بهینه‌سازی شرایط استخراج آنزیمی پروتئین و شناسایی پروتئین‌های ریزجلبک سندسموس آبلیکوس

مطهره سادات امیری[a]، سید ابراهیم حسینی[*b]، بابک خیام باشی[c]، غلامحسن اسدی[d]

[a] دانشجو دکتری علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استادیار گروه تحقیقات خاک و آب ، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، اصفهان، ایران
[d] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۰۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1400.18.2.4.0

چکیده

مقدمه: هدف از این مقاله بهینه سازی شرایط استخراج پروتئین ریزجلبک سندسموس به روش آنزیمی با استفاده از تکنیک سطح پاسخ و شناسایی پروتئین‌های استخراج شده از این ریزجلبک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بهینه سازی شرایط استخراج آنزیمی پروتئین به کمک نرم‌افزار Minitab به روش سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی، برای فاکتورهای نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان اثر آنزیم (آنزیم‌های سلولاز و مولتی آنزیم تحت شرایط بهینه pH) طراحی شد. سپس بهترین تیمار از نظر بیشترین راندمان استخراج در کمترین زمان بهینه سازی شد و در پایان پروتئین‌های استخراج شده به روش الکتروفورز شناسایی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد هرچه غلظت آنزیم افزایش یابد درصد استخراج و راندمان استخراج پروتئین بیشترمی‌شود به طوری که با افزایش غلظت از ۲ به ۶ میکرولیتر آنزیم بر میلی لیتر سوبسترا راندمان استخراج به کمک آنزیم مولتی آنزیم از ۱۵/۲۸ به ۲۷/۸۷ درصد و برای سلولاز از ۱۶/۸۸ به ۲۱/۴۲ درصد به ترتیب افزایش یافته است. بهینه شرایط محاسبه شده در بالاترین غلظت و کمترین زمان پاسخگوئی برابر ۶/۸۴ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۲/۳۴ ساعت به ازای ۰/۵ گرم وزن خشک بدست آمد. نتایج بررسی‌های الکتروفورز به روش SDS- page نشان داد پروتئین‌های استخراج شده از این ریزجلبک حاوی ۸ باند پروتئینی با وزن ملکولی بین ۱۱۰-۲۰ کیلودالتون (kDa) می‌باشد. همچنین شاخص شیمیایی پروتئین که معیاری است برای ارزیابی کیفیت پروتئین برای این ریز جلبک به میزان ۰/۴-۰/۲ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: استخراج پروتئین به کمک تیمار آنزیمی در مقایسه با تیمار شیمیایی راندمان استخراج بالاتر داشته همچنین به دلیل مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی، جهت استخراج پروتئین از سوبسترا پیشنهاد می‌گردد. باتوجه به نزدیک بودن شاخص شیمیایی پروتئین‌های این ترکیب با پروتئین غلات، این ترکیب به عنوان یک منبع پروتئینی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *استخراج، الکتروفورز، سلولاز، شناسایی پروتئین، مولتی آنزیم*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: ebhoseini@srbiau.ac.ir

مقدمه

پیشرفت علمی، اقتصادی و فرهنگی جوامع، عادت‌های غذایی و سبک زندگی افراد را به سمت افزایش مصرف جلبک‌های دریایی سوق داده است. سال هاست که فعالیت بیولوژیکی جلبک‌ها به دلیل وجود ترکیبات عملگرا که ممکن است در گیاهان معمول وجود نداشته باشند، توجه محققین را به خود جلب نموده است. بنابراین تلاش برای کشف متابولیت‌ها طی چند سال گذشته منجر به شناسایی تعداد چشمگیری از این ترکیبات شده است. ترکیبات فعال بیولوژیکی حاصل از جلبک‌ها نقش مهمی در جلوگیری از بیماری‌هایی نظیر سرطان، التهابات، دیابت و بیماری‌های فشار خون ایفا می‌کنند. این ترکیبات کاربردهای صنعتی بسیاری از جمله در مواد غذایی، تغذیه دام و طیور، داروسازی و مواد آرایشی دارند. بنابراین تمایل به استخراج این ترکیبات از جلبک‌ها آشکار است. کاروتنوئیدها، آمینواسیدها، اسیدهای چرب و دیگر متابولیت‌های ثانویه در ریزجلبک‌ها ارزش تغذیه ای رژیم غذایی انسان و حیوان را افزایش می‌دهد. پروتئین‌های منابع حیوانی اساسا منبع غنی از اسید آمینه‌های ضروری موردنیاز بدن می‌باشند. پروتئین‌های منابع گیاهی در رتبه بعدی قرار دارند و عمدتا فاقد اسیدآمینه‌های ضروری (شامل: هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و والین) هستند (Young *et al.*, 1994). بنابراین کمبود اسیدآمینه‌های ضروری در منابع گیاهی و نیز وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب اشباع و کلسترول در منابع حیوانی که باعث افزایش بیماری‌های قلبی عروقی می‌شوند، منجر شده تا متخصصان و سازمان‌هایی مثل سازمان خواروبار و کشاورزی (فائو) منابع جایگزین دیگری که غنی از پروتئین باشند را به عنوان منبع تامین کننده پروتئین در فرمول‌های غذایی پیشنهاد کنند. به‌طور کلی جلبک به عنوان یک منبع پروتئینی حاوی اسیدهای آمینه ضروری پیشنهاد شده است که متفاوت از منابع پروتئینی دیگر مثل سویا و تخم مرغ هستند (FAO/WHO, 2002).

پروتئین‌ها معمولا به دلیل خواص ایجاد عملکردی مطلوب (مثل خاصیت جذب آب، ایجاد ژل، کف کنندگی و ایجاد امولسیون پایدار) در مواد غذایی استفاده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین پیش نیازهای اساسی ایجاد این خواص در مواد غذایی، خاصیت حل شوندگی پروتئین‌ها است. تمامی خواص عملکردی آنها وابسته به خواص ملکولی پروتئین می‌باشد که متاثر از عواملی همچون pH، قدرت یونی و حضور سایر ملکول‌ها (مثل پلی ساکاریدها) می‌باشد. (Schwenzfeier *et al.*, 2013).

استخراج کامل ترکیبات تغذیه‌ای از ریزجلبک‌ها به دلیل حضور دیواره سلولی سخت روی آنها معمولا با مشکل مواجه می‌شود. برای حل این مسئله نیاز به انجام عملیات‌های آماده سازی و تخریب دیواره سلولی می‌باشد. از اینرو روش‌های تخریب سلولی برای آماده سازی شرایط استخراج ترکیبات زیستی از ریز جلبک‌ها مثل آسیاب کردن[1] (Lee *et al.*, 2010; Doucha *et al.*, 2014) ، استفاده از امواج فراصوت (Furuki *et al.*, 2003)، میکروویو (Zheng *et al.*, 2011)، تیمارهای آنزیمی (Fleurence *et al.*, 1999; Sari *et al.*, 2013)، تخریب به کمک فرآیندهای فشار بالا (Jubeau *et al.*, 2012) مورد آزمون قرار گرفته است. افزایش درصد استخراج پروتئین بسته به مقاومت متفاوت دیواره سلولی و ساختار شیمیایی دیواره سلولی ریزجلبک‌ها متفاوت است اما بررسی روش‌های مختلف استخراج نشان داده بیشترین راندمان استخراج پروتئین به ترتیب فشار بالا> فرایند استخراج شیمیایی> فرایند فراصوت[2] > آسیاب دستی بوده است (Safi *et al.*, 2014).

Maehre در سال ۲۰۱۶ به بررسی روش استخراج آنزیمی پروتئین جلبک پرداخت و بیان کرد تاکنون روش‌های متعددی برای استخراج پروتئین جلبک به کار گرفته شده است که راندمان استخراج محدود داشته اند اما بررسی پیش تیمار آنزیمی در مطالعات این محقق نشان داد استفاده از فرآیند آنزیمی می‌تواند راندمان استخراج اسیدآمینه‌های ضروری را تا سه برابر افزایش دهد. ترکیب پیش تیمار آنزیمی به همراه استخراج قلیایی در مقایسه با استخراج به کمک قلیا به تنهایی، راندمان تولید پروتئین را ۱/۶ برابر افزایش داد. شبیه‌سازی هضم روده‌ای اسیدآمینه‌های استخراج شده به روش پیش تیمار آنزیمی نشان داد جذب این ترکیبات در روده به ۳/۲ برابر افزایش یافته است. بنابر این، این روش میتواند پیش تیماری موثر

[1] Bead Milling

[2] Ultrasonication

برای افزایش راندمان استخراج پروتئین و اسیدآمینه‌های ضروری مورد نیاز انسان از ریزجلبک باشد.

Sulaiman و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر پیش تیمار آنزیمی را در مقایسه با تکنیک‌های اولتراسونیک، استخراج آبی با فشار بالا برای استخراج پروتئین چند گونه ریزجلبک انجام دادند. پیش تیمار آنزیمی در شرایط ملایم حرارتی اثر منفی نسبت به تیمار با دما بالا مشابه آنچه در اولتراسونیک رخ می‌دهد، بر روی پروتئین نداشت. همچنین راندمان استخراج پروتئین به روش آنزیمی نیز نسبت به سایر روش‌ها بالاتر بود. این محققان بیان کردند روش اولتراسونیک، با راندمان استخراج ۰/۴ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌گرم وزن خشک نمونه، تکنیک موثری برای استخراج پروتئین کلرلا sp نمی‌باشد.

Nair و همکاران (۲۰۱۸) به تشخیص، خالص سازی و ویژگی‌های بیوشیمیایی و اسپکترومتری جرمی فیکوبیلی پروتئین‌ها از جلبک قرمز *Centroceras clavulatum* مبادرت ورزیدند. فیکوبیلی پروتئین‌ها ترکیبات پروتئینی فلورسانت هستند که به گستردگی در جلبک‌ها و سیانوباکترها وجود دارند. فیکوبیلی پروتئین‌ها به آلوفیکوسیانین، فیکوسیانین، فیکواریترین و فیکواریتروسیانین طبقه‌بندی می‌شوند. بررسی‌های فلورسانت نشان داد که پروتئین‌های خالص متعلق به آرفیکوسیانین (R-PC) و آرفیکواریترین (R-PE) هستند. وزن مولکولی و ترکیب پروتئین‌های دو پروتئین با SDS-PAGE شناسایی شد. با خالص‌سازی، ته نشینی سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون فیکوبیلی پروتئین‌ها جداسازی شدند.

مواد و روش‌ها

- کشت ریزجلبک

ریزجلبک سندسموس آبلیکوس از بانک جلبکی شیراز (شیراز، ایران) تهیه شد. این سلول‌ها در محیط‌کشت BBM به شکل ناپیوسته کشت داده شدند.

- آنالیز ترکیبات اصلی جلبک

رطوبت: به روش اصلاح شده **AOAC** شماره ۹۵۰/۴۶۱۳ در سه تکرار اندازه گیری شد.

خاکستر: طبق روش AOAC به شماره ۹۳۸/۰۸ در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

چربی: مقدار چربی نمونه به کمک پترولیوم اتر از نمونه‌های رطوبت‌گیری شده طبق روش AOAC به شماره ۹۴۵/۱۶ در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

کربوهیدرات: کربوهیدرات بر اساس اختلاف وزن کل نمونه از وزن پروتئین، چربی، فیبر، رطوبت و خاکستر تخمین زده شد.

پروتئین کل: اندازه‌گیری پروتئین نمونه به روش کلدال انجام گرفت. یک گرم نمونه را به همراه اسیدسولفوریک ۹۶ درصد هضم کرده و پس از تقطیر به‌کمک اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار تیتر شد. برای اندازه گیری مقدار پروتئین از ضریب تبدیل ۶/۲۵ استفاده شد.

املاح معدنی: برای اندازه‌گیری عناصر آهن، منیزیم، روی و مس نمونه به کمک اسیدنیتریک هضم شد و سپس جذب آن توسط جذب اتمی قرائت شد.

- استخراج پروتئین

استخراج ترکیبات زیستی ریزجلبک به دلیل حضور دیواره سلولی محکم با ممانعت مواجه می‌شود برای غلبه بر این دیواره سخت با ساختار سه لایه‌ای سلولز، پروتئین و ترکیبات دیگر مثل اوریک اسید، مانوز، زایلان، آلگانان[1] و گلیکوپروتئین، استفاده از آنزیم‌های هیدرولیز کننده مثل سلولاز که بر روی هیدرولیز ساختار سلولزی دیواره بسیار موثر است و لیزوزیم که می‌تواند پیوندهای پپتیدوگلیکان[2] دیواره را بشکند بسیار ضروری است. از این رو طراحی آماری استخراج پروتئین مطابق با روش Safi و Violeta (۲۰۱۴) با کمی تغییرات، در سه سطح بر اساس مطالعات مبنا، (جدول ۱) برای دو فاکتور غلظت آنزیم و زمان اثر آنزیم به کمک طرح سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی انجام گرفت.

جدول ۱- فاکتورها و سطوح اندازه گیری

فاکتورها	سطوح		
کد	+۱	۰	−۱
غلظت آنزیم (میکروگرم بر میلی لیتر)	۶	۴	۲
زمان (ساعت)	۱۲	۸	۲

[1] Algaenan
[2] Peptidoglycan

آنزیم‌های مورد استفاده در این تحقیق سلولاز L ۱/۵[1] (۷۰۰EGUg^{-1}) و ویسکوزایم L (400 FBUg^{-1}) از نمایندگی شرکت نووزایم دانمارک دریافت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده قرار گرفت. نخست دامنهٔ تغییرات فاکتورها برای نسبت آنزیم به سوبسترا و مدت زمان اثر آنزیم انتخاب گردید. سپس بر اساس تعداد فاکتورها و سطوح آنها جدول طرح آماری (۱۳ استخراج با ۵ تکرار در نقطهٔ مرکزی) معین شد (جدول۲). در ادامه شرایط پیشرفت درصد هیدرولیز دیواره سلولی، از طریق اندازه گیری میزان پروتئین محلول در عصاره بدست آمده، بررسی گردید.

جدول ۲- جدول طرح آماری سطوح کد بندی متغیرهای مستقل طرح مرکب مرکزی

مشاهدات	غلظت آنزیم	زمان
۱	−۱/۴۱۴	۰,۰
۲	−۱	−۱
۳	۰,۰	−۱/۴۱۴
۴	۱	−۱
۵	۰,۰	۰,۰
۶	۰,۰	۰,۰
۷	۰,۰	۰,۰
۸	۰,۰	۰,۰
۹	۰,۰	۰,۰
۱۰	۰,۰	۱/۴۱۴
۱۱	۱/۴۱۴	۰,۰
۱۲	۱	۱
۱۳	−۱	۱

- تیمار آنزیمی

ابتدا یک گرم از ریزجلبک با ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار درpH بهینه فعالیت آنزیم مخلوط شد و به مدت ۰/۵ ساعت برای رسیدن به دما و pH مناسب در حمام آب ۵۰ درجه قرار گرفت و پس از آن آنزیم مورد نظر به آن اضافه شد و تا اتمام زمان فرایند در دما۵۰ درجه باقی ماند تا فعالیت آنزیمی انجام گیرد پس از آن سانتریفوژ با ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و محلول رویی برای اندازه‌گیری پروتئین جمع‌آوری شد (Al-Zuhair and Ashraf, 2016).

- تیمار شیمیایی

۰/۵ گرم نمونه به ۲۵ میلی لیتر محلول سود ۲ نرمال با pH ۱۲ اضافه شد و به مدت ۲ساعت در دما ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد تا حداکثر پروتئین محلول جدا شود. سپس محلول رویی به کمک سانتریفوژ با g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه در دما ۲۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد و به کمک هیدروکلریدریک اسید ۰/۱ مولار روی pH ۳ تنظیم شد تا پروتئین رسوب کند و به کمک سانتریفوژبا g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰دقیقه در دما ۲۰درجه سانتی گراد جدا شد در مرحله بعد به کمک سود ۰/۰۱ مولار اسید خنثی شد و ۱۰ سی‌سی سود به آن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شد تا در مرحله بعد به کمک روش Lowery پروتئین آن ارزیابی شود (Safi *et al*., 2014).

- اندازه‌گیری پروتئین به روش لوری

در ابتدا یک میلی لیتر از عصاره به همراه ۰/۹میلی لیتر محلول شماره ۱ (حاوی ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات به همراه ۱۰۰گرم سدیم کربنات و ۵۰۰ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید یک نرمال به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) مخلوط شد و به مدت ۱۰دقیقه در حمام آب ۵۰درجه سانتی گراد قرار گرفت پس از آن تا دمای اتاق خنک شد و به آن ۰/۱ سی‌سی محلول شماره ۲ (حاوی ۲ گرم سدیم پتاسیم تارتارات تتراهیدرات و یک گرم سولفات مس ۵ آبه و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید یک نرمال به حجم ۱۰۰ میلی لیتر) اضافه شد و اجازه داده شد ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی بماند و به سرعت ۳ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (به نسبت ۱:۱۵) به آن اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد عدد جذب آن به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۰ نانومتر قرائت شد. از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد.

- شناسایی وزن ملکولی پروتئین به کمک الکتروفورز

جداسازی و تعیین وزن ملکولی پروتئین با روش الکتروفورز انجام گرفت(Padraigin *et al*., 2013).

برای انجام الکتروفورز پروتئین موردنظر، از ژل SDS-PAGE ناپیوسته استفاده شد. این ژل دارای دو ناحیه با

[1] Celluclast 1.5L

اسیدیته متفاوت و غلظت‌های متفاوتی از محلول آکریل آمید–بیس آکریل آمید است. پروتئین‌ها پس از عبور از ناحیه‌ی بالایی یا ژل متراکم‌کننده[1]، در ناحیه‌ی پایینی یا ژل جداکننده[2]، براساس اندازه از یکدیگر جدا می‌شوند در این مطالعه از ژل متراکم‌کننده با غلظت ۵٪ و ژل جداکننده با غلظت ۱۲٪ برای ردیابی حضور پروتئین در نمونه پروتئینی موردنظر استفاده شد. مواد و مقادیر موردنیاز برای ساخت این دو ناحیه، در جداول ۳ و ۴ ذکر شده است.

جدول ۳- مواد و مقادیر موردنیاز برای ساخت ۱۰ میلی‌لیتر ژل جداکننده با غلظت ۱۲٪.

مواد	غلظت موردنیاز	مقادیر موردنیاز(ml)
آب مقطر	–	۳/۳
آکریل آمید–بیس آکریل آمید	٪۳۰	۴
تریس (pH=۸/۸)	۱۵۰۰mM	۲/۵
SDS	٪۱۰	۰/۱
APS	٪۱۰	۰/۱
TEMED	–	۰/۰۰۴

جدول ٤- مواد و مقادیر موردنیاز برای ساخت ٤ میلی‌لیتر ژل متراکم‌کننده با غلظت ۵٪

مواد	غلظت موردنیاز	مقادیر موردنیاز(ml)
آب مقطر	–	۲/۷
آکریل آمید–بیس آکریل آمید	٪۳۰	۰/۶۷
تریس (pH=۶/۸)	۱۰۰۰mM	۰/۵
SDS	٪۱۰	۰/۰۴
APS	٪۱۰	۰/۰۴
TEMED	–	۰/۰۰۴

- شناسایی پروفایل اسید آمینه‌های ضروری

مقدار اسید آمینه‌های موجود در عصاره استخراج شده به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه گیری شد. نمونه مورد نظر در ۶ میلی‌لیتر هیدروکلریدریک اسید ۶ نرمال مخلوط شده و به مدت ۲۴ ساعت برای تکمیل هیدرولیز پروتئین‌ها داخل حمام آب گرم قرار گرفت و به منظور بهبود فرآیند هر یک ساعت به کمک ورتکس کاملا مخلوط شد. پس از ۲۴ ساعت به مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ g سانتریفوژ شد. محلول رویی به کمک کاغذ صافی فیلتر شده و با سود یک نرمال خنثی شد. سپس محلول فیلتر شده به میزان ۱:۱۰۰ با آب مقطر با درجه خلوصHPLC رقیق شد و به کمک دستگاه HPLC (به کمک دتکتور UV–vis با دو طول موج ۴۴۰ و۵۷۰ نانومتر و ستون تبادل کاتیونی با ابعاد ۲۰۰×۴/۶) آمینواسیدهای پروتئین برآورد شد (Mokni *et al*., 2015).

- تجزیه و تحلیل آماری

بهینه سازی شرایط استخراج آنزیمی به کمک نرم‌افزار Minitab در قالب روش سطح پاسخ طرح مرکب مرکزی طراحی شد و ارتباط بین متغیرهای مستقل و پاسخ‌ها به کمک معادله درجه دوم بدست آمده، بررسی شد. پس از استخراج پروتئین به کمک دو آنزیم ذکرشده جهت بررسی عملکرد آنزیم‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS در قالب طرح تی–استیودنت درصد استخراج پروتئین مورد مقایسه آماری قرار گرفت.

یافته‌ها

- آنالیز ترکیبات اصلی جلبک

در تجزیه نمونه ریزجلبک سندسموس مقدار ماده خشک، چربی، کربوهیدرات کل، پروتئین و خاکستر تعیین شد، نتایج حاصل در جدول ۵ ارائه شده است. این نتایج

[1] Stacking [2] Resolving

نشان دهنده آن است که نزدیک ۲۴٪ از وزن خشک جلبک را پروتئین تشکیل داده است که به نظر می‌رسد محتوی پروتئینی این پژوهش کمتر از سایر مطالعات ارائه شده است که می‌تواند به دلیل تغییرات درجه حرارت، شرایط رشد و محتوی محیط‌کشت ریز جلبک و شرایط آزمایشگاهی متفاوت باشد. روش رایج در اندازه‌گیری میزان پروتئین کجلدال است که کل نیتروژن موجود در نمونه به کمک این روش اندازه‌گیری می‌شود و با استفاده از ضریب تبدیل پروتئین[1] که در این پژوهش معادل ۶/۲۵ بود، میزان تقریبی پروتئین اندازه‌گیری شد. این ریزجلبک حاوی املاح مغذی از جمله فسفر۰/۹۵٪، پتاسیم۰/۷۵٪، آهن ۴۳۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و منیزیم ۱۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد که می‌توان به منظور افزایش این عناصر شرایط محیط کشت را بهبود داد.

جدول ۵- آنالیز شیمیایی ترکیبات ریزجلبک (برمبنا وزن خشک)

ترکیبات موجود در جلبک	درصد
ماده خشک	۹۲/۲۵
پروتئین	۲۳/۷
خاکستر	۴۹/۴۵
چربی	۲ /۱
کربوهیدرات کل	۱۷
فسفر	۰/۹۵
پتاسیم	۰/۷۵

جدول ٦- آنالیز املاح معدنی ریزجلبک

املاح موجود در ریزجلبک	mg/kg
آهن	۴۳۸۰
کلسیم	۱
منیزیم	۱۲۴
روی	۱۰۶
مس	۵۰

- استخراج پروتئین

مطابق جدول ۷ با افزایش غلظت، راندمان استخراج پروتئین افزایش یافته است به طوری که با افزایش غلظت از ۲ به ۶ میکرولیتر بر میلی لیتر راندمان استخراج به کمک آنزیم ویسکوزیم از ۱۵/۲۸ به ۲۷/۸۷ درصد و برای سلولاز از ۱۶/۸۸ به ۲۱/۴۲ درصد به ترتیب افزایش یافته است. به طوریکه این مقدار در تیمار شیمیایی تنها ۱۹/۱۳ درصد بدست آمده است.

- مدل سازی

از مجموع ۲۶ تست انجام شده برای هیدرولیز آنزیمی، مدل ارائه شده در معادلات ۱و ۲ برای آنزیم‌های سلولاز و ویسکوزیم پیشنهاد میگردد. مقدار ضریب همبستگی (R2) برای مدل از فعالیت آنزیم سلولاز۹۸/۹۷ و برای آنزیم ویسکوزیم معادل ۹۴/۷۵ درصد بدست آمد که نشان دهنده ضریب همبستگی بالا بین داده‌های آزمایشی و داده‌های پیش بینی شده توسط مدل و مناسب بودن مدل حاصله می‌باشد. مقدار $P < 0.001$ نشان میدهد که مدل‌های بدست آمده می‌توانند رابطه بین پارامترهای انتخابی رابه خوبی بیان کنند.

$$Y= ۲/۸۴۴+ ۰/۰۱۴۸۶\ X_1 - ۰/۰۱۷\ X_2 - ۰/۰۰۰۰۵\ X_1^2 + ۰/۰۰۵۸\ X_2^2 - ۰/۰۰۰۳۴۶\ X_1X_2$$

(معادله ۱: درصد استخراج پروتئین به کمک ویسکوزیم X_1 = غلظت X_2= زمان)

$$Y= ۰/۷+ ۰/۰۱۷۳۹\ X_1 - ۰/۰۲۳۶\ X_2 - ۰/۰۰۰۰۰۹\ X_1^2 + ۰/۰۰۶۹۷\ X_2^2 - ۰/۰۰۰۳۳۸\ X_1X_2$$

(معادله ۲: درصد استخراج پروتئین به کمک سلولاز X_1 = غلظت X_2= زمان)

با توجه به نتایج بدست آمده (جداول ۸ و۹) مهمترین فاکتور اثرگذار بر راندمان استخراج پروتئین، غلظت آنزیم به کار رفته نسبت به سوبسترا می‌باشد که هم به صورت خطی و هم درجه دو بر روی میزان استخراج پروتئین اثرگذار بود و در سطح احتمال ۹۵٪ معنا دار است درحالی که با افزایش مدت زمان اثر آنزیم راندمان استخراج افزایش یافته است اما این افزایش از نظر آماری معنا دار نبوده است.

همانطور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهد می‌گردد با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا و مدت زمان هیدرولیز، درصد استخراج پروتئین به صورت خطی افزایش می‌یابد. این مشاهده نشان می‌دهد که استفاده از غلظت بالاتر آنزیم سبب استخراج بیشتر پروتئین از ریزجلبک خواهد شد.

[1] Nitrogen-to-Protein Conversion Factor

افزایش مدت زمان هیدرولیز نیز تاثیر مثبت بر راندمان استخراج داشته اما این تاثیر مثبت پس از مدت تقریبا ۲/۵ ساعت از نظر آماری معنی دار نبوده است، به دلیل آن که ۸۰٪ فعالیت آنزیم در یک ساعت اول بر سوبسترا اعمال می‌شود.

جدول ۷ - درصد پروتئین محلول حاصل از تیمار آنزیمی

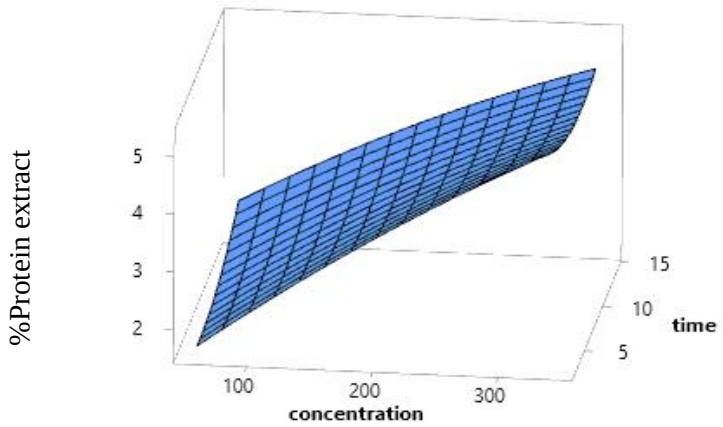
تیمار	درصد پروتئین استخراج شده باویسکوزیم (exp)	درصد پروتئین استخراج شده (pre)	راندمان استخراج ویسکوزیم	درصد پروتئین استخراج شده باسلولاز (exp)	درصد پروتئین استخراج شده (pre)	راندمان استخراج سلولاز
۱	۱/۹۱	۲/۱۱	۸/۳۱	۱/۷۶	۱/۷۸۵	۷/۶۶
۲	۲/۴۸	۲/۴۹	۱۰/۷۶	۲/۲۵	۲/۲۲۷	۹/۷۸
۳	۳/۹۴	۳/۷۸	۱۷/۱۲	۳/۶۳	۳/۶۲۹	۱۵/۷۸
۴	۳/۱۹	۲/۸۴	۱۳/۸۸	۲/۶۷	۲/۶۶۱	۱۱/۶۱
۵	۳/۶۲	۳/۶۸	۱۵/۷۴	۳/۴۱	۳/۵۲۲	۱۴/۸۲
۶	۳/۸۴	۳/۶۸	۱۶/۶۷	۳/۶	۳/۵۲۲	۱۵/۶۳
۷	۳/۵۱	۳/۶۸	۱۵/۲۶	۳/۴۱	۳/۵۲۲	۱۴/۸۳
۸	۳/۵۸	۳/۶۸	۱۵/۵۷	۳/۴۳	۳/۵۲۲	۱۴/۹۰
۹	۳/۸۴	۳/۶۸	۱۶/۶۷	۳/۷۶	۳/۵۲۲	۱۶/۳۷
۱۰	۳/۵۱	۳/۸۶	۱۵/۲۷	۳/۸۸	۳/۸۶۱	۱۶/۸۸
۱۱	۵/۰۳	۵/۰۲	۲۱/۸۷	۴/۹۳	۴/۸۸۴	۲۱/۴۲
۱۲	۴/۸۱	۴/۶۱	۲۰/۸۹	۴/۵۴	۴/۵۸۲	۱۹/۷۷
۱۳	۴/۶۷	۴/۸۳	۲۰/۳۲	۴/۶۶	۴/۶۸۹	۲۰/۲۵
تیمار شیمیایی	۴/۴		۱۹/۱۳	-		-

جدول۸ - آنالیز واریانس (ANOVA) تاثیر غلظت و زمان بر راندمان استخراج پروتئین محلول به کمک آنزیم ویسکوزیم

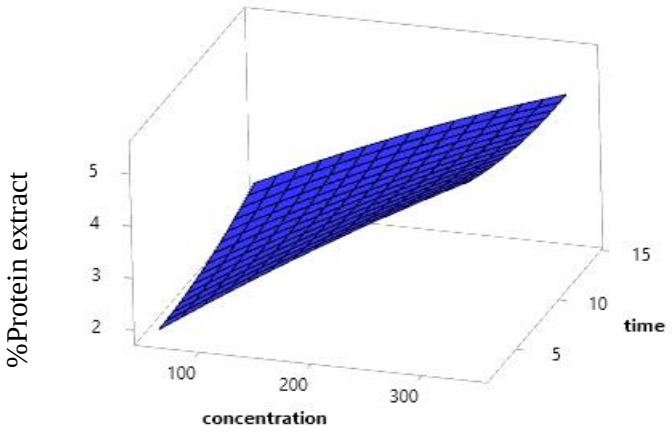
	Df	Sum of squire	Mean squire	F value	P value
Model	5	8.570	1.715	22.85	0.000
Linear	2	8.410	4.205	56.07	0.000
Concentration	1	8.405	8.405	112.07	0.000
Time	1	0.0049	0.0049	0.07	0.804
Square	2	0.0839	0.042	0.56	0.041
concentration*concentration	1	0.0147	0.0147	0.20	0.049
time*time	1	0.0599	0.0599	0.8	0.401
2-Way Interaction	1	0.0765	0.0765	1.02	0.346
concentration*time	1	0.0765	0.0765	1.02	0.346
Error	7	0525	0.075		
Lack-of-Fit	3	0.4086	0.136	4.68	0.085
Pure Error	4	0.116	0.029		
Total	12	9.0945			
R-sq	94.75%				
R-adj	94.05%				
C.V	0/8067				

جدول ۹- آنالیز واریانس (ANOVA) تاثیر غلظت و زمان بر راندمان استخراج پروتئین محلول به کمک آنزیم سلولاز

	Df	Sum of squire	Mean squire	F value	P value
Model	5	9.894	1.98	135.02	0.000
Linear	2	9.652	4.83	329.29	0.000
Concentration	1	9.599	9.598	654.94	0.000
Time	1	0.0533	0.0533	3.64	0.098
Square	2	0.169	0.085	5.77	0.033
concentration*concentration	1	0.061	0.061	4.15	0.021
time*time	1	0.086	0.086	5.90	0.045
2-Way Interaction	1	0.073	0.073	4.97	0.061
concentration*time	1	0.073	0.073	4.97	0.061
Error	7	0.103	0.015		
Lack-of-Fit	3	0.0063	0.0021	0.09	0.963
Pure Error	4	0.096	0.024		
Total	12	9.997			
R-sq	98.97%				
R-adj	98.24%				
C.V	0.8131				



شکل ۱- نمودار سه بعدی سطح پاسخ تاثیر دما و غلظت آنزیم سلولاز بر راندمان استخراج پروتئین محلول



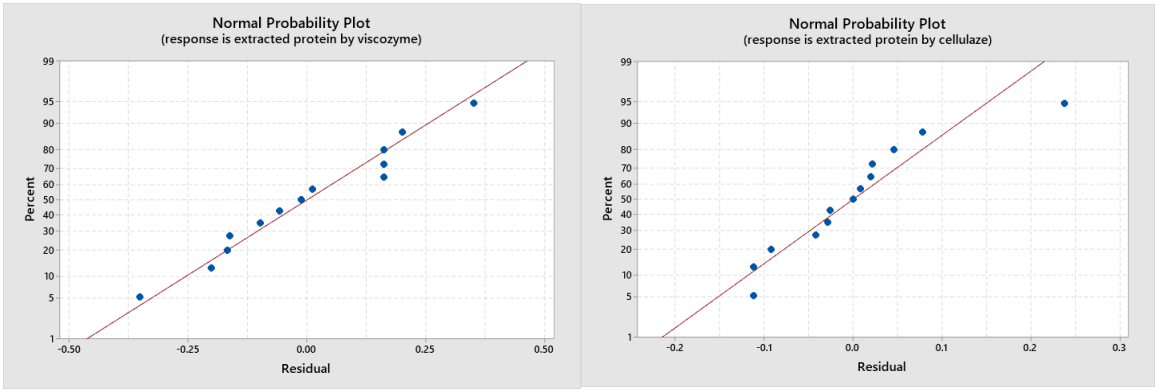
شکل ۲- نمودار سه بعدی سطح پاسخ تاثیر دما و غلظت آنزیم ویسکوزیم بر راندمان استخراج پروتئین محلول

نتایج بدست آمده از نمودار نرمال پلات (شکل ۳) بیانگر آن است که داده‌ها و همچنین باقیمانده‌های آزمایشی نرمال بوده و نهایتا واریانس‌ها نیز همانطور که در نمودار ورساس فیت مشاهده (شکل ۴) می‌شود ثابت است. لذا با توجه به نتایج بدست آمده، مدل توانسته داده‌ها را پوشش دهد و رفتار فاکتورها را به خوبی توصیف کند.

- بهینه سازی

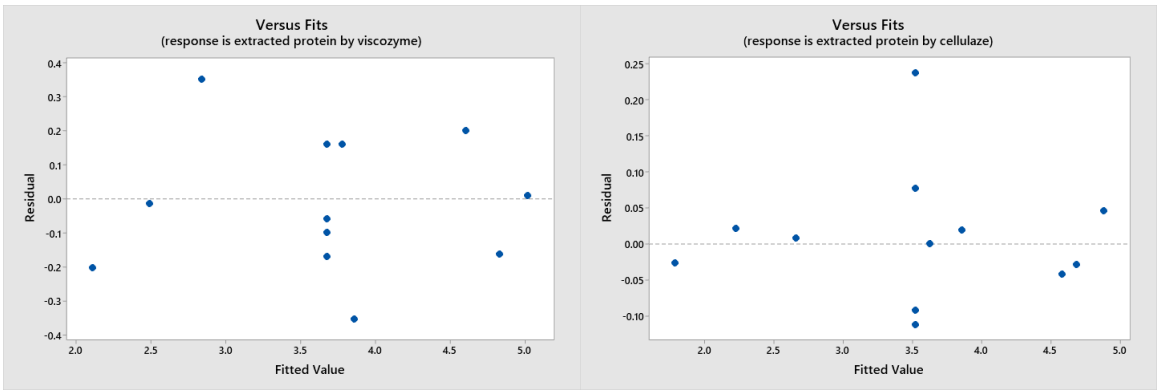
به منظور تایید صحت و دقت مدل، علاوه بر آزمایشات طراحی شده، آزمون‌های اضافی که به نقاط کنترلی معروفند انجام گرفت نتایج حاصل از آزمایشات در جدول ۱۰ ارائه شده است. نتایج فرایند بهینه سازی نشان داد زمان بهینه جهت استخراج بالاترین میزان پروتئین، ۲/۳۴ ساعت با غلظت ۶/۸۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر برای هر یک از آنزیم‌ها می‌باشد. با توجه به این داده ها، نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از پیش‌بینی مدل مطابقت داشته و در نتیجه اثبات می‌کند که مدل قوی بوده و برای تخمین نتایج آزمایش قابل کاربرد است.

نتایج آنالیز تی استیودنت (F =۰/۰۳۱) نشان داد نوع آنزیم به کار رفته در آنالیز آنزیمی درافزایش راندمان استخراج اثر معنی‌داری نداشته است. که این می‌تواند به دلیل سلولزی بودن دیواره ریزجلبک باشد که باعث شده سایر آنزیم‌های موجود در ویسکوزیم (پکتیناز، زایلاناز و سایر کربوهیدراتازها) اثر معنی‌داری در شکست دیواره سلولی نداشته باشند. (جدول ۱۱).



(b) (a)

شکل۳- نمودار نرمال پلات تاثیر دما و غلظت بر فعالیت سلولاز (a)و ویسکوزیم(b) بر راندمان استخراج پروتئین محلول



(b) (a)

شکل٤- نمودار ورساس فیت تاثیر دما و غلظت بر فعالیت سلولاز (a)و ویسکوزیم(b) بر راندمان استخراج پروتئین محلول

جدول ۱۰- سطوح بهینه شده

آنزیم	هدف نهایی	سطح پایین	سطح هدف	فیت	غلظت	زمان	٪۹۵CI	٪۹۵PI
سلولاز	ماکسیمم	۱/۷۶	۴/۹۳	۵/۲۶	۶/۸۳	۲/۳۴	(۴/۸۴ ،۵/۶۹)	(۵/۷۵ ،۴/۷۵)
ویسکوزیم	ماکسیمم	۱/۹۱	۵/۰۳	۵/۴۰	۶/۸۳	۲/۳۴	(۴/۸۹ ،۶/۳۲)	(۶/۵۱ ،۴/۳۰)

نتایج حاصل از استخراج شیمیایی نمونه‌ها نشان داده راندمان استخراج ۱۹/۱۳ بوده است این اختلاف زیاد به دلیل ضایعات بالا استخراج پروتئین در این شرایط می‌باشد و در مقایسه با تیمار آنزیمی، تیمار شیمیایی فرایندی زمانبر می‌باشد.

در مرحله بعد پروتئین استخراج شده از بهترین تیمار، به کمک خشک‌کن انجمادی پودر شد و مورد آزمون‌های بعدی قرار گرفت.

- آنالیز آمینواسید

پروتئین فاکتور اصلی در محصولات غذایی از نظر ارزش تغذیه ای محصول می‌باشد که نه تنها مقدار آن بلکه کیفیت پروتئین نیز بسیار حائز اهمیت است. کیفیت پروتئین معمولا از منظر مقدار و ترکیب آمینواسید ضروری آن ارزیابی می‌شود. ۹ آمینواسید اصلی که به عنوان آمینواسید ضروری برای انسان در نظر گرفته می‌شود شامل هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و والین می‌باشند. نتایج پژوهش نشان داد این ریزجلبک حاوی اسیدآمینه‌های ضروری نظیر والین، ترئونین، فنیل آلانین، لیزین، لوسین و ایزولوسین و هیستیدین و نیز اسید آمینه‌های غیر ضروری آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، آرژنین، گلیسین، پرولین، آلانین، سرین و تیروزین بوده است (جدول۱۲). که از این میان فنیل آلانین و لوسین فراوانترین آمینواسید ضروری و نیز آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید فراوان‌ترین اسید آمینه غیر ضروری می‌باشند. عدم حضور متیونین در این جلبک می‌تواند به دلیل تجزیه آن طی هیدرولیز اسیدی و یا ناشی از غیرقابل ارزیابی بودن مقدار این ترکیب دانست. این نتایج نشان می‌دهد این ریزجلبک قادر به تامین آمینواسیدهای ضروری مورد نیاز انسان می‌باشد. فراوانی اسیدآمینه‌های آسپارتیک و گلوتامیک اسید در مقایسه با اسیدآمینه‌های بازی سبب بروز طعم و مزه خاصی می‌شود که در صنعت غذا کاربرد دارد.

جدول ۱۱- آنالیز آماری به روش تی استیودنت

پروتئین	F	Sig.	T	Sig.(2-tailed)	اختلاف میانگین
مقادیر واریانس برابر	۰/۰۳۱	۰/۸۶۲	۰/۴۳۷	۰/۶۶۶	۰/۱۵۳
مقادیر واریانس غیر برابر			۰/۴۳۷	۰/۶۶۶	۰/۱۵۳

جدول۱۲- آنالیز آمینواسیدهای ضروری و غیرضروری ریز جلبک سندسموس

ترکیب آمینواسید ضروری ریز جلبک	میلی گرم در گرم نمونه جلبک	میلی گرم در گرم پودر پروتئین	مرجع ارائه شده توسط FAO/WHO		شاخص شیمیایی پودر پروتئین
والین	۱۰/۱۸	۱۱/۲۸	۳۵		۰/۳۲
فنیل آلانین	۱۰/۹۶	۲۲/۹۱	۶۳**		۰/۴۶۴
ایزولوسین	۵/۵۸	۴/۵۳	۲۸		۰/۱۶۲
لوسین	۱۵/۸۲	۱۳/۵۵	۶۶		۰/۲۱
لیزین	۸/۱۱	۱۰/۰۴	۵۸		۰/۱۸
تریپتوفان	۱	۱	–		
هیستیدین	۲/۵۳	۵/۴۴	–		
ترئونین	۲/۰۶	۳/۶۱	۳۴		۰/۱۰۵
متیونین	۴/۲۹	۱/۱۹	۲۵***		۰/۰۵
آسپارتیک اسید	۲/۷۶	۲۶/۹۳	-	-	-
گلوتامیک اسید	۱۰/۰۴	۱۹/۸۲	-	-	-
سرین	۷/۴۱	۱۹/۸	-	-	-
پرولین	۸/۹۶	۱۰/۴۲	-	-	-
آرژنین	۹/۱	۹/۷۹	-	-	-
گلایسین	۹/۴۵	۱۴/۸۲	-	-	-
آلانین	۱۴/۹	۱۱/۸۳	-	-	-
تایروزین	۵	۶/۱۳	-	-	-

** مجموع فنیل آلانین و تیروزین

*** مجموع متیونین و سیستئین

- **تعیین وزن ملکولی پروتئین به روش الکتروفورز**

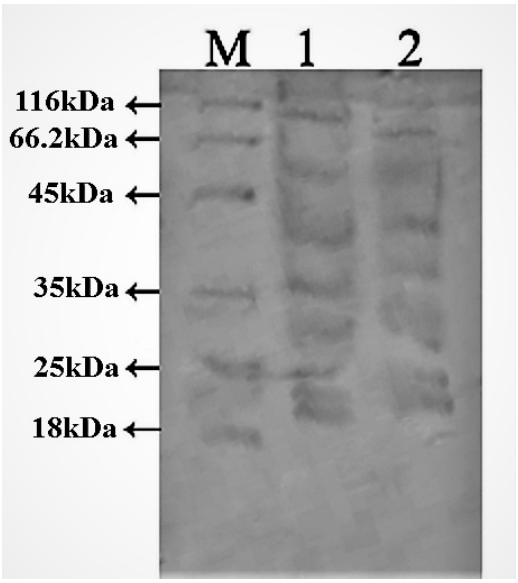
با توجه به نتایج بدست آمده (شکل۳) به روش SDS-page پروتئین این ریزجلبک حاوی ۸ باند پروتئینی با وزن ملکولی بین ۲۰-۱۱۰ کیلودالتون (kDa) است.

بحث

با توجه به وضعیت جغرافیایی و پتانسیل‌های زیستی ایران و نیازهای روز افزون تغذیه ای، شناسایی منبع جدید پروتئینی از گونه جلبک بومی و سازگار ایران با خواص تغذیه‌ای مطلوب به منظور استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی این امکان را فراهم میسازد تا از منابع طبیعی بومی، نیازهای تغذیه‌ای داخلی فراهم گردد. همچنین بهینه سازی شرایط استخراج پروتئین و تهیه ایزوله پروتئینی از این ترکیبات ونیز کاهش هزینه‌های تولیدی، می‌تواند زمینه تهیه ایزوله پروتئینی در ایران را فراهم سازد.

ریزجلبک سندسموس حاوی یک دیواره سخت سلولزی میباشد که این لایه در ترکیب با پکتین ایجاد ماتریکس پکتین سلولز و دیواره مولتی سلولار روی سطح سلولی ریزجلبک میکند تنها زمانی راندمان استخراج پروتئین افزایش میابد که فرایند شکست دیواره به خوبی صورت پذیرد. در تیمار شیمیایی جهت رفع این مشکل نیازمند اعمال فرایندهای سختگیرانه تر نظیر افزایش دما تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد هستیم که میتواند منجر به تغییر ساختار ملکولی پروتئین گردد لذا در این تحقیق برای اولین بار به بررسی و بهینه سازی شرایط استخراج آنزیمی پروتئین ریزجلبک سندسموس به کمک طراحی آماری به روش سطح پاسخ پرداخته شده است. به کمک این طرح آماری می‌توان آثار اصلی و برهمکنش فاکتورها را بر متغیرهای وابسته، با حداقل آزمایش را تعیین نمود. نتایج حاصل از تحقیق بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی فرایند استخراج می‌باشد.

از میان شرایطی که برای استخراج پروتئین محلول در ریزجلبک سندسموس اعمال شد مشخص گردید که راندمان استخراج از میزان غلظت آنزیم در سوبسترا تاثیر می‌پذیرد و با توجه به تجزیه واریانس اثر غلظت بر میزان استخراج به صورت خطی و درجه دوم بیشترین تاثیر مثبت را روی پاسخ داشته است. بهینه شرایط محاسبه شده ۶/۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲/۳۴ ساعت به ازای ۰/۵ گرم ماده خشک بدست آمد و منجر به افزایش درصد استخراج پروتئین به میزان ۱/۴۵۶ برابر تیمار شیمیایی شده است. نتایج فرایند استخراج پروتئین نشان داد تیمار آنزیمی میتواند راندمان استخراج پروتئین را نسبت به استخراج شیمیایی افزایش دهد و باعث کاهش مصرف انرژی و زمان استخراج شود این نتایج مطابق با نتایج مهر و همکاران



شکل۵ - پروفایل آمینواسیدهای پروتین ریزجلبک سندسموس M مارکر ۱) پروتئین استخراج شده از ریزجلبک ۲) ریزجلبک

۲۰۱۶ می‌باشد که نشان دادند پیش تیمار آنزیمی می‌تواند راندمان تولید پروتئین جلبک قرمز Palmaria palmata را تا ۱/۶ برابر افزایش دهد (Maehre *et al.*, 2016). بایستی اشاره کرد که هدف از انجام این تحقیق یافتن شرایط تاثیرگذار روی تجزیه دیواره سلولی ریزجلبک سندسموس آبلیکوس و همچنین استخراج پروتئین محلول از آن به عنوان یک پژوهش آغازین بود. که انجام تحقیقات گسترده‌تر در این رابطه ضروری جلوه می‌کند.

- شناسایی پروفایل پروتئینی

فیکوبیلی‌پروتئین‌ها، پروتئین‌های اسیدی هستند که pH ایزوالکتریک آنها ۴/۵ می‌باشد و حاوی واحدهای پپتیدی β وα (۱:۱) با وزن ملکولی kDa ۱۶–۱۷و kDa ۱۹– ۱۸به ترتیب می‌باشند(Stadnichuka, 2017). نتایج نشان می‌دهد پروتئین این نمونه حاوی باندهای ۱۸، ۲۱، ۳۰ و ۳۵ کیلودالتون می‌باشد که نشان دهنده واحدهای α، β وγ فیکوبیلین‌ها می‌باشد. این نتایج مطابق با نتایج بدست آمده نیر و همکاران در سال ۲۰۱۸ می‌باشد (Divya Nair, 2018).

- تعیین شاخص شیمیایی پروتئین

شاخص شیمیایی[1] معیاری است برای ارزیابی کیفیت پروتئین که در محصولات غذایی استفاده می‌شود این اندیس بر اساس نسبت هر اسیدآمینه ضروری در منبع پروتئینی مورد نظر و اسیدآمینه ضروری در پروتئین مرجع مطرح شده توسط سازمان غذا و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی محاسبه می‌شود. مقدار این اندیس برای پروتئین‌های حیوانی حدود ۱ است و برای پروتئینن غلات بین ۰/۶– ۰/۴ و برای ریز جلبک سندسموس در این تحقیق ۰/۴–۰/۲ بدست آمده است(Maehre, 2014) . و با توجه به نتایج به دست آمده از این گونه ریزجلبک می‌توان به عنوان یک منبع خوب پروتئینی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به دلیل افزایش جمعیت دنیا (پیش‌بینی می‌شود طی ۴۰ سال آینده جمعیت جهان به ۹/۱ بیلیون نفر برسد) نیاز به مواد غذایی رو به رشد است. این افزایش نشان دهنده ضرورت شناسایی منابع غذایی جدید با ارزش تغذیه‌ای بالا و نیز محصولاتی غیر سمی و دوستدار محیط زیست می‌باشد. درنتیجه منجربه گسترش مطالعات درباره ترکیبات طبیعی و افزایش توجه به جلبک به عنوان منبعی طبیعی شده است (Maehre *et al.*, 2014). ریزجلبک‌های سبز صدها سال است به عنوان مکمل غذایی در کشورهای آسیایی مصرف می‌شوند و امروزه به عنوان یک منبع ارزشمند تغذیه‌ای در سراسر جهان گسترش یافته‌اند. این منابع نشان داده اند منبع غنی از پروتئین، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین‌ها و ترکیبات فنلی هستند. لذا در این تحقیق امکان تهیه پروتئین از ریز جلبک سندسموس آبلیکوس مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به مقدار پروتئین بدست آمده و کیفیت مناسب اسیدآمینه موجود در این ریزجلبک، استخراج پروتئین از این جلبک به عنوان یک منبع نوین پیشنهاد می‌گردد.

استخراج به روش آنزیمی میتواند علاوه بر صرفه‌جویی در وقت و هزینه تولید، راندمان استخراج پروتئین را نیز افزایش دهد. مهمترین عامل اثرگزار بر استخراج پروتئین نسبت آنزیم به سوبسترا است. و با توجه به ماهیت دیواره سلولی این ریز جلبک (ماتریکس پکتین– سلولز) و با توجه به نتایج بدست آمده سلولاز می‌تواند به عنوان آنزیم مناسب تخریب دیواره این ریزجلبک به کار گرفته شود.

بررسی‌های انجام گرفته روی پروتئین نشان می‌دهد پروتئین موجود در این ریزجلبک فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند، پروتئین‌هایی محلول در آب که قادرند انرژی خورشید را دریافت کرده (به عنوان منبع جذب نور) و در طول فرایند فتوسنتز و تولید کلروفیل انتقال دهند. با توجه به آنالیز آمینواسیدهای موجود در این ریزجلبک، این منبع قادر به تامین آمینواسیدهای ضروری نظیر والین، ترئونین، فنیل آلانین، لیزین، لوسین و ایزولوسین و هیستیدین مورد نیاز انسان می‌باشد با شاخص شیمیایی معادل ۰/۴– ۰/۲ که نشان دهنده کیفیت تغذیه‌ای پروتئین‌های بدست آمده می‌باشد و می‌تواند نیاز پروتئینی را در مواد غذایی تامین کند. همچنین فراوانی اسیدآمینه‌های غیر ضروری شامل آسپارتیک و گلوتامیک اسید در مقایسه با اسیدآمینه‌های

[1] Chemical Score

بازی سبب بروز طعم و مزه خاصی می‌شود که در صنعت غذا کاربرد دارد.

سپاسگزاری

با تشکر از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان که در زمینه انجام امور اجرایی این پژوهش همکاری لازم را داشته‌اند.

منابع

Aiking, H. (2011). Future protein supply. Trends in Food Science and Technology 22, 112-120.

Al-Shamsi, K., Mudgil, P., Hassan, H. M. & Maqsood, S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model systems. American Dairy Science, 101,1-14.

Al-Zuhair, S. & Ashraf, S. (2016). Enzymatic Pre-treatment of Microalgae Cells for Enhanced Extraction of Proteins. Engineering in Life Sciences, 1-22.

Doucha, J. & Livansky, K. (2014). Influence of processing parameters on disintegration of Chlorella cells in various types of homogenizers. Applied Microbiology and Biotechnology, 81, 431–440.

Estrada, J. E. P., Bescos, P.B. & Fresno, A. M. V. (2001). Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract. Il Farmaco, 56, 497-500.

FAO/WHO. (2002). Protein quality. Report of Joint FAO/WHO expert consultation.

Fleurence, J. (1999). The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility? Applied Phycology, 11, 313–314.

Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T. & Hirokawa, T. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from Spirulina platensis with ultrasonic cell disruption. Applied Phycology, 15, 319–324.

Guil-Guerrero, G. L. & Navarro-Juarez, R. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. Food Engineering, 65, 511-517.

Guil-Guillermo, J. L., Navarro-Juarez, R., Lopez-Martinez, J. C., Campra-Madrid, P. & Rebolloso-Fuentes, M. M. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. Food Engineering, 65, 511-517.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature. 227, 680–685.

Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y. & Ahn, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource Technology, 101, S75–S77.

Lourenço, O., Barbarino, E., Joel, C., De-Paula Pereira, L. & Ursula, M. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. Phycological Research, 233–241.

Maehre, H. K., Jensen, I. J. & Eilertsen, K. E. (2014). characteristic of protein lipid and mineral content in common Norwegian seaweed and evaluation of thaire potential as food and feed. Science Food Agriculture, 94, 3281-3290.

Maehre, H. K., Jensen, I. J. & Eilertsen, K. E. (2016). Enzymatic pre treatment increases protein bio accessibility and extractability in dulse (palmaria palmate). Drugs, 14, 196.

Mokni ghribi, A., Maklouf gafci, I. & Blecker, C. (2015). Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. Food Engineering, 1-42.

Moure, A., Domínguez, H. & Parajó, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltrationrecovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry, 41, 447–456.

Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N., Wijesekara, I. & Kim, S. K. (2012). Biological activities and potential health benefits bioactive peptides derived from marine organisms. International Journal of Biological Macromolecules, 51, 378–383.

Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E. & Abu, G. O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative Spirulina sp. Bioresour Technology, 98, 2207–2211.

Padraigin, A., Harnedy, R. & FitzGerald, J. (2013). Extraction of protein from the macroalga Palmaria palmata. Food Science and Technology, 51, 375-382.

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y. & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties.

Food International Research, 38, 175–182.

Rangel-Yagui, C. O., Danesi, E. D. G., Carvalho J. C. M. & Sato, S. (2004). Chlorophyll production from Spirulina platensis: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresour Technology, 92, 133–141.

Rebolloso-Fuentes, M. M., Acien-Fernandez, F. G. & Sanchez-Perez, J. (2000). Biomass Nutrient Profiles of the microalga Porphyridium cruentum. Food Chemistry, 70, 345–353.

Rebolloso-Fuentes, M. M., Garca-Camacho, F., Navarro Garcıa, A. & Guil-Guerrero, J. L. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga Nannochloropsis spp. Agricultural and Food Chemistry, 49, 2966–2972.

Safi, C. & Violeta, A. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. Algal Research, 3, 61–65.

Sari, Y. W., Bruins, M. E. & Sanders, J. P. M. (2013). Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. Industrial Crops and Products, 43, 78–83.

Sarmadi, B. H. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. Peptides, 31, 1949-1956.

Schwenzfeier, A. (2013). Physico-chemical and techno-functional properties of proteins isolated from the green microalgae Tetraselmis sp. thesis, Netherland: Wageningen University.

Seneviratene, M. & Jea-Young, J. (2010). Enzymatic extract from edible red algae, porphyra tenera and their antioxidunt, anti acetylcholinesterase, and anti inflammatory activities. Food Science, 19, 1551-1557.

Waghmare, A. G., Salve, M. K., LeBlanc, J. G. & Arya, S. S. (2016). Concentration and characterization of microalgae proteins from Chlorella pyrenoidosa. Bioresour and Bioprocessing, 3, 1-11.

Yang, Z. K., Ma, Y., Zheng, J., Yang, W., Liu, J. & Li, H. (2013). Proteomics to reveal metabolic network shifts towards lipid accumulation following nitrogen deprivation in the diatom Phaeodactylum tricornutum. open access at Springer, 1-10.

Zheng, H., Yin, J., Gao, V., Huang, H. & Dou, C. (2011). Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164, 1215–1224.

Optimization of Enzymatic Protein Extraction Conditions and Identification of Microalgae Proteins

M. Amiri [a], S. E. Hoseini [b*], B. Khayambashi [c], G. H. Asadi [d]

[a] Ph D. Student of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Assistant Professor of Soil and Water Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.

[d] Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 26 January 2020 Accepted: 25 April 2020

Abstract

Introduction: The aim of this research work is to optimize the extraction conditions of *Scenedesmus Obliquus* algae protein by enzymatic and alkaline methods using response surface technique and to investigate the extracted protein's functional properties.

Materials and Methods: Optimization of enzymatic protein extraction using Minitab software with central composite response surface methodolog was designed for enzyme to substrate ratio factors and enzyme's effective time (cellulose enzymes and multi-enzymes under optimum pH conditions) followed by optimization of the best treatment for the maximum extraction efficiency in the shortest time and finally the extracted proteins were identified by electrophoresis.

Results: The results showed that, the higher the enzyme concentration, the higher the extraction rate and the protein extraction efficiency, therefore with an increase in the concentration from 4 to 6 µl/ml, the efficiency of the extraction is increased from 15.28 to 27.87 percent using multienzyme, and it increased from 16.88 to 21.42 percent using cellulase. The optimum conditions calculated at the highest concentration and lowest response time were 4 µg / ml for 2.34 hours. The results obtained from the chemical extraction of samples indicated that, the extraction efficiency was calculated as 19.13 percent. The results of electrophoresis analysis showed that the proteins extracted from this microalga contained 8 protein bands with molecular weight ranging from 20 to 110 kDa.

Conclusion: Enzymatic extraction of proteins indicated a better yield as compared to chemical extraction and also considering the economical aspects this method of extraction is suggested.

Keywords: *Cellulase, Extraction, Electrophorese, Identification of Protein, Multienzyme.*

* Corresponding Author: ebhoseini@srbiau.ac.ir