استفاده از دو گونه باکتری لاکتیک به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته از آب ماهی تغلیظ شده کارخانجات پودر ماهی کیلکا

حمیدرضا پردلی [a*]، رضا صفری [b]، سید حسین حسینی [c]

[a] عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

[b] عضو هیات علمی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

[c] عضو هیات علمی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۱۰

چکیده

مقدمه: یکی از مشکلات عمده که در کارخانجات پودر ماهی کیلکا وجود دارد آب ماهی تغلیظ شده (stick water) است که علاوه بر مشکلات زیست محیطی، به لحاظ وجود باکتری‌های پروتئولیتیک، بوی بسیار زننده‌ای در اطراف کارخانه به وجود می‌آورد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (*Lactobacillus bulgaricus*) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum*) به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته از آب ماهی تغلیظ شده استفاده گردید. پس از سازگاری لاکتوباسیل‌ها به مخلوط stick water و آب مقطر، باکتری‌ها با غلظت مشخص به stick water اضافه شده و در زمان‌های مختلف، میزان رشد باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از به پایان رسیدن فرآیند تخمیر، عمل استخراج و لیوفیلیزاسیون پروتئین حاصل انجام شد و اسیدهای آمینه، درصد پروتئین، رطوبت، چربی و خاکستر تعیین شد.

یافته‌ها: میزان تولید محصول برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم بین ۱۳ تا ۱۵ گرم در لیتر و برای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بین ۱۶ تا ۱۹ گرم در لیتر بوده که با اضافه نمودن گلوکز به ترتیب به ۲۰ تا ۲۲ و ۲۱ تا ۲۵ گرم در لیتر افزایش داشت. تغییرات بین تولید پروتئین در دو باکتری معنی‌دار نبود. میانگین پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در محصول تولید شده به ترتیب ۸۲/۲۶، ۱/۰۲، ۰/۵۴ و ۱۵/۵۸ درصد بود. این در حالیست که میانگین مقادیر فوق در stick water اولیه به ترتیب ۵/۱۵، ۲/۲۶، ۹۲ و ۰/۵۷ درصد بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج آنالیز کمی و کیفی اسیدهای آمینه نشان داد که اکثر اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده وجود داشته که قابل مقایسه با استاندارد FAO /WHO می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *آب ماهی تغلیظ شده، پروتئین تک‌یاخته، لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: hr.pordeli@gorganiau.ir

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

واژه پروتئین تک سلولی (SCP) به سلول های خشک شده میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری ها، مخمرها، کپک‌ها، جلبک‌ها، آکتینومیست ها و قارچ‌های عالی‌تر اطلاق می‌شود که در مقیاس بزرگ‌تری کشت داده شده و به عنوان منبع پروتئینی برای انسان یا حیوان مورد استفاده قرار می گیرند (Ashy & Abou-Zeid, 1982; Gildberg, 1992; Griffits, 1992). میکروارگانیسم‌ها دارای مقادیر زیادی از پروتئین (در حدود ۳۵ تا ۷۵ درصد) در ماده خشک فرآورده‌های SCP می‌باشند. امکان رشد و تکثیر موجودات میکروسکوپی مفید بر روی ضایعات و فرآورده‌های زائد کشاورزی و صنعتی وجود داشته که این مهم از یک سو امکان تولید پروتئین مورد نیاز حیوان و انسان را فراهم آورده و از سوی دیگر ضمن دفع ضایعات فوق، ارزش افزوده بالایی را برای آن‌ها فراهم می‌کند. در بسیاری از موارد، فرآورده‌های SCP به لحاظ ارزش پروتئینی و کیفیت، قابل مقایسه با پروتئین موجود در سایر منابع پروتئینی نظیر گوشت می‌باشند (El Saadany *et al*., 1988; Kurbanoglu *et al*., 2002; Storebakken *et al*., 1998). در جدول ۱ ترکیب مواد مختلف در پروتئین تولید شده از جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها مشخص گردیده است.

در دریای خزر ۳ نوع ماهی کیلکا وابسته به جنس Clupeonella وابسته به خانواده شک ماهیان یا هرینگ‌ها Clupeidae به نام های کیلکای آنچوی (*C.engrauliformis*)، چشم درشت (*C.grimmi*) و معمولی (*C.delicatula*) زندگی می‌کنند. میزان صید کیلکا در سال ۱۳۸۶، ۱۵۱۶۷ تن بوده که ۹۶٪ از آن در کارخانه های منطقه به پودر ماهی تبدیل می‌شود. در حالی‌که این ماهی سرشار از پروتئین و اسیدهای چرب ضروری امگا ۳ و ۶ بوده و مطالعات نشان داده است که درصد اسیدهای چرب ضروری این ماهی از ماهیان خاویاری بیشتر می‌باشد. در جدول ۲ به برخی از

جدول ۱- ترکیب مواد مختلف در پروتئین تولید شده از جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها *

فاکتور	درصد ترکیب وزنی		
	جلبک	قارچ	باکتری
پروتئین خام	۴۰-۶۰	۳۰-۷۰	۵۰-۸۳
ازت کلی (پروتئین+ اسیدهای نوکلئیک)	۴۵-۶۵	۳۵-۵۰	۶۰-۸۰
لیزین	۴/۶-۷	۶/۵-۷/۸	۴/۳-۵/۸
متیونین	۱/۴-۲/۶	۱/۵-۱/۸	۲/۲-۳
چربی/ لیپید	۵-۱۰	۵-۱۳	۸-۱۰
کربوهیدرات	۹	NA [۲]	NA
رنگدانه‌های صفراوی و کلروفیل	۶	NA	NA
اسیدهای نوکلئیک	۴-۶	۹/۷	۱۵-۱۶
املاح معدنی	۷	۶/۶	۸/۶
اسیدهای آمینه	NA	۵۴	۶۵
خاکستر	۳	NA	NA
رطوبت	۶	۴/۵-۶	۲/۸
فیبر	۳	NA	NA
فسفر	۰/۲	۳/۰	۰/۴-۴/۵۰
گوگرد	۰/۲-۱/۰	۰/۰۱-۰/۲۴	۰/۱-۰/۵
پتاسیم	۱/۰	۴/۵	۱/۲-۴/۵
سدیم	۰/۵-۱/۰	۰/۰۱-۰/۱	۰/۰۲-۰/۵
کلسیم	۱۰/۱	۰/۱-۰/۳	۰/۱-۱/۴

*درصد بر حسب نوع سوبسترای مورد استفاده، نوع ارگانیسم و شرایط کشت متغیر می‌باشد، NA : غیر قابل دسترس

jftn.srbiau.ac.ir

جدول ۲- برخی از خصوصیات شیمیایی سه گونه از کیلکای دریای خزر

گونه ماهی	رطوبت (٪)	پروتئین (٪)	چربی (٪)	مواد معدنی (٪)	کالری	امگا-۳	امگا-۶
معمولی	۶۸-۷۶	۱۶-۱۸	۵/۵-۱۱	۲/۵-۳	۱۴۶/۴	۱۸۸۰	۳۳۰
چشم درشت	۷۲-۸۰/۴	۱۳/۸-۱۶/۸	۱/۷-۹/۶	۲/۶-۳/۴	۱۱۵/۳	۱۷۲۰	۳۱۵
آنچوی	۷۳/۹-۷۷/۵	۱۷/۳-۱۸/۸	۱/۹-۵/۹	۲/۳-۳/۲	۱۱۰/۱	۱۸۵۰	۳۲۰

فاکتورهای شیمیایی سه گونه ماهی کیلکا اشاره شده است (جانباز، ۱۳۷۸).

در خط تولید پودر ماهی کیلکا سه نوع محصول تولید شده که شامل پودر، روغن ماهی و آب ماهی تغلیظ شده یا Stick Water می‌باشد. برخی از کارخانجات تولید کننده پودر به لحاظ داشتن دستگاه دکانتور، آب ماهی تولید شده را تغلیظ نموده و دوباره مورد استفاده قرار داده و از این طریق کیفیت پودر را افزایش می‌دهند ولی در اکثر کارخانجات تولید کننده پودر در استان مازندران، استفاده بهینه‌ای از Stick Water نمی‌شود. از طرفی به لحاظ غنی بودن این محصول از نظر پروتئین و چربی، می‌توان از آن در جهت تولید محصولات مختلف نظیر SCP استفاده نمود. متأسفانه این ماده غذایی مستقیماً به محیط اطراف کارخانه رها شده و به لحاظ داشتن پروتئین بالا و متعاقب آن‌ها فعال شدن میکروب های پروتئولیتیک، باعث ایجاد بوی بد و زننده در اطراف کارخانه شده و آلودگی مضاعف در محیط ایجاد می‌نماید. همان طوری که در جدول ۱ آمده میزان کل صید کیلکا ماهیان در سال ۱۳۸۶، ۱۵۰۰۰ تن بوده که ۹۵٪ (معادل ۱۴۲۵۰ تن) آن به پودر تبدیل می‌شود. به ازای یک تن از کیلکا ۵۰۰ لیتر Stick Water تولید شده که با احتساب مقدار اولیه ماهی، در حدود ۷۱۲۵۰۰۰ لیتر Stick Water تولید شده که سوبسترای بسیار خوبی جهت تولید فرآورده‌هایی با پایه میکروبی محسوب می‌گردد.

هدف از اجرای این پروژه استفاده از Stick Water تولید شده در کارخانجات پودر ماهی کیلکا به عنوان سوبسترای اولیه در جهت تولید پروتئین میکروبی و استفاده از میکروارگانیسم های مختلف مثل مخمر و باکتری در جهت تولید پروتئین تک‌یاخته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه مورد بررسی شامل Stick Water تولید شده در کارخانجات پودر ماهی کیلکا در استان مازندران بوده است. نمونه برداری از کارخانجات پودر کیلکا در شهرک‌های می‌رود بابلسر و صدرای ساری انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی ابتدا روند آداپتاسیون نمونه‌ها انجام گرفته سپس تولید پروتئین تک‌یاخته در مقیاس آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق از دو باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*Lactobacillus plantarum* PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (*Lactobacillus bulgaricus* PTCC ATCC 1332) استفاده شده است. باکتری‌های مذکور از پژوهشکده بیوتکنولوژی مجتمع تحقیقاتی عصر انقلاب سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها) تهیه گردیدند.

- مرحله آداپتاسیون

جهت آزمایش آداپتاسیون از کشت ۱۸ ساعته دو گونه لاکتوباسیلوس در محیط MRS استفاده شد. بدین منظور ابتدا سوسپانسیون غلیظی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در محیط MRS براث (به طور مجزا) تهیه کرده و سپس به نسبت‌های مختلفی از Stick Water و آب مقطر اضافه گردید (نسبت Stick Water به آب مقطر به ترتیب ۱۰۰ به ۴۰۰، ۲۰۰ به ۳۰۰، ۳۰۰ به ۲۰۰، ۴۰۰ به ۱۰۰ و نمونه خالص و فاقد آب مقطر بود). میکروب‌های رشد یافته در نسبت‌های اولیه به نسبت‌های بعدی انتقال یافته و بدین ترتیب مرحله آداپتاسیون کامل گردید.

jftn.srbiau.ac.ir

- آزمایشات تولید SCP

تیمارهای لحاظ شده در شرایط آزمایشگاهی، شامل ۲ تیمار میکروبی (لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس)، زمان انکوباسیون (از زمان صفر تا ۷۲ ساعت به فواصل زمانی هر ۲۴ ساعت) و سوبسترای اضافه (۱٪ گلوکز) بودند. pH مورد استفاده ۵/۵ و دمای مورد نظر نیز ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است. بعد از اضافه کردن مایه تلقیح به مقدار ۵٪ از باکتری‌ها به Stick Water، نمونه‌ها بر روی انکوباتور شیکردار قرار داده شده و در زمان‌های صفر تا ۷۲ ساعت از نظر تغییرات جمعیت میکروبی (قرائت جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر) مورد ارزیابی قرار گرفتند. تمام آزمایش‌های مذکور در ۳ تکرار انجام گرفت. پس از رسیدن میکروب به فاز ثابت (ثابت ماندن میزان جذب آن) واکنش متوقف شده و عمل استخراج انجام شد. به منظور استخراج اولیه SCP از سانتریفوژ یخچال دار با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه استفاده و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب سلولی جمع آوری شده و سپس لیوفیلیزه گردید. پروتئین میکروبی تولید شده از نظر درصد پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر و پروفایل اسیدهای آمینه مورد آزمایش قرار گرفت (Ferrer *et al*., 1996; Kurbanoglu & Algur, 2002; Tannenbaum & Wang, 1986).

برای اندازه گیری اسیدهای آمینه از دستگاه HPLC با مشخصات نوع ستون SUPELCOSIL, LC-DABS, 12cm× 4.6mm، فاز متحرک پتاسیم دی هیدروژن فسفات (ماده A)، استونیتریل و متانول (ماده B) به نسبت ۷۰ به ۳۰، Flow Rate : 1.5ml/min و دتکتور Vis , 436nm استفاده گردید.

برای تعیین درصد پروتئین از روش کلدال استفاده شد. برای این کار از دستگاه اتوماتیک مدل Kjeltec Analyzer Unit 2300استفاده گردید. درصد چربی با استفاده از روش سوکسله (Soxhlet) و فرمول ذیل محاسبه شد (AOAC, 1990).

۱۰۰× (وزن نمونه/ وزن چربی) = درصد چربی

برای تعیین میزان خاکستر نمونه‌ها از کوره الکتریکی Muffle Furnances استفاده شد. نمونه‌های مورد نظر درون بوته چینی ریخته و به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰۰ تا ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شد و گرد سفید رنگی بدست آمد.

درصد خاکستر نمونه‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید : (AOAC,1990).

۱۰۰× (وزن نمونه/ وزن بوته خالی- وزن بوته با نمونه نهایی) = درصد خاکستر

مقادیر رطوبت نیز از اختلاف وزن پساب و ماده خشک بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد مشخص شد (AOAC, 1990).

- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور رسم نمودارها از نرم افزار Excel و جهت آنالیز داده‌ها از برنامه SPSS و تست آنالیز واریانس استفاده شده و جهت مقایسه واریانس‌ها و ارتباط معنی‌دار مابین گروه‌ها از تست Duncan استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان تولید پروتئین تک‌یاخته بسته به نوع تیمار مورد استفاده متفاوت بوده به‌طوری‌که مقدار آن برای لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بین ۱۳ تا ۱۵ گرم در لیتر از stick water و برای لاکتوباسیلوس پلانتاروم بین ۱۶ تا ۱۹ گرم در لیتر بوده که با اضافه نمودن گلوکز به ترتیب به ۲۰ تا ۲۲ و ۲۱ تا ۲۵ در لیتر افزایش داشته است. تغییرات بین تولید پروتئین در دو باکتری معنی‌دار نبوده است. زمان لازم برای کامل شدن آزمایش در فاز آزمایشگاهی (رسیدن باکتری‌ها به فاز ثابت) ۴۸ ساعت بوده است.

تغییرات تعداد باکتری‌های مورد آزمایش در زمان‌های مختلف از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر و قرائت جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر مشخص گردید.

بحث

پروتئین تک‌یاخته از منابع مختلف قابل تهیه و تولید می‌باشد. محققین مطالعات مختلفی را در ارتباط با تولید پروتئین تک‌یاخته از سوبستراهایی نظیر ضایعات کشاورزی (ملاس، برنج، مرکبات)،

jftn.srbiau.ac.ir

جدول ۳ – مقایسه میانگین پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در پروتئین تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم

خصوصیت	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	پساب اولیه
پروتئین (٪)	۸۲/۲۶	۸۰/۲۱	۵/۱۵
چربی (٪)	۱/۰۲	۱/۵۲	۲/۲۶
رطوبت (٪)	۰/۵۴	۰/۶۵	۹۲
خاکستر (٪)	۱۵/۵۸	۱۷/۲۱	۰/۵۷

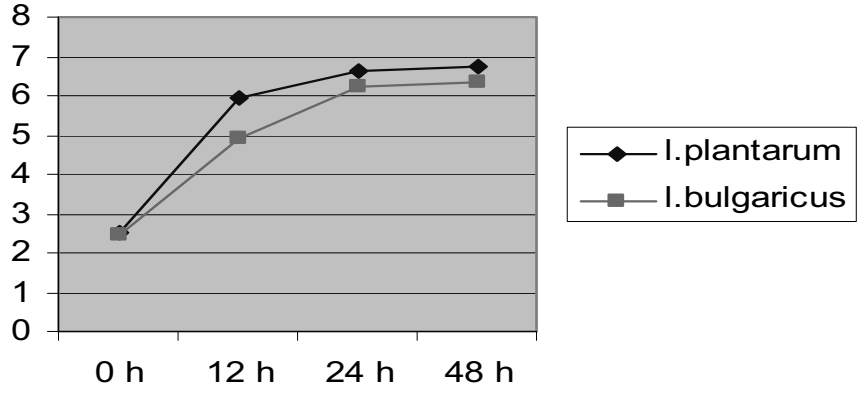
جدول ٤ – پروفیل اسیدهای آمینه در پروتئین میکروبی تولید شده از stick water در ۱۰۰ گرم نمونه و مقایسه با استاندارد FAO (P>0.05)

نوع اسید آمینه		پروتئین تک‌یاخته		استاندارد FAO
		لاکتوباسیلوس پلانتاروم	لاکتوباسیلوس بولگاریکوس	
اسیدهای آمینه ضروری	ایزولوسین	۱۳/۲	۴/۲	۴/۰
	لوسین	۵/۴	۶/۵	۷/۰
	لیزین	۴/۴	۷/۹	۵/۵
	متیونین	۱/۶	۱/۹	۳/۵
	فنیل آلانین	۲/۶	۳/۲	۶/۰
	تیروزین	۲/۵	۲/۷	–
	ترئونین	۳/۳	۳/۸	۴/۰
	والین	۴/۹	۴/۹	۵/۰
اسیدهای آمینه غیر ضروری	آرژنین	۳/۳	۴/۰	–
	هسیتیدین	۳/۴	۱/۹	–
	تریپتوفان	–	–	–
	آسپارتیک	۷/۸	۱۰/۰	–
	گلیسین	۳/۴	۴/۰	–
	آلانین	۹/۸	۷/۲	–
	پرولین	۲/۵	۳/۰	–
	سرین	۲/۵	۲/۳	–
	گلوتامیک	۱۱/۹	۰/۳۴	–

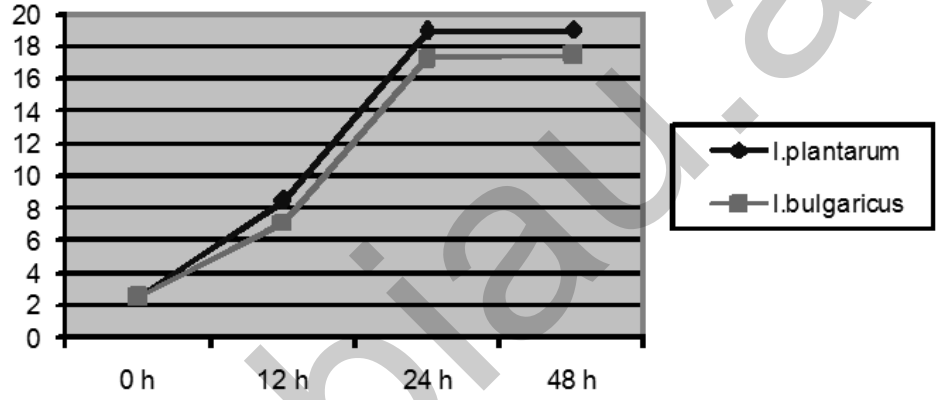
محصولات جانبی شیمیایی (متان و مشتقات نفتی)، ضایعات شیلاتی (نظیر پوست میگو) و آب پنیر انجام داده‌اند (Blancou *et al*., 1978; Bornstein *et al*., 1982; El Saadany *et al*., 1988; Ferrer *et al*., 1996; Fujii, 1989; Moeini, 2004). در هر یک از مطالعات انجام شده، از میکروب یا میکروب‌های مختلف استفاده شده و شرایط مهیا نمودن محیط رشد میکروارگانیسم‌های مورد استفاده نیز متفاوت بوده است. Akman در مطالعه خود به مقایسه پروتئین تولید شده از مخمرها، کپک ها و جلبک‌ها پرداخته و مزایا و معایب هر یک را مورد ارزیابی قرار داد (Akman, 1980). در این تحقیق از آب ماهی تغلیظ شده پودر ماهی کیلکا به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته استفاده شده است.

سیستم مورد استفاده در شرایط آزمایشگاهی از نوع هوازی و کشت غیر مداوم (بسته) بوده است. Griffiths فرآیندهای مختلفی که برای تولید فرآوری میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند را به کشت غیر مداوم، نیمه مداوم، کشت غیر مداوم خوراک دهی شده، کشت غیر مداوم خوراک دهی شده، کشت مداوم تزریقی و کشت مداوم تقسیم نمود (Griffits, 1992). هر یک از فرآیندهای مذکور به

jftn.srbiau.ac.ir



نمودار ۱- جذب نوری برحسب زمان لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در پساب بدون گلوکز ($p>0.05$)



نمودار ۲- جذب نوری برحسب زمان لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در پساب حاوی گلوکز ($p>0.05$)

صورت هوازی و بی هوازی قابل انجام می باشد. Ferrer و همکاران از دو روش بسته و کشت مداوم به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته از پوسته میگو استفاده نمودند. میکروارگانیسم مورد استفاده در تحقیقات آن‌ها ساکارومیسس سرویزیه بوده و نتایج نشان داد که میزان رشد اختصاصی و ضریب تولید محصول به ترتیب ۰/۳۸۹ در ساعت و ۰/۴۴۷ کیلو گرم وزن خشک سلول بوده است (Ferrer *et al*., 1996). باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق از جنس لاکتوباسیلوس بوده که بیشتر در فرآورده‌های لبنی مورد استفاده قرار گرفته که از جمله آن‌ها می‌توان به تولید پروتئین تک‌یاخته از آب پنیر اشاره نمود.

میزان تولید پروتئین تک‌یاخته بسته به نوع تیمار مورد استفاده متفاوت بوده و مقدار آن در لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشتر از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بوده ولی اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبوده است. مطالعاتی که توسط صفری و همکارانش در ارتباط با تولید پروتئین میکروبی از ضایعات آبزیان انجام گرفته نشان داد که میزان تولید محصول در تیمارهای مختلف متفاوت بوده ولی با این وجود میانگین تولید آن‌ها در یک لیتر از آب پخت کارخانجات کنسرو بین ۱۰ تا ۱۵ گرم در لیتر بوده که تقریباً مشابه این تحقیق می باشد (صفری، ۱۳۸۶). البته نوع سوبسترای اولیه، درصد پارامترهای غذایی در آن و روند رشد باکتری‌های مورد استفاده نقش بسزایی نیز در تولید محصول دارند. به عنوان مثال درصد پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در آب پخت به ترتیب ۸/۲-۶/۵، ۱/۵-۱، ۸۶ و ۳-۱/۵ درصد بوده این در حالیست که مقادیر فوق در

jfn.srbiau.ac.ir

stick water به ترتیب ۵/۱۵، ۲/۲۶، ۹۲ و ۰/۵۷ می‌باشد. میانگین پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در پروتئین تولید شده به ترتیب ۸۲/۲۶، ۱/۰۲، ۰/۵۴ و ۱۵/۵۸ درصد بوده است. نتایج تحقیقات نشان دهنده آن است که درصد پروتئین در محصول تولید شده بسته به نوع سوبسترا و میکروارگانیسم های مختلف (باکتری، مخمر و جلبک) متفاوت بوده و به طور کلی درصد آن در محصول باکتریایی بیشتر از سایرین می‌باشد.

Kim و همکاران به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته از باکتری فتوسنتیک رودوسودوموناس پالوستریس (*Rodopseudomonas palostris*) استفاده کرده و نتایج نشان داد که درصد پروتئین در محصول تولید شده بین ۷-۷۲ ٪ متغیر می باشد (Kim *et al*., 2000). Israelidis نیز در مطالعه خود به مقایسه پروتئین تک‌یاخته از منابع مختلف و درصد پروتئین در آن‌ها اشاره کرده و یادآور شد که درصد پروتئین در پروتئین باکتریایی (بین ۷۰ تا ۷۶٪ و ۷۳ تا ۷۸) بیشتر از مخمرها (بین ۵۳ تا ۶۰٪ و ۵۷ تا ۶۵٪) می‌باشد (Israelidis, 2000). نتایج تحقیق صفری و همکاران نیز تاییدکننده مطالعه مذکور می‌باشد (صفری، ۱۳۸۶). نتایج مطالعات Schulz و همکاران نشان داده که میزان پروتئین خام در SCP تولید شده از مخمرها بین ۶۸-۳۹٪ بوده در صورتی‌که این میزان در SCP باکتریایی در حدود ۸۲٪ می‌باشد. میزان اسیدهای آمینه ضروری پروتئین مخمر بین 6/6 -4/8 g/16gN بوده است. ولی با این وجود، میزان چربی کل در پروتئین با منشاء میکروب‌های مختلف، متغیر بوده است (Ogbonda *et al*., 2007; Schulz & Oslage, 1974).

نتایج آنالیز پروفایل اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده از دو گونه لاکتوباسیلوس نشان داد که اکثر اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری (با درصدهای مختلف بجز تریپتوفان) در محصول تولید شده وجود داشته و قابل مقایسه با استانداردهای FAO می‌باشند. اما با این وجود برخی از اسیدهای آمینه نظیر ایزولوسین و لیزین بالاتر از مقدار پیشنهاد شده FAO بوده و برخی دیگر نظیر لوسین، میتونین، فنیل آلانین و ترئونین کم‌تر از استاندارد مورد نظر بوده‌اند. بنابراین به هنگام استفاده از محصول مذکور به عنوان مکمل میکروبی، اضافه نمودن اسیدهای آمینه فوق ضروری می‌باشد. نتایج مقادیر کمی و کیفی اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده ازلاکتوباسیلوس پلانتاروم ولاکتوباسیلوس بولگاریکوس معنی‌دار نبوده است. Erdman و همکاران در مطالعه خود به آنالیز پارامترهای غذایی و تعیین مقادیر اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده از لاکتوباسیلوس‌ها پرداختند. نتایج نشان داد که مقدار کمی اسیدهای آمینه در لاکتوباسیلوس پلانتاروم ولاکتوباسیلوس فرمنتی (*L.fermenti* 3957) بیشتر از سایر گونه ها بوده است. سایر نتایج اسیدهای آمینه مشابه تحقیق حاضر می‌باشد. نتایج مطالعه وی همچنین نشان داد که مقدار اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده مساوی و بالاتر از استاندارد FAO می باشد (Erdman *et al*., 1999). در صورتی‌که در مطالعه حاضر، برخی از اسیدهای آمینه ضروری اندکی کم‌تر از استاندارد FAO بوده‌اند. این امر نشان دهنده آنست که این گروه منابع خوبی از مکمل های میکروبی بوده و می‌توان از آن به عنوان پروبیوتیک در صنایع غذایی استفاده نمود. Camien و همکاران به مقادیر اسیدهای آمینه در پروتئین میکروبی تولید شده از لاکتوباسیلوس‌ها نیز اشاره کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که ترکیب اسیدهای آمینه در پروتئین تولید شده از گونه های مختلف میکروارگانیسم‌ها تقریباً مشابه هم می باشد در صورتی‌که در مطالعه حاضر، Erdman، Purser و Tannenbaum نتایج متفاوتی دیده شده و نشان دهنده ترکیب متفاوت اسیدهای آمینه در منابع پروتئینی متفاوت می‌باشد (Erdman *et al*.,1999; Purser&Buechler,1995;Tannenbaum& Wang,1986).

یکی دیگر از فاکتورهای مهم در فرآیند، زمان تخمیر بوده که میکروب‌ها در زمان‌های مختلف اقدام به تولید پروتئین می‌نمایند. در این تحقیق، ماکزیمم زمان تخمیر ۴۸ ساعت بوده که در این زمان میکروب از نظر تغییرات جذب نوری تقریباً ثابت بوده است. محققین بر این عقیده‌اند که با وارد نمودن میکروب به یک محیط جدید، به لحاظ متفاوت بودن شرایط محیطی، فاز سکون (Lag phase) باکتری طولانی‌تر شده ولی با گذشت

ifn.srbiau.ac.ir

زمان، میکروب با شرایط جدید خود را آداپته نموده و شروع به رشد لگاریتمی می‌نماید (Griffits, 1992; Liu *et al*., 1995) . در تحقیق حاضر، میکروب‌ها پس از آداپتاسیون اولیه و افزایش تدریجی سوبستراهای اصلی، با شرایط جدید آداپته شده‌اند. به همین دلیل باکتری‌ها دارای فاز سکون بسیار کوتاهی بوده و به سرعت وارد فاز لگاریتمی شدند. توقف واکنش و مراحل استخراج آن زمانیست که میکروب وارد فاز رشد ثابت می‌گردد. در این مرحله میزان سلول‌های زنده و مرده تقریباً یکسان بوده و میزان مواد غذایی در دسترس میکروب‌ها کاهش می‌یابد. به همین دلیل اگر مرحله ثابت ادامه پیدا کند تعداد میکروب‌ها کم‌تر شده و در نتیجه میزان پروتئین تولید شده نیز کم تر خواهد بود (Griffits, 1992; Liu *et al*., 1995). Gildberg به فاکتورهای دخیل در فرآیند تخمیر در محصولات دریایی مثل ماهی، خرچنگ و سخت پوستان اشاره نموده و فاکتورهایی نظیر انتخاب نوع میکروارگانیسم، دوز مورد استفاده آن ها و روش استفاده به صورت منفرد و ترکیبی را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد (Griffits, 1992).

به منظور تولید پروتئین تک‌یاخته از سوبستراهای مختلفی نظیر ملاس، متان، آب پنیر، پودر ذرت، هیدروکربن‌های نفتی، ضایعات مرکبات و ضایعات فرآورده‌های شیلاتی استفاده می‌گردد (Bornstein *et al*., 1982; El Saadany *et al*., 1988; Ferrer, 1996; Galves *et al*., 1990; Yazdian *et al*., 2005) . در این تحقیق سوبسترای آب ماهی تغلیظ شده مورد استفاده قرار گرفته است. میزان تولید محصول به ازای یک لیتر از سوبسترای اصلی مورد استفاده و سوبسترای اضافه متفاوت بوده و به هنگام استفاده از سوبسترای اضافه (گلوکز) سرعت واکنش افزایش یافته و میزان بیشتری از SCP تولید گردید.

اضافه نمودن سوبسترای اضافی باعث افزایش رشد مضاعف میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شده و سوبسترای سهل و آسانی در اختیار میکروب قرار می‌گیرد. محققین تاثیر سوبستراهای مختلف بر روند انجام فرآیند را در سیستم‌های متفاوت مورد بررسی قرار دارند. Ahmad و همکاران تاثیر غلظت گلوکز را بر روند رشد مخمر در فرمانتور بسته مورد ارزیابی قرار داده و نتایج نشان داد که کاهش قند گلوکز، باعث افزایش فاز سکون میکروب شده و در نتیجه واکنش کندتر انجام می‌گیرد. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که به هنگام اضافه نمودن گلوکز به سوبسترای اولیه، روند رشد و در نتیجه تولید SCP افزایش می‌یابد. Puniga و همکاران استفاده از سوبستراهای مختلف نظیر هیدروکربن‌های نفتی، ضایعات کشاورزی و باقی‌مانده‌های جنگل به منظور تولید پروتئین میکروبی را مورد بررسی قرار داده و به فاکتورهای مختلف نظیر نوع میکروارگانیسم و مزایا و معایب هر یک از آن ها اشاره نمودند (Puniga *et al*., 1995) . نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان تولید SCP از Stick water بین ۱۶ تا ۱۹ گرم (لاکتوباسیلوس پلانتاروم) و ۱۳ تا ۱۵ گرم در لیتر (لاکتوباسیلوس بولگاریکوس) بوده که به هنگام اضافه نمودن سوبسترا به ۲۱ تا ۲۵ و ۲۰ تا ۲۲ گرم در لیتر افزایش داشته است.

یکی دیگر از فاکتورهای موثر در فرآیند تخمیر میزان تلقیح اولیه می‌باشد. در این تحقیق میزان تلقیح باکتری‌ها ۵٪ بوده است. در اکثر مطالعات میزان تلقیح میکروب‌ها بین ۱۵-۱٪ در نظر گرفته و هر چه میزان تلقیح بیشتر باشد فاز سکون میکروارگانیسم کم تر خواهد بود (Griffits, 1992). Kim در مطالعه خود از غلظت $۱/۱ \times ۱۰^{۱۰}$ باکتری در میلی لیتر استفاده نمود و میزان رشد باکتری و تولید بیوماس را در حدود ۰/۱۲ در ساعت و ۵۵ میلی‌گرم بر لیتر/ساعت گزارش نموده است. میزان تلقیح ۵-۳٪ تقریباً بین ضریبی از $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ از میکروارگانیسم می باشد (Kim & Lee, 2000).

نتیجه‌گیری

پروتئین میکروبی تولید شده در این تحقیق کاربرد فراوانی داشته و می‌توان از آن به عنوان یک ماده افزودنی و پروبیوتیک در جیره غذایی دام، طیور آبزیان استفاده نمود. اما بایستی به این نکته توجه داشت که ارزیابی سایر فاکتورهای غذایی از جمله وجود اسیدهای نوکلئیک و میزان املاح معدنی لازم و ضروری به نظر می رسد. خوشبختانه لاکتوباسیلوس‌ها به عنوان باکتری‌های شاخص در

jftn.srbiau.ac.ir

بسته‌های تجاری پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته و بجز معدودی از گونه‌های لاکتوباسیلوس که عامل فساد در مواد غذایی می‌باشند سایرین به عنوان مکمل‌های میکروبی در فرمولاسیون مواد غذایی (برای مصارف انسان و دام) مورد استفاده قرار می‌گیرند. برتری که پروتئین میکروبی تولید شده نسبت به پودر ماهی (به عنوان مکمل در جیره غذایی طیور و آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد) دارد آنست که پروتئین میکروبی اولاً مقرون به صرفه تر بوده ثانیاً سرشار از پروتئین بوده ثالثاً به عنوان پروبیوتیک عمل کرده و به واسطه داشتن باکتری‌های گروه لاکتیک، باعث افزایش مقاومت آبزیان، تقویت سیستم ایمنی، افزایش رشد و بازماندگی و متعادل نمودن دستگاه گوارش می‌گردد.

منابع

جانباز، ع. ا. (۱۳۸۷). ارزیابی ذخایر کیلکا ماهیان در حوضه جنوبی دریای خزر. گزارش نهایی، موسسه تحقیقات شیلات ایران.

صفری، ر. (۱۳۸۶). دستیابی به دانش فنی تولید پروتئن تک‌یاخته از ضایعات ماهیان پرورشی و دریایی. گزارش نهایی، موسسه تحقیقات شیلات ایران.

AOAC (Assocation of Official Analytical Chemists) .1990. Official methods of analysis AOAC. Washington; DC, 1263.

Ahmad, M. N. & Holland, C. R. 1995. Growth kinetics of single cell protein in batch fermenter . J Food Eng., 26, 443-52.

Akman, M. (1980). Single cell protein , Introduction, the use of algae, fungi and yeasts for SCP production. Microbiol Bul., 14, 2, 141-55.

Anupama, P. & Ravindra, D. (2000). Value-added food: Single Cell Protein .Biotech Advances, 18, 459-479.

Ashy, M. A. & Abou- Zeid, A. (1982). Potentialities of yeasts in production of single cell proteins (SCP). Zentralbl Mikrobiol., 137, 5, 387– 94.

Bayourthe, C. & Vellas, F. (1988). Nutritive value of bacterial proteins (PBOL) in rainbow trout (*Salmo gairdnerii Rich*). diets . Aquacult Eng., 12, 61-70 .

Blancou, J., Calvet, H. & Riviere, R. (1978). Single cell protein production from peanut shell. Rev Elev Med Vet pays Trop., 31, 3, 363 -8.

Bornstein, S., Plavnik, I. & Lipstein, B. (1982). Evaluation of methanol grown bacteria and hydrocarbon grown yeast as sources of protein for poultry: trials with egg laying birds. Br Poult Sci., 23, 6, 487-99.

Camien, M. N., Salle, C. F. & Dunn, M. S. (1998). Investigation of amino acids, peptides and proteins: perecentages of some amino acids in lactobacilli. Arch Biochem., 8, 67-78.

Chae, S. R., Hwang, E. J. & Shin, H. S. (2006). Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxid fixation in an innovative photo-bioreactor. Bioresource Tech., 97, 322-329.

Dabrowsk, K., Hassard, S. & Auinn, J. (1980). Effect of *Geotricum condidum* protein substitution in pelleted fish feed on the growth of rainbow trout and on utilization of diet., 21, 3, 213-232 .

Davies, S. J. & Wareham, H. (1988) . A preliminary evaluation of an industrial single -cell protein in practical diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus Peters*) . Aquaculture. 73, 1-4, 189-199.

El Saadany, R ., Khalaf, H., Manawaty, H. & Salom, F. (1988). The Production of single cell protein from agricultural wastes by fungi . Acta Aliment Acad Sci Hung., 17, 4, 376-377.

Erdman, M. D., Bergen, W. G. & Reddy, C. A. (1999). Amino acids profiles and presumptive nutritional assessment of single cell protein from cetain lactobacilli. Applied and Env Microbiol, 33, 4, 901-905.

Ferrer , J., Paez, G. & Marmol, Z. (1996). Acid hydrolysis of shrimp shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate. Bioresource Tech., 57, 1, 55-60

Fujii, T. (1989). Production of single-cell protein from stickwater. JTokyo Univ., 76, 1 -2, 1-6.

Galvez, A., Ramirez, M. J. & Garcia, G. M. (1990). Chemical composition of a mixture of single cell protein obtainned from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. Arch Latinoam Nutr, 40, 2, 252 -262.

Gildberg, A. (1992). Enzymic processing of marine raw material . Process Biochem., 28, 1, 1-15.

Ghanem, K. M. (1992). Single cell protein production from beet – pulp by mixed Culture. Microbiologia., 8, 1, 39-43.

Griffits, J. B. (1992). Animal cell processes-batch or continuous. J Biotechnol., 22, 21-30.

Invarson, K. C. & Morita, H. (1982). Single cell protein production by the acid tolerant fungus, *Scytalidium acidophilum* from acid hydrolysates of waste paper . Appl Environ Microbiol., 43, 643-647.

Israelidis, C. J. (2000). Nutrition of single cell protein, Twenty years later. Food Technology Institute Greece. Kim , H. K. & Lee, B. K. (2000). Mass Production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. Aquaculture Engin., 23, 4, 281-293.

ifrc.riau.ac.ir

Kurbanoglu, E. B. & Algur, O. F. (2002). Single cell protein production from ram born hydrolysate by bacteria. Bioresource Tech., 85, 125 – 129.

Kuzmanova, S., Vandeaka, E., Dimitrovski, A. & Doneva, D. (1998). Microbial procedure for utilization of food industry wastes. Dechema Bioechnology Conferences 3- VCH Vertagsgesellschaff., 985 – 988.

Liu, G., Zheng, Z., Song, D. & Cen, P. (1995). Kinetic models of batch and fed – batch culture of single cell protein with double carbon sources. Chin J Biotechnol., 11, 3, 163-170.

Moeini, H., Vallian, S. & Nahvi, I. (2004). Isolation and identification of yeaste strains capabale of producing SCP from whey in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. Iranian Journal of Biotech., 2, 1, 13-18.

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. Bioresource Tech., 98 , 2207 – 2211.

Perera, W. M. K., Carter, C. G. & Houlihan, D. F. (1995). Apparent absorption efficiencies of amino acids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed diets containing bacterial single-cell protein. Aquaculture Nutrition., 1, 2, 95-103.

Puniga, A. K., Singh, S., Kumar, C. G. & Singh, K. (1995) . Single cell protein apromising dietary substitute. Indian J Exp Biol., 33, 8, 545-551.

Purser, D. R. & Buechler, S. M. (1995). Amino acid composition of rumen organisms. J Dairy Sci., 49, 81-84.

Schulz, E. & Oslage, H. J. (1974). Composition and nutritive value of single cell protein . Animal Feed Science and Technology., 1, 1, 9-24.

Shipman, R. H., Kao, I. C. & Fan, L. T. (1975). Single cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural byproducts. Biotechnol Bioeng., 17, 1561 –1570.

Storebakken, T ., Kvien, I. S., Shearer, D. D., Grisdale, H. B., Helland, S. J. & Berge, G. M. (1998). The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to the Atlantic salmon (*Salmon salar*). Aquaculture., 169, 195-210.

Tannenbaum, S. R. & Wang, D. I. C. (1986). Single cell protein. The MIT Press. Cambridge, Mass.

Voss, B. (1988). Replacement of fishmeal in a diet for O-group turbot by a single-cell protein probion and a mixture of poultry offal and hydrolysed feathermeal respectively. Arch Fischereiwiss, 38, 3, 203-213.

Yazdian, F., Hajizadeh, S. & Shojasadati, S. A. (2005). Production of SCP from neutural gas, parameter optimizing and RNA evaluation. Iranian J of Biotech., 3, 4, 235-242.

jftn.srbiau.ac.ir

Single Cell Protein Production From Kilka Stick Water by Lactic Acid Bacteria

H. R. Pordeli[a*], R. Safari[b], S. H. Hosseini[c]

[a] Academic Member of Gorgan Branch, Islamic Azad University, Golestan, Iran

[b] Ecological Aquatic Academy of Caspian Sea, Iran

[c] Academic Member of Golestan University of Medical Sciences, Iran

Received: 30 April 2009 Accepted: 5 June 2009

Abstract

Introduction: One of the most important problems in kilka meal factories is stick water production, as a waste, from meal production process. Five hundred litters of stick water is produced for each 1000 kg of kilka fish. This waste has rather high protein and might be used as substrate for the growth of bacteria such as lactic acid bacteria.

Materials and Methods: In this study *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* were used for SCP production from stick water. Adaptation of Lactic AcidA bacteria to pure stick water was performed by increasing the concentration of stick water in distilled water. The growth of bacteria was studied by spectrophotometric method and reading the optical density of bacteria at 600 nm. The effect of glucose, as additional substrate on SCP production, was also evaluated. After separation of biomass, the final product was lyophilized by freeze dryer and then was analyzed for amino acid profiles, total protein, total fat, moisture and ash.

Results: The results showed that the amount of produced SCP from *L. plantarum* and *L. bulgaricus* were 13-15 g/l and 16-19 g/l in normal stick water and 20-22 g/l and 21-25 g/l in the presence of glucose respectively. Mean value of total protein, total fat, moisture and ash in produced SCP were 82.26%, 1.02%, 0.54% and 15.58% whereas the percent of these values in stick water were 5.15%, 2.26%, 92% and 0.57% respectively.

Conclusion: The results showed that amino acids composition in produced SCP is comparable with the suggested pattern of requirement by FAO/WHO.

Key words: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *SCP, Stick Water.*

**Corresponding Author:* hr.pordeli@gorganiau.ir

jfn.srbiau.ac.ir