

## تولید پروتئین قارچی با استفاده از فوزاریوم اکسیسپوروم PTCC 5115

Zahra Ahangi<sup>۱</sup>, Saeid Abbas Shajau Al-Sadaati<sup>۲</sup>, Hosseini Nikpour<sup>۳</sup>

۱- نویسنده مسئول: کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، پست الکترونیکی: zahra\_ahangi@yahoo.com

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ پذیرش: ۱۵/۸/۸۵

تاریخ دریافت: ۲۲/۷/۸۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** مایکوپروتئین یا پروتئین قارچی با تخمیر هوایی قارچ فوزاریوم و نامه ناتوم (*Fusarium venenatum*) روی سوبسترای کربوهیدراتی تولید می‌شود. میزان RNA محصول به دست آمده بالاست. بنابراین، لازم است با روش حرارتی، میزان اسید ریبونوکلئیک آن به کمتر از ۲٪ کاهش داده شود. ارزش تغذیه‌ای پروتئین قارچی، قابل توجه است، دیواره سلولی هیف، منبع فیر رزیمی، غشای سلولی، منبع چربی غیر اشباع با دو یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه و سیتوپلاسم، منبع پروتئین با کیفیت بالاست. در این تحقیق، امکان تولید آزمایشگاهی پروتئین قارچی با استفاده از قارچ فوزاریوم اکسیسپوروم (*Fusarium oxysporum*) مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه تخمیر برای به دست آوردن بالاترین راندمان تولید مشخص شد.

**مواد و روشها:** فرایند تخمیر هوایی روی محیط کشت و گل (Vogel) در شرایط مختلف دما و دورهمن و مقادیر مختلف گلوکز به عنوان منبع کربن و فسفات دی‌هیدروزن آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن انجام شد. برای کاهش میزان RNA تا حد مجاز از روش حرارتی در دمای ۶۵°C به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد.

**نتیجه‌گیری:** این تحقیق نشان داد که بهترین شرایط تخمیر برای تولید پروتئین قارچی با استفاده از قارچ فوزاریوم اکسیسپوروم عبارت است از: دمای ۲۵°C، دورهمن ۱۵۰ rpm، ۵ گرم گلکوز در لیتر و فسفات دی‌هیدروزن آمونیوم  $\frac{3}{4}$  گرم در لیتر که می‌توان محصولی حاوی تقریباً ۴۲٪ پروتئین خام تولید کرد. میزان RNA محصول نیز با روش حرارتی از ۷٪ به کمتر از ۱٪ تقلیل یافت.

**واژگان کلیدی:** مایکوپروتئین، فوزاریوم/اکسیسپوروم، کاهش RNA

### • مقدمه

اروپایی (بلژیک ۱۹۹۲، هلند ۱۹۹۳، ایرلند ۱۹۹۴، سوئیس ۱۹۹۵ و سوئیس ۱۹۹۸) مورد تأیید قرار گرفت. این پروتئین قارچی، با نام تجاری کورن (Quorn) بیش از یک دهه است که در انگلستان تولید می‌شود و به عنوان جایگزین گوشت در بسیاری از فراورده‌های غذایی از قبیل سوسیس استفاده می‌شود. در سال ۱۹۹۸ اداره کل غذا و داروی آمریکا (FDA) استفاده از پروتئین قارچی را برای استفاده در تولید غذای انسان تأیید کرد (۱۱). پروتئین قارچی با تخمیر هوایی قارچ فوزاریوم و نامه ناتوم (*Fusarium venenatum*) که قبلاً با نام فوزاریوم

تولید پروتئین تک یاخته SCP (single cell protein) به عنوان پروتئین افزودنی به خوارک دام، طیور و آبزیان به دلیل کمبود آن در جهان از دهه ۱۹۶۰ مطرح شد و به طور جدی به اجرا در آمد. تولید SCP عموماً از میکروارگانیسم‌هایی چون مخمر و باکتری صورت می‌گیرد. تولید مایکوپروتئین یا پروتئین قارچی با ویژگیهای تغذیه‌ای، فیزیکی و شیمیایی جالب توجه به عنوان غذای انسان در سالهای اخیر توسعه یافته است. فروش پروتئین قارچی برای مصرف انسان در سال ۱۹۸۵ در انگلستان و در سالهای بعدی در سایر کشورهای

و ارزش تغذیه‌ای آن مانند پروتئین شیر بدون چربی بالاست (۱۰).

با توجه به پرونده ثبت اختراع (به شماره ۵۷۳۹۰۳۰) گونه‌های فوزاریوم شامل: فوزاریوم گرامینئاروم (*Fusarium graminearum*), فوزاریوم اکسیسپوروم (*Fusarium oxysporum*) و فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) گونه‌های مورد تایید برای غذای انسان هستند (۱۵). از آنجا که تاکنون از قارچ فوزاریوم اکسیسپوروم برای تولید پروتئین قارچی استفاده نشده است، در این تحقیق، شرایط بهینه برای تولید پروتئین قارچی با استفاده از این گونه، مورد بررسی قرار گرفت و کاهش RNA محصول به کمتر از ۲٪ با استفاده از شوک حرارتی انجام شد.

## • مواد و روشها

**میکروارگانیسم و محیط کشت:** از قارچ فوزاریوم اکسیسپوروم PTCC 5115 و محیط کشت وُگل به همراه گلوکز (۱۰ گرم در لیتر) به عنوان منبع کربن برای تهیه محیط کشت استفاده شد. ترکیبات محیط کشت در یک لیتر عبارت بود از: سیترات سدیم ۲/۶ گرم، نیترات پتاسیم ۲/۵۲ گرم، فسفات‌دی‌هیدروژن‌آمونیوم ۲/۸۸ گرم، فسفات‌دی‌هیدروژن‌پتاسیم ۱/۶ گرم، سولفات‌منیزیوم ۷ آبه ۰/۲ گرم، کلرید کلسیم دو آبه ۰/۱ گرم، بیوتین ۰/۲۵ میلی گرم، اسید سیتریک ۵ میلی گرم، فرو سولفات‌آمونیوم ۶ آبه ۱ میلی گرم، سولفات‌مس ۵ آبه ۰/۲۵ میلی گرم، سولفات‌منیزیوم ۰/۰۵ میلی گرم و مولیبدات سدیم دو آبه ۰/۰۵ میلی گرم (۱۴). مراحل توسعه مایه تلقیح: برای تهیه مایه تلقیح ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت وُگل در یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد، سپس ۵ میلی لیتر سوسپانسیون کپک با افزودن آب مقطر یا محیط کشت روی محیط کشت شیب دار به محیط کشت اضافه شد و در انکوباتور همزد دار با دمای ۲۵°C و دوره‌همزن ۲۰۰ rpm گرفت. پس از رسیدن به حداقل شدت رشد ویره ( $\mu_{max}$ ) - فاز لگاریتمی - کپک به دست آمده برای نگهداری به یخچال با دمای ۴°C منتقل شد.

گرامینئاروم (*Fusarium graminearum*) شناسایی شده بود، روی سوبسترای کربوهیدراتی (گلوكز) تولید می‌شود. قارچ رشته‌ای فوزاریوم به دلیل تاریخچه طولانی استفاده انسان از قارچها به عنوان غذا، امکان فرموله کردن محصولات غذایی حاصل از قارچهای رشته‌ای که بو، طعم و بافت مناسبی دارند و به دلیل برداشت آسان میسلیوم قارچی از محلول حاصل از تخمیر محیط کشت، برای این منظور انتخاب شده است (۱۳، ۱۶).

یکی از مشکلات مربوط به پروتئین قارچی، میزان RNA بالای آن است که در انسان به اسید اوریک نامحلول متابولیزه شده و موجب بیماریهای سنگ کلیه، نقرس و درد مفاصل می‌شود. مقدار مجاز مصرف روزانه اسید ریبونوکلئیک در انسان، حداقل ۲ گرم است. به همین دلیل، ضروری است RNA توده زیستی حاصل از تخمیر، توسط فرایند حرارتی کاهش یابد. در اثر حرارت، آنزیم‌های RNA-ase RNA داخل سلولی، فعال می‌شوند (۷). سوسپانسیون حاصل از تخمیر بعد از کاهش RNA سانتریفیوز می‌شود، خمیر جمع آوری شده که حاوی تقریباً ۷۵٪ آب است، مایکوپروتئین نامیده می‌شود و ترکیب آن عبارت است از: پروتئین تقریباً ۱۲٪، چربی ۳٪، کربوهیدرات ۳٪، فیبر ۶٪ و خاکستر ۲٪. همچنین پروتئین حاوی عناصر معدنی کم‌مقدار و ویتامین‌های گروه B نیز هست. ارزش تغذیه‌ای پروتئین قارچی به دلیل ترکیب شیمیایی آن است؛ دیواره سلولی هیف، منبع فیبر رژیمی، غشای سلولی، منبع چربی غیراشباع با دو یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه و سیتوپلاسم، منبع پروتئین با کیفیت بالاست. فیبر آن که از ۶۵٪ بتاگلوبالین و ۳۵٪ کیتین تشکیل شده است، بر چربیهای خون اثر کرده، کلسترول تام و LDL را کاهش HDL را افزایش می‌دهد. همچنین فیبر به عنوان پری‌بیوتیک در روده کوچک عمل می‌کند. پروتئین قارچی، قادر فیتات است؛ در نتیجه، مانع جذب مواد معدنی نمی‌شود. ترکیب اسیدهای چرب آن، شبیه چربی گیاهی است و نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع آن ۳/۵ به ۱ است. پروتئین آن نیز دارای تمام اسیدهای آمینه ضروری بوده

تعیین کربوهیدراتات کل: اندازه‌گیری کربوهیدراتات کل با روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. در مجاورت اسید سولفوریک و آب، کربوهیدراتات‌ها به قندهای ساده (مانند گلوکز) تبدیل می‌شوند. مخلوط گلوکز، فنل و اسید سولفوریک غلیظ با تولید حرارت، ترکیب رنگی ایجاد می‌کند. این ترکیب در ناحیه مرئی، دارای جذب نور است.<sup>(۶)</sup>.

**تعیین چربی تام: چربی تام با روش گراویمتری**

اندازه‌گیری شد.<sup>(۴)</sup>.

تعیین اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب: اندازه‌گیری اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب به ترتیب با دستگاههای (AOAC 1994) و گازکروماتوگرافی (AOAC 1975) انجام شد.<sup>(۲,۳)</sup>.

**روش‌های آماری:** برای تعیین شرایط بهینه تخمیر برای رسیدن به بالاترین مقدار پروتئین خام از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. در مورد ویژگیهای کمی از آمار توصیفی به کمک میانگین استفاده شد. مقایسه نتایج اسیدهای آمینه پروتئین قارچی با مقادیر ارائه شده به وسیله FAO و اسیدهای آمینه فوزاریوم و نهناatom با استفاده از آزمون t-test در سطح معنی‌داری  $\alpha = 0.05$  انجام شد.

## ۰ نتایج و بحث

شرایط بهینه از نظر تولید پروتئین خام شامل دمای  $25^{\circ}\text{C}$ ، دور همزن  $150\text{ rpm}$ ، گلوکز  $5\text{ g/l}$  و فسفات دی هیدروژن آمونیوم  $3/4\text{ g/l}$  تعیین شد. در این شرایط  $1/5\text{ g}$  توده زیستی با  $42\%$  پروتئین خام تولید شد. نتایج، بیانگر آن است که افزایش دور همزن به دلیل آسیب رساندن به توده سلولی منجر به کاهش تولید پروتئین می‌شود.<sup>(۹)</sup> همچنین نسبت C:N بر تولید پروتئین اثر می‌گذارد، در نتیجه، در میزان گلوکز پایین‌تر ( $1/5\text{ g}$ ) و آمونیوم بالاتر ( $1/3\text{ g/l}$ ) تولید پروتئین بیشتر شده است (شکل ۱).<sup>(۱)</sup>

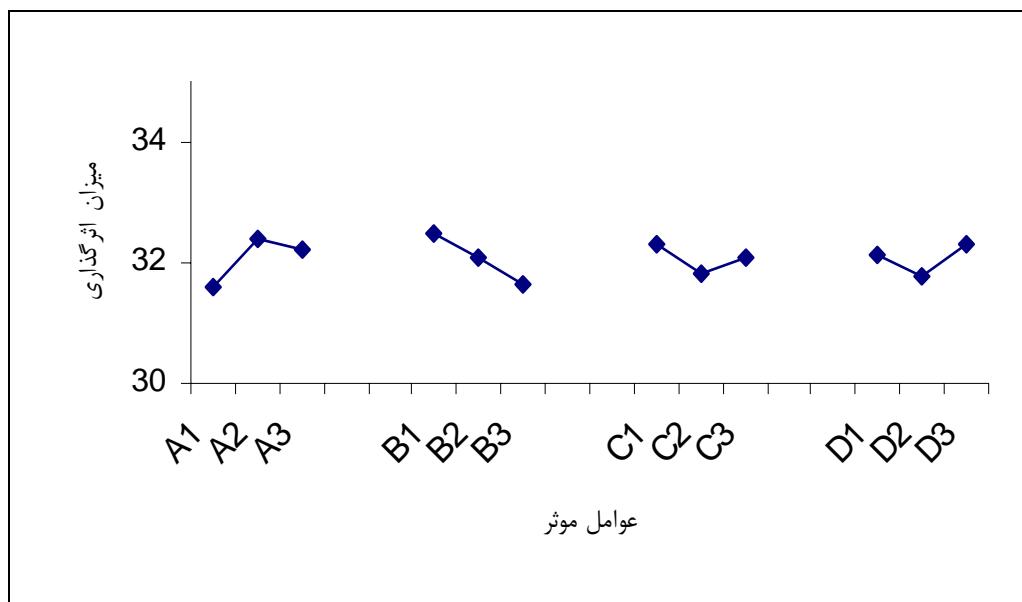
تولید توده زیستی: محیط کشت تولید با همان ترکیب محیط کشت تلقیح، تهیه شد و در ارلن‌های  $500\text{ ml}$  لیتری به میزان  $100\text{ ml}$  لیتر در شرایط سترون ریخته شد.  $5\%$  حجمی از مایه تلقیح در شرایط سترون به محیط کشت تولید اضافه شد. پس از انجام تلقیح، ارلن‌ها در انکوباتور همزن دار در شرایط مختلف دما و دور همزن مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از برداشت کشت‌های تولید (۳۱ ساعت)، توده زیستی تولید شده توسط سانتریفوژ با دور  $4500\text{ rpm}$  و زمان  $20$  دقیقه، جدا شدند، سپس با آب مقطر، شسته و در فور با دمای  $60^{\circ}\text{C}$  خشک شدند.

**طراحی آزمایشها:** برای تعیین شرایط بهینه تخمیر از روش تاگوچی استفاده شد. در این روش برای  $4$  عامل دما، دور همزن، گلوکز به عنوان منبع کربن و فسفات دی هیدروژن آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن در سه سطح مختلف (دما  $20$ ،  $25$  و  $30$  درجه سانتی گراد، دور همزن  $150$ ،  $200$  و  $250\text{ rpm}$ ، گلوکز  $5$ ،  $10$  و  $15\text{ g}$  در لیتر و فسفات دی هیدروژن آمونیوم  $2/4$ ،  $2/9$  و  $3/4$  گرم در لیتر)  $9$  آزمایش (سه تکرار) انجام شد.

**کاهش RNA:** کاهش RNA توده زیستی با روش تیمار حرارتی در دو دمای  $65$  و  $72$  درجه سانتی گراد و زمانهای  $5$  الی  $30$  دقیقه انجام شد. بهترین دما و زمان از نظر بیشترین کاهش RNA و کمترین افت توده زیستی به دست آمد. در این روش RNA به مونونوکلئوتیدها تجزیه و از سلول، وارد محیط کشت می‌شود. پس از کاهش RNA، توده زیستی توسط سانتریفوژ با دور  $4500\text{ rpm}$  و به مدت  $10$  دقیقه جداسازی شد، سانتریفوژ کردن باعث جدا شدن مونونوکلئوتیدها نیز شد.<sup>(۱۲,۱۷)</sup>

**تعیین پروتئین خام:** تعیین مقدار پروتئین به طور غیرمستقیم و از طریق اندازه‌گیری نیتروژن کل با روش میکروکلدلال انجام شد.<sup>(۸)</sup>

**تعیین RNA:** اندازه‌گیری RNA توده زیستی با روش اسپکتروفوتومتری انجام شد. در این روش، جداسازی توسط محلول RNA-Plus RNA انجام شد.<sup>(۵)</sup>



شکل ۱- اثر عوامل مؤثر بر تولید پروتئین قارچی

A: دما (۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد)

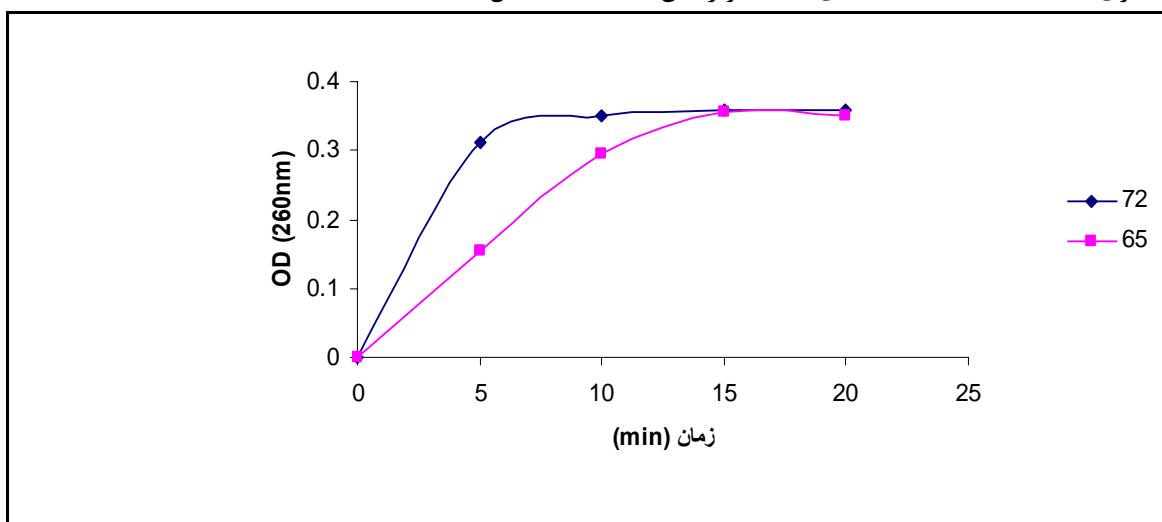
B: دورهمزن (۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ rpm)

C: گلوکز (۵، ۱۰ و ۱۵ گرم در لیتر)

D: فسفات دی هیدروژن آمونیوم (۰.۴/۲، ۰.۶/۲ و ۰.۸/۲ گرم در لیتر)

دقیقه (۰.۳۶٪) نشان داد. میزان RNA توده زیستی با شوک حرارتی در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه از ۷٪ به کمتر از ۱٪ کاهش یافت که مطابق نتایج Wiebe در سال ۲۰۰۲ است.

بیشترین کاهش RNA در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه و دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد (شکل ۲) که دمای  $65^{\circ}\text{C}$  و زمان ۱۵ دقیقه، افت وزن کمتری (۰.۱۸٪) نسبت به دمای  $72^{\circ}\text{C}$  و زمان ۱۰ دقیقه (۰.۲۶٪).



شکل ۲- اثر دما و مدت زمان تیمار حرارتی بر آزاد سازی نوکلئوتیدها

جدول ۲- مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با مقادیر ارائه شده به وسیله Rodger در سال ۲۰۰۱ (گرم درصدگرم پروتئین)

اسید آمینه	پروتئین قارچی حاصل	پروتئین قارچی از فوزاریوم و نه ناتوم
اکسیپوروم		
۵/۷۷	۶/۳	آلانین
۶/۴۱	۷/۳	آرژنین
۹/۸۱	۱۰/۳	آسپارتیک اسید
-	۰/۸	سیستئین
۱۷/۴۸	۱۲/۵	گلوتامیک اسید
۷/۱۱	۴/۳	گلیسین
۲/۴۰	۳/۵	هیستیدین
۴/۶۳	۵/۲	ایزوولوسین
۶/۲۰	۸/۶	لوسین
۶/۶۶	۸/۳	لیزین
۱/۴۵	۲/۱	متیونین
۴/۲۰	۴/۹	فینیل آلانین
۶/۸۲	۴/۵	پرولین
۴/۳۵	۵/۱	سرین
۹/۲۸	۵/۵	ترؤونین
-	۱/۶	تریپتوفان
۱/۳۷	۴/۰	تیروزین
۶/۰۶	۶/۲	والین

جدول ۳- نتیجه آنالیز اسیدهای چرب مهم  
محصول تولید شده

اسیدهای چرب (درصد)	اسید چرب	اسیدهای چرب
۰/۱۹	C14:0	میریستیک
۱۳/۲	C16:0	پالمیتیک
۰/۸۹	C16:1	پالمیتوئیک
۸/۹۸	C18:0	استشاریک
۳۷/۹	C18:1	اولنیک
۳۱/۶	C18:2	لینولنیک
۰/۰۸	C18:3	-لینولنیک
۰/۸۸	C20:0	آرشیدیک
۴/۴۷	C18:3	-لینولنیک- $\alpha$
۰/۵۳	C22:0	بهنیک

مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با اسیدهای آمینه گزارش شده توسط FAO (۹) نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه ترئونین، والین، ایزوولوسین، لوسین، فنیل آلانین و لیزین پروتئین قارچی به طور معنی‌داری بیشتر از مقادیر ارائه شده به وسیله FAO است.

جدول ۱- مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با مقادیر ارائه شده به وسیله FAO (گرم درصدگرم پروتئین)

ترئونین	فالین	سیستئین	متیونین	ایزوولوسین	لوسین	تیروزین	فینیل آلانین	لیزین
۹/۲۹	۲/۸							
۶۰	۴/۲	-	۲/۰					
۱/۴۵	۲/۲							
۴/۶۳	۴/۲							
۶/۲	۴/۸							
۱/۳۷	۲/۸							
۴/۲	۲/۸							
۶/۷	۴/۲							

مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین قارچی تولید شده با نتایج Rodger در سال ۲۰۰۱ نشان می‌دهد که اسیدهای آمینه گلوتامیک، گلیسین، ترئونین و پرولین قارچ فوزاریوم اکسیپوروم به طور معنی‌داری بیشتر از قارچ فوزاریوم و نه ناتوم است (جدول ۲).

نتایج حاصل از آنالیز اسیدهای چرب پروتئین قارچی در جدول ۳ نشان داده شده است. نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع آن  $۳/۱$  به ۱ بود که این نسبت، کمی پایین‌تر از نتایج Rodger در سال ۲۰۰۱ ( $۳/۵$  به ۱) است که تولید پروتئین قارچی از قارچ فوزاریوم و نه ناتوم را بررسی کرده بود. میزان کربوهیدرات‌توده زیستی به دست آمده  $۱۶/۷\%$  و چربی تام  $۱۲\%$  به دست آمد.

به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با استفاده از قارچ فوزاریوم/اکسیپوروم می‌توان پروتئین قارچی با کیفیت مطلوب و حاوی  $۴۲\%$  پروتئین خام در شرایط بهینه تخمیر به دست آورد.

- related substances. *Analytical chemistry* 1956; 28: 350-356.
7. Hunter BT. Make way for mycoprotein in U. S. food supply. *Consumers Research* 2001; 24-27.
  8. Lang CA. Simple microdetermination of kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analytical Chemistry* 1958; 30: 1692-1694.
  9. Moo-Young M, Chisti Y, Vlach D. Fermentation of celluloseic materials to mycoprotein foods. *Biotech Adv* 1993; 11: 469-479.
  10. Peregrin T. Mycoprotein: is America ready for a meat substitute derived from a fungus. *Journal of the American Dietetic Association* 2002; 102(5): 628.
  11. Rodger G. Production and properties of mycoprotein as a meat alternative. *Food Technology* 2001; 55(7): 36-38.
  12. Shojaosadati SA, Chisti Y, Moo-Young M. Reduction of nucleic acids levels in *Neurospora sitophila* by heat treatment. *International Journal of Engineering Science* 1999; 10(2): 83-93.
  13. Trinci APJ. Evolution of the Quorn Registered mycoprotein fungus *Fusarium graminearum* A3/5. *Microbiology* 1994; 140(9): 2181-2188.
  14. Vogel HJ. A convenient medium for *Neurospora* (medium N). *Microbial Genet Bull* 1956; 13: 42-44.
  15. Ward PN. Production of food. *United State Patent* 1998; 5,739,030.
  16. Wiebe MG. Quorn Mycoprotein- overview of a successful fungal product. *Mycologist* 2004; 18(1):17-20.
  17. Wiebe MG. Mycoprotein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 58(4): 421-427.

در نهایت، پیشنهاد می شود استفاده از گونه های خوراکی سایر قارچهای رشتہ ای برای تولید پروتئین قارچی، مورد مطالعه قرار گیرد. و استفاده از سوبسترانی کربوهیدراتی ارزان قیمت (ضایعات صنایع غذایی مانند آب پنیر) به عنوان منبع کربن بررسی شود. همچنین در زمینه استفاده از پروتئین قارچی در تهیه محصولات غذایی نظری سوسیس مطالعات لازم انجام شود.

#### • منابع

1. آهنگی، زهرا. شجاع الساداتی، سیدعباس نیکوپور، هوشنگ. چهارمین کنگره ملی بیوتکنولوژی، مرداد ۱۳۸۴، کرمان.
2. AOAC. Association of official chemists, official methods of analysis of association of official agriculture chemists. Assoc of Offic Agric Washington 1994.
3. AOAC. Association of official chemists, official methods of analysis of association of official agriculture chemists. 11td ed. Assoc of Offic Agric Washington 1975.
4. Barnes H, Balckstock J. Estimation of lipids in marine animals and tissue: detailed investigation of total lipids. *J Exp Mar Biol Ecol* 1973; 12: 101-118.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical chemistry* 1987; 162: 156.
6. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and