استفاده از مخمرها به منظور تولید پروتئین تک یاخته از امعاء و احشاء تون ماهیان

رضا صفری و زهرا یعقوب زاده*

ساری، پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر، بخش بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱/۲۶

چکیده

در این تحقیق از مخمرهای مختلف در جهت تولید پروتئین میکروبی از امعاء و احشاء تن ماهیان استفاده شده است. مخمرهای مورد استفاده کاندیدا اوتیلیس (*Candida utilis*)، ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*) و رودوترولا گلوتینوس (*Rhodotorula glutinus*) بوده و سیستم مورد استفاده از نوع هوازی بوده که در شرایط بسته و در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور (CSTR) انجام گرفت. نتایج نشان داد که میانگین وزنی پروتئین خام تولید شده به ازای یک لیتر از محیط کشت تهیه شده از پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء، بین ۳۲ تا ۳۸ گرم و ۳۷/۵ تا ۴۵ گرم در لیتر در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور بوده است. زمان اتمام فرآیند در مقیاس آزمایشگاهی ۵۴ ساعت و در مقیاس فرمانتور ۲۱ ساعت بوده است. میزان رشد مخمر کاندیدا اوتیلیس نسبت به سایر مخمرها سریعتر بوده و درصد پروتئین خام تولید شده از آن نیز بیشتر بوده است. نتایج نشان داد که میانگین درصد پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در پروتئین میکروبی تولید شده به ترتیب ۵۷/۴۸٪، ۷/۰۵٪، ۴/۳۸٪ و ۱/۰۸٪ بوده است. نتایج این تحقیق نشان میدهد که با مهیا نمودن شرایط مطلوب رشد مخمرها و استفاده از فرمانتور مناسب، میتوان درصد بالایی از پروتئین میکروبی از ضایعات ماهی تولید کرده و بعنوان مکمل غذایی در غذای دام، طیور و آبزیان استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروتیئن تک یاخته، امعاء و احشاء، تون ماهیان، مخمر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۵۵۰۴۶۷، پست الکترونیکی: za_yaghoub@yahoo.com

مقدمه

اصطلاح پروتئین تک یاخته SCP (*Single Cell Protein*) به سلولهای خشک شده میکروارگانیسمهایی مانند باکتریها، 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. مخمرها از جمله ارگانیسمهایی هستند که بطور گسترده در جهت تولید پروتئین تک یاخته مورد استفاده قرار گرفته و از مهمترین آنها میتوان به ساکارومیسس (*Saccharomyces*)، تورولوپسیس (*Torulopsis*)، کاندیدا (*Candida*)، دیدیوم (*Didium*) و ... اشاره نمود(۲۲). از مزیتهای مهم مخمرها در تولید پروتئین تک یاخته در مقایسه با باکتریها، رشد نسبتاً بالا، تولید محصول بیشتر در زمان کوتاهتر، آسان بودن استخراج پروتئین تولید شده و آلودگی بسیار پائین محصول میکروبی حاصل از استخراج (به لحاظ رشد مخمرها در pH اسیدی) می باشد (۶، ۱۳ و۲۲). ارزش غذایی پروتئین تولید شده از جلبکها، قارچها و باکتریها در جدول ۱ مورد مقایسه قرار گرفته است. مخمرها توانایی رشد در دماهای مختلف را دارا بوده ولی اپتیمم دمای رشد آنها بین ۲۵ تا ۳۵ درجه بوده و pH مناسب آنها نیز اسیدی بوده و اپتیمم آن بین ۴/۵ تا ۵/۵ میباشد. همانطوریکه اشاره شد مخمرها کاربرد فراوانی در تولید SCP از منابع مختلف دارند. در جدول ۲ به برخی از این مخمرها اشاره شده است.

جدول ۱- خصوصیات برخی از مخمرهای صنعتی و میزان تولید پروتئین تک یاخته تولید شده از آنها (۵)

نوع مخمر	سوبسترا	دما	pH	زمان تقسیم (ساعت)	غلظت سلولی (گرم بر لیتر)	تولید سلولی
Candida intermedia	گلوکز	۳۰	۵/۵	۲	۱۲	۳۵/۴
Candida guilliermondii	آلکانها	۳۰	۵	۷/۱	۵	۷۰
Candida lipolytica	آلکانها	۲۵	۵/۵	۴/۵	۱۳/۵	۹۰
Candida lipolytica	آلکانها	۲۸/۲۲	۳/۵	۲/۵	۱۲	۸۵
Candida utilis	پساب سولفیت	۳۲	۵	۲	۸/۱۹	۳۹/۱
Rhodotorula gracilis	گلوگز	۳۲	۴/۵	۲	۸/۵	۶۱/۱
Kluyvermyces fragilis	لاکتوز	۳۲	۵/۵	۱/۵	۱۴/۶	۵۵
Saccharomyces cerevisiae	گلوکز و گالاکتوز	۳۰	۴/۵	-	۱۵	-
Saccharomyces cerevisiae	ملاس	۳۰	۴/۵	۲/۵	-	۲۳,۵

جدول ۲ - میانگین پارامترهای غذایی در SCP تولید شده از مخمرها در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور (بر حسب درصد)

مقیاس	تیمار	پروتئین	چربی	خاکستر	رطوبت
آزمایشگاهی	کاندیدا اوتیلیس	۵۸/۶	۷/۳۴	۰/۵۴	۴/۶
	ساکارومیسس سرویزیه	۵۳/۶	۶/۵۶	۱/۴۶	۵/۳
	رودوترولا گلوتینوس	۶۰/۲۶	۷/۲۶	۱/۲۵	۳/۲۵
فرمانتور	کاندیدا اوتیلیس	۶۱/۲	۵/۳۱	۱/۵۱	۳/۱۶
	ساکارومیسس سرویزیه	۵۵/۲	۵/۱۱	۱/۲۸	۴/۲۱
	رودوترولا گلوتینوس	۵۷/۸	۴/۵۱	۱/۲۱	۴/۲۶

تون ماهیان و گونه های وابسته به آن تنها از یک خانواده Scombridae تشکیل یافته اند که دارای ۱۵ جنس و ۴۹ گونه می باشند. از مهمترین گونه های این گروه میتوان به گیدر، هوور، هوور مسقطی، تون منقوس، زرده، شیر و قباد اشاره نمود. به منظور تولید کنسرو ماهی عموماً از ماهیان گونه گیدر، هوور و هوور مسقطی استفاده می گردد(۲). میزان تولید تون ماهیان در سال ۱۳۸۴ در حدود ۱۸۰۰۰۰ تن بوده است (۳). اگر ضایعات مربوط به این گونه ها بین ۴۰ تا ۴۵ ٪ در نظر گرفته شود (ضایعات مربوط به سر و دم و امعاء و احشاء)، ضایعات تولید شده بین ۷۲۰۰۰ و ۸۱۰۰۰ تن خواهد بود. در مراکز عمل آوری تن ماهیان، ضایعات حاصل از امعاء و احشاء جمع آوری شده و در نهایت به کارخانه های پودر جهت تهیه پودر ماهی انتقال داده میشود. اگر ضایعات تولید شده بطور صحیح مدیریت شده و بعنوان سوبسترای غنی از پروتئین جمع آوری و پس از آماده سازی اولیه و هضم آنزیمی به یک بیوراکتور زیستی هدایت گردد می توان محصولات متنوعی با پایه میکروبی تولید کرده و با اهداف گوناگون مورد استفاده قرار داد. هدف از انجام این مطالعه استفاده از مخمرها به منظور تولید پروتئین تک یاخته از ضایعات تون ماهیان (امعاء و احشاء) و تعیین ارزش غذایی محصول تولید شده می باشد.

مواد و روشها

نمونه های مورد بررسی شامل امعاء و احشاء ماهیان تون جمع آوری شده از کارخانجات تولید کننده کنسرو بوده اند. جمع آوری نمونه ها از کارخانجات تولید کننده کنسرو در شهرک های میرود و امیر آباد استان مازندران انجام گرفته و نمونه های انتقال داده شده به آزمایشگاه، ابتدا از نظر ارزش غذایی (پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت) تعیین مقدار شده و سپس آماده سازی شدند.

ابتدا نمونه ها با استفاده از دستگاه آسیاب (Muolinex) کاملا هموژن شده و به منظور غیر فعال شدن آنزیم های داخلی، برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد بن ماری قرار داده شدند (۲۷). بعد از خنک شدن تا دمای اتاق، نمونه در ظروف ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و در داخل بن ماری متحرک (اختریان، ایران) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۲ ساعت، در معرض آنزیم پروتامکس(پروتئاز با منشاء میکروبی) در مقدار ثابت ۱ درصد قرار گرفتند (۱، ۷، ۱۶، ۱۹و ۲۷). سپس نمونه ها به منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین های محلول، تحت عمل سانتریفوژ در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار، در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور g × ۷۰۰۰ برای مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند.

استفاده از پروتئین تولید شده بعنوان منبع ازت در محیط کشت مخمری : مخمرهای مورد استفاده در این تحقیق شامل کاندیدا اوتیلیس، ساکارومیسس سرویزیه،رودوترولا گلوتینوس بوده که از مرکز کلکسیون باکتریها و قارچهای سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند. لازم به ذکر است که از مخمرهای مذکور به عنوان پروتئین تک یاخته در سایر کشورها نیز استفاده شده است. به منظور مقایسه رشد مخمرهای مختلف، از محیط کشت تجاری پوتیتو دکستروز براث (Potato Dextrose Agar) و محیط کشت تهیه شده با پپتون تولید شده از ضایعات امعاء و احشاء (پروتامکس) استفاده گردید. مقدار پپتون مورد استفاده در محیط کشتهای اختصاصی بر اساس مقدار پپتون اولیه در محیط کشت تجاری و مقدار پروتئین هیدرولیز شده برای آنزیم پروتامکس در امعاء و احشاء ماهی تون بوده است.

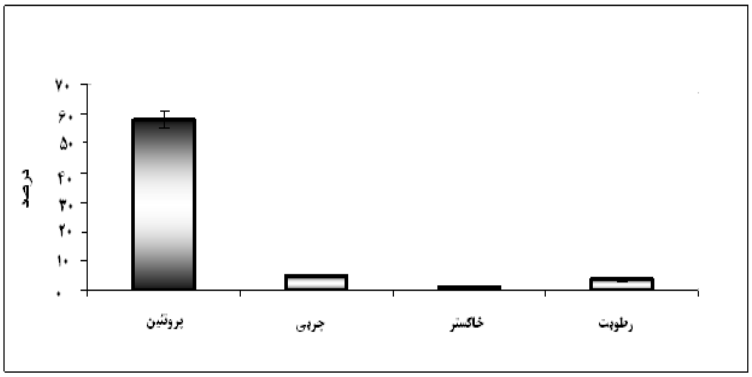
ابتدا مخمرهای مورد استفاده را در محیط کشت مالت براث کشت داده و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه (رساندن مخمرها به فاز رشد لگاریتمی)، به مقدار ۵ میلی لیتر از سوسپانسون مذکور به ۱۰۰ میلی لیتر از محیطهای تهیه شده اضافه گردید (۵٪)(حجمی/ حجمی). نمونه ها در انکوباتور شیکردار قرار گرفته و در زمانهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از رشد مخمرها، جذب نوری(۵۴۰ نانومتر) هریک از آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. دما و pH انتخاب شده به ترتیب ۳۲ و ۵/۴ بوده است. زمان پایان آزمایش در این مرحله ۵۴ ساعت بوده که زمان رسیدن مخمر به فاز سکون رشد (Stationary phase) ثابت بوده است. به منظور انجام آزمایش در مقیاس پایلوت یا فرمانتور از بیورآکتور CSTR (Continuously Stirred Tank Reactor) استفاده شده و سیستم مورد استفاده از نوع هوازی بوده که بصورت بسته انجام گرفته است. تعداد تیمارها، دما و pH مشابه فاز آزمایشگاهی بوده ولی زمان توقف فرآیند در این مرحله (فاز ثابت رشد) ۲۱ ساعت بوده است. سایر پارامترها شامل دور همزن یا rpm (۶۰۰ دور در دقیقه)، Flow rate یا میزان ورودی هوا (۱۵ میلی لیتر در دقیقه) و P_{O2} یا غلظت اکسیژن مورد نیاز در هنگام آزمایش۳۲ بوده و از روغن سیلیکون نیز بعنوان آنتی فوم یا ضد کف استفاده گردید. به منظور استخراج اولیه SCP، از سانتریفوژ یخچال دار با دور ۵۰۰۰ بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه استفاده شده و رسوب حاصله با استفاده از دستگاه فریز درایر خشک گردید. محصول تولید شده، مشابه نمونه اولیه، از نظر درصد پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر مورد آزمایش قرار گرفت جهت اندازه گیری پروتئین از روش کجلدال استفاده شده و به منظور اندازه گیری چربی، رطوبت و خاکستر به ترتیب از روش سوکسله، دمای ۱۰۵

درجه آون و ۵۵۰ درجه کوره استفاده گردید (۴، ۱۱، ۱۷، ۲۰ و ۲۲).

نتایج

نتایج آنالیز پروتئین به این ترتیب ۱۴/۱۲٪ – ۱۳/۲۵٪، چربی۷/۲٪ – ۶/۵٪، رطوبت ۷۶/۰۱ ٪ – ۷۳/۳۱٪ و خاکستر ۱/۳۸٪ – ۱/۱۱٪در امعاء و احشاء تن ماهیان (قبل از شروع فرآیند و بدون در نظر گرفتن نوع گونه) بوده است. میزان پروتئین محلول در امعاء و احشاء هیدرولیز شده ۷۵ درصد بوده است. آنالیز فاکتورهای غذایی در محصول تولید شده بسته به نوع تیمار مورد استفاده متفاوت بوده است (جدول ۳ و نمودارهای ۱و ۲). میانگین پروتئین در SCP تولید شده از مخلوط رودوترولا گلوتینوس در شرایط آزمایشگاهی بیشتر از دو مخمر کاندیدا و ساکارومیسس بوده ولی بهنگام انجام فرآیند در مقیاس فرمانتور، درصد پروتئین در SCP تولید شده از کاندیدا بیشتر از بقیه بوده است ($p < ۰/۰۵$). نتایج نشان داد که میزان تولید پروتئین خام (به ازای یک لیتر از سوبسترای هموژن) متفاوت بوده است (جدول ۴).

نمودار ۱ – میانگین و انحراف معیار پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در SCP تولید شده از امعاء و احشاء تن ماهیان در مقیاس آزمایشگاهی



نمودار ۲ – میانگین و انحراف معیار پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در SCP تولید شده از امعاء و احشاء تن ماهیان در مقیاس فرمانتور

جدول ۳ – تغییرات وزنی پروتئین خام در تیمارهای مختلف در دو مقیاس آزمایشگاهی و فرمانتور

مقیاس	تیمار	پروتئین خام (گرم در لیتر)
آزمایشگاهی	کاندیدا اوتیلیس	۳۸
	ساکارومیسس سرویزیه	۳۲
	رودوترولا گلوتینوس	۳۴/۵
فرمانتور	کاندیدا اوتیلیس	۴۵
	ساکارومیسس سرویزیه	۳۷/۵
	رودوترولا گلوتینوس	۳۹/۷

تغییرات جذب نوری مخمرها در تیمارهای مختلف در جدول های ۵ و ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که میزان جذب در زمان صفر ۱/۶۲ نانومتر بوده که پس از ۵۴ ساعت به ۳/۷۵ (کاندیدا)، ۳/۳۷ (ساکارومیسس) و ۳/۶۵ (رودوترولا گلوتینوس) افزایش یافته است (p <۰/۰۵).

جدول ۴ - تغییرات OD کاندیدا اوتیلیس، ساکارومیسس سرویزیه و رودوترولا گلوتینوس در محیط حاوی امعاء و احشاء هموژن، دمای ۳۲ درجه سانتیگراد و pH = ۵/۴، مقیاس آزمایشگاهی

تیمار / زمان (ساعت)	کاندیدا اوتیلیس	ساکارومیسس سرویزیه	رودوترولا گلوتینوس
۰	۱/۶۲	۱/۶۲	۱/۶۲
۶	۱/۶۹	۱/۶۶	۱/۶۵
۱۶	۲/۴۳	۱/۸۵	۲/۲۵
۲۴	۲/۸۵	۲/۱۴	۲/۷۹
۳۶	۳/۳۵	۲/۳۶	۳/۲۰
۴۲	۳/۵۱	۲/۷۳	۳/۵۲
۴۸	۳/۷۳	۳/۳۶	۳/۶۵
۵۴	۳/۷۵	۳/۳۷	۳/۶۵

تغییرات جذب نوری در مقیاس فرمانتور در تیمارهای مختلف در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان میدهد که میزان دانسیته سلولی در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱/۶۲ نانومتر بوده است که پس از ۲۱ ساعت به ۴/۴ نانومتر (کاندید اوتیلیس)، ۴/۲۱ (ساکارومیسس سرویزیه) و ۴/۱۷ (رودوترولا گلوتینوس) افزایش یافته است(p <۰/۰۵).

جدول ۵ - تغییرات OD در محیط حاوی امعاء و احشاء هموژن و کاندیدا اوتیلیس، ساکارومیسس سرویزیه و رودوترولا گلوتینوس، دمای ۳۲ درجه سانتیگراد، pH = ۵/۴ و rpm = ۶۰۰ ، مقیاس فرمانتور

تیمار / زمان (ساعت)	کاندیدا اوتیلیس	ساکارومیسس سرویزیه	رودوترولا گلوتینوس
۰	۱/۱۶	۱/۱۶	۱/۱۶
۳	۱/۲۹	۱/۲۸	۱/۲۵
۶	۲/۴۵	۲/۳۲	۲/۱۳
۹	۲/۹۶	۲/۷۰	۲/۶۷
۱۲	۳/۴۶	۳/۲۵	۳/۰۴
۱۵	۳/۸۳	۳/۶۲	۳/۵۳
۱۸	۴/۳۸	۴/۲۱	۴/۱۸
۲۱	۴/۴۰	۴/۲۱	۴/۱۷

بحث ونتیجه 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 (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲و۲۵). در هر یک از مطالعات انجام شده، از میکروب یا میکروبهای

مختلف استفاده شده و شرایط مهیا نمودن محیط رشد میکروارگانیسم های مورد استفاده نیز متفاوت بوده است.

سیستم مورد استفاده در این تحقیق از نوع هوازی ممتد و فرمانتور مورد استفاده نیز CSTR بوده است. Ahmad و همکارانش در سال ۱۹۹۵ روند رشد مخمرها را در فرمانتور بسته مورد آزمایش قرار داده کرده و تاثیر فاکتورهای مختلف را بر روند تخمیر مورد ارزیابی قرار دادند. آنها در تحقیقات خود، روند رشد مخمرها را با استفاده از سه روش موناد (Monod)، لونپاید (Levenpid) و تیسیر (Teissier) مورد تجزیه و تحلیل قرار داده و نتایج نشان داد که تولید پروتئین میکروبی بسته به نوع مخمر مورد استفاده متفاوت بوده است. نتایج این تحقیق موضوع فوق را تایید میکند(۴). Ferrer و همکارانش در سال ۱۹۹۶ از دو روش بسته وکشت مداوم به منظور تولید پروتئین تک یاخته از پوسته میگو استفاده نمودند. میکروارگانیسم مورد استفاده در تحقیقات آنها ساکارومیسس سرویزیه بوده و نتایج نشان داد که میزان رشد اختصاصی و ضریب تولید محصول به ترتیب ۰/۳۸۹ در ساعت و ۰/۴۴۷ کیلو گرم وزن خشک سلول بوده است(۱۱). میکروارگانیسمهای مورد استفاده در این تحقیق از گروه مخمرها بوده که در بین آنها کاندیدا اوتیلیس نسبت به سایر مخمرهای مورد استفاده از توانایی و پتانسیل بالاتری برخوردار بوده و در مرحله بعد ساکارومیسس سرویزیه و رودوترولا گلوتینوس قرار داشته است. Ashy و همکارانش در سال ۱۹۸۲ پتانسیل تولید پروتئین تک یاخته را در ۶۷ جنس از مخمر مورد بررسی قرار داده و نتایج نشان داد که دو مخمر کاندیدا تروپیکالیس (*Candida tropicalis*) و یارودویا لیپولیتیکا (*Yaroduwia lipolitica*) بیشترین جنس غالبی بودند که قادر به تولید پروتئین تک یاخته از منابع مختلف می باشند. در این تحقیق میزان رشد کاندیدا نسبت به تیمارهای مورد استفاده بیشتر بوده است(۶).

نتایج این تحقیق نشان میدهد که میزان تولید پروتئین خام تولید شده در شرایط آزمایشگاهی برای تیمارهای سه گانه، متفاوت بوده و بین ۳۲ تا ۳۸ گرم و در مقیاس فرمانتور بین ۳۷/۵ تا ۴۵ گرم در لیتر متغیر بوده و نتایج حاصله نیز معنی دار بوده است($p < ۰/۰۵$). همانطوریکه نتایج نشان میدهد 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. بهنگام 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 می باشند استفاده شده و از اختلال در واکنش جلوگیری می گردد. در شرایط فرمانتور میزان هوای ورودی و اکسیژن محلول در واکنش کنترل شده در حالیکه فاکتورهای مذکور در شرایط آزمایشگاهی و بهنگام انجام فرآیند در ارلن آزمایشگاهی، قابل کنترل نمی بااشد (۴) نتایج مطالعات Schulz و همکارانش نشان داده که میزان پروتئین خام در SCP تولید شده از مخمرها بین ۶۸-۳۹٪ بوده در صورتیکه این میزان در SCP باکتریایی در حدود ۸۲٪ می باشد. میزان اسیدهای آمینه ضروری پروتئین مخمر بین ۸/۴- ۶/۶ در صد گرم پروتئین بوده است. ولی با این وجود، میزان چربی کل در پروتئین با منشاء میکروبهای مختلف، متغیر بوده است(۲۴). نتایج تحقیق حاضر نتایج فوق را تایید میکند. نتایج مطالعات Samuels و همکارانش در سال ۱۹۹۲ نشان داد که بهنگام استفاده از میکروبها، میانگین پروتئین خام در ضایعات ماهی و خرچنگ به ترتیب ٪۶۰/۴ و ٪۴۴/۱ بوده است (۲۳). Ferrer و همکارانش از پوسته میگو در جهت تولید پروتئین میکروبی استفاده نمود و از مخمرهای دریایی به منظور دستیابی به این هدف بهره گرفته است. نتایج نشان

داد که میزان رشد اختصاصی و ضریب تولید محصول به ترتیب ۰/۳۸۹ در ساعت و ۰/۴۴۷ کیلوگرم وزن خشک سلول بوده است (۱۱).

دما و pH از فاکتورهایی هستند که بر رشد و تکثیر میکروارگانیسم های مختلف تأثیر بسزائی دارند. میکروبهای مختلف دارای ماکزیمم، مینیمم و اپتیمم رشد بوده وهر یک در دما وpH خاصی، بیشترین رشد را از خود نشان میدهند (۱۷). در این تحقیق از pH = ۵/۴ و دمای ۳۲ درجه برای رشد مخمرها استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان جذب نوری مخمرها و در رأس آنها کاندیدا اوتیلیس بیشترین مقدار را در دمای ۳۲ درجه و pH = ۵/۴ داشته است. مطالعات Ahmad و همکارانش نشان داد که با ادامه یافتن فرآیند تخمیر و متعاقب آن رشد میکروارگانیسم، دما افزایش یافته که خود از موانع رشد محسوب میگردد (۴). 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 (۴). میزان دور همزن در این تحقیق ۶۰۰ بوده و نتایج نشان داد که مخمرها در این دور، رشد خوبی از خود نشان داده و زمان انجام فرآیند را در مقایسه با مقیاس آزمایشگاهی کاهش دادند. محققین میزان دور همزن در سیستم های مختلف تخمیر را بین rpm ۶۰۰-۵۰۰ گزارش کردند (۱۵). 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 فرآیند ۵۴ ساعت بوده که در این زمان میکروب از نظر تغییرات جذب نوری تقریباً ثابت بوده است. به هنگام انجام فرآیند در سیستم فرمانتور، زمان فرآیند کوتاهتر شده و به ۲۱ ساعت کاهش یافت. با انجام واکنش در فرمانتور، به لحاظ کنترل شدن شرایط، میکروب سریعتر به مصرف سوبسترا پرداخته وتکثیر می نماید. محققین بر این عقیده اند که با وارد نمودن میکروب به یک محیط جدید، به لحاظ متفاوت بودن شرایط محیطی، فاز تاخیری رشد (Lag phase) میکروب طولانی تر شده ولی با گذشت زمان، میکروب با شرایط جدید خود را آداپته نموده و شروع به رشد لگاریتمی می نماید (۱۵). در تحقیق حاضر، میکروبها پس از آداپتاسیون اولیه و افزایش تدریجی سوبستراهای اصلی، با شرایط جدید آداپته شده بودند. Ahmad و همکارانش 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(۴).

نتایج تحقیق Ahmad و همکارانش مشابه این مطالعه میباشد. Gildberg به فاکتورهای دخیل در فرآیند تخمیر در محصولات دریایی مثل ماهی، خرچنگ و سخت پوستان اشاره نموده و فاکتورهایی نظیر انتخاب نوع میکروارگانیسم، دوز مورد استفاده آنها و روش استفاده بصورت منفرد و ترکیبی را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد (۱۴). یکی دیگر از فاکتورهای موثر در فرآیند تخمیر و تولید پروتئین میکروبی میزان تلقیح اولیه و هوای ورودی و میزان اکسیژن مصرفی یا P_{O2} می‌باشد. در این تحقیق میزان تلقیح مخمرها و باکتریها ۵٪ بوده و هوای ورودی در فرمانتور ۰/۱۵vvm (حجم هوا/ حجم مایع در دقیقه) و P_{O2} سوسپانسیون جهت انجام تخمیر بین ۱۰۹-۳۲ متغیر بوده است. در اکثر مطالعات تلقیحی میزان تلقیح میکروبها بین ۱۵-۱٪ در نظر گرفته و هر چه میزان تلقیح بیشتر باشد فاز سکون میکروارگانیسم کمتر خواهد بود (۱۵). میزان هوای ورودی در حقیقت میزان اکسیژن محلول در سوسپانسیون در حال تخمیر را نشان می‌دهد. محققین میزان هوای ورودی به فرمانتوررا بین ۲vvm-۰/۱ در نظر

می‌گیرند (۱۵). میکروارگانیسم هوازی با تکثیر خود و استفاده نمودن از سوبسترا، میزان اکسیژن محصول را کاهش داده و در نتیجه میزان P_{O2} که از طریق دستگاه نشان داده می‌شود کاهش می‌یابد. با افزایش بیشتر رشد میکروارگانیسم، میزان P_{O2} کمتر شده که خود عامل ممانعت کنده رشد میکروب می باشد، زیرا میکروارگانیسم هوازی در حضور اکسیژن قادر به انجام واکنش می باشد. برای رفع چنین مشکلی میزان هوای ورودی در ابتدای واکنش تنظیم شده و بهنگام کاهش P_{O2} بطور اتوماتیک به داخل فرمانتور تزریق می گردد. میزان حداقل P_{O2} که میکروارگانیسم قادر به ادامه رشد میباشد، ۳۲ است. پایین تر از این مقدار باعث کاهش روند رشد بطور چشمگیری شده که با قرائت میزان جذب نوری میکروارگانیسم مشخص می‌گردد(۱۵).

پروتئین میکروبی تولید شده در این تحقیق کاربرد فراوانی داشته و می‌توان از آن بعنوان یک ماده افزودنی و پروبیوتیک در جیره غذایی دام، طیور آبزیان استفاده نمود. اما بایستی به این نکته توجه داشت که ارزیابی سایر فاکتورهای غذایی از جمله وجود اسیدهای نوکلئیک، پروفایل اسیدهای آمینه، میزان املاح معدنی و در نهایت انجام کامل تست فارمی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. امروزه از پروتئین میکروبی بعنوان ماده غذایی جایگزین پودر ماهی در آبزیان استفاده می‌گردد. برتری که پروتئین میکروبی نسبت به پودر ماهی دارد آنست که پروتئین میکروبی اولاً مقرون به صرفه‌تر بوده ثانیاً سرشار از پروتئین بوده ثالثاً بعنوان پروبیوتیک عمل کرده و بواسطه داشتن میکروب یا میکروبهای مفید باعث افزایش مقاومت آبزیان، تقویت سیستم ایمنی، افزایش رشد و بازماندگی، متعادل نمودن دستگاه گوارش و ... می گردد (۱۸، ۲۱ و ۲۶).

منابع

۱- تمدنی، ج.، ۱۳۸۱. تهیه سیلاژ از اندامهای باقیمانده تون ماهیان. گزارش نهایی، شماره فروست ۸۱/۵۱۸

۲- دریانبرد، غ ؛ حسینی، ع و کیمرام، ف.،۱۳۸۳. تعیین اثرات دو شیوه صید سنتی و صنعتی تون ماهیان بر یکدیگر در دریای عمان. گزارش نهایی شماره فروست ۸۲/۹۵۹. موسسه تحقیقات شیلات ایران

۳- سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۹-۱۳۷۹. دفتر طرح و توسعه شیلات ایران، سازمان شیلات ایران.

4- Ahmad, M.N. ;Holland, C.R.,1995. Growth Kinetics of single cell protein in batch fermenter. Journal of Food Engineering, 26, 443-52.

5-Anupama, P. ;Ravindra, D., 2000. Value-added food: Single Cell Protein. Journal of Biotechnology Advances: 18,459-479.

6- Ashy, M.A.; Abou- Zeid, A., 1982. Potentialities of yeasts in production of single cell Proteins (SCP). Journal of Zentralbllaty for Microbiology: 137 (5):387– 94.

7- Bhaskar, N.; Benila, T.; Radha, C. and Lalitha, R. G., 2008.Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, Volume 99, Issue 2, 335–343.

8- Blancou, J. ;Calvet, H.and Riviere, R. 1978. Single cell protein production from Peanut shell. Rev Elev Med Vet Pays Trop: 31(3): 363 -8. 1978; 31(3), 363-8.

9- Bornstein, S. ;Plavnik, I. and Lipstein, B.1982. Evaluation of methanol grown bacteria and hydrocarbon grown yeast as sources of protein for poultry: trials with egg laying birds. British Poultry Science . 23(6):487-99.

10-El Saadany, R. ;Khalaf, H. ;Manawaty, H. and Salom, F.,1988. The Production of single cell protein from agricultural wastes by fungi. Acta – Alimentus. Academic Science Hung: 17(4):376-7.

11- Ferrer, J.; Paez,G.; Marmol, Z.; Ramones, E. ;Garcia, H. and Forster, C.F., 1996 . Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Journal of Bioresource Technology. Volume 57, Issue 1, Pages 55–60.

12- Fujii, T., 1989. Production of single-cell protein from stickwater. Journal of the Tokyo University of Fisheries. V.76, no. 1-2,1-6.

13- Galvez, A.; Ramirez, M.J.and Garcia,G.M., 1990. Chemical composition of a mixture of single cell protein obtainned from Kluyveromyces fragilis and whey proteins. Archive Latinoamericanos the Nutrtion: 40(2), 252 -62.

14-Gildberg, A., 1992. Enzymic processing of marine raw material. Process Biochemistry, 28, 1, 1-15.

15- Griffits, J.B., 1992.Animal cell processes- batch or continuous. Journal Biotechnology. 22, 21-30.

16- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A., 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Volume 40,Issue1:43–81.

17-Kurbanoglu, E.B and Algur,O.F. 2002. Single cell protein production from ram born hydrolysate by bacteria. Journal of Bioresource Technology., 85: 125–129.

18-Mahnken, C.V.w ;Spinelli , J .and Waknitz waknitz, F. .,1980. Evaluation of yeasts as a substitute for fish meal. Feeding trials with Coho salmon and Rainbow trout. Journal of Aquaculture. Volume 20, Issue 1, Pages 41–56.

19- Nilsang, S.; Lertsiri, S.; Suphantharika, M.and Assavanig, A., 2005.Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. 70, 571–578.

20- Ogbonda, K.H. ;Aminigo, R.E.and Abu, G.O .2007. Influence of temperature and PH on biomass production and protein biosynthesis in a putative spirulina SP. Journal of Bioresource Technology. 98, 2207 – 2211.

21- Puniga, AK. ;Singh, S. ;Kumar, C.G. and Singh, K., 1995. Single cell protein. apromising dietary substitute. Indian Journal of Experimental Biology, 33, 8, 545-51.

22- Rhishipal, R. and Philip, R., 1998. Selection of marine yeast for generation of single cell protein from Prawn shell wastes. Bioresource technology:65, 255-6

23- Samuels, W.A.;Fontenot. G.P.; Allen, V.G.and Flick , G.J., 1992. Animal Feed Science and Technobgy. 38, 4, 305-317.

24- Schulz, E. and Oslage, H.J.,1974. Composition and nutritive value of single cell protein. Animal Feed Science and Technology . Volume 1, Issue 1, 9–24.

25- Sivalingam, P.M .,1989, Microbial bioconversion of discarded aquatic proteins into quality proteins. Programe of the First International Marine Biotechnology Conference. IMBC-89, 13.

26- Storebakken, T.; Kvien, I.S.; Shearer, D.D.; Grisdale, H.B.; Helland, S.J. and Berge, G.M., 1998. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to the Atlantic salmon (Salmon salar). Journal of Aquaculture: 169,195-210.

27- Wasswa, J.; Tang, J.; Gu, X. and Yuan, X., 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp. Journal of Food Chemistry, 104, 1698-1704.

Production of single cell protein from viscera of tuna fish using yeasts

Safari R. and Yaghobzadeh Z.

Institute of Caspian Sea Research, Sari, I.R. of Iran

Abstract

In this study, production of single cell protein from viscera of some tuna fish was investigated. The used yeasts were consisting of *Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae, Rhodotorula glutinus.* Examination was done two scale laboratory and fermentor (Continuous Stirred Tank Reactor). The used fermentor was Continues Stirred Tank Reactor (CSTR).The results showed that mean of crude protein (g/l) was 32-38.5 and 37.5- 45 for lab and fermentor scales respectively. Time of fermentation in lab and fermentor scales was 54h and 21h respectively. Growth of *Candida utilis* and value of crude protein were more than other used yeasts. Mean of protein, lipid, wet and ash in produced microbial protein were 75.48%, 7.05%, 4.38% and 1.08% respectively. The conclusion of this study showed that with optimizing of growth parameters for yeasts and also suitable fermentor can be produced SCP with high quality and can be used from this products as probiotic in animal feed.

Key words: SCP, bowels and viscera, tuna fish, yeasts