تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از باکتری‌های اتوژن و سنجش کمی و کیفی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول

رضا صفری[1*]، سهیل ریحانی پول[2]، زهرا بانکه‌ساز[1]، محمدجواد تقوی[1]، عین‌اله صفری[1]

[1]پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

[2]گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول safari1351@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۳۰

چکیده

با افزایش مراکز فراوری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشور، استفاده بهینه از ضایعات تولید شده در این مراکز ضروری به نظر می‌رسد. یکی از روش‌های استفاده بهینه از ضایعات، تبدیل آن‌ها به محصولاتی با ارزش افزوده بالا نظیر بیوسیلاژ می‌باشد. این محصول در صورت دارابودن خصوصیات مطلوب، می‌تواند در صنعت تغذیه آبزیان، دام و طیور استفاده گردد. هدف این مطالعه تولید بیوسیلاژ از ضایعات ماهی مذکور با استفاده از باکتری‌های اتوژن و بررسی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول است. نتایج نشان داد مجموع اسیدهای آمینه ضروری، غیر ضروری و کل در محصول تولیدشده به ترتیب ۳۲/۱۲، ۲۷/۰۶ و ۵۹/۱۸ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا است. در ادامه مشخص شد در بین اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری به ترتیب آرژینین و گلوتامیک‌اسید دارای بیشترین مقدار هستند (به ترتیب ۵/۸۲ و ۹/۰۲ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و محصول تولیدشده فاقد اسید آمینه تریپتوفان است. در محصول تولیدشده شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین‌های مرجع برای اسیدآمینه‌های هیستیدین، آرژینین، والین و لوسین بالای یک محاسبه شد. بررسی ترکیب اسیدهای چرب بیوسیلاژ نشان داد مجموع اسیدهای چرب اشباع (SFA)، اسیدهای چرب تک غیر اشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA) در این محصول به ترتیب ۳۳/۳۹، ۳۱/۳۲ و ۳۵/۲۷ درصد می‌باشد. در ادامه نسبت امگا۶ به امگا۳ در سیلاژ بیولوژیک ۹/۷۳ گزارش گردید. بر اساس نتایج، بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از نظر ترکیب اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب غنی بوده و می‌تواند به فرمولاسیون جیره در تغذیه آبزیان، دام و طیور اضافه گردد.

واژگان کلیدی: ضایعات ماهی، بیوسیلاژ، پروفیل اسیدهای آمینه، پروفیل اسیدهای چرب.

مقدمه

به‌طور کلی در مراکز تولید و فراوری محصولات پروتئینی (گوشت، مرغ و آبزیان)، حجم زیادی از ضایعات پروتئینی تولید می‌شود. پوست، امعا و احشا، استخوان، سر جاندار و خون از جمله این ضایعات هستند که در صورت دورریز شدن علاوه بر آلودگی محیط زیست، هیچ سودی برای آن واحد تولیدی ندارند. با استفاده از روش‌های سنتی، طی چند دهه اخیر این ضایعات به شکل پودر در آمده و در تغذیه دام، طیور و آبزیان تحت عنوان پودر ماهی، پودر گوشت و پودر خون استفاده می‌شوند. با استفاده از تکنولوژی جدید می‌توان ترکیباتی با ارزش افزوده بالاتر از ضایعات پروتئینی تولید کرد. سیلاژ یکی از این محصولات است که یک محصول تخمیری بر پایه واکنش‌های اتولیز، شیمیایی و یا میکروبی می‌باشد. این محصول کاربردهای متنوعی داشته و می‌توان از آن در صنایع کشاورزی (به عنوان کود بیولوژیک)، آبزی‌پروری و طیور (در جیره غذایی دام و طیور و آبزیان به‌عنوان منبع جایگزین پروتئینی) استفاده کرد. بیوسیلاژ، سیلاژی است که در فرایند تولید آن از میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها) استفاده می‌شود. با بهره‌گیری از باکتری‌های مفید نظیر باکتری‌های لاکتیک، باسیلوس‌ها و مخمرها، ضایعات آماده‌سازی شده تحت تخمیر میکروبی قرار گرفته و به یک مایع

یکنواخت تبدیل می‌گردند. با تغلیظ محصول و خشک‌کردن آن، بیوسیلاژ تولید می‌شود. بیوسیلاژ از نظر قیمت، مقدار و نوع پروتئین و تکنولوژی خط تولید نسبت به سایر محصولات مانند پودر ماهی ارجحیت دارد. بنابراین استفاده از آن به جای سایر محصولات در صنعت تغذیه آبزیان مزایای زیادی از جمله کاهش قیمت تمام‌شده محصول دارد (Vázquez *et al*., 2011; Palkar *et al*., 2018). ارزش غذایی سیلاژ بسته به نوع ماده اولیه، نوع فرآیند مورد استفاده و کاهش رطوبت در محصول متفاوت می‌باشد. به‌طور کلی میانگین درصد پروتئین در بیوسیلاژ خشک شده از منابع مختلف ماهیان آب شیرین و دریایی بین ۳۹ تا ۵۹ درصد بوده و درصد اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین حاصله، قابل قبول به منظور استفاده در جیره غذایی ماهی می‌باشد (Vidotti *et al*., 2003). درصد چربی، مشابه پروتئین، به عوامل مختلف از جمله نوع فرآیند و نوع ماهی بستگی داشته و میانگین آن بین ۱۲ تا ۲۲ درصد می‌باشد. میانگین اسیدهای چرب اشباع شده، تک زنجیره و چند زنجیره غیراشباع در این فراورده به ترتیب ۲۰ تا ۳۶ درصد، ۳۱ تا ۴۴ درصد و ۲۵ تا ۳۸ درصد گزارش شده است (Haider *et al*., 2017; Ozyurt *et al*., 2018).

با تولید و مصرف بالای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در کشور، فرآوری این ماهی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. کارخانجات مختلفی در استان‌هایی نظیر چهارمحال بختیاری، مازندران، تهران و کهگیلویه و بویر احمد اقدام به فرآوری این ماهی و تولید اشکال مختلف شامل فیله، ماهی کامل شکم خالی، ماهی شکم خالی سر و دم زده می‌کنند. حجم ضایعات تولیدشده بسته به نوع محصول و مدل فرآوری متغیر و از ۲۰ تا ۳۴ درصد وزن ماهی را شامل می‌شوند. مواد مذکور سوبسترای مناسبی جهت تبدیل به پودر ماهی نیستند و به‌واسطه افزایش شاخص‌های فساد در محصول تولیدشده، دارای زمان ماندگاری بسیار پائینی می‌باشند. یکی از روش‌های مناسب جهت بازیافت و بهره‌برداری از ضایعات این ماهی، تولید سیلاژ است (Vázquez *et al*., 2011; Palkar *et al*., 2018). مطالعات متعددی در جوامع بین‌الملل در مورد تولید بیوسیلاژ از ضایعات ماهی انجام گرفته و نتایج قابل قبولی از خصوصیات این محصول گزارش گردیده است (Kim *et al*., 2011; Vazquez *et al*., 2011; Najim *et al*., 2014; Özyurt *et al*., 2016; Ramírez *et al*., 2016; Palkar *et al*., 2018; Shabani *et al*., 2021). در داخل کشور نیز تحقیقاتی در این زمینه انجام شده است. برای مثال تمدنی (۱۳۷۸) با استفاده روش اسیدی از ضایعات تون ماهیان سیلاژ تولید کرده و خواص کیفی آن را مورد بررسی قرار داد. از آن‌جا که در کشور تاکنون از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، بیوسیلاژ تولید نشده است، در این مطالعه ضمن تولید بیوسیلاژ از سوبسترای مذکور، محصول تولیدشده از نظر پروفیل اسیدهای آمینه، شاخص شیمیایی اسیدهای آمینه و ترکیب اسیدهای چرب مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تولید بیوسیلاژ از ضایعات قزل‌آلای رنگین‌کمان:

ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (سر، دم، پوست، امعاء و احشاء، باله‌ها) از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ساری تهیه و در مجاورت زنجیره سرد و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از انجمادزدایی، نمونه‌ها چرخ و به یک ارلن ۲ لیتری انتقال داده شدند. پس از اضافه‌کردن آب مقطر (به مقدار ۳۰ درصد ماده اولیه)، جهت غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی و همچنین حذف باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی (*Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli*)، نمونه‌ها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری قرار داده

شدند. سپس از باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین (*Bacillus subtilis* و *B. licheniformis*) و باکتری‌های تولیدکننده اسید (*Lactiplantibacillus plantarum*، *lactobacillus bulgaricus*، *Lacticaseibacillus rhamnosus*، *Pediococcus acidilactici* و *Lacticaseibacillus casei*) جهت کاهش pH سوسپانسیون، تحت عنوان باکتری‌های آغازگر یا استارترهای میکروبی استفاده شد. جهت آماده‌سازی اولیه باکتری‌های اسپوردار از محیط کشت تریپتیک سوی براث (Merck - آلمان) و باکتری‌های اسید لاکتیک از محیط کشت MRS براث (Merck - آلمان) استفاده گردید. بدین ترتیب که پس کشت اولیه هر باکتری در محیط های مذکور و گرم‌خانه-گذاری (ژال تجهیز- ایران) در دمای ۳۵ درجه به مدت ۱۸ ساعت، عمل سانتریفوژ (Cencom-p.selecta-اسپانیا) در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از شستشو با سرم فیزیولوژی (۳ مرتبه)، مجددا سانتریفوژ انجام گردید و در نهایت با لوله ۳ مک فارلند ($9\times^{8}$) مقایسه شده و جهت تزریق به عنوان استارتر مورد استفاده قرار گرفت. میزان تلقیح باکتری‌ها به صورت مخلوط باکتری‌ها در لوگ ۸ به مقدار ۵ درصد ماده اولیه بوده است. لازم به بیان است که باکتری‌های مورد استفاده انحصاری بوده و دارای ویژگی‌هایی نظیر رشد در pH اسیدی، توانایی رشد در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا ۶ ساعت و همچنین خواص پروتئازی بالا می‌باشند. به هنگام اضافه‌نمودن استارترهای میکروبی، منبع کربوهیدرات (ملاس نیشکر) به طور توأمان نیز اضافه گردید (به مقدار ۱۰ درصد ماده اولیه). نمونه‌ها در محدوده دمایی ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری به مدت ۴۸ ساعت شیک شده تا نمونه‌ها در شرایط هموژن تخمیر گردند. پس از اتمام فرآیند، جهت جداسازی روغن از محصول تولیدشده، نمونه‌ها در دور ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از خارج‌کردن روغن، به سوسپانسیون باقیمانده مقدار ۳ درصد سبوس برنج اضافه شد و در نهایت فرآیند خشک‌شدن در دمای ۶۰-۵۵ درجه آون (بهداد - ایران) به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. در مرحله نهایی، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خرد-کن (Moulinex - فرانسه)، به مش‌های (کمتر از ۱ میلی متر) یکسان تبدیل و بسته‌بندی و در مکان خشک و خنک نگهداری شدند.

سنجش پروتئین و چربی محصول

پروتئین خام: برای اندازه‌گیری پروتئین خام، ۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات‌سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد. چرا که بخارات متصاعدشده از بالن هضم سوزاننده است. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم‌شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سود ۵۰ درصد اضافه گردید و روی حرارت قرار داده شد. چون واکنش گرمازا است، قسمت‌های اتصال دستگاه کنترل شد تا از خروج گازهای متصاعدشده به خارج جلوگیری گردد. سپس۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به طوری که انتهای لوله متصل به رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ور گردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع شده و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. در مرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچگونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشد. در پایان محتوای ارلن توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد (استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴، ۱۳۷۲؛ AOAC, 2005). میزان پروتئین خام از رابطه زیر به دست آمد.

درصد نیتروژن = حجم اسید مصرفی برای نمونه × نرمالیته اسید × ۱۴ × ۱۰۰ / گرم نمونه خشک × ۱۰۰۰

جدول ۱- مشخصات دستگاه HPLC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای آمینه.

نام دستگاه	HPLC (Cecil)
پمپ	Cecil: Seri 200
دتکتور	Knauer
ستون	C18 (15cm × 4.6 mm) –Phenomenex
طول موج مورد استفاده	238 nm
سرعت عبور حلال	1 ml/min
ترکیب حلال	Acetate buffer + Hexansulfonate + CU acetate
روش آنالیز	Isocratic
نرم افزار مورد استفاده	CHRUMuLan

(فاکتور پروتئین) ۶/۲۵ × درصد نیتروژن = درصد خام

چربی: مقدار ۲۰ گرم از نمونه به داخل دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱۶۰ میلی‌لیتر متانول و به همین میزان کلروفرم به دکانتور اضافه گردید. با اضافه‌کردن آب مقطر به مجموعه، فازها از یکدیگر جدا شدند. نسبت متانول، کلروفرم و آب ۲: ۲: ۱/۶ بود. سپس لایه کلروفرمی محتوی چربی به وسیله دستگاه روتاری خارج گردید. با خروج حلال و توزین مجدد بالن، مقدار چربی نمونه بر حسب درصد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲، ۱۳۸۲؛ AOAC, 2005؛ Suvanich *et al*., 2000).

۱۰۰× (وزن نمونه اولیه/ وزن چربی)= درصد چربی

سنجش پروفایل اسیدهای آمینه: به‌منظور بررسی پروفیل اسیدهای آمینه در بیوسیلاژ تولیدشده، نمونه‌ها پس از انجمادزدایی به خوبی ترکیب و همگن شدند. در مرحله اول به منظور هیدرولیز نمونه‌ها برای به دست‌آوردن اسیدهای آمینه آزاد، ۰/۵ گرم از نمونه بیوسیلاژ به همراه ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول نورولوسین به لوله‌های هیدرولیز اضافه شدند. مقدار ۲۴ میلی‌لیتر اسیدهیدروکلریک ۶ نرمال به لوله‌های حاوی نمونه اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه مجاور گاز نیتروژن قرار گرفتند و بلافاصله درپوش آن‌ها گذاشته شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و سپس لوله‌های درپوش‌دار در آون با دمای ۱۱۲ تا ۱۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت برای هیدرولیز قرار داده شدند. پس از پایان عمل هیدورلیز، لوله‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا سرد شوند. نمونه‌های موجود به سیلندر ۵۰ سی‌سی منتقل و با آب دارای درجه خلوص ویژه HPLC به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. در انتها، مقدار ۵ میلی-لیتر از محلول تهیه شده، صاف شد و با استفاده از آون متصل به پمپ خلاء به آرامی خشک گردید. در مرحله دوم جهت مشتق‌سازی، به هر لوله حاوی نمونه، ۲۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌سازی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب با درجه خلوص ویژه HPLC است، ۱۰۰ میکرولیتر تری اتیل آمین، ۷۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر فنیل ایزوتیوسیانات اضافه شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در جای ثابت (دمای اتاق) قرار داده شدند تا به خوبی واکنش مشتق‌سازی انجام شود. در انتهای آزمایش در این مرحله، نمونه‌ها و استاندارد در آون متصل به پمپ خلا به آرامی خشک شدند. برای قرائت با دستگاه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر رقیق‌کننده، به لوله حاوی استاندارد و لوله‌های حاوی نمونه افزوده و به آرامی ورتکس شدند. در مرحله بعد، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. در انتها از مایع رویی (سوپرناتانت) لوله‌ها به مقدار ۲۰ میکرولیتر جدا و به دستگاه HPLC با مشخصات جدول ۱ تزریق شد (Moore, 2004).

سنجش پروفیل اسیدهای چرب: به‌منظور بررسی پروفیل‌اسیدهای چرب بیوسیلاژ لازم بود تا ابتدا چربی نمونه استخراج شود. بدین ترتیب ابتدا ۱ گرم نمونه به بالون ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و سپس ۵

جدول ۲- مشخصات دستگاه GC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای چرب.

نام دستگاه	GC (Shimadzu)[1]
درجه حرارت ستون	۱۹۱ درجه سانتی‌گراد
درجه حرارت تزریق	۲۱۵ درجه سانتی‌گراد
درجه حرارت دتکتور	۳۲۰ درجه سانتی‌گراد
نوع دتکتور	(F.I.D.) Flame Ionization Detector
نوع ستون	BPX70
گاز حامل	نیتروژن
شدت جریان	۰/۶ میلی لیتر بر دقیقه

میلی‌لیتر متانول به نمونه افزوده و به شدت تکان داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و مجدداً بالن ژوژه به شدت تکان داده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا چربی بافت کاملاً خارج شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها به دکانتور منتقل و به آن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از یک ساعت سه فاز مجزا در داخل دکانتور تشکیل شد. فاز چربی و حلال که در قسمت زیرین دکانتور وجود داشت با استفاده از قیف و کاغذ صافی جدا و به ظرف مخصوص منتقل و به کمک نیتروژن حلال‌پرانی شد که در نهایت چربی (روش سرد) باقی ماند (Egan *et al*., 1997). جهت استری‌کردن چربی از روش ISO 550 استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر سود متانولی ۲ درصد به چربی استخراج شده اضافه گردید. سپس درب ظرف بسته و به شدت تکان داده شد. ظرف حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و پس از خنک شدن، ۲/۲ میلی‌لیتر محلول تری‌فلورایدبور (BF_3) به ترکیب اضافه و سپس ۳ دقیقه مجدداً در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک‌شدن، به ترکیب فوق، ۱میلی‌لیتر n_هگزان نرمال اضافه شد. به این محلول (بعد از تکان‌دادن)، ۱ میلی‌لیتر محلول نمک اشباع (۳۰۰ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) نیز اضافه گردید. ترکیب فوق به شدت تکان داده شد و تا زمان تشکیل دو فاز مختلف ظرف حاوی نمونه در محلی خاص قرار گرفت. فاز بالایی با دقت جدا و برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Shimadzu ژاپن با مشخصات جدول ۲ استفاده شد. پس از تهیه متیل استر اسیدهای چرب، حدود ۱ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مکان هر یک از اسیدهای چرب براساس زمان بازداری آن‌ها در نمونه استاندارد شناسایی و به صورت گرم در ۱۰۰ گرم چربی نمونه بیان گردید (ISO 5509, 2000).

میزان پروتئین و چربی در محصول: سیلاژ بیولوژیک تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داری۰/۳۶±۵۲/۲۷ درصد پروتئین و ۸/۰±۳۰/۲۰ درصد چربی بود.

پروفیل اسیدهای آمینه در محصول: جدول ۳، پروفیل اسیدهای آمینه در بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را نشان می‌دهد. همچنین در این جدول، مقادیر اسیدهای آمینه پروتئین‌های مرجع و شاخص شیمیایی اسیدهای آمینه نیز ارائه شده است. مطابق نتایج مجموع اسیدهای آمینه ضروری، غیر ضروری و کل در محصول تولیدشده به ترتیب ۳۲/۱۲، ۲۷/۰۶ و ۵۹/۱۸ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا است. در ادامه مشخص شد در بین اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری به ترتیب آرژینین و گلوتامیک‌اسید دارای بیشترین مقدار هستند (به ترتیب ۵/۸۲ و ۹/۰۲ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و محصول تولیدشده فاقد اسید آمینه تریپتوفان است. ارزیابی شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین مورد نیاز برای رشد ماهی کپور (پروتئین مرجع الف) و ماهی تیلاپیا (پروتئین مرجع ب) نشان داد (N.R.C, 1993) که این شاخص برای

جدول ۳- پروفیل اسیدهای آمینه در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقادیر اسیدهای آمینه پروتئین‌های مرجع (گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و شاخص شیمیایی اسیدهای آمینه.

اسیدهای آمینه	مقدار	پروتئین مرجع الف	پروتئین مرجع ب	شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین مرجع الف	شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین مرجع ب
اسیدهای آمینه					
هیستیدین	۳/۱±۰/۵۴	۲/۱	۱/۷۲	۱/۴۷	۱/۸
آرژینین	۵/۸۲±۰/۲۲	۱/۳۱	۴/۲	۴/۴۴	۱/۳۸
ترئونین	۱/۶۲±۰/۳۴	۳/۹	۳/۷۵	۰/۴۱	۰/۴۳
والین	۴/۶۵±۰/۰۷	۳/۶	۲/۸	۱/۲۹	۱/۶۶
متیونین	۰/۶۴	۳/۱	۲/۶۸	۰/۲	۰/۲۳
ایزولوسین	۲/۴۲±۰/۲۲	۲/۵	۳/۱۱	۰/۹۶	۰/۷۷
لوسین	۵/۱۲±۰/۰۴	۳/۳	۳/۳۹	۱/۵۵	۱/۵۱
فنیل‌آلانین	۱/۹۹±۰/۲۵	۶/۵	-	۰/۳	-
لایزین	۱/۶۵±۰/۳۲	۵/۷	۵/۱۲	۰/۲۸	۰/۳۲
تریپتوفان	۰		۱		
اسیدهای آمینه					
آسپارتیک‌اسید	۲/۷۲±۲/۶۹				
گلوتامیک‌اسید	۹/۰۲±۰/۱				
سرین	۲/۶۹±۰/۱				
گلایسین	۵/۳۹±۰/۲۲				
آلانین	۶/۴۴±۰/۱۳				
پرولین	۲/۹۵±۰/۱۷				
تیروزین	۲/۱۸±۰/۱۵				
سیستئین	۱/۶۴±۰/۳۳				
مجموع اسیدهای	۲۷/۰۶±۰/۱۳				
مجموع اسیدهای	۳۲/۱۲±۰/۱۳				
اسید آمینه کل	۵۹/۱۸±۰/۲۶				

اسیدهای آمینه ترئونین، متیونین، ایزولوسین، فنیل-آلانین و لایزین کمتر از یک است. ضمن این که این شاخص برای سایر اسیدهای آمینه ضروری (هیستیدین، آرژینین، والین و لوسین) بالاتر از یک گزارش شده است.

پروفیل اسیدهای چرب محصول: جدول ۴ پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را نشان می‌دهد. مطابق نتایج مجموع اسیدهای چرب اشباع (SFA)، اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA) در این محصول به ترتیب ۳۳/۳۹، ۳۱/۳۲ و ۳۵/۲۷ درصد می‌باشد. نسبت امگا ۶ به امگا ۳ در بیوسیلاژ تولیدشده ۹/۷۳ بود. این محصول در مجموع دارای ۲/۸۲ درصد ایکوزاپنتانوئیک‌اسید (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید (DHA) بود.

بحث

ارزیابی مقادیر پروتئین و چربی بیوسیلاژ نشان داد که این محصول نسبت به بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ، پودر ماهی کیلکا و پودر گوشت (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) پروتئین و چربی کمتری دارد. مقادیر پروتئین و چربی در بیوسیلاژ تحت تاثیر نوع سوبسترا و شرایط تولید متغیر است. اگر چه مقادیر برخی از اسیدهای آمینه ضروری در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلا در تحقیق حاضر نسبت به مقادیر اسیدهای آمینه پروتئین مرجع (مورد نیاز برای رشد ماهی کپور و ماهی تیلاپیا)

جدول ۴- پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات قزل‌آلای رنگین‌کمان (درصد اسید چرب از کل اسیدهای چرب شناسایی‌شده).

اسیدهای چرب (درصد)	مقدار (٪)
C14:0	۱/۰±۳۷/۰۶
C15:0	۰/۰±۱۹/۰۰۵
C16:0	۲۵/۰±۵۴/۳۲
C18:0	۵
C17:0	۰/۰±۶/۳۸
C20:0	۰/۹۸
SFA	۳۳/۰±۳۹/۴۶
C16:1	۰
C17:1	۰/۰۷۵
C18:1(n-9)C	۳۱/۰±۲۴/۲۴
MUFA	۳۱/۰±۳۲/۲۴
C18:2(n-6)C	۳۰/۰±۲۶/۱۴
C18:3 n3	۰/۰±۷۱/۰۲
C20:3 n6	۰/۶۹
C20:4 n6 ARA	۰/۰±۷۴/۰۱
C20:5 n3 EPA	۰/۰±۱۵/۰۳
C22:5 n3 DPA	۰/۰۵
C22:6 n3 DHA	۲/۰±۶۷/۱
PUFA	۳۵/۰±۲۷/۲۲
n6/n3	۹/۱±۷۳/۵۳
EPA+DHA	۲/۰±۸۲/۰۷

کمتر بود؛ اما اسیدهای آمینه هیستیدین، آرژینین، والین و لوسین در محصول تولیدشده بیشتر از مقادیر مورد نیاز برای رشد ماهی کپور و تیلاپیا بوده‌اند. ضمن این که اسید آمینه ایزولوسین در محصول نیز تقریباً مقدار برابری با میزان پروتئین مرجع (برای رشد ماهی کپور) را داراست (شاخص شیمیایی معادل ۰/۹۶). بنابراین از این مقادیر می‌توان نتیجه گرفت که محصول حاضر می‌تواند در تغذیه آبزیان مورد استفاده قرار گیرد. شاخص شیمیایی برای اسیدهای آمینه تریپتوفان و آرژینین در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی تیلاپیا بر اساس پروتئین مرجع (ب) کمتر از یک بود. این مورد در بیوسیلاژ تولیدشده از ماهیان آب شیرین نیز گزارش شد (Vidotti *et al.*, 2003). در تحقیق حاضر نیز در مورد تریپتوفان چنین موضوعی صادق بود. چرا که بیوسیلاژ تولیدشده در مطالعه پیش رو فاقد تریپتوفان بود. اما در مورد آرژینین، شاخص شیمیایی بالاتر از یک (۱/۳۱) است (بر اساس پروتئین مرجع ب). مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری در بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ به ترتیب ۲۴/۴۱۶ و ۳۰/۹۵۹ گرم در ۱۰۰ گرم بود (صفری و همکاران، ۱۳۹۹). مقایسه این مقادیر در تحقیق مذکور و پژوهش حاضر نشان می‌دهد بیوسیلاژی که از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تولید گردید، از نظر پروفیل اسید آمینه غنی‌تر از بیوسیلاژی است که از ضایعات مرغ تولید شد. در تحقیق حاضر محصول تولیدشده فاقد اسید آمینه تریپتوفان است که این یافته در مطالعه صفری و همکاران (۱۳۹۹) نیز گزارش گردید. اما در بیوسیلاژ تولیدشده از ماهیان آب شیرین و ضایعات ماهی تیلاپیا مقادیر اندکی (به ترتیب ۰/۸۷ و ۰/۶۱ گرم در ۱۰۰ گرم) از اسید آمینه تریپتوفان گزارش شد (Vidotti *et al.*, 2003). در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلا، آرژینین بالاترین مقادیر را در بین اسیدهای آمینه ضروری دارا بود، اما در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ، لوسین بیشترین سهم را به خود اختصاص داد (صفری و همکاران، ۱۳۹۹). در بیوسیلاژ تولیدشده از ماهیان آب شیرین لیزین بیشترین فراوانی را در بین اسیدهای آمینه ضروری داشت (Vidotti *et al.*, 2003)، اما در مطالعه حاضر چنین چیزی ثبت نشد. طبق نتایج، هم در مطالعه حاضر و هم در مطالعه مذکور گلوتامیک‌اسید فراوان‌ترین اسید آمینه غیرضروری بود. در مطالعه سرحدی و همکاران (۱۳۹۱) پروفیل اسید آمینه در استخوان سه ماهی کیلکای آنچوی، ساردین پهلو طلایی و موتوماهی بررسی شد. میزان اسیدآمینه ضروری کل در استخوان این سه ماهی به ترتیب ۳۷/۹۵، ۳۸/۲ و ۳۶/۶۷ درصد بود که این مقادیر بسیار کمتر از اسید آمینه کل در بیوسیلاژ تولیدشده در مطالعه حاضر می‌باشد.

مقایسه پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولیدشده

از ضایعات مرغ (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) و بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر نشان داد که محصول تولیدشده در مطالعه حاضر نسبت به بیوسیلاژ ضایعات مرغ دارای اسیدهای چرب تک غیر اشباع (MUFA) کمتر و اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA) بیشتری است. ضمن اینکه این دو محصول از نظر مقادیر اسیدهای چرب اشباع (SFA) تقریباً مشابه و یکسان هستند. مجموع EPA و DHA در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) ۲/۷ درصد گزارش شد که کمتر از مقدار گزارش‌شده در بیوسیلاژ ضایعات قزل‌آلا می‌باشد (۲/۸۲ درصد). در مطالعه Turan و همکاران (۲۰۰۷)، پروفیل اسیدهای چرب پودر ماهی آنچوی ارزیابی و مشخص شد مقادیر SFA، MUFA و PUFA در این محصول به ترتیب ۳۲/۲۴۸، ۲۰/۲۲۸ و ۳۱/۹۸۴ درصد است. این مقادیر در بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر بیشتر است و این موضوع نشان می‌دهد محصول تولیدشده در تحقیق پیش رو از پودر ماهی آنچوی از نظر اسیدهای چرب غنی‌تر می‌باشد. نسبت امگا۶ به امگا۳ در بیوسیلاژ ضایعات مرغ (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) و پودر ماهی آنچوی (Turan *et al*., 2007) به ترتیب ۱۱/۰۶ و ۰/۱۸ بود، اما این نسبت در محصول تولیدشده در تحقیق حاضر ۹/۷۳ گزارش شد که تقریبا مشابه با این رقم در بیوسیلاژ ضایعات مرغ است.

نتیجه‌گیری

بررسی پروفیل اسیدهای آمینه بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که این محصول از نظر اسیدهای آمینه هیستیدین، آرژینین، والین و لوسین در سطح بالاتری از مقادیر مورد نیاز برای رشد ماهی کپور و تیلاپیا قرار دارد (شاخص شیمیایی بیشتر از یک). همچنین نتایج بررسی شاخص‌های مهم در ترکیب اسیدهای چرب محصول نشان داد که بیوسیلاژ تولیدشده از نظر اسیدهای چرب در سطح ایده‌آلی قرار دارد. بنابراین این محصول می‌تواند به عنوان منبع مناسبی از اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب در جیره غذایی آبزیان، دام و طیور مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از همکاران بخش‌های تخصصی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

استاندارد ملی ایران شماره ۹۲۴، ۱۳۷۲. اندازه‌گیری پروتئین تام در گوشت و فرآورده های آن. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۲، ۱۳۸۲. گوشت و فرآورده های آن – تعیین چربی تام – روش آزمون. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.

تمدن م. ۱۳۷۸. تهیه سیلاژ از ضایعات تون ماهیان. گزارش نهایی. مرکز تحقیقات شیلات استان هرمزگان. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی علوم کشور.

سرحد ن.، معتمد زادگان ع.، طاهری ع.، آزاد م. ۱۳۹۱. بررسی مقایسه‌ای ترکیبات مغذی و پروفیل اسیدهای-آمینه در استخوان‌های ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*)، کیلکای آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) و موتو ماهی (*Stolephorus indicus*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۱(۱): ۱۰۱-۱۱۲.

صفری ر.، نصراله‌زاده ح.، فارابی س.م.و.، جعفری ع.، قیاسی م.، بینایی م.، افرائی م.ع. ۱۳۹۹. تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات طیور و تاثیر آن بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. گزارش نهایی. پژوهشکده اکولوژی دریای خزر. ۱۱۲ ص.

AOAC. 2005. Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, 2005; Washington DC.

Egan H., Krik, R.S., Sawyer R. 1997. Pearson's Chemical Analysis of Foods [Book]. Longman Group Ltd, 9(ed): 609-634.

Haider M.S., Ali Z., Abbas S. 2017. Fatty acid profile and effect of fish fermented silage

24-29.

Shabani A., Boldaji F., Dastar B., Ghoorchi T., Zerehdaran S., Ashayerizadeh A. 2021. Evaluation of increasing concentrations of fish waste silage in diets on growth performance, gastrointestinal microbial population, and intestinal morphology of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 275, 114874.

Turan H., Kaya, Y., Erkoyuncu İ. 2007. Protein and lipid content and fatty acid composition of anchovy meal produced in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 31(2), 113-117.

Vidotti R.M., Viegas, E.M.M., Carneiro D.J. 2003. Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* 105(1-4), 199-204.

Vázquez J.A., Nogueira M., Durán A., Prieto M.A., Rodríguez-Amado I., Rial D., Murado M. A. 2011. Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. *Journal of Food Engineering* 103(4), 442-448.

on digestive enzymes in *Labeo rohita*. *Bioscience Journal* 33(6), 1562-1571.

ISO 5509. 2000. Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO/TC 34/SC 11. 24 p.

Kim J.K. 2011. Cost-effectiveness of converting fish waste into liquid fertilizer. *Fisheries and Aquatic Sciences* 14(3), 230-233.

Moore J. 2004. Amino acid analysis of hydrolysates (feed, fxal, etc), Michign State University, Department of Animal Sciences, Nathalie Trottiers Laboratory.

N.R.C., National Research Council. Nutrient Requirements of Fish. Washington. 1993.

Najim S.M., Al-Noor S.S., Jasim B.M. 2014. Effects of fish meal replacement with fish biosilage on some haematological and biochemical parameters in common carp Cyprinus carpio fingerlings. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* 4(3), 112-116.

Özyurt G., Gökdoğan S., Şimşek A., Yuvka I., Ergüven M., Kuley Boga E. 2016. Fatty acid composition and biogenic amines in acidified and fermented fish silage: a comparison study. *Archives of Animal Nutrition* 70(1), 72-86.

Özyurt G., Özkütük A.S., Uçar Y., Durmuş M., Özoğul Y. 2018. Fatty acid composition and oxidative stability of oils recovered from acid silage and bacterial fermentation of fish (Sea bass–*Dicentrarchus labrax*) by-products. *International Journal of Food Science & Technology* 53(5), 1255-1261.

Palkar N. D., Koli J. M., Gund D.P., Patange S.B., Shrangdher S.T., Sadawarte R.K., Akhade A.R. 2018. Preparation of co-dried fish silage by using fish market waste and its comparative study. *International Journal of Pure and Applied Bioscience* 6(2), 1567-1577.

Ramírez Ramírez J.C., Ibarra Espain J.I., Gutiérrez Leyva R., Ulloa J.A., Rosas Ulloa P. 2016. Use of biological fish silage in broilers feed: effect on growth performance and meat quality. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)*, 27(3), 4293-4304.

Suvanich V., Jahncke M.L., Marshall D.L. 2000. Changes in selected chemical quality characteristics of channel catfish frame mince during chill and frozen storage. *Journal of Food Science*, 65(1),

Production of biological silage from wastes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using autogenous bacteria and quantitative and qualitative measurement of amino acid and fatty acid profiles of the product

Reza Safari*[1], Soheyl Reyhani Poul[2], Zahra Bankehsaz[1], Mohammad Javad Taghavi[1], Eynollah Safari[1]

[1]Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Sari, Iran.
[2]Department of Processing of Fishery Products, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding author: safari1351@gmail.com
Received: 2021/9/21 Accepted: 2021/7/10

Abstract
With the increasing of rainbow trout processing centers in the country, the optimal use of the wastes produced is necessary. One of the efficient use of waste products is convert them into products with value added products such as biosilage. This product, if it has the desirable characteristics, can be used in the fish, livestock and poultry feed industry. The aim of the present study was to produce biosilage from rainbow trout wastes using autogenous bacteria and to investigate the amino acid and fatty acid profiles of the product. The results showed that the total of essential, non-essential and total amino acids in the produced product are 32.12, 27.06 and 59.18 g/100g, respectively. It was further found that among the essential and non-essential amino acids, arginine and glutamic acid have the highest amounts (5.82 and 9.02g per 100g of substrate, respectively) and the product produced does not contain the amino acid tryptophan. In the product, the chemical index was calculated based on the reference proteins for the amino acids histidine, arginine, valine and leucine more than one. Examination of biosilage fatty acids showed that the total of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in this product are 33.39, 31.32 and 35.27%, respectively. In the following, ratio of omega 6 to omega 3 in biological silage was reported to be 9.73. According to the findings, biosilage produced from rainbow trout wastes is rich in term of amino acids and fatty acids and can be added to diet formulation in fish, livestock and poultry feed.

Keywords: Fish wastes, Biosilage, Amino acid profiles, Fatty acid profiles.