بررسی اثرشوک حرارتی برروی پروتئین تک یاخته از آب پنیر

سید کریم شفقی اصل
اردبیل – انتهای خیابان دانشگاه، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده فنی و مهندسی – صندوق پستی ۱۷۹

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران
دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

امروزه در جهان کمبود مواد غذایی مسئله بسیار مهمی است و اکثر جوامع به نوعی در پی یافتن راهی برای حل این مشکل هستند. دنیا امروزه با کمبود مواد غذایی، به ویژه مواد پروتئینی مواجه است. به همین دلیل محققان در جستجوی منابع ارزان قیمت پروتئین برای مردم می باشند. طرح تولید پروتئین از منابع غیر معمول نظیر میکروارگانیسم ها تحت عنوان پروتئین تک یاخته[1] از سال ها قبل مورد توجه قرار گرفته است.

البته پروتئین توده زیستی که به عنوان غذای انسان مورد استفاده قرار می گیرد قبل از استفاده باید استخراج و تغلیظ شود و اسیدهای نوکلئیک[2] آن کاهش یابد اسید نوکلئیک باعث تولید اسید اوریک و در نهایت بیماری نقرس[3] می شود. با توجه به اینکه محتوای اسید های نوکلئیک موجود در پروتئین تک یاخته از مقدار مجاز مصرف روزانه ان یعنی ۲ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم پروتئین بیشتر است، محققان روش های گوناگونی را جهت کاهش اسید نوکلئیک پروتئین تک یاخته بکار گرفته اند. در این تحقیق با استفاده از شوک حرارتی مقدار اسید نوکلئیک در مخمر تریکو سپرون[4] از ۶/۲۵ به ۰/۸۸ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم پروتئین کاهش یافت که این مقدار معادل ۸۵/۶ در صد کاهش اسید نوکلئیک در پروتئین تک یاخته از مخمر تریکو سپرون است.

در این تحقیق با استفاده از روش عملیات حرارتی سه پارامتر دما، زمان و پی . اچ که برفعالیت آنزیم ریبو نو-کلئاز مؤ ثر هستند و در میزان هیدرولیز اسید نوکلئیک نقش دارند مورد بررسی و بهینه سازی شدند. مقادیر بهینهٔ دما، زمان و پی . اچ به ترتیب $^{\circ}C$ ۶۵، ۲ دقیقه و ۵/۵ بدست آمد. بر اثر شوک حرارتی در صد افت در پروتئین برابر با ۸/۴۶ و در صد افت وزن برابر با ۲۹/۷ مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: پروتئین تک یاخته، شوک حرارتی، مخمر تریکو سپرون، آب پنیر

1- Single cell protein (SCP)
2- Nucleic acid
3 - Gout
4 – *Tricosporon sp.*

مقدمه

امروزه در جهان کمبود مواد غذایی مسئله بسیار مهمی است که این مسئله به علت افزایش روز افزون جمعیت و محدودیت منابع تولید پروتئین می باشد. در اکثر جوامع، محققان به نوعی در پی یافتن راه حلی برای این مشکل هستند. یکی ازاین منابع، پروتئین تک یاخته است. واژه پروتئین تک یاخته برای بیان تولید ماده غذایی از میکرو ارگانیسم ها ی تک سلولی بکار می رود و بیشتر به محصولات قارچی اطلاق می شود. برای تولید پروتئین تک یاخته باید مراحل مختلفی مانند انتخاب مادۀ اولیۀ مناسب، انتخاب و جداسازی بهترین میکروارگانیسم، بهینه کردن شرایط رشد، طراحی و تهیه بیوراکتور مناسب و بررسی ترکیب محصول نهایی را طی کرد.

طرح تولید پروتئین از میکروارگانیسم ها مورد توجه قرار گرفته است ولی ازآنجائیکه این نوع پروتئین به علت بالا بودن محتوای اسید های نوکلئیک در آن برای انسان قابل مصرف نبوده و باعث بیماری نقرس در اثر تولید اسید اوریک می شود، لذا در این تحقیق سعی شده است که بااستفاده ازروش شوک حرارتی[1] مقدار اسید های نوکلئیک موجود در آن کا هش داده شود، بطوریکه در این فرآیند اولاً به پروتئین موجود از نظر کمی و کیفی کمترین لطمه وارد شود، ثانیاً روش بکار رفته باعث آلودگی این ماده غذایی نشود[۱،۲].

با توجه به اینکه پروتئین تک یاخته از چه نوع میکروارگانیسمی تولید شود مقدار اسید های نوکلئیک در پروتئین حاصله متفاوت بوده و از ۵ تا ۲۵ گرم اسید نوکلئیک در ۱۰۰ گرم پروتئین متغیر است. مقدار اسیدهای نوکلئیک موجود در پروتئین تک یاخته نسبت به سایر مواد غذایی بالا گزارش شده ا ست. بخش اعظم اسید های نوکلئیک در پروتئین تک یاخته بصورت ریبو نوکلئیک اسید (RNA) می باشد. مقدار اسید نوکلئیک در کبد حدود ۴ گرم و در ساردین و خاویار به ترتیب ۲/۲ و۵/۷ گرم به ازای هر ۱۰۰گرم پروتئین است. اسید نوکلئیک مصرف شده به وسیله آنزیم نو کلئاز ترشح شده از پانکراس از حالت پلیمریزه خارج شده و قبل از جذب توسط آنزیم های روده ای به نو کلئوزید ها تبدیل شده و گوا نین[2] و آدنین[3] موجود در آن در اثر متابولیسم به اسید اوریک تبدیل می شود. در انسان آنزیم اوریکاز[4]، اکسید کنندۀ اسید اوریک به متابولیتهای قابل حل و قابل دفع آلا نتونین وجود ندارد. با توجه به اینکه حلالیت اسیداوریک کم است پس از رسوب در بافت ها در نهایت باعث بیماری نقرس می شود.مقدار مجاز و مطمئن مصرف اسید های نوکلئیک برای بزرگسالان در حدود ۲ گرم در روز ا ست. لذا باید مقدار اسید های نوکلئیک موجود در پروتئین تک یاخته را کاهش داد تا بتوان از آن به عنوان یک منبع پروتئین برای انسان استفاده کرد[۳،۴،۵].

1- Heat shock
2- Gaunine
3- Adenine
4 - Uricase
5- Potato dextrose agar (PDA)

مواد و روش ها

میکرواگانیسم ها

میکرو ارگانیسم استفاده شده برای تولید پروتئین تک یاخته در این تحقیق، مخمرتریکو سپرون بود. این مخمر طی تحقیقات قبلی از پساب کارخانه پنیر سازی، جدا سازی شده بود. برای ابن منظورابتدا ۱۰۰ گرم مخمر تریکوسپرون را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده توسط اتوکلاو، حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه آن را بهم زده و از این محلول کشت بر روی محیط مناسب P DA[۵] استفاده شد[۶].

محیط کشت ها

در مرحله خالص سازی از محیط کشت PDA ودر مرحله رشد از یک محیط کشت سنتتیک شامل یک در صد گلوکز، نیم درصد عصارهٔ مخمر و یک درصد پپتون استفاده شد. در مرحلهٔ تولید ازآب پنیر استفاده شد. برای این منظور ابتدا آب پنیر شیرین و تازه از کارگاه پنیر سازی تهیه کرده، پی . اچ آن در ۴/۶۷ که پی .اچ ایزوالکتریک آب پنیر است تنظیم شد. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۱۰۰ جوشا نده شد. بعد از سرد شدن پروتئین های منعقد شده توسط پارچه تمیز جدا شد. برای حذف ذرات کوچک پروتئین ازاولترافیلتراستفاده شد. رنگ آب پنیر صاف شده در این حالت سبز مایل به زرد است. برای نگهداری آن، مقدار مورد نیاز بدرون یخچال منتقل نموده تا سرد نگهداری شود. به هنگام استفاده از اب پنیر صاف شده پس ازاضافه کردن سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن وتنظیم پی. اچ آن روی ۳/۵، دردستگاه اتوکلاو استریل شد ومورد استفاده قرار گرفت.

شرایط تخمیر

در مرحلهٔ خالص سازی پلیت ها، اسلنت های حاوی PDA کشت داده شده را به مدت ۴۸ ساعت دردمای $^{\circ}C$ ۳۵ در انکوباتور قرار می دهیم. پس ازاین مرحله و مرحله رشد ابتدا درارلن های ۲۵ میلی لیتری مقدار ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت سنتتیک را به همراه مخمر کشت داده به مدت ۴۸ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۵ بر روی همزن با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده و پس از این مدت محتویات ارلن را در شرایط استریل به یک ارلن ۲۰۰۰ میلی لیتری حاوی ۹۰۰ میلی لیتر محیط کشت سنتتیک منتقل کرده ومجدداً به مدت ۴۸ ساعت در شریط فوق قرار گرفت. در مرحله تولید به بیوراکتور ۲۵ لیتری که حاوی ده لیتر محیط کشت آب پنیر بوده در شرایط استریل محتویات ارلن کشت داده شده در مرحله قبل را اضافه کرده و سپس کشت مخمر تریکوسپرون در شرایط بهینه به مدت ۴۸ ساعت انجام شد برای هوادهی نیز شدت ۲/۵ v.v.m انتخاب شد برای جلوگیری از تولید کف و کنترل آن از مادهٔ ضد کف[۱] استفاده شد.

1- Anti foam
2- One factor at a time

شوک حرارتی

در این آزمایش ها سه عامل دما، زمان و پی.اچ بهینه شد. بدین مفهوم مشخص شد که در کدام دما، زمان و پی.اچ آنزیم ریبونوکلئاز بیشترین فعالیت را داشته و در نتیجه مقدار اسید نوکلئیک هیدرولیز شده بیشتر است. بدین منظور برای بهینه سازی این سه پارامتر از روش یک فاکتور در یک زمان[۲] استفاده شد. ابتدا دما بهینه شد برای این منظور نمونه ها در دماهای مختلف که در جدول ۳ آورده شده قرار گرفتند. در مرحله دوم پارامتر زمان بهینه شد که برای این منظور نمونه ها در زمان های مختلف که در جدول ۴ آورده شده قرار گرفتند. در مرحله آخر پارامتر پی.اچ بهینه شدکه برای این منظور نمونه ها در پی.اچ های مختلف که در جدول ۵ آورده شده قرار گرفتند. برای مقایسهٔ اسید نوکلئیک آزاد شده نمونه هایی که تحت شوک حرارتی قرار نگرفته به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

اندازه گیری مقدار اسید نوکلئیک تودهٔ زیستی

برای اندازه گیری مقدار اسید نوکلئیک تودهٔ زیستی، نمونه ها را در محلول اسید پرکلریک ۰/۵ نرمال در دمای $90^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه حل کرده و پس از سانتریفوژ کردن، مقدار جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. هر واحد جذب معادل ۵۰ میکروگرم بر میل لیتر اسید نوکلئیک است [۷].

اندازه گیری مقدار پروتئین

مقدار پروتین معمولاً به طور غیر مستقیم و از طریق اندازه گیری میزان نیتروژن کل توسط روش میکروکلدال انجام می شود. برای تبدیل نیتروژن به پروتئین لازم است مقدار نیتروژن بدست آمده در یک ضریب مناسب بسته به نوع نمونه ضرب شود که این ضریب برای تودهٔ سلولی میکربی ۶/۲۵ است[۸].

نتایج و بحث

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش های انجام شده مقادیر بهینه دما، زمان و پی.اچ به ترتیب $65^{\circ}C$، ۲ دقیقه و ۵/۵ بدست آمد. از آنجائیکه ریبو نوکلئاز یک آنزیم مقاوم در برابر حرارت است فعالیت این آنزیم در $65^{\circ}C$ بیشتر می شود. علت آن است که آنزیم ریبو نوکلئاز دارای یک ممانعت کننده حساس به حرارت از جنس پروتئین است که با عملیات حرارتی در دمای بالااین ممانعت کنندهٔ پروتئینی دناتوره شده و فعالیت آنزیم افزایش می یابد. در روش شوک حرارتی هر چقدر مدت زمان عملیات حرارتی کوتاهتر باشد بهتر است زیرا افت وزن و افت پروتئین کمتری خواهیم داشت البته در زمان های خیلی کوتاه هم، اثرشوک حرارتی قابل لمس نبوده لذا زمان بهینه حدود ۲ دقیقه انتخاب گردید[۹].

آنزیم ها حداکثر فعالیت خود را در پی.اچ بهینه دارند به همین علت تعیین پی.اچ بهینه بسیار حائز اهمیت است. با توجه به نتایج بدست امده در پی.اچ ۵/۵ آنزیم ریبونوکلئاز بیشترین فعالیت را دارد. بنظر می رسد

که در این پی.اچ از نظر الکتریکی و شکل فضایی حاصل از ان شرایط بهتری را برای جذب و عمل بر روی اسید نوکلئیک دارد.

مقدار پروتئین و اسید نوکلئیک قبل و بعد از عملیت حرارتی اندازه گیری شده که در جدول ۱و۲ آورده شده است.

جدول ۱- اندازه گیری مقدار پروتئین قبل و بعد از عملیت حرارتی

پروتئین g/L	نیتروژن بر حسب p.p.m	جذب در ۴۲۰ نانو متر
۱۵/۶۵۲۱	**۱۲/۷۶**	**۰/۵۷۱**
۱۵/۴۷۲۳	**۱۱/۶۸**	**۰/۵۲۳**

جدول۲- اندازه گیری مقداراسید نوکلئیک قبل و بعد از عملیت حرارتی

اسید نوکلئیک بر حسب گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم	اسید نوکلئیک g/L	جذب در ۲۶۰ نانو متر
۶/۸۲	**۱/۰۱۷۲**	**۱/۷۲۳**
۰/۹۸	**۱/۱۴۱۹**	**۱/۲۷۳**

با توجه به نتایج بدست آمده مقدار ۸/۴۶ در صد افت پروتئین بوجود آمده همچنین براثر شوک حرارتی مقدار ۸۵/۶ در صد افت در مقدار اسید نوکلئیک بوجود آمده و مقدار آن در پروتئین تک یاخته به مقدار مجاز رسیده است. پس از انجام شوک حرارتی مقدار ۲۹/۷ افت وزن ایجاد شد. علت افت وزن زیاداین است که علاوه بر کاهش اسید های نوکلئیک کاهش در پروتئین وجود داشته همچنین علت دیگر افت وزن را می توان خروج مواد با وزن مولکولی پایین مانند ویتامین ها، اسید های آمینه از سلول دانست. بهینه سازی دما، زمان و پی.اچ طبق جدول های ۳و۴و۵ می باشد.

جدول ۳- اثر دما در فرآیند حرارتی(P H=۷ و Time =۲min) طول موج ۲۶۰ نانومتر

دما °C	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰	۶۵	۷۰	۷۵	۸۰	۸۵	۹۰	۹۵	۱۰۰
جذب ۲۶۰ nm	/۰۰۶ ۰	/۰۰۹ ۰	/۰۳۹ ۰	/۰۴۱ ۰	/۱۷۸ ۰	/۱۷۹ ۰	۰/۱۸	/۱۸۱ ۰	/۱۸۱ ۰	/۱۸۲ ۰	/۱۸۲ ۰	/۱۸۲ ۰

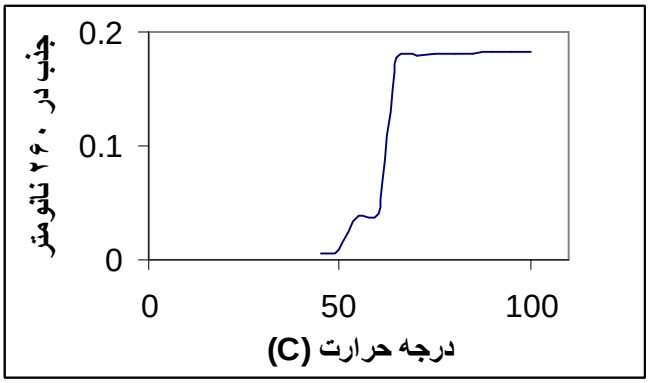
جدول ۴- اثر دما در فرآیند حرارتی(P H=۷ و $T = ۶۵ ^{o}C$) طول موج ۲۶۰ نانومتر

زمان	۵ ثانیه	۱۰ ثانیه	۲۰ ثانیه	۱دقیقه	۲دقیقه	۵دقیقه	۱۰دقیقه	۱۵دقیقه	۲۰دقیقه	۲۵دقیقه
جذب ۲۶۰ nm	۰/۱۴	۰/۱۴۵	۰/۱۴۶	۰/۱۵۴	۰/۱۸۳	۰/۱۶۱	۰/۱۶۳	۰/۱۶۴	۰/۱۶۵	۰/۱۷

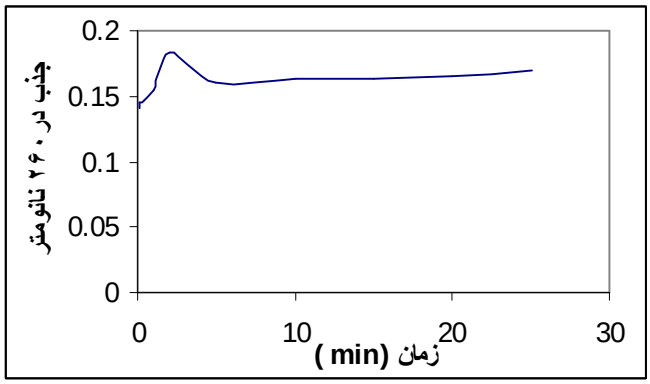
جدول۵- اثر دما در فرآیند حرارتی($T = ۶۵ ^{o}C$ و Time =۲min) طول موج ۲۶۰ نانومتر

PH	۴	۴/۵	۴/۸	۵	۵/۲	۵/۵	۶	۶/۵	۷	۷/۵	۸
جذب ۲۶۰ nm	/۱۳۱ ۰	/۱۴۴ ۰	۰/۲	۰/۲۸	/۲۸۵ ۰	۰/۲۹	/۱۹۷ ۰	/۱۵۳ ۰	/۱۴۹ ۰	۰/۱۴	/۰۸۹ ۰

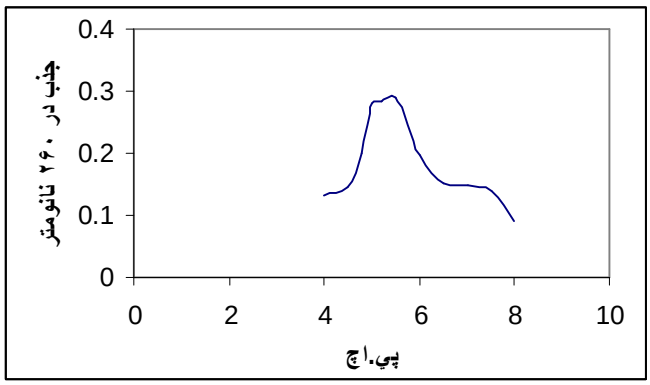
شکل های ۱و۲و۳ به ترتیب اثر دما، زمان و پی.اچ را در فرآیند حرارتی بر روی پروتئین تک یاخته تولیدی با استفاده از مخمر تریکوسپرون در آب پنیر به صورت زیر نشان می دهد.



شکل ۱- اثر دما در فرآیند حرارتی(P H=۷ و Time =۲min) طول موج ۲۶۰ نانومتر



شکل ۲- اثر دما در فرآیند حرارتی(P H=۷ و ^{o}C ۶۵ = T) طول موج ۲۶۰ نانومتر



شکل ۳- اثر دما در فرآیند حرارتی(^{o}C ۶۵ = T و Time =۲min) طول موج ۲۶۰ نانومتر

منابع و مراجع

۱. حسینی، مریم و سید عباس شجاع الساداتی، ۱۳۷۸، «کارایی راکتور ستونی حبابدار در تولید پروتئین تک یاخته از آب پنیر» پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران، دانشگاه تربیت مدرس.

۲. شفقی اصل، سید کریم و جعفر توفیقی داریان، ۱۳۷۹، «کارایی راکتور ایرلیفت در تولید پروتئین تک یاخته از آب پنیر» پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران، دانشگاه تربیت مدرس.

3. R. Kilberg, 1972, "The microbe as a source food" In Assail review of Microbiology 26, 427 – 466.

4. S. A, Miller, 1968, "Nutritional factors in scp", In scpede. R. I. Materies and S. R. Tasseaben, caambridge, M. I. T. press.

5. N. S. scri mahaw, 1974, "scp for human consumption" An over view is single cell protein II eds. S. R. Tassebum and D. I. C wang, combridge. M. I. T. press.

۶. رحمن، علیرضا و سید عباس شجاع الساداتی، ۱۳۷۸، «کاهش اسید های نوکلئیک در پروتئین تک یاخته به روش شوک حرارتی » پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران، دانشگاه تربیت مدرس.

7. S. A. shojaosadati, Y. chisti, and M. Moo. Young, 1997, "Removal of ondex acid in *newsporon sitophila* by heat treat ear, procceeding of second congress of Iranian chemical engineering pp. 108 – 110.

۸. پروانه، ویدا، ۱۳۷۱، «کنترل کیفی و آزمایش های شیکیایی مواد غذایی »، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

9. R. F. Gomez, 1973, "Nucleic acid damege in Thermal in activation of vegetable micro organism" Ananual microbial 26, 78.

۱۰. کریم زاده، رامین و جعفر توفیقی داریان، ۱۳۷۶، «بیوراکتورهای برج حباب و ایرلیفت» مطالعه مخصوص، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

11. Yeonng – sang and etal,1998, "Reclamrtion of wastewater from a sreel – Making plant using on air lift sabmerged biofilm reactor", J. chem. Technol, Biotechnol. 73, 162 – 168.