جداسازی بهترین گونه میکروارگانیسم و شرایط تخمیری جهت تولید پروتئین تک یاخته میکروبی از آب پنیر

سید احمد عطایی *، شیدوش دولتشاهی **

چکیده:

آب پنیر (Whey) بعنوان پساب کارخانه های تولید پنیر با آلودگی بسیار زیاد از آلاینده های بسیار خطرناک بشمار می رود. این منبع مهم و غنی از لاکتوز بعنوان سوبسترای مفیدی در تهیه بسیاری از مواد با ارزش بکار می رود. پروتئین تک یاخته میکروبی SCP(Single Cell Protein) یکی از این مواد است که دارای ارزش غذایی بالا جهت دام و طیور و قابل رقابت با سایر پروتئین هاست بهمین منظور این مطالعه با هدف جداسازی میکروارگانیسم جهت تولید پروتئین تک یاخته میکروبی از آب پنیر انجام گرفت.

در این مطالعه، سوش میکروبی از بین انواع و اقسام میکروارگانیسم های موجود در محیط آب پنیر انتخاب گردید. معیار انتخاب، حجم توده سلولی تولید شده، میزان کاهش لاکتوز موجود در آب پنیر و سرعت تکثیر میکروارگانیسم و همچنین میزان کاهش شاخص آلودگی COD (Chemical Oxygen Demand) بوده است. میکروارگانیسم های انتخاب شده پس از جداسازی، به محیط پایه تخمیری آب پنیر استریل شده تلقیح شدندو شرایط تخمیری از لحاظ دما، pH و دور همزن بهینه گردیدند. شرایط بهینه عمل تخمیر برای مخمر انتخاب شده بنام Candida utillis در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد، pH = ۸/۳ با میزان هوادهی ۲ VVm و دور همزن ۸۰۰ rpm به مدت ۲۵ ساعت انجام گرفت. توده سلولی پس از پایان عمل تخمیر، سانتریفیوژ شده و از محیط تخمیر جدا گردید.

با این عمل حدود ۷۵ درصد COD آب پنیر کاهش یافت و میزان بیومس (توده سلولی) تولید شده به حدود ۸/۸ گرم بر لیتر رسید در حالیکه این مقدار برای Lactobacillus fermentans حدود ۷/۵ گرم بر لیتر بود.

بیومس تولید شده محتوی اسیدآمینه های ضروری می باشد و از آن می توان بعنوان مکمل غذائی دام و طیور استفاده کرد.

کلید واژه ها : آب پنیر / پروتئین تک یاخته میکروبی / توده سلولی

مقدمه :

توسعه روز افزون کارگاههای پنیرسازی با توجه به رشد جمعیت و تامین پروتئین مورد نیاز بشر، سبب شده است که مقادیر قابل توجهی آب پنیر بعنوان فاضلاب این کارگاهها به سیستم فاضلاب وارد شده و مشکلات زیادی برای محیط زیست بهمراه آورد. ارائه روشهایی جهت تصفیه فاضلاب این صنایع، خصوصاً اینکه در راستای تولید محصولات باارزش باشد هم از لحاظ اقتصادی و هم به لحاظ مسایل زیست محیطی حائز اهمیت است(۱). با استفاده از روشهای بیوتکنولوژی و با تبدیل آب پنیر به بیوگاز، اتانول، پروتئین تک یاخته میکروبی و محصولات دیگر می توان BOD آب پنیر را تا حدود ۷۵٪ کاهش داد (۲).

* عضو هیأت علمی گروه مهندسی شیمی دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان

** عضو هیأت علمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کرمان

کاهش COD آب پنیربه ۹۸٪ مقدار اولیه، توسط روشهای خاص بااضافه کردن سایر افزودنیها به محیط کشت جهت تولید فرآورده های بیوتکنولوژی نیز گزارش شده است(۳). دربین این محصولات پروتئین تک یاخته میکروبی باارزش غذایی بالا و داشتن اسیدهای آمینه ضروری بعنوان مکمل غذای دام و طیور مورد استفاده قرار می گیرد (۴).

در ایران تنها روشی که برای تصفیه پساب کارخانه های تولید پنیر ارائه شده است، تبدیل آب پنیر (whey) به پودر پنیر (Whey Powder) است که در کارخانه شیر پاستوریزه تهران مورد بهره برداری قرار گرفته است و به گفته مسئولین این واحد، هزینه سرسام آوری به خود اختصاص داده است. تولید اسید لاکتیک ال (+) که بعنوان مونومر در تولید پلمیرهای زیست تخریب پذیر بکار می رود نیز از جمله روشهای مناسب جهت تصفیه پساب این کارخانجات محسوب می شود (۵).

در سایر کشورها با بهره گیری از سایر موجودات زنده نظیر قارچها مخصوصاً قارچهای رشته ای و ترکیبات نشاسته ای بعنوان سوبسترا از توده میکروبی رشد داده شده در آب پنیر، پس از خشک کردن به عنوان مکمل غذای دام مورد استفاده قرارمی گیرد. اما بدلیل اینکه در این روشها از موجودات تک سلولی نظیر باکتری استفاده نمی شود بجای واژه (SCP) از واژهMBP (Microbial Biomass Protein) استفاده می شود(۶).

در حال حاضر با بهره گیری از علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک با دستکاری ژنتیکی روی ژنوم میکروارگانیسم ها سعی بر این است که میکروارگانیسمی را معرفی کنند که قادر به تولید پروتئینی باشد که ضمن داشتن بیشترین اسیدهای آمینه ضروری، بتوان از آن بعنوان پروتئین مورد نیاز بشر نیز استفاده کرد (۷).

این مطالعه با هدف جداسازی بهترین گونه میکروارگانیسم و شرایط تخمیری جهت تولید پروتئین تک یاخته میکروبی از آب پنیر انجام گرفت.

مواد و روش کار:

الف) جداسازی میکروارگانیسمها : آب پنیر مورد استفاده از کارخانه شیر پاستوریزه کرمان تهیه شد. چند محیط کشت عمومی جامد جهت رشد باکتریها و مخمرها تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. محیط های کشت مورد استفاده انتهایی عبارتند از: Yeast melt Agar – Nutrient Agar و دو محیط کشت با نامهای(MRS, CYM sharpe) (۸).

چند قطره آب پنیر تازه تهیه شده را به محیط های سنتزی جامد بر روی پلیت ها افزوده و در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت دو روز انکوبه شد. سپس در چند نوبت پاساژهایی بر روی پلیت های جدید انجام شد و با این عمل کلنی ها از نظر شکل ظاهری رشد، از یکدیگر جدا سازی و روی محیط کشت لوله ای بصورت اسلنت (Slant) درون یخچال نگهداری شدند و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

ب) محیط پایه تخمیر: محیط پایه تخمیری، آب پنیر تهیه شده از کارخانه شیر پاستوریزه کرمان بود. مقدار لاکتوز اولیه موجود در آن حدود ۴۴ گرم در لیتر بود که بعنوان سوبسترای اصلی مورداستفاده میکروارگانیسمهای جداسازی شده قرار می گیرد. این محیط بعلت داشتن ویتامین ها و مواد معدنی موجود در شیر اولیه، از جمله محیط های غنی برای رشد میکروارگانیسم ها بشمار می رود (۹).

در هر نمونه آزمایش ۱/۵ لیتر آب پنیر را پس از پروتئین گیری در pH=۴/۵ درون فرمنتور (تخمیر کننده)

۲ لیتری مجهز به همزن مغناطیسی ریخته و مقدار 10^{-4} مول بر لیتر منبع ازت بصورت $(NH_4)_2SO_4$ و 10^{-3} مول منبع فسفات (بصورت K_2HPO_4) به آن افزوده و استریل گردید.

آنگاه با تهیه محیط های کشت آبگوشتی(Broth) از هر کدام از میکروارگانیسم های جدا سازی شده در مرحله قبل، حدود ۱۰ درصد از سوسپانسیون فوق را بصورت جداگانه در هر نمونه تلقیح کرده و در دماهای ۲۵، ۲۸، ۳۱، ۳۵ درجه سانتیگراد با دورهمزمان از ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ دور در دقیقه انکوبه کرده و پس از نمونه برداری بعد از حدود یک روز مقدار توده سلولی خشک شده و میزان COD و لاکتوز موجود در هر ظرف نمونه اندازه گیری و با یکدیگر مقایسه شدند که در نهایت یک گونه از دسته مخمرها با بیشترین میزان تولید با نام Candida utillis و یک گونه باکتریائی که در بین سایر گونه ها رشد بیشتری داشت، با نام Lactobacillus fermentans با یکدیگر مقایسه شدند.

توده سلولی تولید شده در حقیقت پیکر میکروارگانیسمهای مورد نظر بود که حاوی اسیدهای آمینه می باشد.

روشهای اندازه گیری : میزان لاکتوز موجود در آب پنیر و محیط تخمیری توسط روش استاندارد سوموگی نلسون با اندازه گیری جذب محلول رنگی در طول موج ۵۴۰نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر محاسبه شد (۱۰).

میزان جرم توده سلولی (بیومس) پس از سانتریفیوژ کردن محلول تخمیری و خشک کردن در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در آون و توزین آن توسط ترازوی آنالیتیکال (تجزیه ای) اندازه گیری شد.

مقدار کل پروتئین نیز توسط روش کجلدال (Kjeldahl) اندازه گیری شد. (۱۰). ضمن اینکه مقدار اسیدهای آمینه موجود در پروتئین ها نیز توسط دستگاه HPLC اندازه گیری شد (۱۱).

پس از تلقیح محیط های تخمیری با میکروارگانیسمهای جداسازی شده و انکوبه کردن آنها تحت شرایط متفاوت از لحاظ دور همزمان، درجه حرارت و pH، شرایط بهینه بصورت زیر تعریف شد: (pH=۸/۳ ، درجه حرارت ۳۱ درجه سانتیگراد و دور همزمان ۸۰۰ rpm).

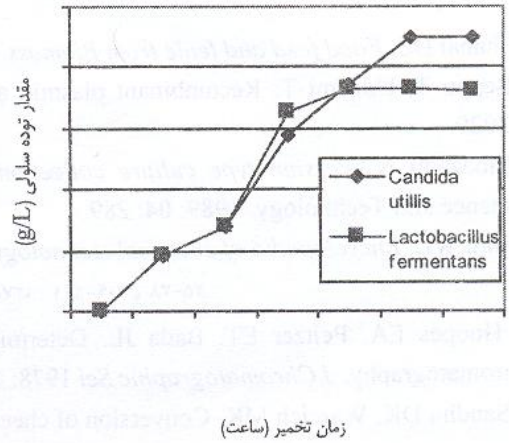
نتایج:

از بین نمونه های تلقیح شده، گونه ای که بیشترین توده سلولی را تولید کرد بعنوان بهترین گونه میکروارگانیسم انتخاب شد. نام این مخمر (Candida utillis) بود که از دسته هوازیهاست و در آزمایش جداگانه با میزان هوادهی متفاوت تاثیر هوادهی بر رشد آن بررسی شد که مناسبترین میزان هوادهی حدود 2VVm (۲ لیتر هوا به ازاء هر لیتر محیط کشت در دقیقه) بدست آمد.

تولید میکروارگانیسم فوق پس از گذشت ۲۵ ساعت تخمیر و سانتریفیوژ کردن و خشک کردن به حدود ۸/۸ گرم بر لیتر رسید که در بین گونه های تلقیح شده بیشترین مقدار رشد را داشت.

از بین گونه های باکتریایی نیز پس از رنگ آمیزی و مشاهده زیر میکروسکوپ، لاکتو با سیلوس فرمانتانس (Lactobacillus fermentans) بهترین رشد را داشت و حداکثر میزان تولید آن تنها ۷/۵ گرم بر لیتر بود.

منحنی تغییرات مقدار پروتئین تولید شده در طول زمان تخمیر برای دو گونه انتخاب شده در نمودار ۱ رسم شده است.



نمودار ۱: منحنی رشد دو گونه انتخاب شده در طول زمان تخمیر

بحث :

با توجه به اینکه حداکثر میزان توده سلولی تولید شده برای نمونه باکتریایی تنها ۷/۵ گرم بر لیتر بود، برای نمونه مخمر حدود ۸/۸ گرم بر لیتر رسید بنابراین بهترین گونه میکروارگانیسم از لحاظ میزان رشد Candida utillis معرفی می شود ضمن اینکه نتایج حاصل از HPLC نیز تنوع اسیدهای آمینه نمونه معرفی شده را نسبت به سایر پروتئین های تولید شده نشان داده است.

در پژوهش های مشابهی تولید پروتئین تک یاخته میکروبی از سوبستراهای مشابهی مثل ملاس، چغندرقند و نیشکر نیز آورده شده است. اما بدلیل اینکه آب پنیر به عنوان یکی از آلاینده های خطرناک، قبل از ورود به سیستم فاضلاب باید به نحوی تصفیه شود. لذا استفاده از این پساب بعنوان سوبسترایی جهت تولید این ماده با ارزش غذایی (SCP) علاوه بر اهمیت زیست محیطی از لحاظ اقتصادی نیز بسیار حائز اهمیت است (۱۲). ضمن اینکه در این روش تنوع اسیدهای آمینه ضروری در خورد توجه است.

بالا رفتن سرعت همزن بشدت بر رشد توده سلولی اثر سوء گذاشت و مقدار بیومس تولید شده را کاهش داد که علت آن وارد کردن تنش حاصل از دور همزن بر پیکر میکروارگانیسم ها بود که باعث صدمه زدن بر آنها می گردد. از طرفی با کاهش دورهمزن از مقدار بهینه (۸۰۰ rpm) نیز رشد مخمرها را به تاخیر انداخت که علت، کاهش ضریب انتقال جرم اکسیژن به درون سلول میکروارگانیسم می باشد.

امید است در آینده ای نزدیک با بهره گیری از علم بیوتکنولوژی و دستکاریهای ژنتیکی بتوان میکروارگانیسمی را معرفی کرد که ضمن افزایش میزان توده سلولی، قادر به تولید پروتئین با حداکثر اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز بشر باشد و بدین ترتیب گام موثری در جهت تولید پروتئین مورد نیاز بشر نیز فراهم کرد (۷).

سپاسگزاری

با تشکر از مدیریت محترم کارخانه شیر پاستوریزه کرمان، انستیتو تحقیقات رازی، دانشگاههای تربیت مدرس تهران و شهید باهنر کرمان و سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران که نهایت همکاری را با اینجانب داشته اند.

منابع :

1. Barraquio VL, Silverio LG, Revilleza RP. Whey utilization of single cell protein production.
2. Flores SH, Alegre RM. Nisin production from Lactococcus lactis A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. *Biotechnol Biochem* 2001; **34**: 103-107.

3. Ghaly AE, Kamal MA. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey from protein production and pollution potential reduction. *Water Res* 2004 Feb; **38**(3):631-644.

4. Reed G. Biotechnology, food and feed production with microorganism. *Verlag Chemie*, 1983 : 231.

۵. عطایی سید احمد. تولید و جداسازی اسیدلاکتیک ال(+) از پساب صنایع پنیر سازی ، مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان ،دوره هفتم ، شماره ۴، پائیز ۱۳۷۹: ۲۰۰-۲۰۵.

6. Chahal DS. *Food feed and feule from Biomass*. Oxford : Oxford University . 1991: 107.

7. Beppu T, Uozumi T. Recombinant plasmid and microorganism containing same. *Eur Pattent* 1983 : 73029.

8. Moazami N. *Persian type culture collection (P.T.C.C)*. 3rd ed. Iranian Research Organization for Science and Technology. 1989; **04**: 289.

9. Faith WL. *Encyclopedia of chemical technology*. Interscience pub. 1993 : 576-577.

۱۰. حسینی فریبا. روش های متداول در تجزیه مواد غذایی، شیراز : دانشگاه شیراز، ۱۳۷۸ : ۱۱۱-۱۰۹ و ۲۸-۲۵.

11. Hoopes EA, Peitzer ET, Bada JL. Determination of amino acid eantiomeric ratios by gas liquid chromatography. *J Chromatographic Sci* 1978; **16**: 556-560.

12. Sandhn DK, Warcich MK. Conversion of cheese whey to single cell protein. *Bioeng* 1983; **27**:797-808.