بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف آب ماکارونی در رشد قارچ صدفی *Pleurotus florida* و تولید پروتئین تک سلولی

پروانه پاسالار[1]، سارا سعادتمند[2]*، رمضانعلی خاوری‌نژاد[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[2] استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[3] استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۱۹

چکیده

پروتئین تک سلولی (SCP) به پروتئین تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های تک سلولی ازجمله باکتری‌ها و قارچ‌ها اطلاق می‌شود. در این پژوهش قارچ صدفی (*Pleurotus florida*) بر روی غلظت‌های مختلف پساب حاصل از پخت ماکارونی به عنوان محیط کشت حاوی کربن کشت داده شد و میزان رشد پرگنه قارچ، وزن تر، وزن خشک و مقدار پروتئین قارچ صدفی اندازه‌گیری گردید. نتایج بدست آمده نشان داد سرعت رشد قارچ صدفی وابسته به غلظت آب ماکارونی بود به طوری‌که بالاترین میزان رشد مربوط به غلظت ۱۰۰درصد آب ماکارونی بود و با رقیق شدن محیط، میزان رشد کاهش نشان داد. بالاترین غلظت پروتئین در محیط کشت حاوی ۲۵٪درصد آب ماکارونی با میزان پروتئین ۶۸۰ میکروگرم در میلی لیتر و کمترین غلظت پروتئین در محیط کشت حاوی ۱۰۰٪ آب ماکارونی و محیط کشت آب آگار مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: اندام بارده، ماکارونی، پروتئین تک سلولی SCP، ضایعات کشاورزی، *Pleurotus florida*.

* مسوول مکاتبه: s_saadatmand@srbiau.ac.ir

۱- مقدمه

تولید مواد غذایی با ارزش، از مواد و ضایعات دور ریختنی یکی از راه‌های مقابله با کمبود مواد غذایی است. قارچ‌ها علاوه بر تولید ویتامین‌ها منبع خوبی برای تولید پروتئین هستند. واژه پروتئین تک سلولی SCP[1] به معنی تولید پروتئین برای مصرف انسان یا حیوان از طریق میکروارگانیسم‌ها است. تکنولوژی تولید SCP یک روش مهم برای رفع مشکل جهانی کمبود پروتئین است که توسط آن محصولات مازاد یا جانبی کم ارزش به محصولاتی که از نظر تغذیه‌ای و بازار با ارزش هستند تبدیل می‌شوند. قارچ ها ی خوراکی ساپروفیت هستند و بر روی مواد آلی با منشا گیاهی رشد می‌کنند و می‌توانند بر روی بسیاری از مواد زاید کشاورزی به عنوان سوبسترا رشد نمایند . بدین ترتیب می‌توان مواد زاید کشاورزی و صنایع غذایی را به کمک قارچ ها به انواع محصولات غذایی، پزشکی و کود ها و غیره تبدیل کرد و باعث حمایت و بازسازی محیط شد(۱۳). در این پروژه از نوعی قارچ صدفی با نام علمی *Pleurotus florida* استفاده شد. قارچ پلوروتوس به قارچ صدفی معروف می‌باشد زیرا کلاهک آن شبیه صدف، قاشقی و زبانی شکل است (۵). قارچ ها به عنوان غذاهایی سالم با کالری ،چربی و کلسترول کم و پروتئین و کربوهیدرات و مواد معدنی بالا شناخته شده اند(۱۲).

قارچ ها باعث تجزیه مولکول‌های آلی و باز گرداندن عناصر به طبیعت می‌شوند (۲). قارچها اهمیت زیادی در صنایع تخمیری (تولید انواع سسها، نوشابه‌های الکلی و نان) دارند. این صنایع بر اساس تخمیر قند توسط مخمر و تولید اتیلن، الکل و CO_2 می‌باشند (۳). بیشتر قارچ ها می‌توانند از نشاسته و سلولز به خوبی استفاده نمایند. بعد از آب، قند بیشترین ماده تشکیل دهنده محیط کشت مایع برای رشد قارچ است(۱).

نوع قارچ نیز در تولید SCP از اهمیت بالایی برخوردار است. گونه های مختلف قارچ صدفی علاوه بر سازگاری زیاد دارای رشد آسان و سریع می‌باشند.

در این تحقیق قارچ صدفی (*Pleurotus florida*) بر روی غلظت‌های مختلف آب حاصل از پخت ماکارونی،به عنوان منبع کربوهیدرات رشد داده شد و تاثیر غلظت این سوبسترا بر میزان تولید پروتئین SCP مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه محیط های کشت قارچ صدفی

نیم کیلو ماکارونی در دو لیتر آب به مدت ۱۵ دقیقه پخته شد. آب ماکارونی که به این ترتیب تهیه می‌شود، غلظت اولیه (۱۰۰ درصد) نامیده شد و از آن رقت های (۵۰ درصد)، (۲۵ درصد) و (۱۲/۵ درصد) تهیه شد. به تمامی غلظت های فوق به ازای هر ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت، ۳ گرم از پودر آگار اضافه شد. به عنوان محیط کشت کنترل منفی از آب آگار و به عنوان محیط کشت کنترل مثبت از محیط کشت *PDA* استفاده شد. پس از اتو کلاو زمانی که دمای محیط های کشت به ۵۰ درجه سانتیگراد رسید، زیر هود استریل داخل پتری دیش‌ها توزیع گردیدند.

جدول ۱نحوه تهیه انواع محیط کشت قارچ پلوروتوس که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است را نشان می‌دهد.

۲-۲- نحوه کشت

میسلیوم قارچ صدفی از آزمایشگاه گیاه شناسی واحد علوم و تحقیقات تهیه و در محیط کشت PDA کشت داده شد. ابتدا داخل پتری دیش هایی به قطر ۱۰ سانتی متر ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت PDA ریخته شد. سپس نمونه‌ها در داخل انکوباتور ۲۵ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری گردیدند.

۲-۳- اعمال تیمارهای مختلف کشت قارچ صدفی

در این تحقیق از هر محیط کشت ۱۰ پلیت تهیه شد. سپس دیسک های حاوی میسلیوم خالص قارچ پلوروتوس روی آنها قرار داده شد. بعد از حصول اطمینان از استقرار و تثبیت کامل دیسک‌ها در جایگاهشان، پتری دیش ها با پارافیلم غیر قابل نفوذ شده و به انکوباتور تاریک با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل گشتند. تمامی نمونه ها پس از گذشت هشت روز به طور کامل سطح محیط کشت را پر کرده بود.اما جهت سنجش های بعدی کلیه نمونه ها بعد از مدت ۳۰ روز ، از سطح محیط کشت برداشت شدند. لازم به ذکر است که در طول این دوره نیز مطالعات ماکروسکوپی شامل اندازه گیری قطر کلنی، میزان رشد عمودی قارچ و تولید اندام سوزنی و اندام بارده بر روی نمونه انجام شد، همچنین وزن تر و وزن خشک قارچ اندازه گیری گردید. میزان پروتئین به روش برادفورد تعیین شد.

[1]Single – cell protein

۲-٤- نحوه برداشت قارچ از سطح محیط کشت

در شرایط نسبتاً استریل درب پتری دیش ها باز شدند و نمونه ها با کمک اسکالپل با دقت به طوری که کمترین آغشتگی به محیط کشت همراه آنها باشد از سطح محیط جدا شده و به داخل ویالهای شیشه ای کوچکی که شماره گذاری شده بودند منتقل گشتند. درب ویال ها مسدود گردید و به سرعت به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت حداقل ۴۵ دقیقه انتقال یافتند تا در حد امکان از فعالیت پروتئازها جلوگیری شده و نمونه ها جهت انتقال به دستگاه فریز درایرآزمایشگاهی مدل FD-5003-BT آماده شوند. پس از خشک شدن از نمونه ها عصاره گیری شد.

۲-۵-عصاره گیری

۰/۵ گرم وزن خشک نمونه را داخل هاون چینی که در ظرف حاوی یخ قرار داده شده بود(دمای حدود ۴ درجه سانتیگراد) ریخته شد و به آن مقدار بسیار کمی خرده شیشه و ml ۱ بافر فسفات خنک اضافه گردید. به سرعت نمونه ها داخل هاون ساییده و له شدند به طوری که مخلوطی یکنواخت به دست آمد. این مخلوط را به داخل میکروتیوبهای ml ۱/۵ ریخته و سپس با ml ۰/۵ دیگر بافر فسفات، هاون چینی شستشو داده شد و به محتویات داخل همان میکروتیوب اضافه گردید. سپس میکروتیوبها داخل سانتریفیوژ یخچال دارمدل ROTOFIX 32 به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ قرار گرفتند. لازم به ذکر است که تمامی مراحل به سرعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت.

پس از سانتریفیوژ، محلول رویی میکروتیوبها به آرامی برداشته شد و به یک میکروتیوپ تمیز انتقال داده شد. این عصاره ها را برای مدت ۴ ماه در دمای ۴- درجه سانتیگراد و برای مدت ۸ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد می‌توان نگهداری نمود.

۲-٦- سنجش پروتئین

ارزیابی ارزش غذایی قارچ از طریق سنجش پروتئین‌های محلول به روش برادفورد صورت گرفت (۶).

۳-۷- آنالیز آماری

آنالیز داده ها به کمک نرم افزار SPSS به صورت One way Anova در قالب طرح بلوک های کاملا تصادفی صورت گرفت. مقایسه میانگین ها به روش دانکن انجام گرفت. نمودارها به کمک نرم افزار Exel رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

شکل ۱ میزان رشد میسلیوم درتیمارهای مختلف آب ماکارونی را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت آب ماکارونی در محیط کشت، سرعت رشد میسلیوم افزایش یافته است. بطوریکه در تیمار ۱۰۰٪ آب ماکارونی قطر کلنی در روز چهارم تا پنجم پس از کشت به حداکثر خود (۸سانتی‌متر) رسیده که پس از این مدت رشد عمودی قارچ‌ها در تمامی سطح پلیت ادامه یافت و در روز سیزدهم پس از کشت چند اندام سوزنی در سطح پلیت ها مشاهده گردید (شکل ۱). بیشترین وزن تر و وزن خشک قارچ نیز مربوط به این نمونه می‌باشد (شکل های ۳و۴).

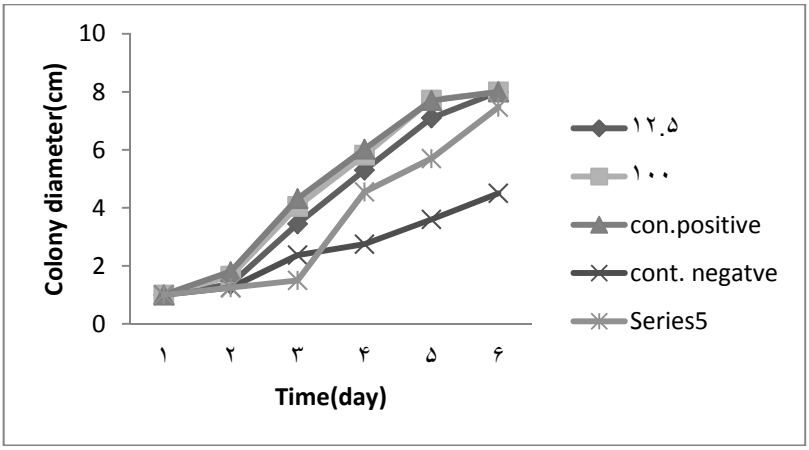
همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود میزان رشد میسلیوم در تیمار ۱۰۰٪ اب حاصل از پخت ماکارونی هم سطح محیط کشت PDA می‌باشد و به احتمال خطای ۱٪ با این محیط کشت تفاوت معنی‌داری ندارد. کمترین میزان رشد میسلیوم قارچ مربوط به محیط کشت آب آگار می‌باشد و با افزایش غلظت آب ماکارونی در محیط کشت بر میزان رشد قارچ افزوده می‌شود.

شکل های۳و۴ نیز به ترتیب وزن خشک و وزن تر میسلیوم در محیط کشت حاوی در صدهای مختلف پساب ماکارونی را نشان می‌دهد. وزن خشک و وزن تر میسلیوم قارچ نیز با افزایش در صد آب ماکارونی افزایش می‌یابد بطوریکه در تیمار ۱۰۰٪ پساب ماکارونی افزایش وزن تر و وزن خشک با محیط کشت PDA که کنترل مثبت می‌باشد اختلاف معنی‌داری ندارد.

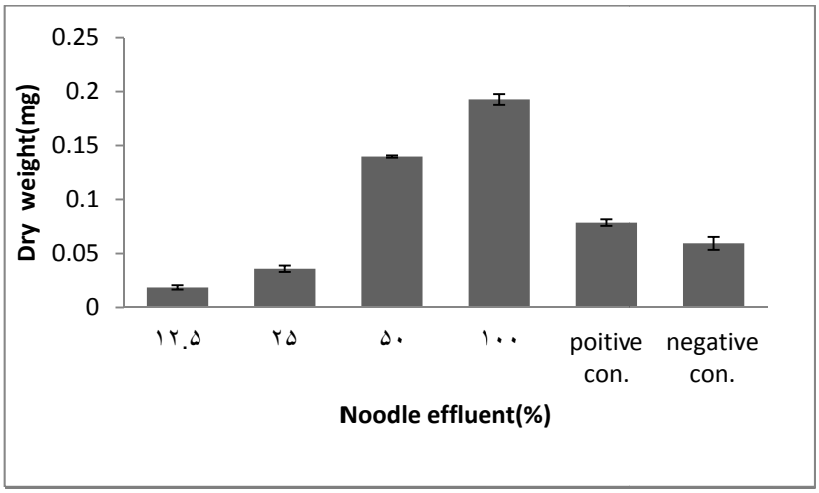
ارزیابی ارزش غذایی قارچ از طریق سنجش مقدار پروتئین‌های محلول موجود در نمونه‌های تحت تیمار و مقایسه آن‌ها با نمونه شاهد نشان داد که میزان پروتئین در میسلیوم قارچ در تیمارهای با در صد کمتر آب ماکارونی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد دارد (شکل۴). این نشان می‌دهد که غلظت ۲۵٪ اب ماکارونی به عنوان سوبسترہ مناسبی جهت تولید SCP محسوب می‌شود. بین غلظت ۱۲/۵٪ و ۲۵٪ آب ماکارونی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. گرچه در تیمارهای مذکور رشد میسلیوم کمتر از نمونه شاهد بود اما در قارچ‌ها همیشه روند رشد و تولید پروتئین موازی نیست و گاه در شرایط مناسب رشد رویشی تولید پروتئین بالا نمی‌باشد.

جدول۱- انواع محیط کشت قارچ پلوروتوس مورد استفاده در این مطالعه

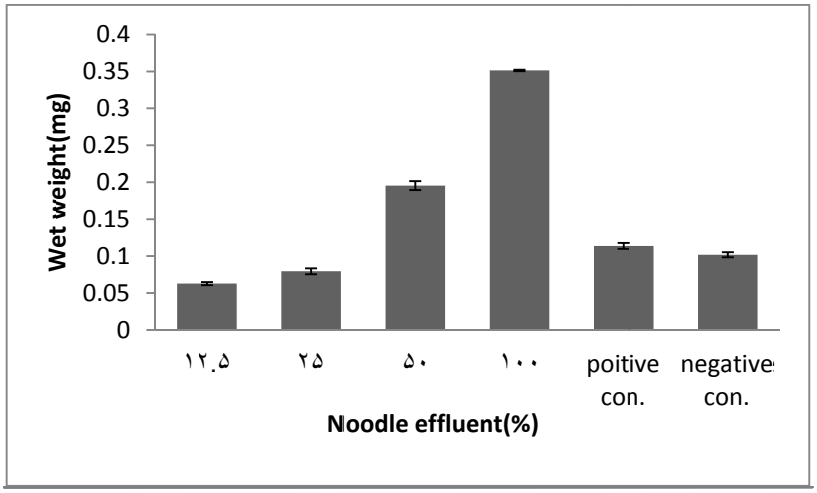
	نام محیط کشت	محیط اضافه شده (ml)	آب مقطر اضافه شده(ml)	آگار اضافه شده(gr)	حجم نهایی (ml)
۱	محیط کشت کنترل منفی	-	۲۰۰	۳	۲۰۰
۲	محیط کشت کنترل مثبت	۲۰۰ ml محیط کشت PDA	-	۳	۲۰۰
۳	۱۰۰درصد آب ماکارونی	آب ماکارونی ۲۰۰ ml	-	۳	۲۰۰
۴	۵۰درصد آب ماکارونی	آب ماکارونی ۱۰۰ ml	۱۰۰	۳	۲۰۰
۵	۲۵درصد آب ماکارونی	آب ماکارونی ۵۰ml	۱۵۰	۳	۲۰۰
۶	۱۲/۵درصدآب ماکارونی	آب ماکارونی ۲۵ ml	۱۷۵	۳	۲۰۰



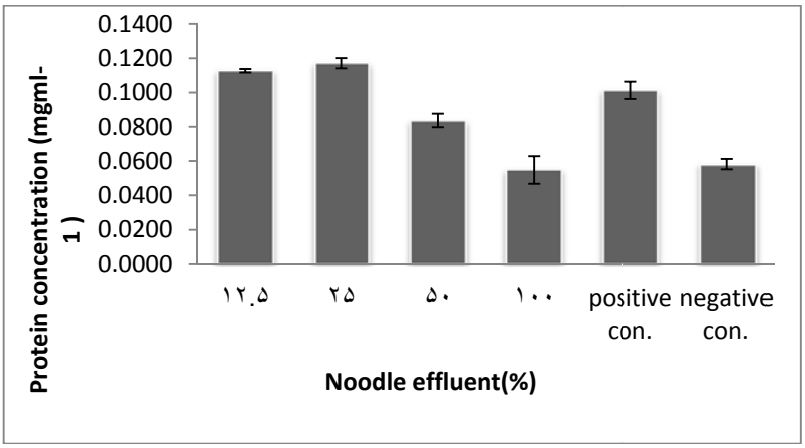
شکل۱- مقایسه قطر کلنی بر حسب سانتیمتر در تیمارهای مختلف پساب حاصل از پخت ماکارونی بر حسب درصد در روزهای مختلف پس از کشت



شکل۲- وزن خشک میسیلیوم بر حسب میلی گرم در تیمارهای مختلف محیط کشت حاوی پسآب ماکارونی ، کنترل مثبت PDA، کنترل منفی آب آگار.



شکل۳- وزن تر میسیلیوم بر حسب میلی گرم در تیمارهای مختلف محیط کشت حاوی پسآب ماکارونی ، کنترل مثبت PDA، کنترل منفی آب آگار.



شکل٤- غلظت های مختلف پروتئین در محیط کشت حاوی در صدهای متفاوت پساب حاصل از پخت ماکارونی به ترتیب شامل ۱۲/۵٪، ۲۵٪، ۵۰٪، ۱۰۰٪، کنترل مثبت محیط کشت PDA ، کنترل منفی آب آگار

در رابطه با میزان پروتئین در بسترهای کشت قارچ صدفی Rashad در سال ۲۰۰۹ با استفاده از سه نوع ماده زاید شامل پالپ لیمو، مواد زاید میوه پاپایا، آب برنج و مخلوطی با نسبت‌های مختلف از آنها نشان داد که نوع و میزان تولید پروتئین تولید شده و میزان فعالیت آنزیمی در آنها متفاوت می‌باشد(۱۳). به طوری که با رشد *Pleurotus ostreatus* بر روی سه نوع ماده زاید پالپ لیمو، مواد زاید میوه پاپایا، آب برنج و مخلوطی با نسبت های مختلف از آنها بالاترین مقدار **SCP** مربوط به رشد قارچ در محیط پالپ لیمو و آب برنج با نسبت مساوی بود. همچنین آنها نشان دادند که با وجودیکه نوع سوبسترا بر روی میزان تولید اجسام باردهٔ و بعضی از آنزیم‌ها مانند آمیلاز اثر دارد، به طوری که فعالیت بالای آنزیم در محیط کشت پالپ لیمو و پاپایا مشاهده می شود، میزان فعالیت برخی دیگر از آنزیم‌ها مانند سلولاز و انورتاز با استفاده از انواع سوبستراهای مورد استفاده تفاوتی را نشان نمی دهد. .Chiejina در سال ۲۰۱۰ نشان داد که میزان SCP تولید شده توسط قارچ پلوروتوس بر روی شن رودخانه به تنهایی بسیار بیشتر از خاک اره بوده، ولی میزان تولید اجسام بارده بر روی خاک اره بیشتر می‌باشد(۷). وقتی شن رودخانه با خاک اره مخلوط شد بدون آن که میزان SCP تفاوت معنی داری پیدا کند میزان اجسام بارده بسیار زیاد گردید. Massadeh در سال ۲۰۱۰ نشان داد که اگر به عنوان سوبسترا از منابع کربنی ساده استفاده شود میزان تولید بیوماس نسبت به هنگامی که از سوبستراهای حاوی پلی ساکاریدهای پیچیده مانند آب مازاد کارخانه زیتون و یا سبوس گندم استفاده می‌شود بسیار بیشتر است ولی میزان تولید آنزیم‌های خارج سلولی کمتر می‌باشد(۱۱). قارچ صدفی که بر روی خاک اره حاصل از چوب‌های مختلف رشد داده شده باشد، از نظر ارزش غذایی(شامل میزان پروتئین، چربی و نیز مواد معد نی، مانند سدیم ، پتا سیم) متفاوت خواهد بود (۱۴).

هنگامی که نوعی مخمر آبزی حساس به حرارت بر روی عصاره یاکون رشد داده شود ، میزان تولید SCP بسیار زیاد است. جالب اینجاست که پروتئین های تولیدی فوق، در شرایطی که مخمر در آب با اسمولالیته کم رشد داده شود به راحتی از مخمر آزاد شده و وارد محیط کشت می‌شوند (۸).

Hadar, Y., Cohen, E. (1989) نشان دادند که بیوماس تولید شده در پلوروتوس فلوریدا که بر روی مازاد پنبه (کتان)رشد کرده نسبت به حالت کنترل از نظر میزان شش اسید آمینه با هم فرق می کند در حالی که میزان اسیدهای چرب تولید شده مشابه می باشد(۹).M. Ashrafuzzaman در سال ۲۰۰۹ نشان داد که رشد قارچ بر روی آب برنج باعث تولید اجسام بارده نمی‌شود(۴). F.Hassan در سال ۲۰۱۰ نشان داد که میزان تولید اجسام بارده بر حسب نوع محیط کشت (خاکه اره، کنجاله سویا، مازاد آب برنج یا چغندر) متفاوت است. اما وزن تر قارچ در همه نمونه‌ها تقریبا شبیه هم بوده و اختلاف معنی‌داری بین رشد قارچ و انواع پروتئین های تولید شده توسط قارچ رشد یافته بر روی تمامی محیط‌ها دیده نشد(۱۰).

٤- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد پساب حاصل از پخت ماکارونی، محیط کشت مناسبی برای رشد قارچ صدفی می باشد و حتی گزینه مناسب تری از محیط کشت PDA است. همچنین پساب رقیق شده ماکارونی سبب افزایش میزان پروتئین در میسلیوم قارچ صدفی می گردد.

٥- منابع

۱- ذکائی، محمود.۱۳۷۵. ترجمه بیولوژی قارچ ها، نوشته سی. تی. اینگولد، انتشارات فردوسی مشهد.

۲- زارع مایوان، حسن.۱۳۷۰. مبانی قارچ شناسی،انتشارات فرهنگ جامعه.

۳- سعادتمند، س.۱۳۸۶. قارچ شناسی نوین، نشر آیندگان .

4- Ashrafuzzaman, M., Kamruzzaman, M., Razi, A., Shahidullah, M. 2009. Comparative Studies on the Growth and Yield of Shiitake Mushroom (*Lentinus Edodes*) on Different Substrates. *Advances in Environmental Biology*, 3(2): 195-203.

5- Badole, S. L, Bodhankar, S,L . 2007. Reaction of aqueous extract of *Pleurotus pulmonarius* Quel.-Champ with acarbose in alloxan induced diabetic mice.

6- Bradford, Marion. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding.*Analytical biochemistry*,72,248-254.

7- Chiejina, N., Olumide, J. 2010. Effects of different substrates on the yield and protein content of *Pleurotus tuberregium. African Journal of Biotechnology*, Vol (9): 1573-1577.

8- Chun, H., Tong, Z., Zhen, C., Zhe, C., Jing, L., Xiang-Hong, W. 2009. Single cell protein production from yacon extracts using a highly thermosensitive and permeable mutant of the

marine yeast Cryptococcus aureus G7a and its nutritive analysis. *Bioprocess Biosyst Eng* , DOI 10.1007/s00449-009-0376-z.

9- Hadar, Y., Cohen, E. 1989. Chemical Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 6, p. 1352-1354.

10- Hassan, F., Ghada, M., Medany, L., Hussein, A. 2010. Cultivation of the King Oyster Mushroom (*Plerrotus eryngii*) in Egypt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(1): 99-105.

11- Massadeh. M.L.,Fraij, A., Fandi, K. 2010. Effect of carbon sources on the extracellular lignocellulolytic enzymetic system of *Pleurotus sajor-caju*. *Jordan Journal of Biological Sciences* Vol 3, No 2, p. 51-54.

12- Moore, D. & Chiu, S. W. 2001. Fungal products as food in Bio-Exploitation on fungal, Filamentous Fungi, Chapter 10, ed. S. B. Pointing & K.D. Hyde, p. 251-223, Diversity Press: Hong Kong.

13- Rashad, M., Hala, M., Abdou, M., Abeer, M., Mahmoud, E., Nooman, M. 2009. Nutritional Analysis and Enzyme Activities of *Pleurotus ostreatus* Cultivated on *Citrus limonium* and *Carica papaya* Wastes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3352-3360.

14- Shyam, S., Patil, S., Abrar, A., Suresh, M., Mirza, M., Vaseem, B. 2010. The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 7: 66-76.