استفاده از باکتری باسیلوس (Bacillus sp.) به منظور تولید پروتئین تک یاخته از امعاء و احشاء ماهی هوور (*Thannus tonggol*)

رضا صفری، زهرا یعقوب زاده*

بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۶

چکیده

در این تحقیق از دو گونه باسیلوس(*Bacillus subtilis* , *Bacillu liquineformis*) به منظور تبدیل امعاء و احشاء ماهی هوور *(Thannus tonggol)* به پروتئین میکروبی استفاده گردید. سیستم مورد استفاده از نوع هوازی بوده که در شرایط بسته و در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور انجام و تاثیر فاکتورهای مختلف نظیر pH، دما، دور همزن و زمان تخمیر بر روند آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفته است.

نتایج نشان داد که درصد پروتئین در پروتئین استخراج شده بالا بوده و کارآیی باسیلوس لیکنوفورمیس نسبت به باسیلوس سوبتی‌لیس بهتر بوده است. نتایج تاثیر فاکتورهای دما وpH نشان داده که باکتریها در دمای^{o}C ۳۵ و ۶/۹ =pH بهتر از دمای ^{o}C ۳۲و ۶/۵ =pH عمل کردند. زمان لازم برای کامل شدن آزمایش در فاز آزمایشگاهی ۵۴ ساعت بوده در صورتیکه این زمان در فرمانتور ۲۱ ساعت بوده است. نتایج همچنین نشان داده که با افزایش دور همزن، روند واکنش سریعتر انجام گرفته و دستیابی به پروتئین در زمان کوتاهتری انجام گرفته است. با انجام آزمایشات تکمیلی در پروتئین تولید شده ، میتوان از پروتئین میکروبی تولید شده بعنوان پروبیوتیک در جیره غذایی دام، طیور و آبزیان استفاده نمود .

واژگان کلیدی: پروتیئن تک یاخته، امعاء و احشاء، ماهی هوور، باسیلوس

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: za_yaghoub@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

رشد روز افزون جمعیت در جهان و افزایش مصرف مواد غذایی ، بشر را بر آن داشته که به فکر منابع غذایی جدید باشد که تولید آن ارزانتر و به صرفه تر باشد. یکی از منابع ارزان قیمت ، پروتئین تک یاخته یا SCP می باشد که فرآورده ای با پایه میکروبی می باشد. اصطلاح پروتئین تک سلولی به سلولهای خشک شده میکروارگانیسمهایی مانند باکتری ها ، مخمرها، کپکها ، جلبکها ، آکتینومیست ها و قارچهای عالی تر اطلاق میشود که در مقیاس بزرگتری کشت داده شده و به عنوان منبع پروتئینی برای انسان یا حیوان مورد استفاده قرار میگیرند. با توجه به رشد و تکثیر بسیار سریع میکروبهای مورد استفاده ، پتانسیل تولید SCP بمنظور استفاده در رژیم غذایی انسان و حیوان بسیار بالا میباشد. برخی از باکتری ها در شرایط محیطی مناسب دارای سرعت رشد و تکثیر بسیار بالایی میباشند. بر اساس محاسبات انجام شده از کشت یک SCP به وسعت ۰/۹۳۷ کیلومتر مربع ، ۱۰ درصد نیازهای پروتئینی جهان تامین می گردد (Akman, 1980).

باکتری ها گروه بزرگی از موجودات تک سلولی بوده که بواسطه بالا بودن سرعت رشد و تکثیرشان نسبت به انواع دیگر موجودات تک سلولی و همچنین امکان رشد آنها بر روی انواع مختلفی از محیط ها، از ارجحیت بالاتری در تولید پروتئین های تک یاخته برخوردار میباشند.

برخی از گونه های مهم باکتری ها که در تولید SCP بکار می روند عبارتند از :

متیلو فیلوس متیلوتروفوس (*Methylophilus methylotrophous*) ۲-

آگروباکتریوم (*Agrobacterium sp*) ۳-

باسیلوسها *(Bacillus sp)*

عمده مسائل مربوط به کاربرد باکتری ها در تولید SCPشامل موارد ذیل می باشد:

- باکتری ها دارای سرعت رشد و تکثیر بسیار بالایی می باشند.

- احتمال آلودگی فرآورده های حاصل از باکتری ها به عوامل پاتوژن بیشتر از سایر منابع تولید پروتئین تک یاخته بوده زیرا محیط کشت مورد استفاده باکتری ها دارای pH ایی در حدود ۵ تا ۷ بوده که خود باعث بروز آلودگیهای ثانویه در محیط رشد و در نتیجه فرآورده نهایی می گردد. در مواردی که از باکتری های گرم مثبت جهت تولید SCP استفاده میشود خطر تولید آندوتوکسین بطور قابل ملاحظه ایی افزایش می یابد.

-درصد پروتئین و اسیدهای نوکلئیک محصولاتی با پایه باکتری ها بالا بوده و به ترتیب ۸۰ و ۲۰ درصد میباشد.

-میزان اسیدهای آمینه باکتری ها نسبتا بالا بوده ولی با این، فرآورده نهایی بایستی با اسیدهای آمینه گوگرددار مصنوعی غنی گردد.

-جداسازی باکتری ها در مقایسه با سایر منابع تولید کننده پروتئین های تک یاخته نسبتا" مشکل بوده و نیاز به تکنولوژی بالاتری داشته که خود مستلزم صرف هزینه های بیشتری می باشد (Kim and Lee, 2000; Kurbanoglu and Algur, 2002; Sasikala and Ramana, 1995; Shipman *et al.*, 1975).

تون ماهیان وگونه های وابسته به آن تنها ازیک خانواده Scombridae تشکیل یافته اند که دارای ۱۵ جنس و ۴۹ گونه می باشند. از مهمترین گونه های این گروه می توان به گیدر، هوور، هوور مسقطی، تون منقوس، زرده، شیر و قباد اشاره نمود. به منظور تولید کنسرو ماهی تون عموما" از ماهیان گونه گیدر ، هوور و هوور مسقطی استفاده میگردد (Anupama and Ravindra, 2000; Akman, 1980). در این تحقیق از گونه گیدر استفاده شد. میزان تولید تون ماهیان در سال ۱۳۸۴ در حدود ۱۶۵۴۲۰ تن بوده که سهم سه گونه مورد استفاده در تولید کنسرو ۱۴۲۷۵۰ تن میباشد. اگر ضایعات مربوط به این گونه هابین۲۰ تا ۲۵ ٪ در نظر گرفته شود(ضایعات مربوط به سر و دم و امعاء و احشاء) ضایعات تولید شده بین ۲۸۵۵۰ و ۳۵۶۸۷ تن خواهد بود. ضایعات حاصله، مانند ماهیان

Archive of SID

www.SID.ir

پرورشی، جمع آوری شده و به پودر تبدیل میگردد. اگر ضایعات تولید شده بطور صحیح مدیریت شده و بعنوان سوبسترا غنی از پروتئین جمع آوری شده و پس از آماده سازی اولیه و هضم های شیمیایی و یا آنزیمی به یک بیوراآکتور بیولوژیک هدایت گردد میتوان محصولات متنوع با پایه میکروبی تولید نمود و با اهداف گوناگون نیز مورد استفاده قرار داد (دفتر طرح و توسعه شیلات ایران، ۱۳۸۵).

هدف از اجرای این پروژه استفاده از ضایعات آبزیان دریایی و پرورشی (امعاء و احشاء ماهی تون و فیتوفاگ و همچنین آب پخت کارخانجات تولید کننده کنسرو ماهی تون) بعنوان سوبسترای اولیه در جهت تولید پروتئین میکروبی و استفاده از میکراروگانیسمهای مختلف مثل مخمر و باکتری در جهت تولید پروتئین تک یاخته میباشد. فاکتورهای مختلف مرتبط با تولید محصول نظیر دما ، نوع باکتری مورد استفاده ، pH ، زمان تخمیر و دور همزن نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. سیستم مورد استفاده در این تحقیق از نوع هوازی و فرمانتور مورد استفاده نیز CSTR (Continuously Stirred Tank) Reactor بوده است.

۲. مواد و روش ها

نمونه های مورد بررسی شامل امعاء و احشاء ماهی تن از گونه هوور(Thannus tonggol) بوده است.نمونه برداری از کارخانجات تولید کننده کنسرو در شهرک های میرود و امیر آباد استان مازندران انجام گرفته و نمونه ها در مجاورت زنجیره سرد به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه ها در ابتدا از نظر ارزش غذایی (پروتئین ، چربی ، خاکستر و رطوبت) (AOAC, 1990) . تعیین مقدار شده و سپس آماده سازی شدند (آنزیمی و شیمیایی). در هیدرولیز آنزیمی از دو آنزیم پروتوماکس و فلیورزیم به میزان ۰/۱٪ برای مدت ۴-۲ ساعت استفاده شده (Gildberg, 1993)و در هیدرولیز شیمیایی از اسید فرمیک ۷۵٪ آمونیه شده به میزان ۳/۵ درصد وزن نمونه و پپسین خام به میزان ۱ گرم در کیلوگرم برای مدت ۱۶ ساعت استفاده گردید(تمدنی، ۱۳۸۱). باکتری های مورد استفاده از دو گونه باسیلوس بنامهای لیکنوفورمیس (PTCC1355) و سوبتی لیس (PTCC 1156) بودند. به منظور تولید SCP در شرایط آزمایشگاهی ، از ۲ تیمار (باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس) با ۳ تکرار استفاده شده و دو متغیر پروتئین و جذب نوری(Optical Density) باکتری ها در حین انجام فرآیند، به ترتیب با استفاده از روش بیورد و قرائت جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر انجام گرفت. در روش بیورد ، پس از سانتریفوژ سوسپانسیون در دور ۵۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی جدا شده و پس از قرائت جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر ، میزان پروتئین محلول (بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر) محاسبه گردید. از آلبومین سرم گاو نیز بعنوان پروتئین استاندارد استفاده گردید. دما و pH انتخاب شده به ترتیب۳۰°C و۳۵ ° C و ۶/۵ و ۶/۹ بوده است. پس از تلقیح باکتری ها (به میزان ۵٪)، نمونه ها در انکوباتور شیکردار قرار گرفته و در زمانهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند (از زمان صفر تا ۵۳ ساعت با فواصل زمانی هر ۶ ساعت). پس از رسیدن میکروب به فاز ثابت (ثابت ماندن میزان جذب آن) واکنش متوقف شده و عمل استخراج انجام گرفت. به منظور استخراج اولیه SCP از سانتریفوژ یخچالدار با دور ۵۰۰۰ بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه استفاده و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب پروتئین جمع آوری شده و سپس لیوفیلیزه گردید. عمل لیوفیلیزه با استفاده از دستگاه فریز درایر انجام گردید. پروتئین میکروبی تولید شده مشابه نمونه اولیه از نظر درصد پروتئین، چربی، رطوبت ، و خاکستر مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از روش ماکروکجلدال میزان پروتئین در محصول تولید مشخص شده و بر حسب درصد بیان گردید (Kurbanoglu and Algur, 2002; Shipman *et*

Archive of SID

www.SID.ir

al.,1975; Ferrer *et al.*,1996; Ogbonda *et al.*, 2007; Rhishipat and Philip 1998; Layne,1957).

به منظور انجام آزمایشات در مقیاس پایلوت یا فرمانتور از فرمانتور CSTR استفاده شده و سیستم مورد استفاده از نوع هوازی بوده است. در مقیاس پایلوت نیز از میکروارگانیسم مورد استفاده در شرایط آزمایشگاهی (با اندکی تغییر) مجددا استفاده گردید با این تفاوت که دراین حالت تمامی فاکتورها بطور دقیق قابل کنترل بودند. فاکتورهای دخیل در فرمانتور شامل PH و دما (مشابه مقیاس آزمایشگاهی) ، میزان دور همزن یا ایمپلیر در دقیقه یا rmp (۳۰۰ و ۶۰۰ دور در دقیقه برای هر دو گروه)، Flow rate یا میزان ورودی هوا (۱۵ میلی لیتر در دقیقه برای هر دو گروه)، PO_2فشار نسبی اکسیژن یا مقدار اکسیژن مورد نیاز جهت انجام فرایند در هنگام آزمایش (۳۲ برای هر دو گروه) و روغن سیلیکون بعنوان آنتی فوم یا ضد کف بودند. پس از تنظیم فاکتورهای ذکر شده و تلقیح میکروارگانیسم با تیمار ۵٪ واکنش آغاز شده و با فواصل زمانی هر ۳ ساعت، دو نمونه جهت ارزیابی میزان جذب نوری و تغییرات پروتئینی اخذ شده و مانند روش آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفت. مانند روش آزمایشگاهی، پروتئین میکروبی، استخراج شده و لیوفیلیزه گردید. ارزش غذایی پروتئین تولید شده در این مرحله با روش آزمایشگاهی مقایسه شده واز نظر آماری (آنالیز واریانس یکطرفه)مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Kurbanoglu and Algur, 2002; Shipman *et al.*,1975; Ferrer *et al.*,1996; Ogbonda *et al.*, 2007; Rhishipat and Philip 1998; Ahmad and Holland 1995).

به منظور مقایسه تیمارهای مختلف نظیر دما، زمان، نوع میکروارگانیسم، pH و دور همزن از تست آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شده و در نهایت ارزش P تعیین گردید.

۳. نتایج

نتایج آنالیز فاکتورهای غذایی نظیر پروتئین ، چربی ، رطوبت و خاکستر در امعاء و احشاء ماهی هوور (قبل از شروع فرآیند) به ترتیب ۱۴/۱۲٪، ۷/۲٪، ۷۶/۰۱ ٪ و ۱/۳۸٪ بوده است.

میزان تولید پروتئین باکتریایی بین ۳۰ تا ۴۵ گرم به ازای یک لیتر از سوبسترای اختصاصی بوده است. به هنگام استفاده از تیمارهای مختلف نظیر pH، دما، تغییر دور همزن فرمانتور و هوادهی، سرعت فرآیند تغییر یافته و در نتیجه بر میزان تولید محصول نهایی نیز تاثیر گذاشته است. به هنگام استفاده از فرمانتور، تولید محصول در زمان کوتاهتری انجام گرفته است(۲۱ ساعت) در صورتی که در فاز آزمایشگاهی، این زمان ۵۴ ساعت بوده است.

نتایج جدول ۱ نشان میدهد که به هنگام استفاده از *باسیلوس لیگنوفورمیس* و *باسیلوس سوبتی لیس* در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، از زمان صفر تا ۵۴ ساعت، میزان جذب نوری به ترتیب از ۱/۶۲ به ۳/۵۳ (۵۱/۶٪) و از۱/۱۶ به ۴/۳۵ (۷۳/۳٪)افزایش یافته است.

نتایج جدول ۲ نشان می دهد که به هنگام استفاده از باسیلوس لیگنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، از زمان صفر تا ۵۴ ساعت، میزان جذب نوری به ترتیب از۱/۶۴ به ۳/۱۹ (۴۸/۶٪) و از ۱/۶۲ به ۳/۲۶ (۵۰/۳٪) افزایش یافته است .

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. تغییرات جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و pH=۶/۹ (P<۰/۰۵)

باکتری / زمان (ساعت)	باسیلوس لیکنوفورمیس	باسیلوس سوبتی لیس
۰	۱/۶۲	۱/۶۲
۶	۱/۶۷	۱/۶۸
۱۶	۲/۱۳	۱/۷۳
۲۴	۲/۶۶	۲/۱۱
۳۶	۳/۱۰	۲/۵۳
۴۲	۳/۴۶	۲/۹۳
۴۸	۳/۶۵	۳/۳۵
۵۴	۳/۶۷	۳/۳۵

جدول۲. تغییرات جذب نوری *باسیلوس لیکنوفرمیس* و *باسیلوس سوبتی لیس* در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی ، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و pH=۶/۵ (P<۰/۰۵)

باکتری / زمان (ساعت)	باسیلوس لیکنوفورمیس	باسیلوس سوبتی لیس
۰	۱/۶۴	۱/۶۲
۶	۱/۶۵	۱/۶۶
۱۶	۱/۸۳	۱/۷۹
۲۴	۲/۱۳	۲/۰۶
۳۶	۲/۳۷	۲/۳۶
۴۲	۲/۹۶	۲/۷۹
۴۸	۳/۱۸	۳/۲۶
۵۴	۳/۱۹	۳/۲۶

نتایج جدول ۳ نشان میدهد که به هنگام استفاده از *باسیلوس لیکنوفورمیس* و *باسیلوس سوبتی لیس* در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، از زمان صفر تا ۵۴ ساعت، تغییرات پروتئین به ترتیب ۱۰/۷۹ به ۳/۲ (۷۰/۳٪) و۱۰ به ۴/۱۲ (۶۱/۸٪) کاهش داشته است. نتایج جدول ۴ نشان میدهد که به هنگام استفاده از باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، از زمان صفر تا ۵۴ ساعت، تغییرات پروتئین به ترتیب ۱۰/۷۹ به ۳/۷ (۶۵/۷٪)و از۱۰/۷۹ به ۵/۶۴ (۴۷/۷٪) کاهش داشته است. نتایج جدول۵ نشان میدهد که به هنگام استفاده از باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی و فرمانتور اختصاصی(rpm=۶۰۰) و (rpm=۳۰۰)، از زمان صفر تا ۲۱ ساعت، تغییرات پروتئین به ترتیب ۱/۱۶به ۳/۵۵ (۶۷/۳٪)واز ۱/۱۶ به ۲/۶۲ (۵۵/۷٪)کاهش داشته است. تغییرات مصرف اکسیژن در زمانهای مختلف مشابه تیمارهای اولیه بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. تغییرات پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، pH=۶/۹ (P<۰/۰۵)

باکتری / زمان (ساعت)	باسیلوس لیکنوفورمیس	باسیلوس سوبتی لیس
۰	۱۰/۷۹	۱۰/۷۹
۶	۱۰/۶۷	۱۰/۶۵
۱۶	۹/۸۳	۹/۳۶
۲۴	۸/۳۶	۸/۱۳
۳۶	۷/۷۳	۷/۲۱
۴۲	۵/۴۳	۵/۳۹
۴۸	۳/۲۳	۴/۱۳
۵۴	۳/۲۰	۴/۱۲

جدول ۴. تغییرات پروتئین (میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی، باسیلوس لیکنوفورمیس و باسیلوس سوبتی لیس دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، pH=۶/۵ (P<۰/۰۵)

باکتری / زمان (ساعت)	باسیلوس لیکنوفورمیس	باسیلوس سوبتی لیس
۰	۱۰/۷۹	۱۰/۷۹
۶	۱۰/۷۲	۱۰/۷۰
۱۶	۹/۹۶	۹/۷۳
۲۴	۸/۵۶	۸/۷۹
۳۶	۷/۱۱	۷/۷۰
۴۲	۵/۳۲	۶/۷۳
۴۸	۳/۷۶	۵/۶۶
۵۴	۳/۷۰	۵/۶۴

جدول ۵. تغییرات جذب نوری و فشار نسبی اکسیژن (PO2) در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی و باسیلوس لیکنوفورمیس دمای ۳۵ درجه ، pH=۶/۹ (P<۰/۰۵)

نوع سوبسترا / زمان (ساعت)	rpm=۶۰۰		rpm=۳۰۰	
	جذب نوری	PO2	جذب نوری	PO2
۰	۱/۱۱	۱۰۹	۱/۱۳	۱۰۸
۳	۱/۲۰	۹۶	۱/۱۱	۱۰۰
۶	۱/۳۴	۸۳	۱/۳۲	۸۳
۹	۲/۳۹	۷۲	۱/۶۸	۷۰
۱۲	۲/۸۷	۵۳	۲/۰۶	۵۵
۱۵	۳/۳۲	۴۵	۲/۳۶	۴۶
۱۸	۳/۵۵	۳۴	۲/۶۲	۳۴
۲۱	۳/۵۵	۳۴	۲/۶۲	۳۴

نتایج جدول ۶ نشان میدهد که به هنگام استفاده از باسیلوس لیکنوفورمیس در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی و فرمانتور اختصاصی (rpm=۶۰۰) و (rpm=۳۰۰)، از زمان صفر تا ۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

ساعت، تغییرات پروتئین به ترتیب ۱۰/۹۱ به ۳/۶۲ (۶۶/۷٪) واز ۱۰/۹ به ۳/۷۳ (۶۵/۷٪) کاهش داشته است. تغییرات مصرف اکسیژن در زمانهای مختلف مشابه تیمارهای اولیه بوده است.

جدول۶. تغییرات پروتئین و اکسیژن محلول (PO2) در محیط حاوی سوبستراهای اختصاصی و باسیلوس لیکنوفورمیس دمای ۳۵ درجه ، pH=۶/۹ (P<۰/۰۵)

نوع سوبسترا	rpm=۶۰۰		rpm=۳۰۰	
زمان(ساعت)	پروتئین(mg/ml)	PO_2	پروتئین(mg/ml)	PO_2
۰	۱۰/۹۱	۱۰۹	۱۰/۹۱	۱۰۸
۳	۱۰/۷۳	۹۶	۱۰/۸۷	۱۰۰
۶	۹/۲۱	۸۳	۹/۸۶	۸۳
۹	۸/۱۳	۷۲	۸/۴۲	۷۰
۱۲	۶/۲۶	۵۳	۶/۴۸	۵۵
۱۵	۴/۷۸	۴۵	۵/۲۶	۴۶
۱۸	۳/۶۲	۳۴	۳/۷۳	۳۴
۲۱	۳/۶۲	۳۴	۳/۷۳	۳۴

۴. بحث و نتیجه گیری

پروتئین تک یاخته از منابع مختلف قابل تهیه و تولید می باشد . محققین مطالعات مختلفی را در ارتباط با تولید پروتئین تک یاخته از سوبستراهایی نظیر ضایعات کشاورزی (ملاس، برنج، مرکبات)، محصولات جانبی شیمیایی (متان و مشتقات نفتی) و ضایعات شیلاتی (نظیر پوست میگو) انجام داده اند (Ahmad and Holland 1995; Blancou *et al.*, 1978; Bornstein *et al.*, 1982; El-Saadany *et al.*1988; Fujii, 1989; Sivalingam, 1989).

میکروارگانیسمهای مورد استفاده در این تحقیق از گروه باکتری ها بوده و در جنس باسیلوس، گونه لیکنوفورمیسس بهتر از سوبتی لیس بوده است نتایج نشان داده که انتخاب تیمارهای مختلف باکتریایی تغییر معنی داری را در میزان تولید محصول نداشته است. Kurbanoglu و همکارانش در سال ۲۰۰۲ از *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سوبتی لیس* و *اشریشیا کلی* به منظور تبدیل شاخ گاو به پروتئین تک یاخته در سیستم بسته استفاده نموده اند. نتایج نشان داد که میزان پروتئین کل برای باکتری های مورد استفاده به ترتیب ۶۶٪ (*اشریشیا کلی*)، ۶۸/۵٪ (*باسیلوس سرئوس*) و ۷۱٪ (*باسیلوس سوبتی لیس*) بوده است (Kurbanoglu and Algur 2002).

Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۰ از باکتری فتوسنتیک *رودوسودوموناس پالوستریس* (*Rodopseudomonas palustris*) پروتئین تک یاخته تولید کرده و از سه روش تخمیر بی هوازی استفاده نموده اند. محیط کشت مورد استفاده جهت انجام فرآیند ، محیط کشت آزمایشگاهی بوده است. ماکزیمم میزان رشد اختصاصی و تولید بیوماس در حدود ۰/۱۲ در هر ساعت و ۵۵ میلی گرم در لیتر / ساعت و میزان پروتئین خام تولید شده نیز ۷-۷۲ ٪ بوده است (دفتر طرح و توسعه شیلات ایران، ۱۳۸۵). Israelidis نیز در مطالعه خود به تعریف پروتئین تک یاخته ، منابع مختلف میکروبی تولید کننده آن و

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه آنها با یکدیگر، مقایسه ارزش غذایی پروتئین میکروبی اشاره نمود (Israelidis, 2000).

میانگین درصد پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در محصول نهایی حاصل از باکتری ها در مقیاس آزمایشگاهی به ترتیب ۷۲/۰۵٪ ،۸/۳۸٪ ، ۱/۳۵٪ و ۱/۲۸٪ بوده است. همچنین میانگین فاکتورهای فوق در پروتئین باکتریایی در مقیاس فرمانتور به ترتیب ۷۴/۷۹٪، ۴/۴۷٪، ۱/۳۲ و ۱/۸۳ بوده است . همچنین نتایج حاصله نشان میدهد که میزان درصد پروتئین در شرایط فرمانتور بهتر از شرایط آزمایشگاهی بوده است. علت این امر کنترل نمودن فاکتورهای مختلف در فرآیند فرمانتور بوده است. در شرایط آزمایشگاهی ، فاکتورهای مختلف محیطی بر روند انجام فرآیند تأثیر گذاشته و نمیتوان تمام فاکتورها ی دخیل در تخمیر را بطور کامل کنترل نمود. به هنگام استفاده از فرمانتور ، با افزایش یا کاهش pH، بطور اتوماتیک اسید و باز اضافه شده و یا آنکه با افزایش کف در سطح محیط کشت، آنتی فوم یا ضد کف که اغلب از سیلیکونها میباشند استفاده شده و از اختلال در واکنش جلوگیری می گردد. در شرایط فرمانتور میزان هوای ورودی اکسیژن محلول در واکنش کنترل شده در حالیکه پارامترهای مذکور در شرایط آزمایشگاهی و به هنگام انجام فرآیند در ارلن آزمایشگاهی، قابل کنترل نمی باشد (Ahmad and Holland 1995).

نتایج مطالعات Schulz و همکاران نشان داده که میزان پروتئین خام در SCP تولید شده از باکتری ها در حدود ۸۲٪ می باشد. میزان چربی کل در پروتئین با منشاء میکروبهای مختلف، متغیر بوده است (Kurbanoglu and Algur, 2002).

دما و pH از فاکتورهایی هستند که بر رشد و تکثیر میکروارگانیسم های مختلف تأثیر بسزائی دارند. میکروبهای مختلف دارای بیشینه، کمینه و بهینه رشد بوده و هر یک در دما وpH خاصی، بیشترین رشد را از خود نشان می دهند (Ogbonda *et al.*, 2007). در این تحقیق ازدماهای ۳۵ و ۳۰ درجه برای رشد باکتری ها استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان جذب نوری باسیلوس لیکنوفورمیس در دمای ۳۵ درجه و۹/۶ =pH نسبت به دمای ۳۲ درجه ۶/۵ =pH رشد بهتری از خود نشان داده است.

با توجه به نتایج بدست آمده در شرایط آزمایشگاهی، از pH و دمای مناسب رشد باکتری ها (۳۵ و ۶/۹) در فاز فرمانتور استفاده شده است. نتایج آزمایشات در فاز فرمانتور نیز حاکی از رشد بسیار خوب میکروبهای مورد استفاده بر روی سوبستراهای مختلف بوده است . مقایسه pH در تکرارهای مختلف معنی دار بوده ولی تغییرات دما فاقد ارزش معنی دار بوده است ($P<۰/۰۵$) . بعبارت دیگر با افزایش یا کاهش pH، رشد میکروب نیز دچار تغییر میشود. بدنبال افزایش یا کاهش pH در دستگاه فرمانتور ، با اضافه شدن اسید یا سود میزان آن کنترل میشود. از طرفی رشد باکتری ها وتولید SCP باعث تولید گرما شده که خود باعث افزایش دمای محیط کشت مورد استفاده شده که خود از موانع رشد میکروبها در ادامه فرآیند تخمیرمی باشد (Ahmad and Holland 1995).

یکی دیگر از فاکتورهای دخیل در فرآیند تخمیر، میزان دور همزن بوده که باعث همزن زدن محیط کشت مورد استفاده شده و از این طریق سوبسترا آسانتر در اختیار میکروارگانیسم قرار گرفته و در نتیجه میزان رشد وتولید SCP افزایش می یابد (Ahmad and Holland 1995). میزان دور همزن در این تحقیق ۳۰۰ و ۶۰۰ بوده و نتایج نشان داد که در دور ۶۰۰، میزان رشد باکتری ها بیشتر از دور ۳۰۰ بوده است ($P<۰/۰۵$). محققین میزان دور همزن در سیستم های مختلف تخمیر را بین rpm ۶۰۰-۵۰۰ در نظر می گیرند (Griffits, 1992) .

یکی دیگر از فاکتورهای مهم در فرآیند ، زمان تخمیر بوده که میکروبها در زمانهای مختلف اقدام به تولید پروتئین می نمایند. در این تحقیق ، به هنگام انجام فرآیند در شرایط آزمایشگاهی ، ماکزیمم زمان تخمیر ۵۴ ساعت بوده که در این زمان میکروب از

Archive of SID

www.SID.ir

نظر تغییرات جذب نوری تقریباً ثابت بوده است. لازم به ذکر است که میکروبهای مورد استفاده در حضور سوبستراهای مورد استفاده تقریبا در زمان ۵۴ ساعت به فاز ثابت رشد رسیده اند. به هنگام انجام فرآیند در سیستم فرمانتور ، زمان تخمیر کوتاهتر شده و به ۲۱ ساعت کاهش یافت. با انجام واکنش در فرمانتور ، به لحاظ کنترل شدن شرایط ، میکروب سریعتر به مصرف سوبسترا پرداخته و تکثیر می نماید. محققین بر این عقیده اند که با وارد نمودن میکروب به یک محیط جدید ، به لحاظ متفاوت بودن شرایط محیطی ، فاز سکون (Lag phase) باکتری طولانی تر شده ولی با گذشت زمان ، میکروب با شرایط جدید خود را آداپته نموده و شروع به رشد لگاریتمی می نماید(Griffits, 1992; Liu *et al.*,1995). در تحقیق حاضر ، باکتری ها پس از آداپتاسیون اولیه و افزایش تدریجی سوبستراهای اصلی ، با شرایط جدید آداپته شده اند. بهمین دلیل اضافه کردن میکروب به سیستم فرمانتور ، فاز سکون را بسیار کوتاهتر نموده و بسرعت وارد فاز لگاریتمی شده اند. توقف واکنش و مراحل استخراج آن زمانی است که میکروب وارد فاز رشد ثابت میگردد. در این مرحله میزان سلولهای زنده و مرده تقریبا یکسان بوده و میزان مواد غذایی در دسترس میکروبها کاهش می یابد. بهمین دلیل اگر مرحله ثابت ادامه پیدا کند تعداد میکروبها کمتر شده و در نتیجه میزان پروتئین تولید شده نیز کمتر خواهد شد (Griffits, 1992; Liu *et al.*,1995). Ahmad و همکاران به فاکتورهای مختلف از جمله سرعت دور همزن، میزان ورودی هوا، دما و pH محیط که به نوعی در فرآیند تخمیر تاثیرگذار می‌باشند اشاره نموده و اشاره کردند که با افزایش دور همزن و افزایش نسبی دما، میزان رشد میکروبها افزایش می یابد. فاز سکون رشد مخمرها با کاهش فاکتورهای ذکر شده افزایش یافته و بیانگر آنست که رابطه مستقیم بین دما و دور همزن با رشد میکروبها وجود دارد (Ahmad and Holland, 1995). Mahasnehدر سال ۱۹۹۷ تاثیر فاکتورهایی نظیر دما، نور و املاح معدنی را بر روند تولید پروتئین میکروب را مورد ارزیابی قرار داده و اشاره نمود که با تغییر فاکتورهای مختلف می‌توان درصد پروتئین میکروبی را افزایش یا کاهش داد.

میزان پروتئین میکروبی تولید شده در این تحقیق بین ۴۵-۳۰ گرم بوده است. به لحاظ بالا بودن میزان پروتئین اولیه در امعاء و احشاء تن ماهیان، بالطبع باکتری ها سوبسترای بیشتری را در اختیار داشته و سریعتر تکثیر یافته و میزان بیشتری از پروتئین تک یاخته را تولید می‌نمایند. نتایج مطالعات Samuels و همکارانش در سال ۱۹۹۲ نشان داد که به هنگام استفاده از میکروبها، میانگین پروتئین خام در ضایعات ماهی و خرچنگ به ترتیب ٪۶۰/۴ و ٪۴۴/۱ بوده است.

در این تحقیق از دو روش هضم آنزیمی و اسیدی استفاده گردید در روش آنزیمی از دو آنزیم فلیورزیم و پروتوماکس استفاده شده که اولی بوی ماهی را از سوسپانسیون حذف نموده و دومی هیدرولیز آنزیمی را انجام می‌دهد. در هیدرولیز اسیدی از اسید فرمیک و پپسین استفاده شده که فرآیندی شبیه تهیه سیلاژ می باشد. روش اخیر زمان بر بوده و تا ۱۶ ساعت بطور می‌انجامد در صورتیکه زمان مورد نیاز برای هیدرولیز آنزیمی بین ۵-۲ ساعت می‌باشد. نتایج نشان داده که متوسط تولید پروتئین هیدرولیز شده بین ۶۵ تا ۷۲ درصد (هیدرولیز آنزیمی) و ۵۷ تا ۶۲ درصد (هیدرولیز اسیدی) بوده ولی با این وجود نتایج حاصله معنی دار نبوده است.

منابع

تمدنی ج. ۱۳۸۱. تهیه سیلاژ از اندامهای باقیمانده تون ماهیان. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات.

دریانبرد، غ.، کیمرام، ف.، حسینی، ع. ۱۳۸۳. تعیین اثرات دو شیوه صید سنتی و صنعتی تون ماهیان بر یکدیگر در دریای عمان . گزارش نهایی طرح تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات.

Archive of SID

www.SID.ir

دفتر طرح و توسعه شیلات ایران. ۱۳۸۵ .سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۴-۱۳۷۵ . سازمان شیلات ایران.

Ahmad, M.N., Holland C.R. 1995. Growth Kinetics of single cell protein in batch fermentor. J .Food Eng. 26: 443-52.

Akman, M. 1980. Single cell protein, Introduction, the use of algae, fungi and yeasts for SCP production. Microb. Bul. 14: 141-55.

Anupama, P. and Ravindra P. 2000. Value-added food: Single cell protein. Biotechnol. Adv. 18: 459-479.

AOAC (Assocafiotion of official analytical analysis AOAC chemists), 1990. Official methods of analysis AOAC. Washington DC, p1263.

Blancou, J. Calvet H., Riviere R. 1978. Single cell protein production from Peanut shell. Rev. Elev. Med.Vet. Trop. 31: 363 -8.

Bornstein, S. Plavnik I., Lipstein B. 1982. Evaluation of methanol grown bacteria and hydrocarbon grown yeast as sources of protein for poultry: trials with egg laying birds. Br. Poult Sci. 23: 487-99.

El Saadany, R., Khalaf, H., Manawaty, H., Salom, F. 1988. The Production of single cell protein from agricultural wastes by fungi. Acta Aliment. Acad. Sci. Hung. 17:376-387.

Ferrer, J. Paez, G., Marmol, Z., Ramones E., Garcia, H., Forster, C.F. 1996. Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Biores. Technol. 57:55-60.

Fujii, T. 1989. Production of single-cell protein from stickwater. J. Tokyo Univ. Fisheries. 76: 1-6.

Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. Biochem. 28: 1-15.

Griffits, J.B.1992. Animal cell processes-batch or continuous. J.Biotechnol. 22: 21-30.

Israelidis C.J 2000. Nutrition of single cell protein, twenty years later. Food Technology Institute Greece.

Kim, H.K., Lee B.K. 2000. Mass Production of Rhodopseudomonas palustris as diet for Aquaculture. Aquaculture Eng. 23: 281-293.

Kurbanoglu, E.B., Algur O.F. 2002. Single cell protein production from ram born hydrolysate by bacteria. Biores. Technol. 85: 125-129.

Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Methods in Enzymology. Academic press, New York Vol. 3 p450.

Liu, G., Zheng, Z., Song, D., Cen, P. 1995. Kinetic models of batch and fed–batch culture of single cell protein with double carbon sources. Chin. J.Biotechnol. 11:163-70.

Mahasneh, L.A. 1997. Production of single cell protein from five strains of Chlorella spp. (Chlorophyta).Cytobios. 90:153-61.

Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O. 2007. Influence of temperature and PH on biomass production and protein biosynthesis in a putative spirulina SP .Biores. Technol.98: 2207-2211.

Rhishipat, R and Philip R. 1998. Selection of marine yeast for generation of single cell protein from Prawn shell wastes. Biores Technol. 65: 255-6.

Sasikala, C. and Ramana C.V. 1995. Biotechnological potentials of anoxygenic phototrophic bacteria production of single cell protein, vitamins, ubiquinones, hormones and use in waste treatment. Adv. Appl. Microbiol. 41:173-226.

Schulz E., Oslage, H.J. 1974. Composition and nutritive value of single cell protein. Animal Feed Sci. Technol. 1: 9-24.

Shipman, R.H., Kao, I.C., Fan L.T. 1975. Single cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural byproducts. Biotechnol. Bioeng. 17:1561-1570

Sivalingam, P.M. 1989. Microbial bioconversion of discarded aquatic proteins into quality proteins.Program of the First International Marine Biotechnology Conference (IMBC), 89.P.13.

Archive of SID

www.SID.ir