیسم‌ها در اتوکلاو در دمای  $121$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا استریل شوند. سپس میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه به میزان ۱ سی‌سی در ۱۰ گرم نمونه به طور جداگانه به خوبی مخلوط می‌گردند. این میکروارگانیسم‌ها شامل: *A. awamori*، *A. niger*، *B. subtilis*، *L. plantarum*، *S. cerevisiae* و *S. carlesbergensis* هستند. نمونه‌های تلقیح شده در ظرف‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. پس از کامل شدن دوره فرایند تخمیر، برای متوقف ساختن فعالیت میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌ها از حرارت  $55$  درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. همچنین برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی از آنتی‌اکسیدان اتوکسی کوئین استفاده گردید. دیواره ظرف‌های شیشه‌ای و نمونه‌های حاوی باکتری با محلول پتاسیم سورات ۱٪ اسپری شدند تا مانع رشد قارچ و مخمر گردند. همچنین از محلول آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین) در ظرف‌های حاوی میکروارگانیسم قارچ و مخمر نیز جهت جلوگیری از رشد باکتری استفاده گردید (Vijayan et al., 2009). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار شامل فرآورده‌های تخمیری حاصل از قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها در ۳ تکرار انجام گردید. نمونه برداری هر ۴۸ ساعت برای هر ۶ تیمار در

برای اندازه‌گیری نیتروژن های غیر پروتئینی ( Non Protein Nitrogen: NPN) از روش تنگستات (Tungstat) استفاده شد (Licitra et al., 1996). ۰/۵ گرم نمونه خشک در فلاسک ارلن مایر ریخته شد. ۵۰ میلی‌لیتر آب سرد به نمونه اضافه گردید. ۸ میلی‌لیتر از محلول تنگستات ۱۰ درصد به آن‌ها اضافه شد. فلاسک به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۵ مولار، pH محلول به ۲ تنظیم گردید (با استفاده از pH متر کنترل شد). فلاسک به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شد و سپس کاغذ صافی واتمن شماره ۵۴ تا شده را در قیف مخروطی قرار گرفت و قبل از اضافه کردن نمونه، کاغذ صافی با آب مقطر کاملاً خیس گردید. کاغذ صافی به دستگاه کلدال منتقل و نیتروژن باقیمانده اندازه‌گیری گردید. از کسر نیتروژن باقیمانده از کل نیتروژن، NPN محاسبه گردید (رابطه ۵).

رابطه (۵)

$$NPN = \frac{\text{نیتروژن موجود در مواد باقیمانده پس از فیلتر کردن}}{\text{با محلول تانگستیک اسید - نیتروژن کل}}$$

مقدار NPN به صورت درصدی از کل نیتروژن نمونه و یا به صورت پروتئین خام (N×۶/۲۵) ارائه شد.

جهت اندازه‌گیری عصاره آنزیمی، محصولات تخمیری در این مرحله از فریزر خارج و در دمای اتاق انجماد زدایی آنها انجام پذیرفت. سپس ۱ گرم از محصولات تخمیری وزن و تا حجم ۴ برابر آن با آب مقطر سرد رقیق شدند. سپس نمونه رقیق شده با آب مقطر را در بشر ریخته و در حضور یخ و با استفاده از هموژنایزر (IKA® T25 digital ULTRA-TURRAX®, Germany) عمل یکنواخت سازی به مدت ۲ دقیقه انجام شد. سپس سوسپانسیون حاصله در سانتریفیوژ مدل Centrifuge 5810 R،

۲/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۴ نرمال به ۱۰ گرم نمونه هموزن شده اندازه‌گیری شد. ۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از تقطیر این مخلوط به ۵ میلی‌لیتر معرف تیوباربیتریک اسید افزوده و به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. پس از سرد شدن میزان جذب مایع صورتی حاصل در طول موج ۵۳۸ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. طبق رابطه ۳، عدد جذب خوانده شده در ثابت ۷/۸ ضرب شد تا میزان تیوباربیتریک اسید نمونه بدست آید. میزان تیوباربیتریک اسید بصورت میلی‌گرم مالون آلدهید اکی والان بر کیلوگرم نمونه بیان شد.

$$TBA_{\text{value}} = 7/8 \text{ Ab}_{S538}$$

$$\text{Ab}_{S538} = \text{میزان جذب در طول موج ۵۳۸ نانومتر}$$

میزان شاخص اسیدهای چرب آزاد با استخراج چربی از ۱۰ گرم نمونه گوشت با کمک کلروفرم/متانول به روش Woyewoda et al. (1986) و تیتراسیون گروه‌های کربوکسیلیک آزاد موجود در آن با هیدروکسید سدیم صورت پذیرفت. کلروفرم، متانول و ۲-پروپانول به نسبت ۲:۱:۲ به همراه معرف متاکروزول ارغوانی به عصاره استخراج شده اضافه شد و تیتراسیون تا تغییر رنگ از زرد به آبی ادامه یافت. این شاخص با استفاده از رابطه ۴ اندازه‌گیری شد. نتایج بصورت درصد اولئیک اسید (Oleic acid) بیان شد.

$$\text{رابطه (۴)} \quad FFA = \frac{N \times (V2 - V1) \times 2.82}{W}$$

$$N = \text{نرمالیتة NaOH}$$

$$V2 = \text{مصرفی برای هر نمونه NaOH میلی لیتر}$$

$$V1 = \text{مصرفی برای نمونه شاهد (Blank) NaOH میلی لیتر}$$

$$W = \text{وزن چربی (گرم)}$$

تعیین فعالیت آنزیم پپسین از سوبسترای هموگلوبین استفاده گردید (Anson, 1938; Worthington, 1991). هموگلوبین تحت اثر آنزیم تجزیه و به اسید آمینه تیروزین تبدیل می‌شود که در طول موج 280 nm قرائت نوری انجام می‌شود. واحد فعالیت آنزیم پپسین بر حسب میکرومول تیروزین که در مدت زمان یک دقیقه و به ازای میلی گرم وزن تر بافت و میلی گرم پروتئین آزاد شده با استفاده از رابطه ۶ محاسبه شد. برای اندازه گیری پروتئین محلول از معرف رنگی فولین فنل سیوکالتو استفاده گردید (Lojda et al., 1979).

Eppendorf AG 22331, Hamburg با دور ۷۶۰۰ در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ کردن، بخش رویی حاصله با پیپت جمع آوری شده و آن را در داخل ویال‌هایی به حجم ۱۰ میلی‌لیتر تقسیم بندی کرده و در دمای ۲۰ °C- برای سنجش آنزیمی در فریزر نگهداری شد. همه مراحل ذکر شده در دمای پایین و روی قطعات یخ انجام پذیرفت (Yamamoto et al., 2005). فعالیت آنزیم  $\alpha$ -آمیلاز در محصولات تخمیر شده با استفاده از کیت (Ziestchem Diagnostics, Iran) اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم  $\alpha$ -آمیلاز بر حسب U/g soluble protein بیان شد. برای

$$\text{unit/mg protein} = \frac{(A_{280} \text{ sample} - A_{280} \text{ blank}) \times 1000 \times 4}{1250 \times 10 \times \text{mg protein in assay}} \times \text{DF} \quad \text{رابطه (۶)}$$

قابلیت هضم پروتئین خام و ماده خشک نمونه آزمایشی همراه با پودر ماهی تخمیری از روش پپسین-پانکراتین استفاده شد (Yamamoto et al., 2005). قابلیت هضم پروتئین خام و ماده خشک با استفاده از رابطه های ۷ و ۸ محاسبه شدند (Yamamoto et al., 2005).

برای تعیین قابلیت هضم پروتئین خام و ماده خشک بر روی نمونه آزمایشی شامل ۷۰ درصد ذرت و ۳۰ درصد کنجاله سویا در شرایط آزمایشگاهی، میزان ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰٪ پودر ماهی تخمیری جهت تامین مقادیر متفاوت آنزیم به آن مخلوط شاهد افزوده شد. به منظور تعیین

$$\text{رابطه (۷)} \quad 100 \times (\text{مقدار نیتروژن کل نمونه} / \text{مقدار نیتروژن در لایه فوقانی}) = (\%) \text{ قابلیت هضم پروتئین خام}$$

رابطه (۸)

(وزن کاغذ صافی خشک شده - وزن کاغذ صافی خشک شده با پس مانده ها)

$$100 \times \frac{(\%) \text{ قابلیت هضم ماد خشک}}{\text{وزن نمونه خشک شده}}$$

وزن نمونه خشک شده

آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range Test) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ < p با استفاده از نرم افزار آنالیز آماری SSPS مورد مقایسه قرار گرفت.

داده های مربوط به تغییرات کیفی، فعالیت آنزیمی و قابلیت هضم پروتئین و ماده خشک در قالب طرح کاملا تصادفی با آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) بررسی شده و نتایج بصورت میانگین  $\pm$  خطای معیار (Standard Error) بیان شد. اختلاف بین تیمارها طی زمان و همچنین بین میکروارگانسیم‌های مختلف از طریق

## ۳. نتایج

یافتند ( $P < 0.05$ ). میزان اسیدهای چرب آزاد در سیلاژ ماهی حاصل از تخمیر مخمرها تا روز ۸ به طور معنی-داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) و سپس از روز ۱۰ تا انتهای دوره نگهداری کاهش نشان داد. مقایسه میزان اسیدهای چرب آزاد در سیلاژ تخمیری حاصل از میکروارگانیسم‌های مختلف نشان داد که سیلاژ ماهی حاصل از فعالیت باکتری کمترین مقدار اسیدهای چرب آزاد را داشتند ( $P < 0.05$ )

نتایج تغییرات اسیدهای چرب آزاد سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود میزان اسیدهای چرب آزاد در شروع فرایند تخمیر حدود ۵ میکرو مول بر گرم ماهی بود که با پیشرفت فرایند تخمیر میزان اسیدهای چرب آزاد در سیلاژ ماهی حاصل از تخمیر باکتری‌ها و قارچ‌ها به طور معنی داری افزایش

جدول ۱: تغییرات شاخص اسیدهای چرب آزاد سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف

<i>S.carlesbergensis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>A.awamori</i>	<i>A.niger</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.plantarum</i>	
۵/۲۸±۰/۱۳ <sup>aD</sup>	۵/۲۱±۰/۰۴ <sup>aD</sup>	۵/۳۰±۰/۰۳ <sup>aH</sup>	۵/۳۷±۰/۱۸ <sup>aE</sup>	۵/۲۲±۰/۰۵ <sup>aG</sup>	۵/۲۱±۰/۰۴ <sup>aH</sup>	۰
۸/۶۰±۰/۲۰ <sup>c</sup>	۸/۱۶±۰/۲۶ <sup>BC</sup>	۸/۶۸±۰/۲۹ <sup>G</sup>	۷/۵۴±۰/۳۳ <sup>E</sup>	۱۲/۲۳±۰/۵۸ <sup>F</sup>	۱۱/۱۶±۰/۵۱ <sup>G</sup>	۲
۹/۰۶±۰/۲۶ <sup>B</sup>	۱۲/۳۵±۰/۲۱ <sup>A</sup>	۱۰/۸۲±۰/۲۸ <sup>F</sup>	۱۲/۳۳±۰/۴۹ <sup>D</sup>	۱۳/۵۸±۰/۳۰ <sup>F</sup>	۱۷/۵۲±۰/۲۴ <sup>F</sup>	۴
۱۲/۸۸±۰/۶۹ <sup>A</sup>	۱۲/۰۶±۰/۷۴ <sup>A</sup>	۱۷/۲۹±۰/۵۰ <sup>E</sup>	۲۳/۶۰±۰/۱۶ <sup>C</sup>	۱۷/۲۴±۰/۵۳ <sup>E</sup>	۲۱/۰۴±۰/۸۲ <sup>E</sup>	۶
۱۳/۲۴±۰/۵۶ <sup>A</sup>	۱۲/۹۴±۰/۹۹ <sup>A</sup>	۱۸/۸۲±۰/۲۸ <sup>D</sup>	۲۸/۳۸±۰/۶۸ <sup>B</sup>	۲۲/۶۱±۰/۰۷ <sup>D</sup>	۲۵/۶۳±۰/۲۹ <sup>D</sup>	۸
۱۱/۵۳±۰/۲۹ <sup>B</sup>	۹/۹۸±۰/۲۳ <sup>B</sup>	۲۰/۰۲±۰/۲۵ <sup>C</sup>	۳۲/۷۸±۰/۱۳ <sup>A</sup>	۲۵/۹۱±۰/۶۷ <sup>C</sup>	۲۷/۹۷±۰/۸۷ <sup>C</sup>	۱۰
۱۰/۸۲±۰/۵۹ <sup>B</sup>	۸/۳۱±۰/۱۵ <sup>BC</sup>	۲۱/۲۶±۰/۰۶ <sup>B</sup>	۳۰/۴۷±۰/۵۷ <sup>AB</sup>	۲۹/۴۳±۰/۲۹ <sup>B</sup>	۳۰/۳۲±۰/۴۹ <sup>B</sup>	۱۲
۱۰/۲۱±۰/۳۲ <sup>B</sup>	۷/۶۲±۰/۳۱ <sup>C</sup>	۲۳/۱۵±۰/۵۷ <sup>A</sup>	۳۱/۶۸±۰/۱۸ <sup>A</sup>	۳۱/۹۳±۰/۲۱ <sup>A</sup>	۳۴/۴۷±۰/۳۷ <sup>A</sup>	۱۴

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ )

مختلف تا روز ۸ به طور معنی داری افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ) و سپس از روز ۱۰ تا انتهای دوره نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

مقدار اولیه پراکسید سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف، کمتر از ۱ میلی اکی والان بر ۱۰۰۰ گرم روغن تخمین زده شد (جدول ۲). میزان پراکسید در سیلاژ ماهی تهیه شده با میکروارگانیسم‌های

جدول ۲: تغییرات شاخص پراکسید سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف

<i>S.carlesbergensis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>A.awamori</i>	<i>A.niger</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.plantarum</i>	
۰/۸۲±۰/۳۶ <sup>aF</sup>	۰/۹۰±۰/۴۷ <sup>aD</sup>	۰/۷۳±۰/۲۳ <sup>aG</sup>	۰/۶۹±۰/۲۷ <sup>aE</sup>	۰/۷۲±۰/۰۳ <sup>aE</sup>	۰/۷۰±۰/۰۲۷ <sup>aG</sup>	۰
۱۱/۱۶±۰/۵۱ <sup>E</sup>	۱۱/۷۱±۰/۲۴ <sup>C</sup>	۱۳/۴۲±۰/۲۸ <sup>F</sup>	۱۲/۷۲±۰/۲۸ <sup>D</sup>	۱۱/۷۹±۰/۲۲ <sup>D</sup>	۱۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>F</sup>	۲
۱۴/۸۶±۰/۳۳ <sup>C</sup>	۱۲/۶۱±۰/۴۱ <sup>C</sup>	۱۶/۶۹±۰/۲۹ <sup>D</sup>	۱۵/۹۲±۰/۷۰ <sup>C</sup>	۱۴/۶۱±۰/۳۵ <sup>BC</sup>	۱۳/۲۰±۰/۰۹ <sup>CD</sup>	۴
۱۵/۸۴±۰/۷۰ <sup>BC</sup>	۱۴/۶۱±۰/۲۱ <sup>B</sup>	۲۱/۹۲±۰/۲۸ <sup>A</sup>	۲۰/۷۰±۰/۲۹ <sup>A</sup>	۱۷/۹۴±۰/۳۸ <sup>A</sup>	۱۵/۰۵±۰/۰۴ <sup>B</sup>	۶
۱۷/۲۷±۰/۰۲ <sup>A</sup>	۱۶/۳۶±۰/۱۷ <sup>A</sup>	۲۰/۶۸±۰/۳۲ <sup>B</sup>	۲۱/۰۳±۰/۶۳ <sup>A</sup>	۱۵/۰۷±۰/۰۸ <sup>B</sup>	۱۷/۶۸±۰/۰۳ <sup>A</sup>	۸
۱۶/۱۵±۰/۰۷ <sup>B</sup>	۱۴/۰۸±۰/۰۶ <sup>B</sup>	۱۸/۱۱±۰/۱۴ <sup>C</sup>	۱۷/۹۱±۰/۲۹ <sup>B</sup>	۱۴/۰۸±۰/۰۷ <sup>C</sup>	۱۳/۹۱±۰/۰۳ <sup>C</sup>	۱۰
۱۴/۹۳±۰/۱۴ <sup>C</sup>	۱۳/۸۷±۰/۰۷ <sup>B</sup>	۱۷/۲۰±۰/۰۴ <sup>D</sup>	۱۵/۵۸±۰/۸۷ <sup>C</sup>	۱۵/۰۰±۰/۰۶ <sup>B</sup>	۱۲/۷۷±۰/۲۳ <sup>DE</sup>	۱۲
۱۳/۷۰±۰/۰۲ <sup>D</sup>	۱۲/۴۷±۰/۰۶ <sup>C</sup>	۱۵/۳۱±۰/۰۶ <sup>E</sup>	۱۵/۵۸±۰/۳۳ <sup>C</sup>	۱۴/۹۱±۰/۰۸ <sup>B</sup>	۱۲/۳۳±۰/۱۲ <sup>E</sup>	۱۴

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ )

در جدول ۳، تغییرات شاخص تیوباربتوریک اسیدسیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف مشاهده می‌شود. میزان اولیه تیوباربتوریک اسید در روز صفر در تمام نمونه‌ها بین ۱/۹۳ و ۲/۷۱ میلی‌گرم مالون آلدئید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه بود که با تلقیح *A. awamורי*، *A. niger*، *B. subtilis*، *L. plantarum*، *S. carlesbergensis* و *S. cerevisiae* تیوباربتوریک اسید دچار نوسان شدند. میزان

تیوباربتوریک اسید در سیلاژ ماهی تلقیح شده با *S. cerevisiae* تا انتهای دوره تخمیر ثابت بود ( $P > 0.05$ ). بالاترین میزان متوسط تیوباربتوریک اسید در طول دوره نگهداری مربوط به نمونه‌های تخمیری با باکتری بود. میزان تیوباربتوریک اسید در پودر ماهی تلقیح شده با باکتری‌های *B. subtilis* و *L. carlesbergensis* به ترتیب ۱۴/۳۹ و ۱۲/۹۵ میلی‌گرم مالون آلدئید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه بودند.

جدول ۳: تغییرات شاخص تیوباربتوریک اسید سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف

<i>S.carlesbergensis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>A.awamורי</i>	<i>A.niger</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.plantarum</i>	
۲/۰۶±۰/۴ <sup>aE</sup>	۲/۰۶±۰/۴ <sup>aE</sup>	۲/۷۱±۰/۲۰ <sup>aF</sup>	۲/۵۷±۰/۲۱ <sup>aE</sup>	۲/۱۵±۰/۶۴ <sup>aD</sup>	۱/۹۳±۰/۴۷ <sup>aCS</sup>	۰
۲/۸۸±۰/۱۱ <sup>E</sup>	۲/۸۵±۰/۱۵ <sup>D</sup>	۲/۲۹±۰/۲۷ <sup>B</sup>	۴/۳۷±۰/۱۱ <sup>D</sup>	۵/۲۸±۰/۴۳ <sup>C</sup>	۲/۲۸±۰/۴۴ <sup>C</sup>	۲
۵/۹۷±۰/۴۵ <sup>C</sup>	۵/۰۴±۰/۲۵ <sup>C</sup>	۶/۷۴±۰/۱۳ <sup>BC</sup>	۶/۵۳±۰/۷۴ <sup>BC</sup>	۵/۰۷±۰/۰۶ <sup>C</sup>	۴/۳۱±۰/۱۷ <sup>C</sup>	۴
۴/۵۴±۰/۲۳ <sup>D</sup>	۵/۵۶±۰/۲۳ <sup>C</sup>	۶/۴۴±۰/۰۸ <sup>C</sup>	۹/۶۹±۰/۸۰ <sup>A</sup>	۱۱/۷۳±۰/۲۵ <sup>AB</sup>	۱۰/۳۲±۰/۱۸ <sup>BC</sup>	۶
۴/۶۹±۰/۷۵ <sup>D</sup>	۶/۵۷±۰/۱۸ <sup>B</sup>	۵/۵۸±۰/۱۵ <sup>D</sup>	۵/۱۵±۱/۲۹ <sup>CD</sup>	۱۱/۴۳±۰/۲۸ <sup>AB</sup>	۱۸/۰۲±۰/۲۲ <sup>A</sup>	۸
۸/۹۴±۰/۳۳ <sup>A</sup>	۸/۲۸±۰/۰۹ <sup>A</sup>	۴/۹۶±۰/۰۲ <sup>E</sup>	۷/۲۳±۰/۴۱ <sup>B</sup>	۱۰/۳۳±۱/۲۰ <sup>B</sup>	۱۴/۵۴±۰/۸۴ <sup>B</sup>	۱۰
۷/۹۳±۰/۴۴ <sup>AB</sup>	۸/۱۸±۰/۱۱ <sup>A</sup>	۸/۶۲±۰/۳۱ <sup>A</sup>	۷/۳۷±۰/۴۳ <sup>B</sup>	۱۳/۴۲±۱/۵۸ <sup>A</sup>	۱۴/۵۵±۰/۲۴ <sup>B</sup>	۱۲
۷/۴۸±۰/۷۵ <sup>B</sup>	۸/۱±۰/۱۰ <sup>A</sup>	۸/۱±۰/۰۵ <sup>A</sup>	۷/۰۰±۰/۷۲ <sup>B</sup>	۱۲/۹۵±۰/۹۹ <sup>AB</sup>	۱۴/۳۹±۰/۶۴ <sup>B</sup>	۱۴

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

روز صفر به حدود ۱/۵-۰/۹۷ درصد در نمونه های حاوی قارچ و به حدود ۲/۲۶-۱/۵۱ درصد در نمونه های حاوی مخمر در روز ۱۴ افزایش یافت. میزان متوسط نیتروژن غیر پروتئینی پودر ماهی تلقیح شده با مخمر بالاترین میزان را داشت.

در جدول ۴ تغییرات میزان نیتروژن غیر پروتئینی تیمارهای مختلف در طی فرایند تخمیر مشاهده می‌شود. میزان این شاخص، در نمونه های حاوی قارچ و مخمر با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت. در نمونه های قبل تخمیر میزان نیتروژن غیر پروتئینی از حدود ۳ درصد در

جدول ۴: تغییرات شاخص نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف

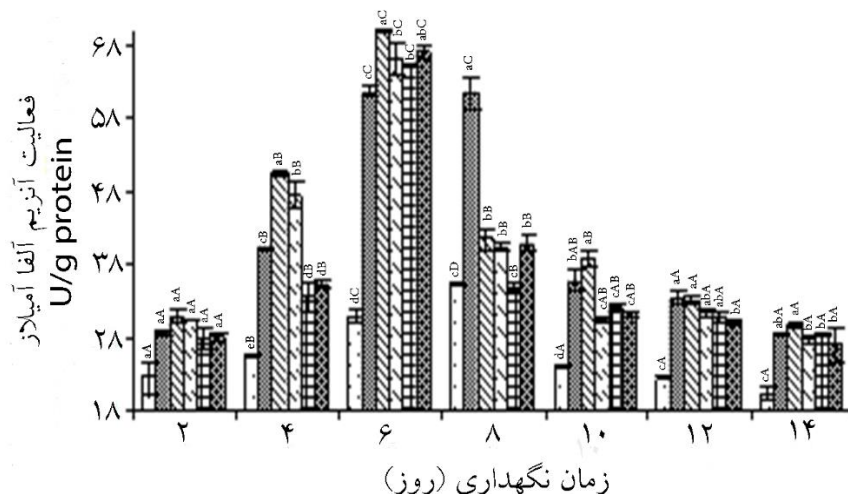
<i>S.carlesbergensis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>A.awamורי</i>	<i>A.niger</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.plantarum</i>	
۰/۵±۰/۰۱ <sup>aD</sup>	۰/۴۹±۰/۰۰ <sup>aE</sup>	۰/۵۲±۰/۰۳ <sup>aD</sup>	۰/۵۲±۰/۰۱ <sup>aF</sup>	۰/۵±۰/۰۳ <sup>aC</sup>	۰/۵±۰/۰۴ <sup>aC</sup>	۰
۰/۹۰±۰/۰۴ <sup>C</sup>	۰/۹۷±۰/۰۰ <sup>D</sup>	۰/۹۴±۰/۰۲ <sup>C</sup>	۰/۶۳±۰/۰۰ <sup>E</sup>	۰/۹۳±۰/۰۲ <sup>A</sup>	۰/۹۵±۰/۰۳ <sup>A</sup>	۲
۰/۸۵±۰/۰۴ <sup>C</sup>	۱/۳۲±۰/۱۰ <sup>C</sup>	۰/۹۳±۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۷±۰/۰۰ <sup>D</sup>	۰/۶۳±۰/۰۱ <sup>B</sup>	۰/۹۴±۰/۰۲ <sup>B</sup>	۴
۰/۹±۰/۰۲ <sup>C</sup>	۱/۶۹±۰/۱۴ <sup>B</sup>	۰/۹۱±۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۸۴±۰/۰۲ <sup>C</sup>	۰/۶۷±۰/۰۲ <sup>B</sup>	۰/۶۴±۰/۰۲ <sup>B</sup>	۶
۰/۹۸±۰/۰۰ <sup>BC</sup>	۱/۳۲±۰/۰۶ <sup>C</sup>	۰/۸۷±۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۸۶±۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۵۱±۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۵۹±۰/۰۱ <sup>BC</sup>	۸
۱/۲۸±۰/۱۱ <sup>AB</sup>	۱/۸±۰/۰۳ <sup>B</sup>	۱/۱۰±۰/۰۳ <sup>B</sup>	۰/۹۲±۰/۰۲ <sup>B</sup>	۰/۵۳±۰/۰۱ <sup>C</sup>	۰/۶۳±۰/۰۶ <sup>B</sup>	۱۰
۱/۳۵±۰/۰۷ <sup>A</sup>	۲/۱۸±۰/۱۱ <sup>A</sup>	۱/۲۴±۰/۰۸ <sup>B</sup>	۰/۹۶±۰/۰۱ <sup>AB</sup>	۰/۴۹±۰/۰۰ <sup>C</sup>	۰/۶۴±۰/۰۲ <sup>B</sup>	۱۲
۱/۵۱±۰/۲۴ <sup>A</sup>	۲/۲۶±۰/۱۲ <sup>A</sup>	۱/۵±۰/۱۱ <sup>A</sup>	۰/۹۷±۰/۰۰ <sup>A</sup>	۰/۵۲±۰/۰۳ <sup>C</sup>	۰/۴۹±۰/۰۴ <sup>C</sup>	۱۴

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

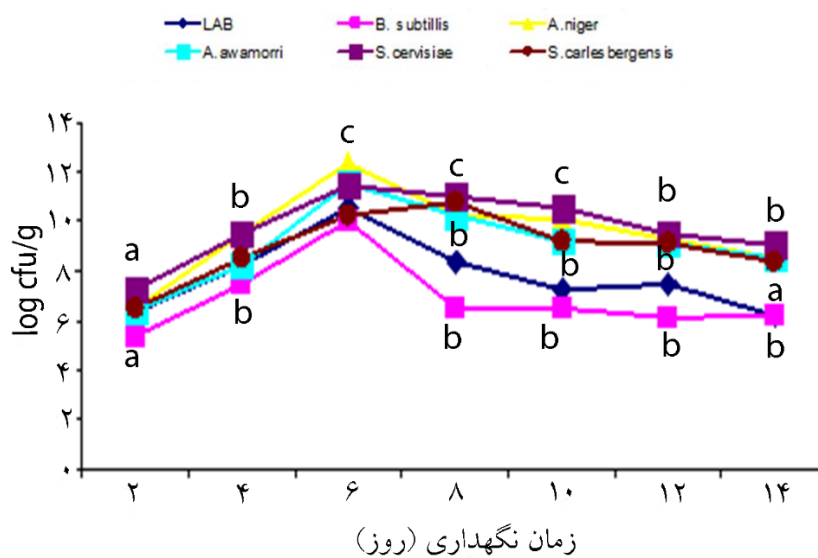


در میان میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش، بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز مربوط به قارچ *A. niger* بود که میزان آن برابر با ۷۰/۳۵ واحد بین المللی بر گرم پروتئین محلول بود. در تمام میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پیک افزایش میزان آنزیم آلفا آمیلاز در روز ۶ مشاهده گردید (شکل ۲).

تغییرات میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز طی فرایند تخمیر با استفاده از میکروارگانیسم‌های متفاوت در شکل ۱ نشان داده‌است. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با شروع فرایند تخمیر افزایش یافت که بیشترین میزان آن در روز ۶ مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز پس از روز ۶ کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).



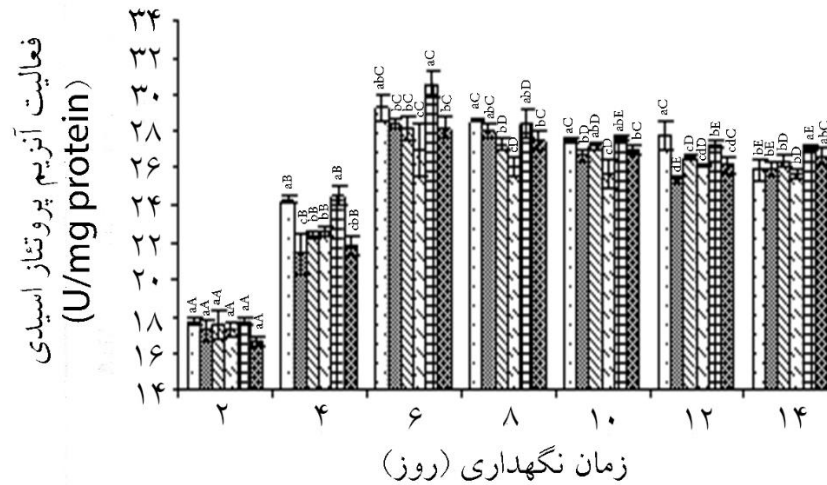
شکل ۱: تغییرات میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۲: نمودار رشد میکروارگانیسم‌ها طی تخمیر حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

پروتئاز اسیدی افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان فعالیت پروتئاز اسیدی در روز ۶ مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی پس از روز ۶ کاهش یافت ولی معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ).

تغییرات میزان فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی در پودر ماهی تلقیح شده با باکتری، قارچ و مخمر در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان اولیه فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی، حدود ۱۷ واحد بین المللی بر میلی گرم پروتئین محلول بود. با شروع فرایند تخمیر میزان فعالیت آنزیم



شکل ۳: تغییرات میزان فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارها می‌باشد ( $P < 0.05$ ). حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار طی دوره نگهداری در هر تیمار می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

نمونه‌های حاوی ۵ و ۱۰ درصد پودر ماهی تخمیری تلقیح شده با *S. cerevisiae*، *A. wamorri*، *A. niger* و *S. carlesbergensis* به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ).

تاثیر پودر ماهی تخمیری به عنوان منبع آنزیمی بر روی قابلیت هضم پروتئین و ماده خشک در شرایط آزمایشگاهی در مخلوط ذرت و کنجاله سویا در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. قابلیت هضم پروتئین خام در

جدول ۵: تاثیر پودر ماهی تخمیری روی قابلیت هضم پروتئین خام مخلوط ذرت و کنجاله سویا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از *S. carlesbergensis*، *S. cerevisiae*، *A. awamori*، *A. niger*، *B. subtilis*، *L. plantarum*.

<i>S. carlesbergensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. awamori</i>	<i>A. niger</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. plantarum</i>	
$79.9 \pm 0.39$	$79.73 \pm 0.60$	$79.84 \pm 0.37$	$80.49 \pm 1.76$	$79.36 \pm 0.84$	$79.96 \pm 0.28^b$	کنترل
$79.68 \pm 0.27$	$79.62 \pm 0.78$	$80.04 \pm 2.20$	$80.77 \pm 0.91$	$80.27 \pm 0.17$	$80.18 \pm 0.52^b$	۰/۱
$80.06 \pm 0.50$	$79.99 \pm 0.37$	$80.49 \pm 0.95$	$80.22 \pm 1.47$	$80.95 \pm 2.04$	$80.49 \pm 0.06^b$	۱
$89.87 \pm 0.30$ A	$89.80 \pm 0.57$ A	$89.75 \pm 0.41$ A	$88.52 \pm 1.00$ A	$86.39 \pm 1.10$ B	$86.29 \pm 0.96$ B	۵
$89.66 \pm 0.44$ BC	$90.98 \pm 0.85$ A	$89.91 \pm 0.33$ B	$88.79 \pm 0.45$ C	$86.66 \pm 0.85$ D	$86.39 \pm 0.15$ D	۱۰

حروف (a-b) در هر یک از ستون‌ها نشان دهنده تفاوت معنی داری است. همچنین حروف (A-D) در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری است.

جدول ۶: تاثیر پودر ماهی تخمیری روی قابلیت هضم ماده خشک مخلوط ذرت و کنجاله سویا در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از *S. carlesbergensis* و *S. cerevisiae*، *A. awamori*، *A. niger*، *B. subtilis*، *L. plantarum*

<i>S.carlesbergensis</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>A.awamori</i>	<i>A.niger</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.plantarum</i>	کنترل
$50.20 \pm 0.30^c$	$50.59 \pm 0.57^c$	$49.99 \pm 0.14^c$	$50.44 \pm 0.77^c$	$50.40 \pm 0.75^d$	$50.10 \pm 0.38^c$	۰/۱
$51.10 \pm 0.40^B$	$51.05 \pm 0.47^B$	$52.19 \pm 1.15^{AB}$	$52.20 \pm 1.90^{AB}$	$52.45 \pm 0.48^{AB}$	$53.65 \pm 0.52^A$	۱
$53.28 \pm 0.11^C$	$54.61 \pm 0.49^B$	$53.55 \pm 0.11^C$	$54.33 \pm 0.25^B$	$55.24 \pm 0.56^A$	$54.33 \pm 0.27^B$	۵
$62.18 \pm 0.78^A$	$61.78 \pm 1.17^{AB}$	$60.35 \pm 1.31^{ABC}$	$60.18 \pm 1.62^{ABC}$	$59.31 \pm 0.79^C$	$59.69 \pm 1.05^{BC}$	۱۰
$63.05 \pm 0.71^A$	$63.02 \pm 0.69^A$	$60.99 \pm 0.67^B$	$62.39 \pm 0.23^A$	$60.41 \pm 0.96^B$	$60.72 \pm 0.61^B$	

حروف (a-b) در هر یک از ستون ها نشان دهنده تفاوت معنی داری است. همچنین حروف (A-C) در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی داری است.

#### ۴. بحث

تغییرات میزان پراکسید سیلاژ ماهی با میکروارگانیسم-های مختلف طی ۱۴ روز نگهداری در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان پراکسید در سیلاژ ماهی تهیه شده با میکروارگانیسم‌های مختلف تا روز ۸ به طور معنی داری افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ) و سپس از روز ۱۰ تا انتهای دوره نگهداری به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان شاخص پراکسید در سیلاژ تخمیری با قارچ‌ها مشاهده گردید. تبدیل پراکسید به محصولات ثانویه مانند آلدئیدها و پیوند آن‌ها با پروتئین‌ها منجر به کاهش میزان پراکسید می‌گردد (Woyewoda et al., 1986) Yamamoto et al. (2005) یافتند که میزان پراکسید سیلاژ تخمیری با *A. awamori* در مقایسه با پودر ماهی خشک شده با حرارت کمتر بود. در این مطالعه، میزان پراکسید سیلاژ تخمیری با میکروارگانیسم‌ها در انتهای دوره نگهداری در مقایسه با روز ابتدایی به طور معنی داری افزایش نشان داد.

تغییرات شاخص تیوباربتوریک اسید سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. میزان تیوباربتوریک اسید سیلاژ تخمیری با میکروارگانیسم‌های مختلف طی دوره نگهداری متغیر بود. کمترین و بیشترین میزان تیوباربتوریک اسید به ترتیب در سیلاژ تخمیری تلقیح

تغییرات میزان اسیدهای چرب آزاد سیلاژ ماهی با میکروارگانیسم‌های مختلف طی ۱۴ روز نگهداری در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین میزان اسیدهای چرب آزاد در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری‌ها و قارچ‌ها مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). افزایش میزان اسیدهای چرب فرار طی فرایند تخمیر توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها نشان دهنده تاثیرات سمی در خوراک ماهی نمی‌باشد (Ahmed and Mahendrakar, 1996). علت افزایش میزان اسیدهای چرب فرار، لیپولیز چربی‌ها با آنزیم لیپاز با منشا میکروبی می‌باشد. Yano et al. (2008) و Nasseri et al. (2011) نشان دادند که میکروارگانیسم-های *A. niger* و *L. plantarum* قادر به هیدرولیز لیپید و استفاده از لیپید به عنوان منبع انرژی می‌باشند. بنابراین شاخص اسیدهای چرب آزاد در این نوع میکروارگانیسم‌ها برخلاف نتایج به دست آمده در این مطالعه برای سیلاژ تخمیری با قارچ و باکتری کاهش یافت. در کمترین میزان اسیدهای چرب در *S. cerevisiae* و *S. carlesbergensis* مشاهده گردید که علت آن، وجود سیکل بتا اکسیداسیون در سلول مخمرها است که اسیدهای چرب آزاد را جهت تولید سایر محصولات مصرف می‌کنند (Yano et al., 2008).

ترشح پروتئاز اسیدی میکروبی را نیز تسریع می‌بخشد (Hammoumi et al., 1998). تغییرات شاخص نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف در جدول ۴ نشان داده شده‌است. میزان نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ تخمیری با میکروارگانیسم‌های مختلف طی دوره نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت. کمترین میزان نیتروژن غیر پروتئینی در سیلاژ ماهی تلقیح شده با باکتری‌ها مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). علت میزان اندک نیتروژن غیر پروتئین در باکتری‌ها می‌توان به دلیل احاطه شدن آنزیم‌های باکتری‌ها با کربوهیدرات‌ها باشد (Fagbenro and Bello-Olusoji, 1996). همچنین کاهش میزان نیتروژن غیر پروتئینی در طی تخمیر باکتریایی را می‌توان به استفاده این ترکیبات به وسیله میکروارگانیسم‌ها تعمیم داد (Kakio et al., 1997; Je et al., 2005). Shabani et al. (2018) نشان دادند که میزان نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ تخمیری با *L. plantarum* قبل و بعد از تخمیر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در حالی که در مطالعه حاضر میزان نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ تخمیری با باکتری، قارچ و مخمر قبل و بعد تخمیر کاهش معنی‌داری نشان داد. میزان بالای نیتروژن غیر پروتئینی نشان دهنده این است که نیتروژن غیر پروتئینی مانند اسیدهای آمینه آزاد، آمونیاک، آمین-ها و پپتیدها در نتیجه اتولیز پروتئین توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در ماهی و میکروارگانیسم‌ها تشکیل می‌گردند (Hasan, 2003; Vijayan et al., 2009; Ezeama and Udoh, 2012). در باکتری‌های *L. plantarum* و *B. subtilis* میزان نیتروژن غیر پروتئینی به جز در روز ۲ به تدریج کاهش می‌یابد. در کل، کاربرد تخمیر در فراوری خوراک به ویژه باکتری‌ها شاخص مناسبی جهت کاهش میزان نیتروژن غیر پروتئینی می‌باشد.

شده با قارچ *A. niger* و باکتری *L. plantarum* مشاهده شدند ( $P < 0/05$ ). محققین بسیاری عقیده دارند که میکروارگانیسم‌ها یک سری مواد آنتی اکسیدانی ترشح می‌کنند که میزان آن در باکتری، قارچ و مخمر متفاوت است و نیاز به مطالعه بیشتری می‌باشد (Kawai et al., 1994; Smith and Alford, 1970; Tabbene et al., 2010; Li et al., 2012). همچنین کاهش مقدار تیوباربتوریک اسید بعد از ۸ روز را می‌توان در ارتباط با کاهش میزان مالون آلدئید دانست که مالون آلدئید با پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه واکنش می‌دهد (Mach and Nortvedt, 2009). اسیدهای آلی تولید شده توسط پودر ماهی تخمیری ممکن است دنا توره شدن پروتئین را منجر گردد که منجر به رها سازی هم آزاد می‌گردد که یک نوع پیش اکسید کننده بالقوه در عضله ماهی کیلکا می‌باشد. این عامل ممکن است دلیلی برای اکسید سریع چربی در پودر ماهی تلقیح شده با باکتری‌ها باشد. این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً روش تخمیر منجر به کند شدن اکسیداسیون چربی می‌گردد.

Ndaw et al. (2008) پیشنهاد کردند که بیشترین میزان تیوباربتوریک اسید ۵ میلی گرم مالون آلدئید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه خوراک است. در حالی که میزان مجاز تیوباربتوریک اسید پودر ماهی تا ۸ میلی گرم مالون آلدئید اکیوالان بر کیلوگرم ماهی است. بنابراین، در میان میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، قارچ و مخمر (حدود ۷-۸ میلی گرم مالون آلدئید اکیوالان بر کیلوگرم نمونه) بهترین میزان تیوباربتوریک اسید را دارند. کاهش میزان تیوباربتوریک اسید سیلاژ تخمیری با قارچ و مخمر به دلیل کاهش اکسیداسیون چربی به عنوان خوراک سالم برای ماهیان است (Yano et al., 2008).

آنزیم‌های لیزوزوم مانند کاتاپسین D مهمترین پروتئازهای ماهیچه‌ای هستند (Viana et al., 1996) که ممکن است فرایند اتولیز را تسریع بخشند. همچنین

تغییرات میزان فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان اولیه فعالیت پروتئاز اسیدی تقریباً  $14 \text{ U/mg of protein}$  بود که با شروع فرآیند تخمیر با تلقیح میکروارگانیسم‌ها، فعالیت پروتئاز اسیدی به طور معنی داری افزایش می‌یابد ( $P < 0.05$ ). افزایش میزان پروتئاز اسیدی با رشد لگاریتمی میکروارگانیسم‌ها تا روز ۶ تخمیر ادامه داشت و پس از روز ۶، میزان فعالیت پروتئاز اسیدی به تدریج کاهش می‌یابد ( $P < 0.05$ ). Yamamoto et al. (2005) نشان داد که میزان پروتئاز اسیدی سیلاژ تخمیری با *Aspergillus awamori* پس از تخمیر افزایش یافت. میزان ترشح آنزیم پروتئاز اسیدی توسط میکروارگانیسم‌ها با رشد آن‌ها در ارتباط می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم با رشد میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابد (شکل ۲ و شکل ۳). همچنین، با افزایش میزان اسیدهای آلی فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی افزایش می‌یابد (Islam, 2012). علاوه بر این، میزان فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی با افزایش میزان پروتئین می‌یابد (Chutmanop et al., 2008). همچنین افزایش میزان فعالیت پروتئاز اسیدی در روزهای اولیه تخمیر با افزایش میزان پروتئین خام در ارتباط است (Bhatnagar et al., 2010). هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم پروتئاز اسیدی تولید پپتیدها و همچنین اسیدهای آمینه آزاد می‌گردد که اسیدهای آمینه آزاد فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی را کاهش می‌دهد (García-Gómez et al., 2009). بیشترین میزان فعالیت پروتئاز اسیدی در پودر ماهی تلقیح شده با مخمر *S. cerevisiae* و *S. carlesbergensis* به دست آمد. Bhatnagar et al. (2010) و Mukhtar و Haq (2009) یافتند که که میزان پروتئاز اسیدی سیلاژ تخمیری با *A. niger* ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت که مشابه نتایج مطالعه حاضر بود.

تخمیر میکروبی یکی از مهمترین منابع تولید آنزیم است که به طور گسترده در صنعت برای تولید آنزیم‌های متنوع مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیم آلفا آمیلاز و پروتئاز اسیدی از مهمترین آنزیم‌هایی است که در خوراک حیوانات مانند ماهیان اهمیت دارند (Pandey et al., 1999). آنزیم آلفا آمیلاز، نشاسته کربوهیدرات‌ها و پروتئاز اسیدی نیز پروتئین پودر ماهی را هیدرولیز می‌کنند. تخمیر با ماده زمینه جامد قادر به تولید آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز اسیدی است که قادر به اصلاح قابلیت هضم کربوهیدرات و پروتئین پودر ماهی می‌باشند. تغییرات میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سیلاژ ماهی طی فرایند تخمیر با میکروارگانیسم‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز سیلاژ ماهی با میکروارگانیسم‌های مختلف طی دوره تخمیر تا روز ۶ افزایش و سپس کاهش نشان داد ( $P < 0.05$ ). افزایش میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز طی فرایند تخمیر در ابتدای دوره تخمیر را می‌توان در رشد بهینه و حداکثر تعداد میکروارگانیسم‌های موجود و همچنین وجود مواد مغذی حداکثر (علی‌الخصوص کربوهیدرات‌ها) در پودر ماهی دانست (Hernández et al., 2006). میکروارگانیسم‌ها در مرحله فاز رشد بیشترین میزان توانایی جهت تولید آنزیم آلفا آمیلاز را دارند (شکل ۲). میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در روز ۶ به بیشترین میزان خود می‌رسد که افزایش میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز با رشد میکروارگانیسم‌ها در ارتباط می‌باشد (Bhatnagar et al., 2010). کاهش میزان آنزیم آلفا آمیلاز از اواسط دوره تا انتهای فرایند تخمیر را می‌توان در کاهش فعالیت میکروارگانیسمی و کاهش مواد مغذی دانست (Rani Singhania et al., 2009; Sivaramakrishnan et al., 2006). همچنین Chutmanop et al. (2008) نشان دادند که ممکن است آنزیم آلفا آمیلاز توسط آنزیم پروتئاز هضم شود.

تخمیری با میکروارگانیسم های مختلف نشان داد که کمترین میزان اسیدهای چرب آزاد و پراکسید در مخمرها و کمترین میزان تیوباربتوریک اسید در قارچ *A. niger* مشاهده گردید. باکتری های *L. plantarum* و *B. subtilis* منجر به کاهش نیتروژن غیر پروتئینی سیلاژ تخمیری شدند. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز، پروتئاز اسیدی و قابلیت هضم پروتئین و ماده خشک ذرت و کنجاله سویا در شرایط آزمایشگاهی در سیلاژ ماهی کیلکا آنچوی تلقیح شده با مخمر *S. cerevisiae* مشاهده گردید. به طور کلی، سیلاژ تخمیری ماهی کیلکا آنچوی تلقیح شده با *S. cerevisiae* در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب در خوراک آبزیان باشد.

قابلیت هضم پروتئین خام و ماده خشک روشی جهت تشخیص پودر ماهی تخمیری مناسب است. قابلیت هضم پروتئین خام در نمونه های حاوی ۵ و ۱۰ درصد پودر ماهی تخمیری تلقیح شده با قارچها و مخمرها به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). علت آن ممکن است به درصد بالای پودر ماهی تخمیری (حاوی آنزیم پروتئاز بیشتر) در نمونه های ذرت و کنجاله سویا می باشد که منجر به هیدرولیز پروتئین به پپتیدها می شود و در نتیجه قابلیت هضم پروتئین خام نیز افزایش می یابد. در میان نمونه های مختلف آزمایشی، باکتری های *L. plantarum* و *B. subtilis* کمترین میزان قابلیت هضم پروتئین خام را دارند که علت آن در وجود ترکیبات نیتروژنی غیر قابل هضم در این نمونه است. میزان قابلیت هضم ظاهری ماده خشک در مقادیر متفاوت پودر ماهی تخمیری افزایش نشان داد که بیشترین میزان آن در مقدار ۵ و ۱۰ درصد وجود داشت ( $p < 0.05$ ) Yamamoto et al. (2005) نشان دادند که قابلیت هضم ماده خشک مخلوط ذرت و کنجاله سویا با افزایش درصد سیلاژ ماهی تلقیح شده با *A. awamori* به طور معنی داری افزایش یافت در حالی که قابلیت هضم پروتئین ذرت و کنجاله سویا با افزایش درصد سیلاژ ماهی تلقیح شده با *A. awamori* تغییری نشان نداد. میزان بالای قابلیت هضم ماده خشک ممکن است به دلیل مقدار بالای پلی ساکاریدهای غیر نشاسته-ای باشد که به وسیله آنزیمها هیدرولیز می-شود (Yamamoto et al., 2005).

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تکنیک سیلاژ تخمیری با میکروارگانیسمها یک روش کارآمد و موثر برای اصلاح ارزش های تغذیه ای پودر ماهی کیلکا آنچوی است. تخمیر پودر ماهی کیلکا آنچوی با میکروارگانیسم های مختلف منجر به افزایش اکسیداسیون چربی (اسیدهای چرب آزاد، پراکسید و تیوباربتوریک اسید) شد. مقایسه شاخص های اکسیداسیون چربی سیلاژ

**References:**

- Ahmed, J. and Mahendrakar, N. S. 1996. Autolysis and rancidity development in tropical freshwater fish viscera during fermentation. *Bioresource Technology*. 58: 247-251.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathapsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*. 22: 79-89.
- Arruda, L. F., Borghesi, R. and Oetterer, M. 2007. Use of fish waste as silage- a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50: 897-886.
- Bhatnagar, D., Joseph, I. and Raul Raj, R. 2010. Amylase and acid protease production by solid state fermentation using (*Aspergillus niger*) from mangrove swamp. *Indian Journal of Fisheries*. 57: 45-51.
- Chutmanop, J., Chuichulcherm, S., Chisti, Y. and Srinophakun, P. 2008. Protease production by (*Aspergillus oryzae*) in solid-state fermentation using agroindustrial substrate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1012-1018.
- Ezeama, C. F. and Udoh, E. J. 2012. The influence of fermentation and salting on the bacterial, chemical and sensory characteristics of catfish (*Clarias buthupogon*) based marinate in Nigeria. *African Journal of Food Science*. 6: 381-385.
- Fagbenro, O. A. and Bello-Olusoji, O. A. 1996. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food Chemistry*. 60: 489-493.
- Faid, M., Zouiten, A., Elmarrakchi, A. and Achkari-Begdouri, A. 1997. Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. *Food Chemistry*. 60: 13-18.
- García-Gómez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. and Prado-Barragán, L. A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by (*Aspergillus oryzae*) from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*. 112: 604-608.
- Goulas, A. E. and Kontominas, M. G. 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. 93: 511-520.
- Hammoumi, A., Faid, M., El yachoui, M. and Amarouch, H. 1998. Characterization of fermented fish waste used in feeding trials with broilers. *Process Biochemistry*. 33: 423-427.
- Hasan, B. 2003. Fermentation of fish silage using (*Lactobacillus pentosus*). *Jurnal Natur Indonesia*. 6: 11-15.
- Hernández, M. S., Rodríguez, M. R., Guerra, N. P. and Rosés, R. P. 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*. 73: 93- 100.
- Islam, K. M. S. 2011. Use of citric acid in broiler diets. *World's Poultry Science Journal*. 68: 104-118.
- Je, J., Park, P., Jung, W. and Kim, S. 2005. Amino acid changes in fermented oyster (*Crassostrea gigas*) sauce with different fermentation periods. *Food Chemistry*. 91:15-18.
- Kakio, M., Kawai, Y., Kunimoto, M., Yamazaki, K., Inoue, N. and Shinano, H. 1997. Chemical and microbiological characteristics of sardine meal fermented with *Aspergillus oryzae* IFO4202. *Food Science and Technology International (Tokyo)*. 3:61-68.
- Kawai, Y., Otaka, M., Kakio, M., Oeda, Y., Inoue, N. and Shinano, H. 1994. Screening of antioxidant-producing fungi in (*Aspergillus niger*) group for liquid and solid-state fermentation. *Bulletin of the*

- Faculty of Fisheries Hokkaido University. 45:26-31.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C. and Yang, Z. 2012. Antioxidant activity of (*Lactobacillus plantarum*) strain isolated from traditional Chinese fermented feeds. *Food Chemistry*. 135: 1914-1919.
- Licitra, G., Hernandez, T. M. and Van Soest, P. J. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 57: 347-358.
- Lojda, Z., Gossrau, R. and Schiebler, T. H. 1979. *Enzyme histochemistry: a laboratory manual*. New York: sprinter- verlag.
- Mach, D. T. N. and Nortvedt, R. 2009. Chemical and nutritional quality of silage made from raw or cooked lizard fish (*Saurida undosquamis*) and blue crab (*Portunus pelagicus*). *Journal of the Science Food and Agriculture*. 89: 2519-2526.
- Malekpour, M., Allaf Nvyryan, H., Sajjadi, MM. and Mohseni, M. 2016. Effect of replacing fish meal with canola meal on growth performance, survival and body composition of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt). *Journal of Marine Science and Technology*. 15: 77-88.
- Mondal, K., Kaviraj, A. and Mukhopadhyay, P. K. 2008. Evaluation of fermented fish-offal in the formulated diet of the freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture Research*. 39: 1443-1449.
- Mukhtar, H. and Haq, I. 2009. Production of acidic protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Pakistan Journal of Zoology*. 41: 253-260.
- Ndaw, A. D., Faid, M., Bouseta, A. and Zinedine, A. 2008. Effect of controlled lactic acid bacteria fermentation on the microbiological and chemical quality of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 10: 21-27.
- NRC (National Research Council). 1993. *Nutrient requirements of fish*. National Academy Press, Washington D.C., U.S.A.
- Ovissipour, M. R. and Ghomi, M. R. 2009. *Biotechnology in seafood production*. Islamic Azad University, Tonekabon Branch. Tonekabon, Iran. 192p.
- Ozyurt, C. E., Boga, E. K., Ozkutuk, A. S., Ucar, Y., Durmus, M. and Ozyurt, G. 2018. Bioconversion of discard fish (*Equulites klunzingeri* and *Carassius gibelio*) fermented with natural lactic acid bacteria; the chemical and microbiological quality of ensilage. *Waste and Biomass Valorization*. (In press).
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for production of industrial enzymes. *Current Science*. 77: 149-162.
- Parafkandeh Haghighi, F. and Kaymaram, F. 2012. Stock assessment and the maximum sustainable yield estimation of common Kilka *Clupeonella cultriventris* Caspian (Svetovidov, 1941) in the South Caspian Basin. *Journal of Marine Science and Technology*. 11: 16-24.
- Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, A. 2005. An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*. 1: 10-16.
- Rahmi, M., Faid, M., EIYachioui, M., Berny, E. H., Fakir, M., Ouhssine M. 2008. Protein rich ingredients from fish waste for sheep feeding. *African Journal of Microbiology Research*. 2: 73-77.
- Rani Singhania, R., Kumar patel, A., Soccol, C. R. and Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state



- fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44: 13-18.
- Shabani, A., Boldaji, F., Dastar, B., Ghoorchi, T. and Zerehdaran, S. 2018. Preparation of fish waste silage and its effect on the growth performance and meat quality of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98: 4097-4103.
- Siripatrawan, U. and Noipha, S. 2012. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*. 27: 102-108.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan Nampoothiri, K., Ricardo Soccol, C. and Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -amylase from microbial sources- and overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*. 44: 173-184.
- Smith, J. L and Alford, J. A. 1970. Presence of antioxidant materials in bacteria. *Lipids*. 5: 795-799.
- Subramaniyam, R. and Vimala, R. 2012. Solide state submerged fermentation for the production of bioactive substances. *International Journal of Science and Nature*. 3: 480- 486.
- Tabbene, O., Karkouch, I., Elkahoui, S., Cosette, P., Mangoni, M. L., Jouenne, T. and Limam, F. 2010. A new antibacterial and antioxidant S07-2 compound produced by (*Bacillus subtilis* B38). *FEMS Microbiology Letters*. 303: 176-18.
- Viana, M. T., Guzman, J. M. and Escobar, R. 1999. Effect of heated and unheated fish silage as a protein source in diets for abalone (*Haliotis fulgens*). *Journal of the World Aquaculture Society*. 30: 481-489.
- Vijayan, H., Joseph, I. and Paul Raj, R. 2009. Biotransformation of tuna waste by co-fermentation into an aquafeed ingredient. *Aquaculture Research*. 40: 1047-1053.
- Worthington, C. C. 1991. *Worthington enzyme manual related biochemical*. 3 th edition. Freehold. New Jersey. pp, 250- 253.
- Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J. and Burns, B. G. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. *Canadian Institute of Fisheries Technology*.
- Yamamoto, M., Saleh, F., Ohtsuka, A. and Hayashi, K. 2005. New fermentation technique to process fish waste. *Animal Science Journal*. 76: 245-248.
- Yamamoto, M., Saleh, F. and Hayashi, K. 2004. A fermentation method of dry and convert shochu distillery by-product to a source of protein and enzymes. *Animal Science Journal*. 41: 275-280.
- Yano, Y., Oikawa, H. and Satomi, M. 2008. Reduction of lipids in fish meal prepared from fish waste by a yeast (*Yarrowia lipolytica*). *International Journal of Food Microbiology*. 127: 302-307.



Available Online: <http://jmst.kmsu.ac.ir>

Original Article



## **Comparative Effect of Anchovy Kilka (*Clupeonella engrauliformis* Svetovidov, 1941) Silage with Solid-state Fermentation with Six Microorganisms on Quality Properties, Enzyme Activity and Apparent Digestibility of Nutrients**

**Ainaz Khodanazary<sup>1\*</sup>, Abdolmajid Hajimoradloo<sup>2</sup>, Rasool Ghorbani<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.

<sup>2</sup> Department of Fisheries and Environment, Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

\*Corresponding Author E-mail: [khodanazary@yahoo.com](mailto:khodanazary@yahoo.com)

Received: 22 November 2018

Accepted: 11 January 2019

DOI: 10.22113/JMST.2019.158271.2230

### **Abstract**

The aim of this study was to investigate the effect of solid-state fermentation on quality properties, enzyme activity and apparent digestibility of nutrients of Kilka Anchovy. Kilka Anchovy meal were mixed with 25% wheat flour and inoculated with microorganisms ( $10^8$  cell/ml) and kept in an incubator for 14 days at 37 °C. Comparison of oxidation and hydrolysis indexes at Kilka Anchovy silage inoculated with microorganisms showed that *S. cerevisiae* was the lower free fatty acid (7.62  $\mu$  mole/g fish) and peroxide (12.47 meq peroxide/1000g oil). The lowest nitrogen non protein of Anchovy Kilka silage was shown with fish silage inoculated with *L. plantarum* and *B. subtilis*. The lowest thiobarbituric acid (8.40 mg malonaldehyde/ kg) was showed at fish silage inoculated with fungi *A. niger*. The highest  $\alpha$ -amylase and acidic protease activities was shown at fish silage inoculated with fungi *A. niger* and yeasts (*S. cerevisiae* and *S. carlesbergensis*), respectively. The in vitro digestibility of dry matter and crude protein with different levels of the fish silage increased. The highest of in vitro digestibility of dry matter and crude protein was related to *S. cerevisiae* ( $P>0.05$ ). Generally, the results showed that *S. cerevisiae* had the best quality properties, enzyme activity and digestibility of nutrient of fermented silage compared with other fish silage inoculated with other microorganisms.

**Keywords:** Anchovy Kilka, Solid-state fermentation, Microorganism, Quality properties, Digestibility of nutrient, Enzyme activity.

**List of Table and Figures**

**Table 1:** Changes in free Fatty Acid indexes of silage fish during fermentation process by different microorganisms

**Table 2:** Changes in Peroxide Acid indexes of silage fish during fermentation process by different microorganisms

**Table 3:** Changes in Thiobarbituric Acid indexes of silage fish during fermentation process by different microorganisms

**Table 4:** Changes in Non-Protein Nitrogen indexes of silage fish during fermentation process by different microorganisms

**Table 5:** The effect of fermented fish powder on the digestibility of crude protein in corn & soybean meal in vitro by *L. plantarum*, *B. subtilis*, *A. niger*, *A. awamori*, *S. cerevisiae* and *S. carlesbergensis*.

**Table 6:** The effect of fermented fish powder on the digestibility of dry matter digestibility in corn & soybean meal in vitro by *L. plantarum*, *B. subtilis*, *A. niger*, *A. awamori*, *S. cerevisiae* and *S. carlesbergensis*.

**Figure 1:** Changes in the activity of Alpha-Amylase Enzyme in silage fish during the fermentation process by different microorganisms

**Figure 2:** Diagram of growth of microorganisms during fermentation.

**Figure 3:** Changes in the activity of Acidic Protease Enzyme of silage fish during the fermentation process by different microorganisms