پرمایه کردن گلبرگ زعفران از پروتئین در کشت بستر جامد

Protein Enrichment of Saffron Petals in Solid State Fermentation

امیر ابوالحسنی[۱]، سیدمحمد حیدریان[۲*]و سیدمحمد حسینی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۲

چکیده

اسپرجیلوس نایجر یکی از ریزجاندارهایی است که برای تولید پروتئین تک‌یاخته به‌کار رفته است. این قارچ ریسه‌ای که توانایی تراوش انواع آنزیم را دارد می‌تواند بر سطح زیادی از سوبسترا رشد کند و از آن‌جا که مقدار زیادی پروتئین برون سلولی تولید می‌کند هم می‌توان بستر رشد آن را از پروتئین درون سلولی قارچ پرمایه کرد و هم می‌توان پروتئین ترشح شده را با حلال به سادگی بیرون کشید. راندمان رشد قارچ از آن‌جا که در حالت طبیعی بر روی جامدات پکتینی رشد می‌کند بر بستر جامد اغلب بیشتر از حالت مایع است. گلبرگ زعفران که در حال حاضر یکی از ضایعات کشاورزی است، می‌تواند به‌عنوان بستر کشت جامد مورد استفاده قرارگیرد. در این تحقیق با کشت بستر جامد *اسپرجیلوس نایجر* بر روی گلبرگ خشک شده زعفران در یک دوره ۱۵ روزه، پروتئین آن با دو حلال متفاوت بیرون کشیده شده و به دو روش لری و بیوره سنجیده شد. بیشترین میزان پروتئین سنجیده شده به روش بیوره با حلال آب خالص ۹۸/۵۳ میلی‌گرم در هر یک گرم گلبرگ خشک آغازین و با حلال سود و بافر کربنات ۱۶۷ میلی‌گرم در هر یک گرم گلبرگ خشک آغازین برآورد شد.

واژه‌های کلیدی: گلبرگ زعفران، کشت بستر جامد، *اسپرجیلوس نایجر*، پروتئین تک‌یاخته، ضایعات کشاورزی

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
۲. دانشیار پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران
*: نویسنده مسوول Email: heydarian@irost.ir

مقدمه

گلبرگ ۸۵ درصد وزن گیاه زعفران و درحدود ۹۸ تا ۹۹ درصد وزن کاسه گل زعفران را به خود اختصاص داده و در سال زراعی ۱۳۸۶ در حدود ۱۲۰۰۰ تن از آن در ایران تولید شده است. گلبرگ زعفران از ضایعات کشاورزی است که با توجه به حجم بالای تولید آن گرایش زیادی برای یافتن روشی جهت استفاده از آن وجود دارد. در پژوهش‌های انجام شده قبلی محققیق مختلف استخراج رنگ خوراکی از زعفران را مورد تحقیق و بررسی قرار داده‌اند (لطفی و همکاران، ۱۳۸۷)؛ *همتی* (Hemmati, 2001). همچنین آنتی‌اکسیدان‌های گلبرگ زعفران توسط محققین شناسایی و سنجیده شده است (تجلی و همکاران، ۱۳۸۷). در یک پژوهش جداگانه دیگر اثر عصاره آبی گلبرگ زعفران بر رشد گندم بررسی و گزارش شده است *عباسی* و همکاران (Abbasi *et al.*, 2008). با این حال هنوز ترکیبات سازنده گلبرگ به‌خوبی سنجیده نشده‌اند. پژوهش‌های زیادی برای افزایش درصد پروتئین ضایعات و پسماند کشاورزی با رشد ریزجانداران و تولید پروتئین تک‌یاخته بر روی آنها صورت گرفته است. برترین این پژوهش‌ها بر روی تخمیر بستر جامد انجام شده است. تخمیر بستر جامد را می‌توان فرآیندی قلمداد کرد که بر روی محیط‌کشت جامد گندزدایی شده (و نه لزوماً استریلیزه) و طبیعی با میزان رطوبت (یا فعالیت آبی Aw) کم انجام می‌شود *پاندی* (Pandey, 2003) *دوئل و همکاران* (۱۹۹۲). گمان می‌رود این روش کشت و تخمیر آغازگر فن‌آوری‌های تخمیر در زمان باستان بوده باشد *میشل و لورانس* (Mitchell and Lonsane, 1990). تخمیر بستر جامد در حضور آب آزاد کم انجام می‌شود و Mitchell و همکارانش در تعریف تخمیر بستر جامد بر این نکته باریک می‌شوند که بستر این فرآیند ذرّات جامد نمناک هستند، به‌صورتی‌که فاصله بین این ذرّات را فاز پیوسته گازی و کمینه‌ای از آب دیده‌شدنی پر کرده باشد *دوئل* و همکاران (Doelle *et al.*, 1992). میزان آب آزاد در بیشتر تعریف‌ها تا آن‌جا ناچیز ذکر شده که تنها برای رشد و سوخت و ساز جاندارهای ریز کافی باشد *پاندی* (Pandey, 2001) که می‌توان آن را در آغاز کشت به بستر افزود یا در طول زمان به مقدار کم وارد بستر کرد *دوئل* و همکاران (1992). ذرّات جامد نقش پایه‌ای را برای رشد میکروارگانیزمها انجام می‌دهند ولی برخی از این ذرّات جامد افزون بر این به‌عنوان تأمین‌کننده منابع غذایی (منبع کربن، نیتروژن، مواد معدنی و اسیدهای آمینه) برای میکروارگانیسم نیز به‌کار می‌روند. اغلب پسماندهای کشاورزی در این دسته جا می‌گیرند. این پسماندها به‌دلیل گستردگی و پیچیدگی ترکیبات موجود، می‌توانند به‌عنوان وادارکننده تولید انواع ترکیبات درون سلّولی یا برون سلّولی در میکروارگانیسم باشند *میشل* و همکاران (Mitchell *et al.*, 2000)، *دوئل* و همکاران (Doelle *et al.*, 1992). فراسنجه‌های زیادی بر تخمیر بستر جامد اثر می‌کنند در این بین این موارد بیش از بقیه مورد بررسی واقع شده‌اند:

۱- اندازه ذرّات جامد
۲- نمناکی بستر (یا نم آغازین) و کنش‌وری آب
۳- پیش‌فراوری بستر جامد
۴- هوادهی و هم‌زدن
۵- مهار آلودگی
۶- pH بستر
۷- دمای کشت ریزجاندار
۸- گونه، اندازه و سن مایه‌کوبی
۹- پدیده‌های انتقال (رفت و آمد جرم و حرارت)

در صورت گزینش یک ماده یا ضایعات کشاورزی برای محیط‌کشت تخمیر بستر جامد، انتخاب ریزجاندار مهم‌ترین گام بعدی در فرآیند است. مواردی مانند پژوهش‌های پیشین، ترکیب جامد به‌کار گرفته شده در بستر و توانایی ریزجاندار در مصرف آن، فرآورده یا فرآوری موردنظر، فرآورده‌های کناری و پیچیدگی جداسازی و پالایش پس از فرآیند برخی از نکات مهم در انتخاب ریزجاندار مناسب برای یک محیط‌کشت مشخص هستند. قارچ‌های ریسه‌ای گزینه مناسبی برای رشد در تخمیر بستر جامدند. قارچ‌ها حداقل به سه دلیل برای تخمیر جامد مناسب هستند. یکی آن‌که این ریزجانداران می‌توانند در pH کم و با بودن مقدار پایین آب آزاد رشد و سوخت و ساز کنند. از آن‌جا که دیگر ریزجانداران نمی‌توانند در محیط‌هایی با چنان درجه خشکی رشد کنند امکان آلودگی کشت هم بسیار کم شده و نیاز به سترون‌سازی پایین می‌آید. توانایی دوم آنها در تراوش آنزیم‌های آبکافتی برون سلولی است که به قارچ‌ها توانایی شکافتن و مصرف بزرگ مولکول‌هایی مانند سلولز و پکتین و مانند این را می‌دهد که دهگاه کربن و انرژی ریزجاندار خواهند بود. مورد آخر هم هاگ‌زایی است که مقاومت ریزجاندار را در برابر شرایط سخت بالا می‌برد. افزون بر این هاگ‌زایی هم برتری بزرگی است چون هاگ به راحتی ذخیره می‌شود و آماده کردن مایه هاگی هم آسان است (*میشل* و همکاران، 2000؛ *دوئل* و همکاران، 1992). رشد هایفایی (ریسه‌ای) قارچ هم به گستردگی توده ریزجاندار و استفاده از تمام قسمت‌های بستر کمک می‌کند. این ریسه‌ها به‌خاطر سختی دیواره نوک آنها می‌توانند فشار ناشی از رشد را به فشار مکانیکی بالایی تبدیل کنند که باعث می‌شود بتوانند در انواع بسترهای سخت و به هم

فشرده نفوذ کنند یا ذرات یکپارچه جامد را شکسته و ریز نمایند.

از آن‌جا که گلبرگ زعفران دیواره سلولی و مواد فنولیک زیادی را به‌همراه قند بالا در اختیار ریزجاندار قرار می‌دهد قارچی که می‌خواهد بر روی آن رشد کند باید بتواند آنزیم‌های لیگنینَلیتیکی مانند لَکیز و لیگنین پراکسیدیز یا منگنز پراکسیدیز را تولید نماید. بهترین گونه قارچ‌های تولیدکننده این نوع آنزیم‌ها قارچ‌های سفیدپوس هستند ولی در این پژوهش به سراغ *آسپرجیلوس نایجر* رفته‌ایم که افزون بر توانایی تولید آنزیم‌های نامبرده می‌توانند دامنه گسترده‌ای از دیگر آنزیم ها مانند آنزیم های پکتینُلیتیکی و سلولیتیکی را هم به خوبی تراوش کرده و میزان بالایی پروتئین خارج سلولی تولید می کند (*دوئل* و همکاران، 1992).

بررسی‌های بسیاری روی سنجش پروتئین و ارتباط آن با جرم کلی توده زیستی صورت گرفته است. همچنین روش‌های گوناگونی برای سنجش پروتئین در تخمیر بستر جامد انجام شده و شُده‌ها برای یافتن و انتخاب بهترین روش سنجش پروتئین در این گونه از تخمیر با هم مقایسه شده‌اند. در سنجش پروتئین برای *آسپرجیلوس نایجر* روش‌های مختلف مقایسه شده‌اند و بیوره روش مطمئن‌تری پیشنهاد شده است *جرنجک* و همکاران (Jernejc *et al.*, 1986).

در پژوهش حاضر تلاش شده با کشت *آسپرجیلوس نایجر* بر روی گلبرگ زعفران، پروتئین این دور ریز کشاورزی زیاد شود تا بتوان از آن به‌عنوان خوراک دام استفاده کرد. این موضوع افزون بر این که ارزش افزوده زیادی ایجاد می‌کند، به خاطر حذف ماده‌ای که نیاز به دفع و تصفیه آن بود باعث صرفه‌جویی در هزینه‌های کناری نیز می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد: تمام مواد به جز در مواردی که جداگانه اشاره شده از شرکت مرک و با خلوص Analytical grade تهیه گردید.

میکروارگانیسم *اسپرجیلوس نایجر* PTCC-5012 به‌صورت کپسول خشک شده به‌کمک انجماد از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. باز کردن و رقیق کردن ریزجاندار در همه مراحل به کمک سرم بیولوژیکی استریل شده (دارای ۰/۹درصد جرمی کلرید سدیم و ۰/۱ درصد حجمی Triton X) انجام می‌گرفت.

آماده کردن بستر جامد: گلبرگ‌ها برای یک شب به‌صورتی‌که بر روی یکدیگر انبار نشده باشند در برابر لامپ UV قرار گرفتند. آن‌گاه داخل ارلن مایر سترون شده ریخته شده و پس از وزن شدن برای یک شب دیگر در برابر لامپ UV گذاشته شدند. هر ارلن دارای ۴ گرم گلبرگ بود. سپس به هر ارلن مایر ۶ میلی‌لیتر آب دارای مواد معدنی برای تأمین آب مورد نیاز بستر اضافه گردید. مواد معدنی افزوده به ازای ۱۰۰ گرم گلبرگ خشک به این شرح است: ۳ گرم نیترات سدیم، ۰/۵ گرم کلریدکلسیم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیم و ۲ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم.

آماده‌کردن مایه تلقیح: در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ۱۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی دارای ده درصد جرمی گلوکز، یک درصد جرمی عصاره مخمر، یک درصد جرمی فسفات دی هیدروژن پتاسیم، نیم درصد جرمی کلریدکلسیم و نیم درصد جرمی سولفات منیزیم و یک درصد حجمی از مواد کم‌مصرف بر مبنای *کیرک و تین* (Kirk and Tien, 1988) که سترون شده بود، اضافه شد. سپس به کمک لوپ از Slantهای آگار دو روزه *اسپرجیلوس نایجر* مقدار نامعینی ریزجاندار به آن اضافه شد. ارلن‌ها برای ۴۸ تا ۷۲ ساعت با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه در شِیکر انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن محلول اضافی آنها در شرایط استریل بیرون ریخته شد و قارچ رشد یافته به کمک مخلوط کن یکنواخت شد. در هر ارلن به کمک پیپت ۵ میلی‌لیتر از مایه که دارای ۲×۱۰^{۸} میسلیوم بود ریخته شد.

بیرون کشیدن پروتئین از بستر با آب خالص: در بیرون کشیدن پروتئین و آنزیم ها به کمک آب خالص به ازای هر گرم گلبرگ خشک، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ارلن افزوده شد. سپس ارلن سه ساعت با دور ۱۸۰ دور در دقیقه چرخیده و بعد از آن از فیلتر شماره ۱ واتمن رد شد و محلول حاصل برای۲۰ دقیقه در دور ۸۰۰۰ دور بر دقیقه (15940 g) سانتریفیوژ گردیده و از کاغذ صافی شماره ۲ واتمن رد شد. خروجی فیلتر برای سنجش پروتئین به‌کار رفت. برای رسم منحنی استاندارد سنجش نیز تنها از آب خالص استفاده شد.

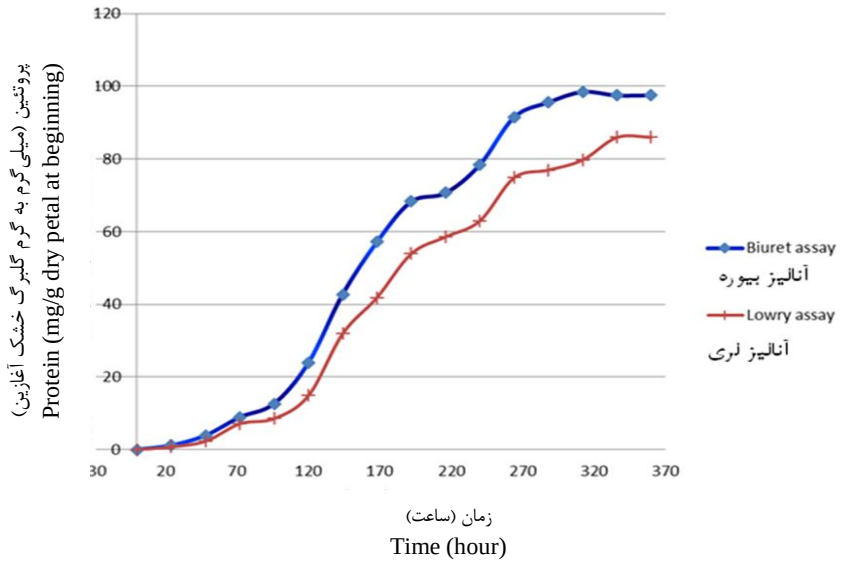
بیرون کشیدن پروتئین از بستر با مخلوط سود و بافر کربنات- بی‌کربنات: پس از افزودن چهار میلی‌لیتر سود یک نرمال در برابر هر یک گرم گلبرگ و گذشت ۱۰ دقیقه چرخش در دور rpm ۱۰۰، ۳۶ میلی‌لیتر از بافر کربنات- بی‌کربنات سدیم با pH برابر با ۱۰/۶ و ۱۰۰ میلی‌مولار به ازای هر یک گرم گلبرگ به آن افزوده شده و با دور ۱۸۰ دور در دقیقه چرخانده شد آن‌گاه از کاغذ صافی واتمن شماره یک گذرانده شده و در با ۸۰۰۰ دور بر دقیق (15940g) برای بیست دقیقه سانتریفیوژ گردید و با کاغذ صافی شماره ۲ واتمن یکبار دیگر فیلتر شد. محلول حاصل برای سنجش پروتئین به‌کار رفت و

برای رسم منحنی استاندارد به جای آب از محلول سود و بافر با نسبت یک به نه استفاده گردید.

سنجش پروتئین به روش لری وبیوره: از روش لری و بیوره بهسازی شده استفاده شد/*ستوچک* (Stoscheck, 1990).

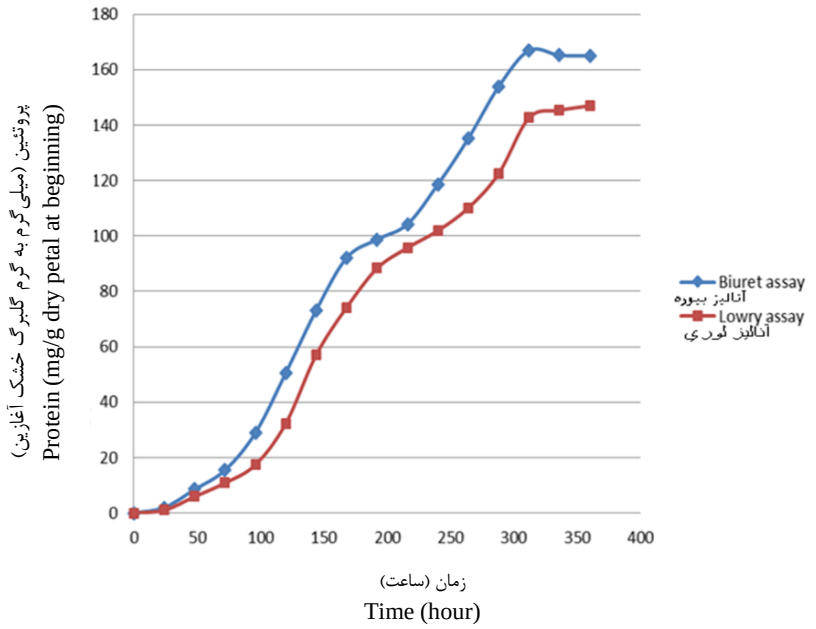
نتیجه و بررسی

داده‌های سنجش پروتئین بیرون کشیده شده به کمک آب در شکل ۱ نشان داده شده است. چنان‌چه مقدار پروتئین تولید شده به‌عنوان پارامتر نماینگر رشد میکروارگانیزم در نظر گرفته شود، مشاهده می‌شود رشد از روز دوم شروع شد و از روز ۴ وارد فاز رشد نمایی شد و در روز ۱۱ به حداکثر رشد رسید.



شکل ۱: سنجش پروتئین بیرون کشیده شده از بستر به کمک آب با دو روش بیوره و لری

Fig. 1: Assay of extracted protein with water using Biuret and Lowry methods



شکل ۲: سنجش پروتئین بیرون کشیده شده از بستر به کمک بافر با دو روش بیوره و لری

Fig. 2: Assay of extracted protein with buffer using Biuret and Lowry methods

نتایج به‌دست آمده از پروتئین بیرون کشیده شده به کمک بافر در شکل ۲ نشان داده شده است. روند افزیش پروتئین در این روش نیز مشابه روش استفاده از آب می‌باشد.

آنالیز آماری اثر دو فاکتور نوع حلال (آب یا بافر) و روش استخراج (لوری یا بیوره) بر میزان استخراج پروتئین براساس حداقل نمودن مربعات خطا با میزان اطمینان ۹۵٪ در جدول (۱) نشان داده شده است. نتایج نشان داده شده در این جدول نمایانگر این است که تأثیر فاکتورهای فوق بر میزان استخراج پروتئین با میزان اطمینان ۹۵٪ از نظر آماری دارای اهمیت است. اما اثر متقابل دو فاکتور نوع حلال و روش استخراج بر میزان استخراج حائز اهمیت نمی‌باشد.

جدول ۱: آنالیز آماری فاکتورهای مؤثر بر میزان استخراج پروتئین

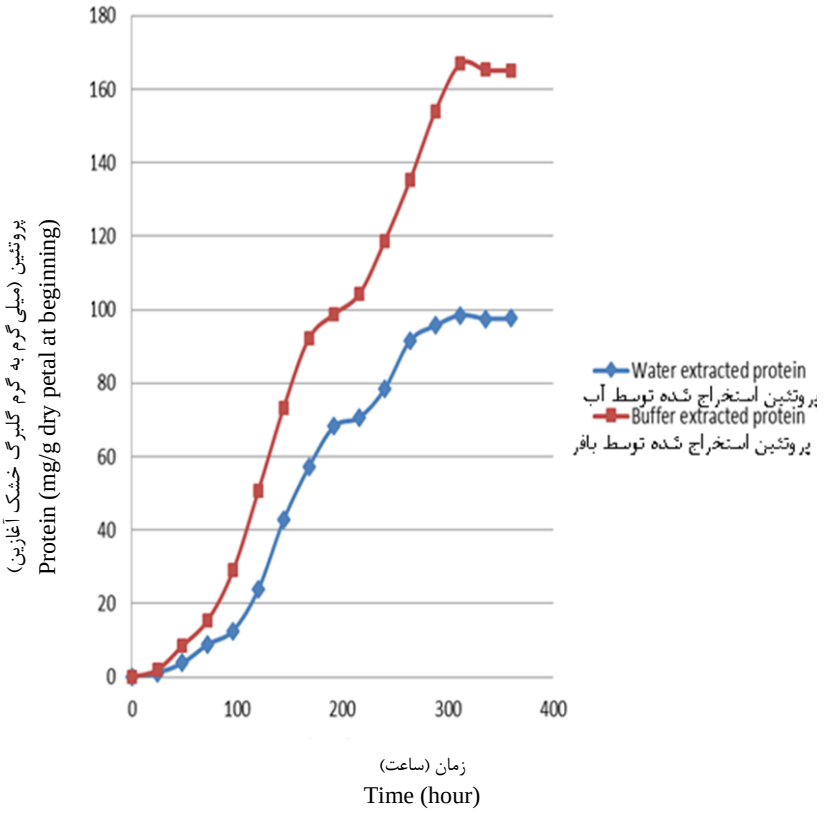
Table 1: Statistical analysis of effective parameters on protein extraction

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	1	16567.1	16567.1	16567.1	93.47	0.000
B	1	2518.8	2518.8	2518.8	14.21	0.001
A×B	1	68.5	68.5	68.5	0.39	0.538
Error	42	7443.9	7443.9	177.2		
Total	59	143016.5				

A: نوع حلال (آب یا بافر)، B: روش استخراج (لوری یا بیوره)

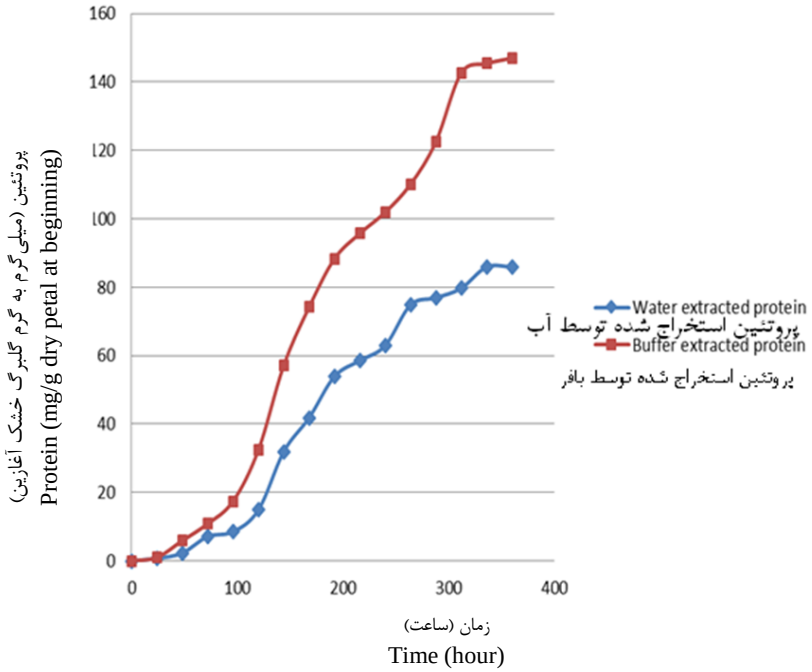
A: Solvent type (Buffer or water)- Extraction type (Lowry or Biuret)

آن‌چنان که از هر دو شکل مشخص است پروتئین سنجیده شده به روش لری همواره کمتر از پروتئین سنجیده شده به روش بیوره است. گرچه نمایه رشد پروتئین در هر دو حالت شبیه به هم است. این موضوع قابل پیش‌بینی بود. زیرا در روش بیوره مولکول مس با پیوندهای پپتیدی واکنش داده و یک همتافت چهار بنیانی می‌سازد. این همتافت رنگ بنفشی می‌سازد که می‌توان آن را در ۵۴۰ نانومتر جدا از رنگ آبی محلول شناساگر سنجید ولی در روش لری حلقه‌های آمینی هستند که با محلول لری واکنش می‌دهند. باید توجه داشت که روشی مانند لری به‌خاطر بازده کمتر پروتئینی که می‌سنجد به رقّت بالاتری از پروتئین نیاز دارد و این رقّت بالا باعث می‌شود اثر عواملی که ممکن است موجب دقت نداشتن سنجش شوند بسیار کمتر شود. به‌علاوه سنجش در رقّت بالا دقت بیشتری را هم به‌همراه می‌آورد. در هر چهار حالت پله‌ای را در سنجش پروتئین در بین زمان ۱۴۴ تا ۲۱۶ ساعت پس از کشت می‌بینیم که دلیل آن می‌تواند تغییر سوبسترای قارچ باشد. از آن‌جا که *اسپرجیلوس نایجر* پس از مصرف کردن قندهای ساده مانند گلوکز اول به سراغ پکتین می‌رود، ممکن است بتوان استدلال کرد که این‌جا نقطه‌ای است که مواد پکتینی (یا سلولزی) تمام شده‌اند و قارچ شروع به مصرف ترکیبات سلولزی (یا لیگنینی) کرده است. برای آزمایش درستی این پندار باید آنزیم‌هایی مانند سلولاز، لَکیز، لیگنین پراُکسیدِیز، پکتینِیز، زایلانِیز و پروتئینیز در طول کشت سنجیده شده و با توجّه به تغییرات آنها نسبت به درستی یا نادرستی این فرض بحث شود. برای همسنجی محلول‌های استخراج‌کننده پروتئین نمودارها به شکل دیگری در دو شکل ۳ و ۴ نشان داده شده‌اند.



شکل ۳: سنجش پروتئین بیرون کشیده شده با آب و بافر به روش بیوره

Fig. 3: Assay of extracted protein with water and buffer using Biuret method



شکل ۴: سنجش پروتئین بیرون کشیده شده با آب و بافر به روش بیوره

Fig. 4: Assay of extracted protein with water and buffer using Lowry method

در هر دو شکل سنجش به روش بیوره و لری (نمودار ۳ و ۴) می‌بینیم که داده‌های پروتئین هنگامی‌که با بافر بیرون کشیده شده‌اند بیشتر از حالتی است که با آب بیرون کشیده شده‌اند. پروتئین در محیط بازی و خنثی محلول است ولی در محیط اسیدی رسوب می‌کند. پندار اول آن است که این امکان وجود دارد که بر اثر فعالیت قارچ محیط اسیدی شده باشد (گرچه خود گلبرگ زعفران هم محیط اسیدی تولید می‌کند) و این می‌تواند باعث رسوب مقداری از پروتئین شده باشد. در حالت دوم، حتی اگر پندار اول نادرست باشد مطمئناً میزان حل شدن پروتئین در محیط بازی بیشتر است ولی با توجه به تفاوت نزدیک ۱۰۰ درصدی دو داده در برخی حالات باید دلیل دیگری هم وجود داشته باشد.

سود افزوده شده به بستر نرمالیته بالایی دارد. گرچه هاگ تشکیل شده به وسیله قارچ ممکن است در برابر حل شدن پایداری بیشتر داشته باشد ولی بودن درصد بالایی از میسلیم در بستر و نرمالیته بالای سود توانسته بخشی از دیواره سلولی قارچ را در خود حل کرده و پروتئین درون سلولی را بیرون بکشد. به همین دلیل پروتئین سنجیده شده مقداری بسیار بالاتر از پروتئین بیرون کشیده شده به کمک آب خالص دارد. با توجّه به داده‌های دو مسیر بیرون کشیدن پروتئین مشخص است که گرچه پروتئین برون سلولی در چند روز آخر ثابت مانده ولی قارچ هنوز به رشد خود ادامه می‌داده است. برای سنجش درستی این فرضیه باید با هر یک از دو حلال پروتئین کل بستر را که به روش‌های معمول از داخل سلول بیرون کشیده می‌شود سنجید تا بتوان با بررسی آن ادعا کرد که آیا بافر توانسته پروتئین درون سلولی را در حالات آزموده شده بیرون بکشد یا نه و آیا هیچ‌یک از این دو مسیر بیرون کشیدن پروتئین می‌توانند به‌عنوان نمایه‌ای از رشد ریزجاندار به شمار بروند؟

نتیجه‌گیری

آسپرجیلوس نایجر می‌تواند به خوبی ترکیبات گلبرگ زعفران را مصرف کرده و محصولات باارزش تولید نماید. پروتئین برون سلولی آن تا ۱۰ درصد وزن بستر بالا رفت. درصورتی‌که تداخلی با روش‌های سنجش به وجود نیاید و نیازی به خالص‌سازی بیشتر در پایان فرآیند نباشد بیرون کشیدن پروتئین از بستر به کمک بافر نتایج بهتری خواهد داشت از آن‌جا که علاوه‌بر حلالیت بهتر پروتئین در آن، می‌تواند با حل کردن دیواره سلولی ریزجاندار بخشی از پروتئین درون سلولی را هم بیرون بکشد ولی آب خالص تنها توانست پروتئین تراوش شده برون سلولی را در خود حل کند.

سپاسگزاری

از شرکت محترم نوین زعفران که همکاری صمیمانه‌ای برای پیشبرد این تحقیق داشتند صمیمانه سپاسگزاریم. همچنین از پرسنل پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران برای همکاری در طرح تشکر می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۲۴ متن انگلیسی مراجعه شود.