غنی سازی پروتئین سبوس گندم توسط قارچ رشته ای نیوروسپورا سیتوفیلا به روش تخمیر حالت جامد

سیّد عباس شجاع السادات
دانشیار

رضا فریدونی
کارشناسی ارشد

بخش مهندسی شیمی دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

از قارچ رشته ای نیوروسپورا سیتوفیلا برای تبدیل بیولوژیکی سبوس گندم به عنوان یك سوبسترای جامد سلولزی، به مواد غنی شده از پروتئین جهت خوراك دام و طیور در سیستم تخمیر حالت جامد (SSF) استفاده شد. تأثیر پارامترهای مختلف شامل تیمار سوبسترا (فیزیکی، حرارتی و شیمیایی)، مقادیر منابع نیتروژن و فسفر و میزان رطوبت، به منظور رشد بهینه قارچ در دمای ۳۵°C و pH = ۴/۵ - ۵/۵ بررسی شد. براساس نتایج به دست آمده بیشترین درصد افزایش پروتئین در شرایطی حاصل شد که نیازی به تیمار سوبسترا نیست. نتایج آزمایش نشان داد که سبوس گندم از لحاظ محتوای نیتروژن و فسفر برای رشد نیوروسپورا سیتوفیلا مناسب است و بهترین میزان رطوبت ٪ ۶۵ می باشد.

Protein Enrichment of Wheat Bran by Neurospora Sitophila Using Solid State Fermentation

S. A. Shojaosadati
Associate Professor

R. Faraidouni
Graduate Student

Chemical Engineering Department,
Tarbiat Modaress University

Abstract

The Neurospora sitophila filamentous fungus was used for bioconversion of wheat bran as solid cellulosic substrate to enrich its protein content for animal feed consumption by using solid state fermentation. Various parameters such as: substrate pretreatment (physical, heat and chemical treatment), levels of nitrogen and phosphorus content and moisture of substrate were optimised at 35°C and pH-4.5 - 5.5. According to the results the highest percentage of protein enrichment was obtained under the condition in which the substrate was not pretreated. The results also revealed that wheat bran contains enough nitrogen and phosphorus for optimal growth of Neurospora sitophila. The optimum moisture content for growth was obtained as 65% (w/w).

واژه‌های کلیدی

تخمیر حالت جامد؛ نیوروسپورا سیتوفیلا؛ پروتئین میکروبی؛ غنی سازی پروتئین ؛ سبوس گندم.

مقدمه

در حال حاضر بخش پروتئینی خوراک طیور را پودر ماهی و خوراک دام را کنجاله سویا و چند نوع ماده پروتئینی دیگر تشکیل می‌دهند که سالانه مبالغ هنگفتی ارز بابت خرید این مواد هزینه می‌شود. از سبوس گندم به عنوان مکمل غذایی در خوراک حیوانات استفاده می‌شود. سبوس گندم یک ماده لیگنوسلولزی است که از فرآیند آسیاب گندم به دست می‌آید و در حدود ۱۴٪ از وزن کل دانه گندم را تشکیل می‌دهد [۱]. در ایران سالیانه بالغ بر یک میلیون تن سبوس گندم تولید می‌شود [۲].

اغلب سوبستراهای به کار گرفته شده در فرآیندهای تخمیر حالت جامد (SSF) از ضایعات محصولات کشاورزی یا فرآورده‌های جانبی آنها می‌باشند. تمامی این سوبستراها علاوه بر ارزان بودن دارای یک جنبه مشترک دیگری نیز هستند که همان ساختمان سلولی آنها است و شامل ماکرومولکولهایی نظیر سلولز، همی سلولز و لیگنن می‌باشند. سلولز منبع مناسبی از کربن و انرژی برای رشد برخی از میکروارگانیسم‌ها، خصوصاً قارچ‌های رشته‌ای است. بنابراین سبوس گندم سوبسترای مناسبی برای فرآیند SSF می‌باشد [۳].

تعدادی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها قادر به رشد بر روی اینگونه سوبستراها در تخمیر حالت جامد هستند. باکتری‌های ترموفیل در فرایند کمپوست لیگنوسلولزها، لاکتوباسیل‌ها در فرآیندهای انبار سازی غلات (که بر روی غلات رشد کرده و اسید لاکتیک تولید می‌کنند و pH را کاهش می‌دهند) و رشد گونه‌های باسیلوس روی سبوس گندم برای تولید آلفا آمیلاز نمونه‌هایی از رشد باکتری‌ها در فرآیند SSF هستند.

تعداد اندکی از مخمرها در فرآیندهای SSF شرکت می‌کنند و مثال روشن در این زمینه فرآیند تهیه اتانول به وسیله کشت ساکارومایسس ـ سرویزیا روی چغندر قند، ذرت شیرین و ... می‌باشد [۴]. اما قارچ‌های رشته‌ای مهمترین گروه میکروارگانیسم ها در فرآیند SSF هستند و گونه‌های مختلف آنها را روی سوبستراهای لیگنوسلولزی مختلف به منظور تولید محصولات متنوعی از خوراک دام و انسان گرفته تا متابولیت‌های ثانویه و ... کشت داده می‌شوند [۵].

قارچ نیوروسپورا سیتوفیلا یک قارچ رشته‌ای است که در خاور دور کاملاً شناخته شده است و به عنوان بخشی از اُنکام[1] و اُنتجام[2] (غذای محلی اندونزی) می‌باشد که توسط فرآیند تخمیر حالت جامد روی تفاله بادام زمینی و ضایعات نشاسته کاساوا رشد داده می‌شود و به دلیل غیر بیماری‌زا بودن، گونه مناسبی برای تحقیقات بیوتکنولوژیکی می‌باشد. قارچ مذکور مشخصه‌های رشد مناسبی روی محیط‌های لیگنوسلولزی غیر محلول دارد و در تولید بیومس میکروبی نتایج بهتری نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های شناخته شده دارد [۶].

در اینجا به بررسی تبدیل بیولوژیکی سبوس گندم به یک محصول غنی شده از پروتئین با قارچ نیوروسپورا سیتوفیلا به عنوان بخش اصلی خوراک دام و طیور، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

قارچ نیوروسپورا سیتوفیلا (ATCC 36935) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. میکروب روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) در دمای ۳۵°C تهیه و در دمای ۴ °C (در یخچال) نگهداری شد [۷].

ترکیبات سبوس	سلولز	همی سلولز	لیگنین	کربو هیدرات *	خاکستر	آب	چربی	پروتئین خام (N × ۵/۷)
(٪)	۲۶	۱۱	۱۸	۱۲	۵	۱۱	۴	۱۳

* کربو هیدرات شامل نشاسته و قندها است.

سوبسترا

سبوس گندم از یکی از مراکز تولید (سیلوی تهران) تهیه و به عنوان سوبسترای سلولزی از آن استفاده شد. درصد مواد تشکیل دهنده سبوس تقریباً به صورت زیر است [۱، ۳]:

محیط کشت تهیه تلقیح

میزان ترکیبات موجود در یک لیتر محیط کشت به قرار زیر بود:

۱۰ گرم گلوکز؛ ۲ گرم عصاره مخمر؛ ۰/۴۷ گرم سولفات آمونیوم؛ ۰/۸۶ گرم اوره ; ۰/۷۱۴ گرم KH_2PO_4؛ ۰/۲ گرم $MgSO_4 . 7H_2O$ ، ۰/۲ گرم $CaCl_2$; ۳/۲ میلی گرم $FeCl_3$; ۴/۴ میلی گرم $ZnSO_4 . 7H_2O$ ، ۰/۱۱۴ میلی گرم H_3BO_3؛ ۰/۴۸ میلی گرم $(NH_4)6$ $Mo_7 O_{24}.4H_2O$; ۰/۷۸ میلی گرم $CuSO_4.5H_2O$ و ۰/۱۴۴ میلی گرم $MnCl_2 . 4H_2O$ [۷].

شرایط تخمیر

تخمیر حالت جامد در مقیاس آزمایشگاهی در ارلن مایرهای ۲۵۰ ml انجام گرفت. در هر ظرف ۵ گرم سوبسترا ریخته و به مقدار لازم آب مقطر به آن افزوده شد. ظرف ها در دمای ۱۲۱°C و در فشار ۱۵۷psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل شده و پس از افزودن ۲ml کشت بذر، در دمای ۳۵°C گرماگذاری شد.

پیش تیمارها

سوبسترا تحت چند تیمار متداول فیزیکی، شیمیایی و حرارتی به ترتیب زیر قرار گرفت:

(۱) محلول ۱ مولار NaOH در یک سوسپانسیون (w/v) ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق،

(۲) محلول ۵ مولار NaOH در یک سوسپانسیون (w/v) ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق،

(۳) اتوکلاو کردن سوسپانسیون (w/v) ۵٪ در آب مقطر و در فشار ۲۰ psi به مدت ۱ ساعت،

(۴) آسیاب کردن سبوس تا رسیدن به اندازه های زیر ۰/۵ mm و سپس تشکیل سوسپانسیون (w/v) ۵٪ آن با آب مقطر.

پس از هر تیمار، سوبسترا چندین بار با آب مقطر تا رسیدن به pH مناسب (۵/۵ - ۴) شستشو داده شد و در دمای ۷۰°C به مدت یک شبانه روز خشک و دوباره آسیاب شد تا اندازه اولیه خود را به دست آورد [۸]. سوبسترای تیمار شده به صورت فوق الذکر تخمیر شد.

اندازه گیری پروتئین خام و سلولز

محتویات ظرف را پس از تخمیر، تحت خلاء و از میان فیلتر نایلونی با مش ۲۵۷μm فیلتر کرده و کیک باقیمانده بر روی فیلتر چندین بار توسط آب بدون یون شسته شده و طی یک شبانه روز در دمای ۹۰°C خشک شد. بیومس خشک را به وسیله سائیدن به ذرات زیر ۱ میلی متر تبدیل کرده و بخشی از آن جهت اندازه گیری ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۷]. پروتئین خام به روش میکروکلدال [۹] محاسبه و به صورت درصد وزنی پروتئین خام در کل جامد خشک گزارش شد. سلولز هم به روش اسپکتوفتومتری با بکارگیری اسید سولفوریک - آنترون [۱۰] تعیین و بر همان مبنای پروتئین گزارش شد.

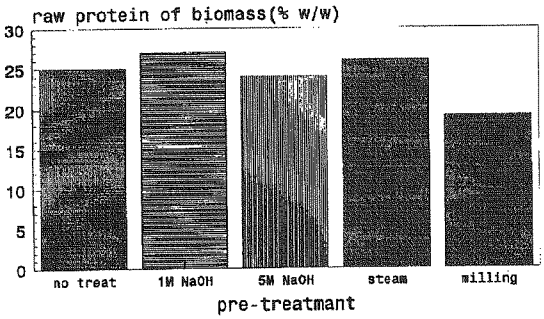
در تمام آزمایش ها ، دما روی ۳۵°C و pH حدود ۵/۵ تنظیم شد (این پارامترها توسط سایرین بهینه شده بود [۶ ، ۷]).

منابع نیتروژن و فسفر

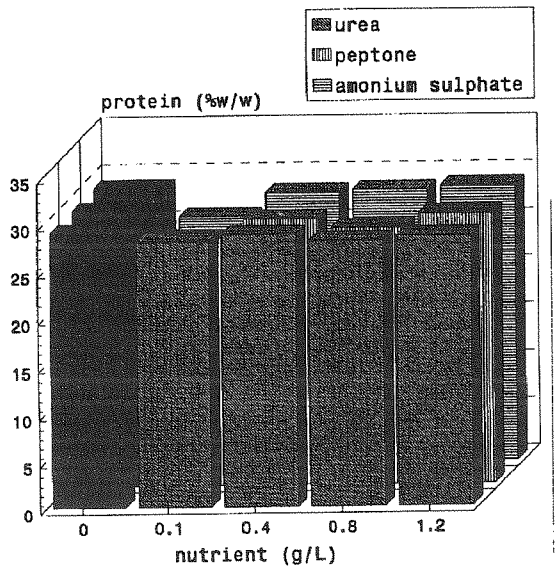
از اوره، پپتن و سولفات آمونیوم به عنوان منابع نیتروژن و از فسفات هیدروژن پتاسیم به عنوان منبع فسفر استفاده شد و در هر مورد، غلظت های مختلف از محلول آنها تهیه و قبل از استریل کردن محیط کشت، به آنها افزوده شد.

نتایج و بحث

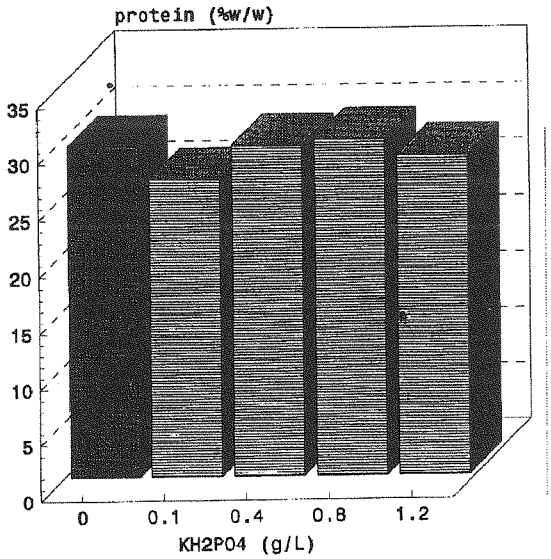
شکل های ۱، ۲ و ۳ نتایج تأثیر پیش تیمارهای مختلف و افزودن منابع نیتروژن و فسفر را بر بهبود رشد قارچ نشان می دهند. مشخص شد که حالت طبیعی سوبسترا برای تبدیل بیولوژیکی مناسب می باشد و نیازی به هیچگونه تیمار روی آن نیست (این نتیجه از لحاظ اقتصادی نیز حائز اهمیت است). از طرفی نیاز به افزودن منبع غذایی اضافی به محیط کشت نیست، چون مشخص شد که سبوس گندم به تنهایی می تواند نقش منابع کربن، نیتروژن و فسفر را برای قارچ ایفا کند.



شکل (۱) اثر تیمار سوبسترا تحت شرایط مختلف بر میزان پروتئین پس از تخمیر حالت جامد: دما ۳۵°C، رطوبت ٪۶۵.



شکل (۲) اثر منابع مختلف نیتروژن بر میزان پروتئین پس از تخمیر حالت جامد، دما ۳۵°C، رطوبت ٪ ۶۵.



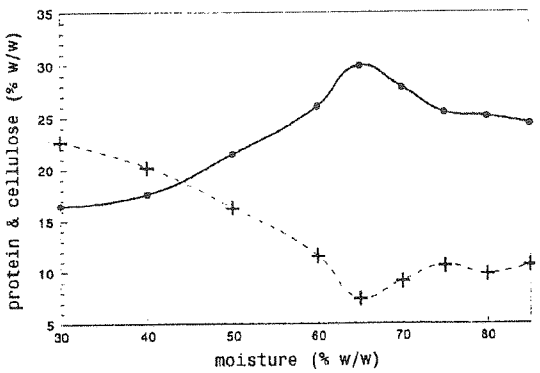
شکل (۳) اثر منبع فسفر بر میزان پروتئین پس از تخمیر حالت جامد، دما ۳۵°C، رطوبت ٪۶۵.

در شکل ۴ نتایج مربوط به بهینه سازی رطوبت نشان داده شده است. مشخص شد که بهترین مقدار رطوبت (منظور از رطوبت مجموع آب افزوده شده به سوبسترا، رطوبت اولیه سوبسترا و تلقیح اضافه شده به آن بوده است) برای به دست آوردن بالاترین رشد، ٪۶۵ بود.

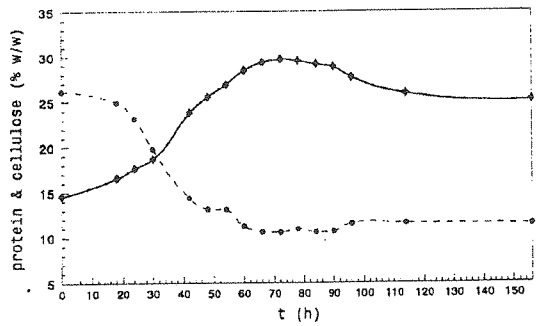
در نهایت تحت شرایط بهینه شده، پروتئین بیومس به دست آمده به ۲۹/۵٪ افزایش یافته و سلولز آن به حدود ۱۰٪ کاهش یافت (شکل ۵).

منحنی رشد قارچ در فرآیند SSF

بعد از مشخص شدن شرایط بهینه رشد، ۱۵ فلاسک حاوی سوبسترا تهیه شد. در یک زمان و تحت شرایط کاملاً یکسان قارچ به آنها تلقیح شد. در فواصل زمانی معین ظرف ها به نوبت برداشته شدند و مورد آزمایش های پروتئین خام و سلولز قرار گرفتند و از روی نتایج آنها شکل ۵ رسم شد. این منحنی نحوه رشد نیوروسپورا سیتوفیلا را در فرآیند SSF بر روی سبوس گندم، تحت رطوبت ٪۶۵ نشان می دهد.



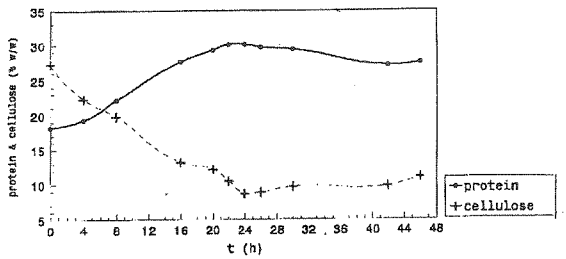
شکل (۴) اثر رطوبت بر میزان غنی سازی پروتئین و کاهش سلولز.



شکل (۵) منحنی رشد قارچ ن. سیتوفیلا روی سبوس گندم و کاهش سلولز در شرایط بهینه.

مقایسه نتایج تخمیر حالت جامد (SSF) و تخمیر حالت غوطه‌ور (SF)

نتایج فوق با نتایج به دست آمده از تخمیر سبوس گندم در یک حالت سوسپانسیونی (w/w)٪۲ در آب (سبوس گندم و به طور کلی لیگنو سلولزها در آب نامحلول هستند و تشکیل سوسپانسیون می‌دهند) توسط نیوروسپورا سیتوفیلا در شرایط بهینه شده [۳] مقایسه شد. شکل (۶) منحنی رشد قارچ را در این شرایط نشان می‌دهد.



شکل (۶) منحنی رشد قارچ نیوروسپورا سیتوفیلا روی سبوس گندم و کاهش سلولز سوبسترا در تخمیر حالت غوطه‌ور در شرایط بهینه (دما ۳۵°C، دور همزن ۲۰۰rpm، شدت هوادهی V.V.m).

پارامترها	SSF (٪۳۵ w/v)	SF (٪۲ w/v)
زمان تخمیر (h) (زمان رسیدن به بشترین مقدار پروتئین)	۶۶	۲۲
پروتئین خام محصول (٪ وزن خشک)	۲۹/۹۵	۳۱/۵
سلولز باقیمانده (٪ وزن خشک)	۱۰/۵	۸/۵
افت وزن در طول تخمیر (٪ وزن خشک اولیه)	۲۴	۴۰
میزان تلقیح کشت بذر (میلی لیتر بر گرم سوبسترای خشک)	۰/۴	۲/۵

در جدول بالا مقایسه‌ای بین تخمیر سبوس گندم در سیستم‌های تخمیر حالت جامد و تخمیر حالت غوطه‌ور آمده است.

زمان تخمیر نیورو سپورا سیتوفیلا در SSF حدوداً ۳ برابر SF می‌باشد ودر مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها که معمولاً زمان تخمیری ۴ تا ۵ برابر دارند، قابل توجه است و بیانگر رشد سریع قارچ روی لیگنو سلولزها مخصوصاً سبوس گندم می‌باشد.

- میزان پروتئین نهایی در هر دو سیستم تقریباً یکسان ودر حدود ۳۰٪ وزن خشک اولیه است.
- افت وزنی محصول نهایی نسبت به سوبسترای خشک اولیه در SSF بسیار کمتر از SF (نزدیک به ۵۰٪) و در نتیجه بازده محصول در تخمیر حالت جامد بیشتر است. در تفسیر این موضوع می‌توان گفت که تخمیر حالت غوطه‌ور، متابولیسم شدیدتری دارد، بنابراین گاز دی اکسید کربن و بخار آب بیشتری تولید و از سیستم خارج می‌شود، لذا وزن نهایی کمتر خواهد شد. از طرف دیگر در مرحله فیلتراسیون محصول، در سیستم SF تمامی املاح و ترکیبات محلول باقی مانده در بیومس فیلتر شده و خارج می‌شوند و همین امر به میزان قابل توجهی از وزن آن می‌کاهد. در صورتی که این مسئله در سیستم SSF با شدت کمتری اتفاق افتاد.
- مرحله تهیه کشت بذر تأثیری مستقیم بر زمان تخمیر و اقتصاد طرح دارد. همانطور که مشخص است. میزان تلقیح مصرفی در سیستم SSF به مراتب کمتر از سیستم SF است (در SF به طور معمول به مقدار کشت بذری معادل ۱۰٪ حجم کاری راکتور نیاز است).

باتوجه به موارد فوق سیستم SSF در شرایط آزمایشگاهی یکسان بر سیستم SF ارجحیت دارد، لیکن بکارگیری آن در مقیاس صنعتی تحقیقات بیشتری را طلب می‌کند.

زیرنویس‌ها

1. Oncom
2. Otijom

مراجع

[۱] کریمی، هادی، «گندم»، مرکز نشر دانشگاهی، چاپ اول، (۱۳۷۱) صص ۴۴۹-۵۱۲.

[۲] آمار وزارت کشاورزی (۱۳۷۵).

[۳] فریدونی، رضا، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، زمستان ۷۶.

[4] Hesseltine, C. W., Solid State Fermentation (Biotechnology report), Biotechnol. Bioeng. (1972). Vol. 14, pp. 517-532.

[5] Doelle, H. W., et al. (1992). Solid Substrate Cultivation, Elsevier Applied Science.

[6] Moo-Young, M., et al. (1990), Process for upgrading cereal milling by products into protein - rich food products, US patent 4, 938, 972.

[7] Moo-Young, M., et al. (1992). Fermentation Conversion of cellulosic substrates to microbial protein by Neurospora sitophila, Biotechnol. lett. Vol. 14, No. 9, pp. 863-868.

[8] Gupta, A. and Madamwar, D. (1997), Solid State Fermentation of Lignocellulosic Waste for Cellulase and β-Glucosidase production, Biotechnol. Prog. Vol. 13, pp. 166-169.

[9] Lang, C. A. (1958). Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological material, Anal. Chem., Vol. 30, pp. 1692-1694.

[10] Updegraff, D. M., (1989). Analytical Biochem. Vol. 32, pp. 420-424.