فصلنامه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال اول، شماره ۲، پاییز ۱۳۸۵ ، صفحات ۲۹ تا ۳۴

تولید پروتئین قارچی با استفاده از فوزاریوم اکسیسپوروم PTCC 5115

زهرا آهنگی [۱] ، سید عباس شجاع‌الساداتی [۲]، هوشنگ نیکوپور [۳]

۱- نویسنده مسئول: کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، پست الکترونیکی: zahra_ahangi@yahoo.com
۲- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۸۴/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۵/۸/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: مایکوپروتئین یا پروتئین قارچی با تخمیر هوازی قارچ فوزاریوم *وِنِه ناتوم* (*Fusarium venenatum*) روی سوبسترای کربوهیدراتی تولید می‌شود. میزان RNA محصول به دست آمده بالاست. بنابراین، لازم است با روش حرارتی، میزان اسید ریبونوکلئیک آن به کمتر از ۲٪ کاهش داده شود. ارزش تغذیه‌ای پروتئین قارچی، قابل توجه است، دیواره سلولی هیف، منبع فیبر رژیمی، غشای سلولی، منبع چربی غیر اشباع با دو یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه و سیتوپلاسم، منبع پروتئین با کیفیت بالاست. در این تحقیق، امکان تولید آزمایشگاهی پروتئین قارچی با استفاده از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* (*Fusarium oxysporum*) مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه تخمیر برای به دست آوردن بالاترین راندمان تولید مشخص شد.

مواد و روشها: فرایند تخمیر هوازی روی محیط کشت وُگل (Vogel) در شرایط مختلف دما و دورهمزن و مقادیر مختلف گلوکز به عنوان منبع کربن و فسفات‌دی‌هیدروژن‌آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن انجام شد. برای کاهش میزان RNA تا حد مجاز از روش حرارتی در دمای $65\ ^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

نتیجه‌گیری : این تحقیق نشان داد که بهترین شرایط تخمیر برای تولید پروتئین قارچی با استفاده از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* عبارت است از: دمای $25\ ^{\circ}C$، دورهمزن ۱۵۰rpm، گلوکز ۵ گرم در لیتر و فسفات دی هیدروژن آمونیوم ۳/۴ گرم در لیتر که می‌توان محصولی حاوی تقریباً ۴۲٪ پروتئین خام تولید کرد. میزان RNA محصول نیز با روش حرارتی از ۷٪ به کمتر از ۱٪ تقلیل یافت.

واژگان کلیدی: مایکوپروتئین، *فوزاریوم اکسیسپوروم*، کاهش RNA

• مقدمه

تولید پروتئین تک یاخته SCP (single cell protein) به عنوان پروتئین افزودنی به خوراک دام، طیور و آبزیان به دلیل کمبود آن در جهان از دهه ۱۹۶۰ مطرح شد و به طور جدی به اجرا در آمد. تولید SCP عموماً از میکروارگانیسم‌هایی چون مخمر و باکتری صورت می‌گیرد. تولید مایکوپروتئین یا پروتئین قارچی با ویژگیهای تغذیه‌ای، فیزیکی و شیمیایی جالب توجه به عنوان غذای انسان در سالهای اخیر توسعه یافته است. فروش پروتئین قارچی برای مصرف انسان در سال ۱۹۸۵ در انگلستان و در سالهای بعدی در سایر کشورهای اروپایی (بلژیک ۱۹۹۲، هلند ۱۹۹۳، ایرلند ۱۹۹۴، سوئیس ۱۹۹۵ و سوئد ۱۹۹۸) مورد تأیید قرار گرفت. این پروتئین قارچی، با نام تجاری کورن (Quorn) بیش از یک دهه است که در انگلستان تولید می‌شود و به عنوان جایگزین گوشت در بسیاری از فراورده های غذایی از قبیل سوسیس استفاده می‌شود. در سال ۱۹۹۸ اداره کل غذا و داروی آمریکا (FDA) استفاده از پروتئین قارچی را برای استفاده در تولید غذای انسان تأیید کرد (۱۱).

پروتئین قارچی با تخمیر هوازی قارچ فوزاریوم *وِنِه ناتوم* (*Fusarium venenatum*) که قبلاً با نام *فوزاریوم*

Archive of SID
www.SID.ir

گرامینئاروم (*Fusarium graminearum*) شناسایی شده بود، روی سوبسترای کربوهیدراتی (گلوکز) تولید می‌شود. قارچ رشته ای فوزاریوم به دلیل تاریخچه طولانی استفاده انسان از قارچها به عنوان غذا، امکان فرموله کردن محصولات غذایی حاصل از قارچهای رشته‌ای که بو، طعم و بافت مناسبی دارند و به دلیل برداشت آسان میسلیوم قارچی از محلول حاصل از تخمیر محیط کشت، برای این منظور انتخاب شده است (۱۳، ۱۶).

یکی از مشکلات مربوط به پروتئین قارچی، میزان RNA بالای آن است که در انسان به اسید اوریک نامحلول متابولیزه شده و موجب بیماریهای سنگ کلیه، نقرس و درد مفاصل می‌شود. مقدار مجاز مصرف روزانه اسید ریبونوکلئیک در انسان، حداکثر ۲ گرم است. به همین دلیل، ضروری است RNA توده زیستی حاصل از تخمیر، توسط فرایند حرارتی کاهش یابد. در اثر حرارت، آنزیم‌های RNA-ase داخل سلولی، فعال می‌شوند (۷). سوسپانسیون حاصل از تخمیر بعد از کاهش RNA سانتریفوژ می‌شود، خمیرجمع‌آوری شده که حاوی تقریباً ۷۵٪ آب است، مایکوپروتئین نامیده می شود و ترکیب آن عبارت است از: پروتئین تقریباً ۱۲٪، چربی ۳٪، کربوهیدرات ۳٪، فیبر ۶٪ و خاکستر ۲٪ . همچنین پروتئین حاوی عناصر معدنی کم‌مقدار و ویتامین‌های گروه B نیز هست. ارزش تغذیه‌ای پروتئین قارچی به دلیل ترکیب شیمیایی آن است؛ دیواره سلولی هیف، منبع فیبر رژیمی، غشای سلولی، منبع چربی غیراشباع با دو یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه و سیتوپلاسم، منبع پروتئین با کیفیت بالاست. فیبر آن که از ۶۵٪ بتاگلوکان و ۳۵٪ کیتین تشکیل شده است، بر چربیهای خون اثر کرده، کلسترول تام و LDL را کاهش وHDL را افزایش می دهد. همچنین فیبر به عنوان پری‌بیوتیک در روده کوچک عمل می‌کند. پروتئین قارچی، فاقد فیتات است؛ در نتیجه، مانع جذب مواد معدنی نمی‌شود. ترکیب اسیدهای چرب آن، شبیه چربی گیاهی است و نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع آن ۳/۵ به ۱ است. پروتئین آن نیز دارای تمام اسیدهای آمینه ضروری بوده و ارزش تغذیه‌ای آن مانند پروتئین شیر بدون چربی بالاست (۱۰).

با توجه به پروانه ثبت اختراع (به شماره ۵۷۳۹۰۳۰) گونه‌های فوزاریوم شامل: *فوزاریوم گرامینئاروم* (*Fusarium graminearum*)، *فوزاریوم اکسیسپوروم* (*Fusarium oxysporum*) و *فوزاریوم سولانی* (*Fusarium solani*) گونه‌های مورد تایید برای غذای انسان هستند (۱۵). از آنجا که تاکنون از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* برای تولید پروتئین قارچی استفاده نشده است، در این تحقیق، شرایط بهینه برای تولید پروتئین قارچی با استفاده از این گونه، مورد بررسی قرار گرفت و کاهش RNA محصول به کمتر از ۲٪ با استفاده از شوک حرارتی انجام شد.

• مواد و روشها

میکروارگانیسم و محیط کشت: از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* PTCC 5115 و محیط کشت وُگل به همراه گلوکز (۱۰ گرم در لیتر) به عنوان منبع کربن برای تهیه محیط کشت استفاده شد. ترکیبات محیط کشت در یک لیتر عبارت بود از: سیترات سدیم ۲/۶ گرم، نیترات پتاسیم ۲/۵۲ گرم، فسفات‌دی‌هیدروژن‌آمونیوم ۲/۸۸ گرم، فسفات‌دی‌هیدروژن‌پتاسیم ۱/۶گرم، سولفات‌منیزیوم ۷ آبه ۰/۲ گرم، کلرید کلسیم دو آبه ۰/۱ گرم، بیوتین ۰/۲۵ میلی‌گرم، اسید سیتریک ۵ میلی‌گرم، فرو سولفات آمونیوم ۶ آبه ۱ میلی‌گرم، سولفات روی ۷ آبه ۵ میلی‌گرم، سولفات مس ۵ آبه ۰/۲۵ میلی‌گرم، سولفات منگنز مونوهیدراته ۰/۰۵ میلی‌گرم، اسید بوریک ۰/۰۵ میلی‌گرم و مولیبدات سدیم دو آبه ۰/۰۵ میلی‌گرم (۱۴).

مراحل توسعه مایه تلقیح: برای تهیه مایه تلقیح ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت وُگل در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۵ میلی لیتر سوسپانسیون کپک با افزودن آب مقطر یا محیط کشت روی محیط کشت شیب دار به محیط کشت اضافه شد و در انکوباتور همزن دار با دمای ۲۵°C و دورهمزن ۲۰۰ rpm قرار گرفت. پس از رسیدن به حداکثر شدت رشد ویژه (μ_{max}) - فاز لگاریتمی- کپک به دست آمده برای نگهداری به یخچال با دمای ۴ °C منتقل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

تولید توده زیستی: محیط کشت تولید با همان ترکیب محیط کشت تلقیح، تهیه شد و در ارلن های۵۰۰ میلی‌لیتری به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر در شرایط سترون ریخته شد. ۵٪ حجمی از مایه تلقیح در شرایط سترون به محیط کشت تولید اضافه شد. پس از انجام تلقیح، ارلن ها در انکوباتور همزن دار در شرایط مختلف دما و دورهمزن مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از برداشت کشت‌های تولید (۳۱ساعت)، توده زیستی تولید شده توسط سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ rpm و زمان ۲۰ دقیقه، جدا شدند، سپس با آب مقطر، شسته و در فور با دمای ۶۰ $^{\circ}C$ خشک شدند.

طراحی آزمایشها: برای تعیین شرایط بهینه تخمیر از روش تاگوچی استفاده شد. در این روش برای۴ عامل دما، دورهمزن،گلوکز به عنوان منبع کربن و فسفات دی هیدروژن آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن در سه سطح مختلف (دما ی ۲۰، ۲۵ و۳۰ درجه سانتی گراد، دورهمزن ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ rpm ، گلوکز ۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر و فسفات دی هیدروژن آمونیوم ۲/۴، ۲/۹ و ۳/۴ گرم در لیتر) ۹ آزمایش (سه تکرار) انجام شد.

کاهش RNA: کاهش RNA توده زیستی با روش تیمار حرارتی در دو دمای ۶۵ و۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمانهای ۵ الی ۳۰ دقیقه انجام شد. بهترین دما و زمان از نظر بیشترین کاهش RNA و کمترین افت توده زیستی به دست آمد. در این روش RNA به مونونوکلئوتیدها تجزیه و از سلول، وارد محیط کشت می‌شود. پس از کاهش RNA ، توده زیستی توسط سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد، سانتریفوژ کردن باعث جدا شدن مونونوکلئوتیدها نیز شد (۱۲،۱۷).

تعیین پروتئین خام: تعیین مقدارپروتئین به طور غیرمستقیم و از طریق اندازه‌گیری نیتروژن کل با روش میکروکلدال انجام شد (۸).

تعیین RNA : اندازه گیری RNA توده زیستی با روش اسپکتروفتومتری انجام شد. در این روش، جداسازی RNA توسط محلول RNA-Plus انجام شد (۵).

تعیین کربوهیدرات کل: اندازه‌گیری کربوهیدرات کل با روش اسپکتروفتومتری انجام شد. در مجاورت اسید سولفوریک و آب، کربوهیدرات‌ها به قندهای ساده (مانند گلوکز) تبدیل می‌شوند. مخلوط گلوکز، فنل و اسید سولفوریک غلیظ با تولید حرارت، ترکیب رنگی ایجاد می‌کند. این ترکیب در ناحیه مرئی، دارای جذب نور است(۶).

تعیین چربی تام: چربی تام با روش گراویمتری اندازه‌گیری شد (۴).

تعیین اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب: اندازه‌گیری اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب به ترتیب با دستگاههای (Amino Acid Analyzer (AOAC 1994 و گازکروماتوگرافی (AOAC 1975) انجام شد (۲،۳).

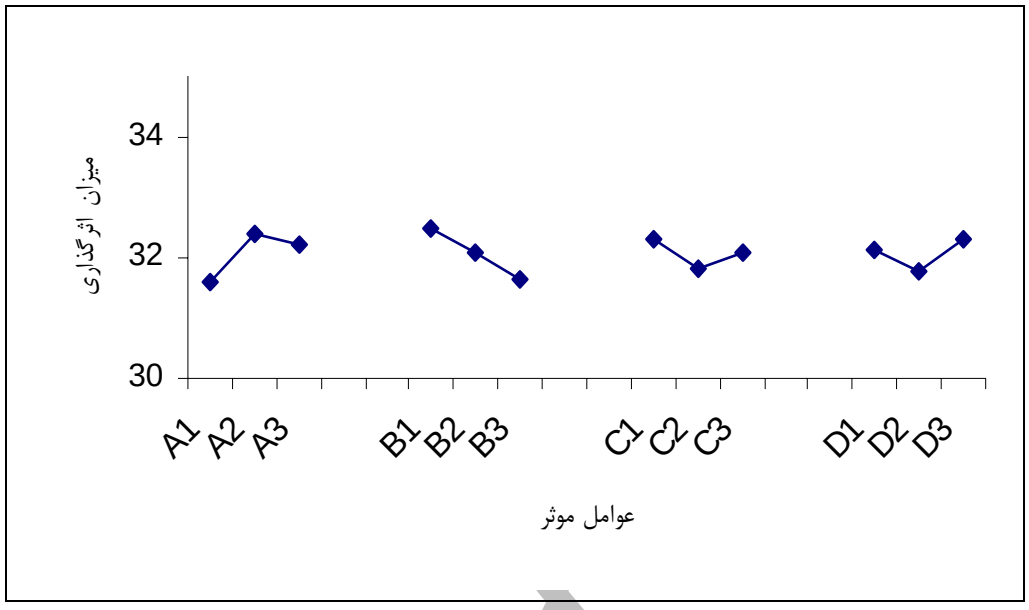
روش‌های آماری: برای تعیین شرایط بهینه تخمیر برای رسیدن به بالاترین مقدار پروتئین خام از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد.در مورد ویژگیهای کمّی از آمار توصیفی به کمک میانگین استفاده شد. مقایسه نتایج اسیدهای آمینه پروتئین قارچی با مقادیر ارائه شده به وسیله FAO و اسیدهای آمینه *فوزاریوم ونِه‌ناتوم* با استفاده از آزمون t-test در سطح معنی‌داری α =۰/۰۵ انجام شد.

• نتایج و بحث

شرایط بهینه از نظر تولید پروتئین خام شامل دمای ۲۵ $^{\circ}C$، دور همزن ۱۵۰ rpm، گلوکز ۵ g/l و فسفات دی هیدروژن آمونیوم ۳/۴ g/l تعیین شد. در این شرایط ۵g/l توده زیستی با ۴۲٪ پروتئین خام تولید شد. نتایج، بیانگر آن است که افزایش دورهمزن به دلیل آسیب رساندن به توده سلولی منجر به کاهش تولید پروتئین می‌شود (۹). همچنین نسبت C:N بر تولید پروتئین اثر می‌گذارد، در نتیجه، درمیزان گلوکز پایین‌تر (۵ g/l) و آمونیوم بالاتر (۳/۴g/l) تولید پروتئین بیشتر شده است (شکل۱) (۱).

Archive of SID

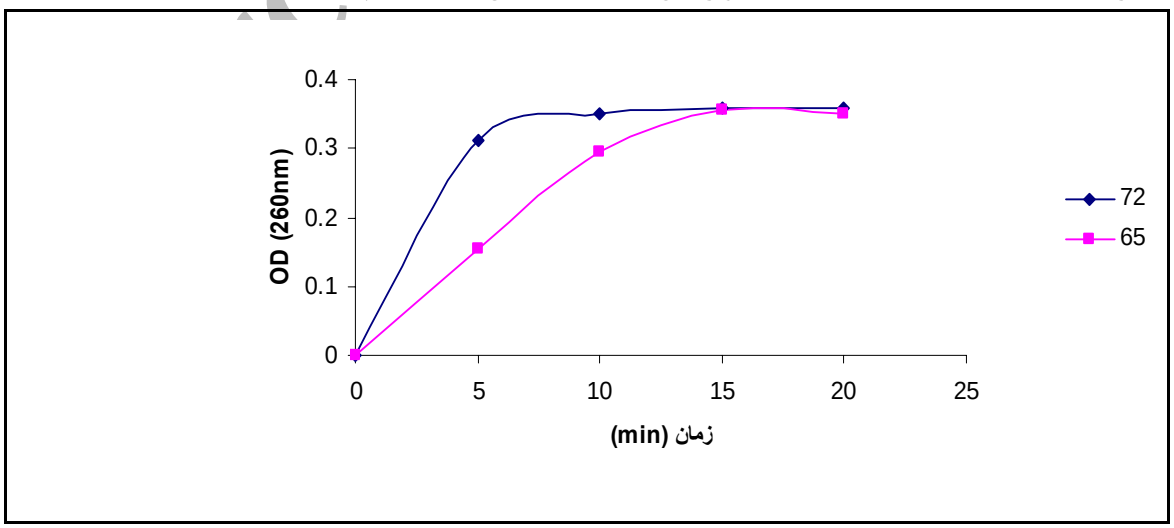
www.SID.ir



شکل ۱- اثر عوامل مؤثر بر تولید پروتئین قارچی

A: دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد)
B: دورهمزن (۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ **rpm**)
C: گلوکز(۵، ۱۰و ۱۵ گرم در لیتر)
D: فسفات دی هیدروژن آمونیوم (۲/۴، ۲/۹، ۳/۴ گرم در لیتر)

بیشترین کاهش RNA در دمای $65^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه و دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد (شکل۲) که دمای $65^{\circ}C$ و زمان ۱۵ دقیقه، افت وزن کمتری (۱۸/۶٪) نسبت به دمای $72^{\circ}C$ و زمان ۱۰ دقیقه (۳۶/۷٪) نشان داد. میزان RNA توده زیستی با شوک حرارتی در دمای $65^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه از ۷٪ به کمتر از ۱٪ کاهش یافت که مطابق نتایج Wiebe در سال ۲۰۰۲ است.



شکل۲- اثر دما و مدت زمان تیمار حرارتی بر آزاد سازی نوکلئوتیدها

www.SID.ir

مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با اسیدهای آمینه گزارش شده توسط FAO (۹) نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه ترئونین، والین، ایزولوسین، لوسین، فنیل آلانین و لیزین پروتئین قارچی به طور معنی‌داری بیشتر از مقادیر ارائه شده به وسیله FAO است.

جدول ۱- مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با مقادیر ارائه شده به وسیلهFAO
(گرم درصدگرم پروتئین)

اسید آمینه	FAO	پروتئین قارچی
ترئونین	۲/۸	۹/۲۹
والین	۴/۲	۶/۰
سیستئین	۲/۰	–
متیونین	۲/۲	۱/۴۵
ایزولوسین	۴/۲	۴/۶۳
لوسین	۴/۸	۶/۲
تیروزین	۲/۸	۱/۳۷
فنیل آلانین	۲/۸	۴/۲
لیزین	۴/۲	۶/۷

مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با نتایج Rodger در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه گلوتامیک، گلیسین، ترئونین و پرولین قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* به طور معنی‌داری بیشتر از قارچ *فوزاریوم ونه ناتوم* است (جدول ۲).

نتایج حاصل از آنالیز اسیدهای چرب پروتئین قارچی در جدول ۳ نشان داده شده است. نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع آن ۳/۱ به ۱ بود که این نسبت، کمی پایین‌تر از نتایج Rodger در سال ۲۰۰۱ (۳/۵ به ۱) است که تولید پروتئین قارچی از قارچ *فوزاریوم ونِه ناتوم* را بررسی کرده بود. میزان کربوهیدرات توده زیستی به دست آمده ۱۶/۷٪ و چربی تام ۱۲٪ به دست آمد.

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* می توان پروتئین قارچی با کیفیت مطلوب و حاوی ۴۲٪ پروتئین خام در شرایط بهینه تخمیر به دست آورد.

جدول۲- مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با مقادیر ارائه شده به وسیله Rodger در سال ۲۰۰۱
(گرم درصدگرم پروتئین)

اسید آمینه	پروتئین قارچی حاصل از *فوزاریوم ونه ناتوم*	پروتئین قارچی حاصل از *فوزاریوم اکسیسپوروم*
آلانین	۶/۳	۵/۷۷
آرژنین	۷/۳	۶/۴۱
آسپارتیک اسید	۱۰/۳	۹/۸۱
سیستئین	۰/۸	–
گلوتامیک اسید	۱۲/۵	۱۷/۴۸
گلیسین	۴/۳	۷/۱۱
هیستیدین	۳/۵	۲/۴۰
ایزولوسین	۵/۲	۴/۶۳
لوسین	۸/۶	۶/۲۰
لیزین	۸/۳	۶/۶۶
متیونین	۲/۱	۱/۴۵
فنیل‌آلانین	۴/۹	۴/۲۰
پرولین	۴/۵	۶/۸۲
سرین	۵/۱	۴/۳۵
ترئونین	۵/۵	۹/۲۸
تریپتوفان	۱/۶	–
تیروزین	۴/۰	۱/۳۷
والین	۶/۲	۶/۰۶

جدول۳- نتیجه آنالیز اسیدهای چرب مهم محصول تولید شده

اسیدهای چرب		اسید چرب (درصد)
میریستیک	C14:0	۰/۱۹
پالمیتیک	C16:0	۱۳/۲
پالمیتولئیک	C16:1	۰/۸۹
استئاریک	C18:0	۸/۹۸
اولئیک	C18:1	۳۷/۹
لینولئیک	C18:2	۳۱/۶
γ- لینولنیک	C18:3	۰/۰۸
آراشیدیک	C20:0	۰/۸۸
α- لینولنیک	C18:3	۴/۴۷
بهنیک	C22:0	۰/۵۳

Archive of SID

www.SID.ir

در نهایت، پیشنهاد می‌شود استفاده از گونه های خوراکی سایر قارچهای رشته ای برای تولید پروتئین قارچی، مورد مطالعه قرار گیرد. و استفاده از سوبسترای کربوهیدراتی ارزان قیمت (ضایعات صنایع غذایی مانند آب پنیر) به عنوان منبع کربن بررسی شود. همچنین در زمینه استفاده از پروتئین قارچی در تهیه محصولات غذایی نظیر سوسیس مطالعات لازم انجام شود.

• منابع

۱. آهنگی، زهرا. شجاع الساداتی، سیدعباس. نیکوپور، هوشنگ. چهارمین کنگره ملی بیوتکنولوژی، مرداد۱۳۸۴،کرمان.

2. AOAC. Association of official chemists, official methods of analysis of association of official agriculture chemists. Assoc of Offic Agric Washington 1994.
3. AOAC. Association of official chemists, official methods of analysis of association of official agriculture chemists. 11td ed. Assoc of Offic Agric Washington 1975.
4. Barnes H, Balckstock J. Estimation of lipids in marine animals and tissue: detailed investigation of total lipids. *J Exp Mar Biol Ecol* 1973; 12: 101-118.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical chemistry* 1987; 162: 156.
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* 1956; 28: 350-356.
7. Hunter BT. Make way for mycoprotein in U. S. food supply. *Consumers Research* 2001; 24-27.
8. Lang CA. Simple microdetermination of kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analytical Chemistry* 1958; 30: 1692-1694.
9. Moo-Young M, Chisti Y, Vlach D. Fermentation of celluloseic materials to mycoprotein foods. *Biotech Adv* 1993; 11: 469-479.
10. Peregrin T. Mycoprotein: is America ready for a meat substitute derived from a fungus. *Journal of the American Dietetic Association* 2002; 102(5): 628.
11. Rodger G. Production and properties of mycoprotein as a meat alternative. *Food Technology* 2001; 55(7): 36-38.
12. Shojaosadati SA, Chisti Y, Moo-Young M. Reduction of nucleic acids levels in *Neurospora sitophila* by heat treatment. *International Journal of Engineering Science* 1999; 10(2): 83-93.
13. Trinci APJ. Evolution of the Quorn Registered mycoprotein fungus *Fusarium graminearum* A3/5. *Microbiology* 1994; 140(9): 2181-2188.
14. Vogel HJ. A convenient medium for *Neurospora* (medium N). *Microbial Genet Bull* 1956;13: 42-44.
15. Ward PN. Production of food. *United State Patent* 1998; 5,739,030.
16. Wiebe MG. Quorn Mycoprotein- overview of a successful fungal product. *Mycologist* 2004; 18(1):17-20.
17. Wiebe MG. Mycoprotein from *Fusarium venenatum*: a well-stablished product for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 58(4): 421-427.

Archive of SID

www.SID.ir