نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۴۳، تابستان ۱۴۰۳
ص‌ص: ۵۷~۷۰

ارزیابی ارزش تغذیه‌ای پروتئین میکروبی تولید شده با متانل با استفاده از باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس*

• سجاد محمودی[1]، جعفر محمدیان موسی آبادی*[2]، رسول خلیل زاده[3]، سید مرتضی رباط جزی[4]، فرشید رضایی[5]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۲- دکترای بیوشیمی، استادیار دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۳- دکترای مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشیار دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۴- دکترای مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، استادیار دانشگاه صنعتی مالک اشتر
۵- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه پیام نور

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۴۰۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۱۲۲۹۷۰۲۵۷
Email: mohama_j@mut.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ ASJ.2023.362099.2307

چکیده

پروتئین میکروبی می‌تواند بخشی از پروتئین مورد نیاز در جیره دام و طیور آبزیان را تامین کند، این پروتئین با استفاده از میکروارگانیسم‌ها و منابع کربنی مختلف از جمله متانول و متان تولید می‌شود. در این پژوهش باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* در ارلن و فرمنتور با استفاده از متانول به عنوان منبع کربن کشت داده شد که سرعت رشد ویژه باکتری در ارلن برابر h^{-1} ۰/۰۳۱۲ و در فرمنتور h^{-1} ۰/۰۴۷ بود. پس از کشت، توده زیستی در چگالی نوری برابر ۳/۸ با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت rpm۷۰۰۰ جداسازی شد و تست‌های کیفی و کمی پروتئین میکروبی روی آن انجام گرفت. پروفایل آمینواسیدی، پروفایل اسیدچرب، میزان نیتروژن و پروتئین خام به ترتیب با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، کروماتوگرافی گازی و با روش کجلدال تعیین شدند. نتایج حاصل نشان می‌دهد مقدار پروتئین خام برابر ۷۳/۵ درصد بود. میزان خاکستر ۸/۲۹ درصد و مجموع آمینواسیدهای ضروری به غیر ضروری (شامل: لیزین، هیستیدین، آرژنین، والین، لوسین، ایزولوسین، فنیل آلانین، متیونین و ترئونین) برای محصول تولید شده ۳۷/۳ درصد بدست آمد. مقدار دو اسید آمینه غیر ضروری سیستئین و تیروزین بالاتر از استاندارد FAO و به ترتیب برابر ۲/۳۸ و ۳/۲۱ درصد بود. نسبت پالمتیک اسید به چربی کل محصول ۲۴/۶ درصد (وزنی/وزنی) است و نسبت لینولئیک اسید و لینولنیک اسید به عنوان اسیدهای چرب غیر اشباع، به ترتیب ۹/۲ و ۲/۳ درصد (وزنی/وزنی) به چربی کل محصول بود. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که محصول تولیدی با محتوای پروتئینی ۷۳/۵ درصد، کاندیدی مناسب برای خوراک دام به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین میکروبی، متیلوفیلوس متیلوتروفوس، ارزیابی تغذیه‌ای، متانل.

Copyright: © 2024 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by **Research Journal of Livestock Science** (https://asj.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Research Journal of Livestock Science No 143 pp: 57-70

Evaluation of nutritional value of microbial protein produced with methanol using *Methylophilus methylotrophus* bacteria

By: Mahmoudi, Sajjad[1], mohamadian mosaabadi, jafar *[1], khalilzadeh, rassoul[1], robatjazi, seyed morteza[1], rezaie, farshid[2]
1: Malek Ashtar University of Technology
2: Payam Noor University, East Tehran Center .

Received: June 2023 **Accepted: August 2023**

Microbial protein is used in animal and poultry feed. This protein is produced using microorganisms and different carbon sources such as methanol and methane. In this study, *Methylophilus methylotrophus* bacteria were cultivated in erlen and fermentor using methanol as a carbon source. The specific growth rate of bacteria was 0.0312 h^{-1} in erlen and 0.0047 h^{-1} in fermenter. After cultivation, the biomass was separated at optical density of 3.8 using a centrifuge at 7000 rpm, and qualitative and quantitative tests of microbial protein were performed on pellet. Amino acid profile, fatty acid profile, nitrogen content and crude protein were determined using high performance liquid chromatography, gas chromatography and Kjeldahl method, respectively. The results show that the amount of crude protein was 73.5%. The amount of ash was 29.8% and the total of essential to non-essential amino acids (including lysine, histidine, arginine, valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, methionine and threonine) was 37.3% for the produced product. The amount of two non-essential amino acids, cysteine and tyrosine, was higher than the FAO standard and was 2.38% and 3.21%, respectively. The ratio of palmitic acid to the total fat of the product is 24.6% (w/w) and the ratio of linoleic acid and linolenic acid as unsaturated fatty acids is 9.2 and 2.3% (w/w) to the total fat of the product, respectively. The results obtained from this research showed that the product with a protein content of 73.5% seems an appropriate candidate for animal feed.

Key words: Microbial protein, *Methylophilus methylotrophus*, Nutritional evaluation, Methanol

مقدمه

با افزایش جمعیت جهان، نیاز به مواد غذایی به ویژه مواد پروتئینی افزایش می‌یابد. تامین پروتئین برای دام، طیور و آبزیان از مشکلات اساسی دنیا در عصر حاضر است. از اصلی‌ترین علل این مشکلات کمبود منابع آب در سطح جهان و به تبع آن بروز خشکسالی و از بین رفتن منابع طبیعی می‌باشد. همین عوامل منجر شده است که کمبود خوراک دام و از بین رفتن زیستگاه‌ها، به یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های صنعت دام، طیور و شیلات مبدل شود. شرایط جغرافیایی و نداشتن مدیریت کلان علت وابستگی واردات پروتئین از کشورهای پیشرفته به کشورهای جهان سوم می‌باشد (Ritala و همکاران، 2007)

با توجه به مشکلات فوق و در پی یافتن منابع جدید، بستر مناسبی برای پژوهش در این زمینه فراهم شد که محققان در جستجوی منابع ارزان قیمت برای تأمین پروتئین انسان و دام باشند. طی سالیان اخیر مطالعات گسترده‌ای به منظور استفاده از میکروارگانیسم‌هایی نظیر مخمرها، باکتری‌ها و جلبک‌ها به عنوان منابع پروتئین میکروبی جهت تولید غذای انسان و دام (به جای منابع پروتئینی رایج) صورت گرفته است. در حال حاضر، از این‌گونه منابع پروتئینی تحت عنوان پروتئین تک یاخته (SCP) در جیره غذایی دام و طیور به طور گسترده استفاده می‌شود.

استفاده از ضایعات سلولزی، آب پنیر، فاضلاب شهری، ملاس،

باگاس، متانول، گاز طبیعی، اتانول و... به عنوان سوبسترا برای تولید پروتئین‌های میکروبی مورد بررسی قرار گرفته است (Parajó وهمکاران،1997). آلکان‌ها یکی از سوبستراهایی است که در دنیا برای تولید پروتئین میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد، که استفاده از آن در بسیاری از کشورها مورد مطالعه قرار گرفته است. متان، به عنوان یک آلکان ارزان قیمت و در دسترس با احتمال آلودگی پایین می‌تواند برای تولید پروتئین میکروبی در مقیاس صنعتی استفاده شود (Yazdian و همکاران، 2005). گزارش‌های پیشین حاکی از آن بوده است که بیومس باکتریایی حاصل از متان حاوی بیش از ۷۵ درصد پروتئین خام بوده و مقدار زیادی از اسیدهای آمینه ضروری مثل لیزین به میزان ۵/۹ درصد و ویتامین‌های گروه B مانند تیامین و بیوتین را داراست (Yazdian و همکاران، 2005؛ Sikander و همکاران،2017؛ Khoshnevisan و همکاران، 2019؛ Spalvins و همکاران، 2018) . در نتیجه، علاقه‌مندی زیادی برای تولید SCP از متان در سال‌های اخیر وجود دارد.

با توجه به شرایط کشور ایران از جهت دارابودن منابع عظیم گاز طبیعی، افزایش شدید قیمت خوراک دام و طیور و از طرف دیگر نیاز کشور به مواد افزودنی پروتئینی به خوراک دام و طیور و آبزیان تولید پروتئین از گاز طبیعی کاملاً منطقی و اقتصادی به نظر می‌رسد.

در سال‌های گذشته تعدادی از شرکت‌ها در اروپا و ژاپن سرمایه گذاری وسیعی را برای تولید SCP از متانل شروع کردند. در آلمان شرکت هوخست و در انگلستان شرکت ICI اقدام به تولید SCP از متانل کردند. انستیتو KISR کویت در سال ۱۹۷۷ شروع به مطالعات و تحقیق بر روی تولید SCP از متانل نمود. حتی اقدام به احداث کارخانه نمودند که در جنگ عراق و کویت مهندم شد(Yazdian و همکاران، 2005 ؛ Vrati، 1984).

ایران نیز از سال ۱۳۷۵ شروع به تحقیقات بر روی تولید SCP از متانل توسط شرکت تهیه، تولید و توزیع علوفه وزارت جهاد سازندگی در این زمینه شروع به فعالیت کرد. این شرکت با توجه به سهولت دسترسی به متانل در ایران به این نتیجه رسید تا طرح تولید را به صورت پروژه‌ای با همکاری دانشگاه تربیت مدرس در سطح آزمایشگاهی بررسی نماید و در نهایت کارخانه‌ای با ظرفیت تولید ۳۰ هزار تن SCP در سال طراحی و ساخته شود (Yazdian و همکاران، 2005).

ارزش غذایی و سودمندی پروتئین میکروبی از هر منبع بر اساس ترکیبات آن است. مواد مغذی، ویتامین‌ها، نیتروژن، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، اجزای دیواره سلولی، اسیدهای نوکلئیک، غلظت پروتئین و اسید آمینه باید قبل از استفاده از محصول برای خوراک یا مکمل غذایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. یکی از روش‌های تجزیه شیمیایی برای ارزیابی خوراک‌ها روش تجزیه تقریبی است. هدف اصلی، تجزیه مواد خوراکی به ترکیبات مواد مغذی مورد نیاز حیوان است. برای ارزیابی ارزش غذایی پروتئین‌های میکروبی، عوامل زیر را باید در نظر گرفت: ترکیب مواد مغذی، پروفایل آمینو اسیدی و ویتامینی، مقدار اسید نوکلئیک اسید، قابلیت هضم پذیری و سمیت برای حیوان (Erdman و همکاران، 1977).

پروتئین میکروبی دارای پروتئین بالا و اسید آمینه‌های ضروری است. محتوای پروتئین خام تقریبا ۸۰ درصد از کل وزن خشک است. محتوای اسید نوکلئیک، به ویژه اسید ریبونوکلئیک، در وزن خشک بسیار زیاد است و به میزان ۱۵ تا ۱۶ درصد گزارش شده است. پروتئین میکروبی تهیه شده از باکتری غنی از متیونین است که حدود ۲/۲–۳ درصد است، که نسبت به جلبک‌ها (۱/۴–۲/۶ درصد) و قارچ‌ها (۱/۸–۲/۵ درصد) نسبتا بالاتر است (Nasseri و همکاران، 2011).

مقدار پروتئین و لیپید در میکروارگانیسم‌ها تا حدی منعکس کننده ترکیبات بکار برده شده در محیط کشت رشد میکروارگانیسم می‌باشد.

در این پژوهش پروتئین تک یاخته میکروبی با استفاده از متانل و باکتری متیلوفیلوس متیلوتروفوس در ارلن و فرمنتور آزمایشگاهی تولید شد و آزمون‌های ارزیابی ارزش تغذیه‌ای روی محصول تولید شده انجام گرفت. این آزمون‌ها شامل میزان پروتئین و چربی خام، پروفایل چربی و اسید آمینه محصول، مقدار خاکستر و آنالیز

عنصری می باشد (Rudravaram و همکاران، 2009 ؛ Johnson، 2013).

مواد و روش‌ها

سویه مورد مطالعه

باکتری مورد استفاده در این پژوهش *متیلوفیلوس متیلوتروفوس*[1] *DSM 6360 از کلکسیون DSMZ آلمان*[2]، یک باکتری گرم منفی می‌باشد که به فرم لیوفیلیزه خریداری شد. این یک باکتری مزوفیل و هوازی است و در محدوده‌ی دمایی ۳۵ درجه سلسیوس رشد می کند.

محیط کشت تولید

برای کشت باکتری از محیط کشت حاوی متانول با ترکیب شیمیایی موجود استفاده شد، که ترکیبات شیمیایی محیط کشت (محیط کشت چوی[3]) (Choie and Lee، 1999) بر حسب گرم در لیتر آب مقطر در جدول ۱ بیان شده است:

کشت در ارلن

پس از احیاء آمپول لیوفیلیزه باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* (آمپول لیوفیلیزه با رعایت استانداردهای اسپتیک و روش‌های میکروبیولوژی شکسته شده و از محتویات آن سوسپانسیون تهیه می‌گردد این سوسپانسیون حاوی میکروگانیسم مورد نظر به محیط‌های کشت بهینه وارد و انکوبه می‌شود تا رشد حاصل گردد)، منحنی رشد آن در محیط کشت مایع در ارلن با استفاده از روش کدورت سنجی رسم شد. برای این منظور جذب نوری نمونه در فواصل زمانی مشخص در طول موج ۶۰۰ نانومتر به مدت ۶۰ ساعت اندازه‌گیری شده و منحنی لگاریتمی جذب بر حسب زمان رسم گردید.

کشت در فرمنتور

کشت در دو مقیاس ارلن و فرمانتور صورت گرفت. بعد از سترون شدن محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و سرد شدن آن، محلول متانول استریل شده با فیلتر به آن اضافه شد تا غلظت نهایی ۰/۵ درصد وزنی حجمی بدست آید. در تهیه محیط کشت برای اجتناب از تشکیل رسوب نمک‌های فسفات، کلسیم و منیزیم هر کدام به صورت جداگانه استریل شده و پس از خنک شدن در شرایط سترون با هم مخلوط شدند. بعد از احیای آمپول لیوفیلیزه، کشت میگروارگانیسم *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* در محیط کشت در ارلن به مدت ۷۲ ساعت در شرایط دمایی ۳۵ سلسیوس و rpm ۲۰۰ برای تهیه مایه تلقیح انجام شد. برای تولید پروتئین تک یاخته، سویه *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* در فرمانتور Infors HT-G3 به حجم ۳ لیتر دارای همزن Rushton با محیط کشت مورد نظر به حجم ۱/۵ لیتر کشت داده شد. غلظت متانول ۵گرم بر لیتر، دما در ۳۵ سلسیوس و pH در ۷ به کمک محلول NaOH و H_2SO_4 دو مولار تنظیم شد. الکترود اکسیژن محلول و pH از نوع Mettler Toldo 30248830 بوده و قبل از استفاده مطابق دستورالعمل کالیبره شدند. همچنین در مدت زمان ۶۰ ساعت، سرعت همزن در rpm ۶۰۰–۷۵۰ و غلظت اکسیژن محلول داخل فرمنتور در ۳۰–۵۰ درصد اشباع تنظیم شد. پس از اتمام کشت، از سانتریفیوژ با سرعت ۷۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه برای جداسازی توده باکتریایی از محیط کشت استفاده شد. پس از شستشوی توده باکتریایی با آب مقطر از آون با دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت جهت خشک کردن توده باکتریایی استفاده شد.

---

[1] *Methylophilus methylotrophus*

[2] DSMZ. German Collection Of Microorganism and Cell Culturs GmbH

[3] Choie

جدول ۱: محیط کشت چوی (Choie and Lee، 1999)

ترکیب شیمیایی	$Na_2HPO_4.7H_2O$	KH_2PO_4	$MgSO_4.7H_2O$	$(NH_4)_2SO_4$	$CaCl_2.2H_2O$	$FeSO_4.7H_2O$
مقدار (گرم)	4.020	1.035	0.450	1.000	0.003	0.001

برای تهیه محلول عناصر کم مقدار، از مواد زیر بر حسب گرم در لیتر ترکیب شده و ۰/۵ میلی‌لیتر آن برای یک لیتر محیط کشت استفاده شد. لازم به ذکر است که برای جلوگیری از رسوب محیط کشت، سولفات آهن به صورت جداگانه از سایر اجزای محیط کشت تهیه شد (جدول ۲).

جدول ۲: محیط کشت چوی/عناصر کم مقدار (Choie and Lee، 1999)

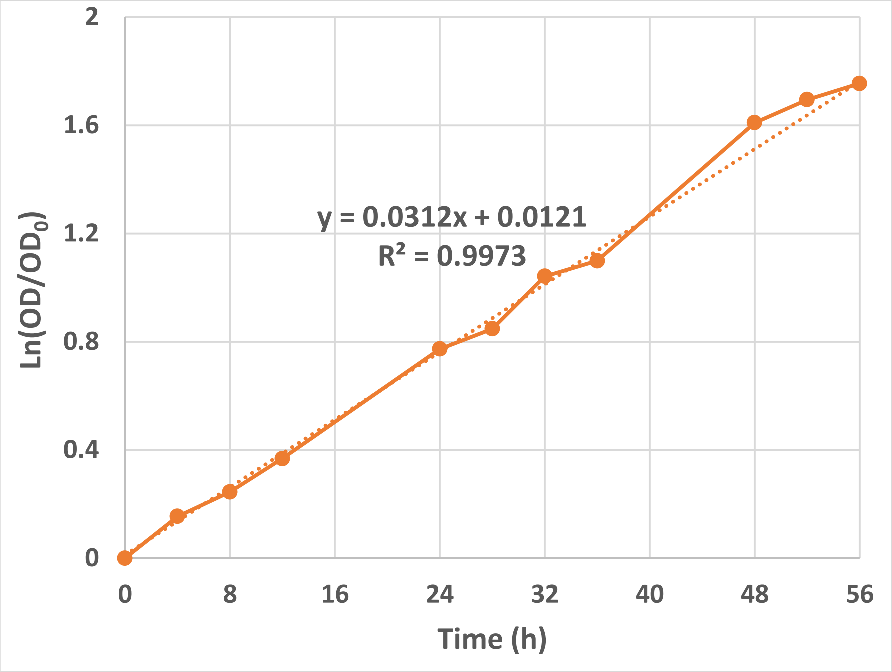
ترکیب شیمیایی	$CoCl_2.6H_2O$	$MnSO_4.H_2O$	$Na_2MoO_4.2H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$	$CuSO_4.5H_2O$
مقدار (گرم)	0.04	0.01	0.04	0.13	0.04

به منظور اندازه گیری محتوای پروتئینی محصول از روش کجلدال دستگاه مدل K1100 از کمپانی Hanon (Kirk، 1950). و برای اندازه گیری چربی از دستگاه سوکسله مدل SOX406استفاده شد (Thiex، 2009). آنالیز پروفایل اسید چرب موجود در محصول با روش کروماتوگرافی گازی با دستگاه Agilent 7890b انجام شد (Marshall، 2010). اندازه گیری خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی بررسی شد (Liu، 2019). از روش HPLC به منظور تعیین پروفایل آمینواسیدی با دستگاه HPLC Agilent 1100 و برای تعیین آنالیز عنصری از روش طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP) از دستگاه Vario EL III Elementar استفاده شد.

نتایج

تکثیر باکتری در ارلن

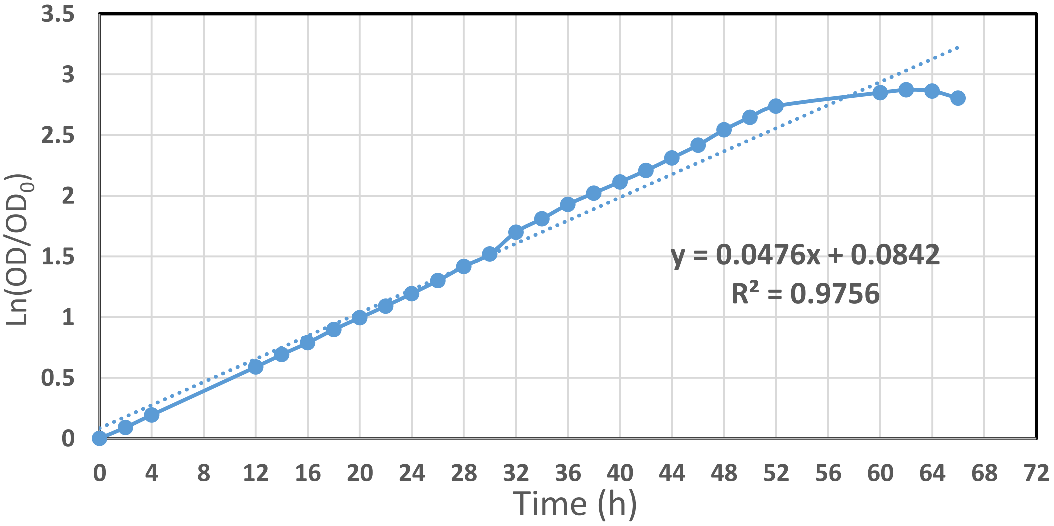
نتایج حاصل نشان می‌دهد که سرعت رشد ویژه (µ) باکتری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و دور ۲۰۰ rpm در ارلن برابر h^{-1} ۰/۰۳۱۲ بود(شکل ۱).



شکل ۱: منحنی رشد باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* در ارلن در محیط کشت چوی حاوی متانول.
(غلظت متانول ۵گرم بر لیتر، دمای ۳۵ ° C و دور rpm ۲۰۰)

تکثیر باکتری در فرمنتور و تولید SCP

نتایج حاصل نشان می‌دهد که سرعت رشد ویژه باکتری در فرمنتور برابر ۰/۰۴۷ h^{-1} می‌باشد که بیشتر از میزان سرعت رشد ویژه باکتری در ارلن است (شکل ۲).



شکل ۲: منحنی رشد باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* در فرمنتور در محیط کشت چوی.

(غلظت متانول ۵ گرم بر لیتر، دما C ° ۳۵، دور همزن rpm ۷۰۰، pH=۷/۰، غلظت اکسیژن محلول ۳۰–۵۰ درصد اشباع)

غلظت نهایی توده سلولی بعد از ۶۴ ساعت به ۳/۲ گرم بر لیتر رسید. حجم بیومس تولیدی خشک شده ۶ گرم بود. که جهت انجام آنالیز عنصری، پروفایل آمینو اسیدی، پروفایل چربی و خاکستر از آن استفاده شد.

میزان پروتئین خام

اندازه گیری پروتئین خام با روش کجلدال انجام شد. یافته ها نشان می دهد میزان پروتئین خام تولید شده توسط روش ذکر شده در این مقاله برابر ۷۳/۴۷ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین میکروبی محصول می باشد.

در جدول شماره ۲ میزان پروتئین خام در نمونه تولید شده در این مقاله با چند نمونه تولیدی پروتئین تک یاخته مقایسه شده است. مقایسه نتایج با محصول سایر مقالات نشان می دهد که محصول تولید شده در محدوده قابل قبولی نسبت به سایرین از لحاظ پروتئین قرار دارد.

چربی خام و اسیدهای چرب

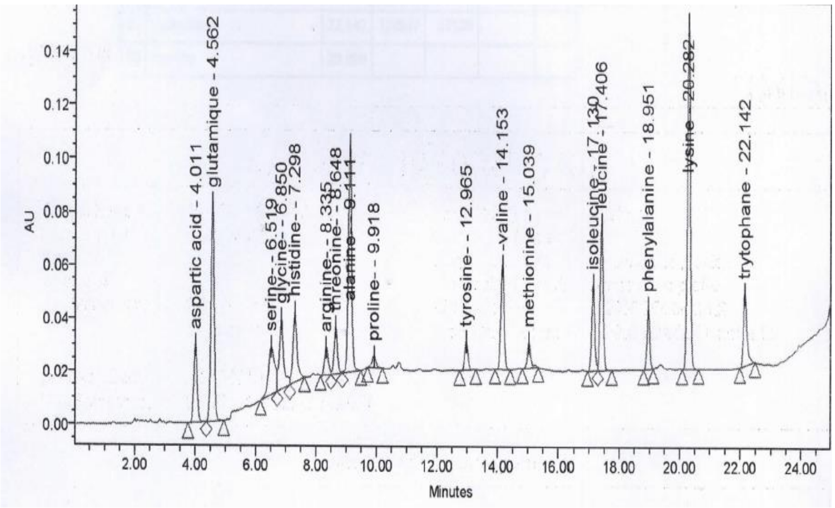
اندازه گیری چربی خام با روش سوکسله انجام شد. یافته ها نشان می دهد میزان چربی خام تولید شده توسط روش ذکر شده در این مقاله برابر ۶.۲ گرم در ۱۰۰ گرم محصول پروتئین میکروبی می باشد. در جدول شماره ۳ میزان چربی خام در نمونه تولید شده در این مقاله با چند نمونه تولیدی پروتئین تک یاخته مقایسه شده است. مقایسه نتایج با محصول سایر مقالات نشان می دهد که محصول تولید شده در محدوده قابل قبولی نسبت به سایرین از لحاظ میزان چربی قرار دارد.

جدول ۳: مقایسه پروتئین و چربی خام پروتئین میکروبی تولید شده با محصولات تولیدی شرکت‌های مختلف

محصولات	پروتئین خام (N*6.25)	چربی خام	سویه تولید کننده	منبع
محصول تولیدی در این مقاله	۷۳/۴۷	۶/۲	متیلوفیلوس متیلوتروپوس	-
شرکت ICI	۸۸	۹/۴	-	Yazdian و همکاران، 2005؛ Taylor و همکاران، 1974
پوروبیون هوخست	۸۲	۹/۲	-	Yazdian و همکاران، 2005 ؛ Taylor و همکاران، 1974
میتسوبیشی	۸۶	۸/۷۵	-	Yazdian و همکاران، 2005؛ Taylor و همکاران، 1974
UNIBIO	۷۲/۹	۹/۱	باکتری‌های متانوتروف	https://www.unibio.dk

آنالیز محتوای آمینواسیدی

با توجه به اینکه تعیین پروفایل آمینواسیدی محصولات پروتئینی با روش های مختلفی انجام می شود؛ اما با توجه به بالا بودن دقت روش HPLC؛ از این روش برای تعیین پروفایل آمینواسیدی محصول استفاده شد. کروماتوگرام مربوط به پروفایل آمینواسیدی محصول تولیدی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: کروماتوگرام محصول تولیدی برای تهیه پروفایل آمینواسیدی

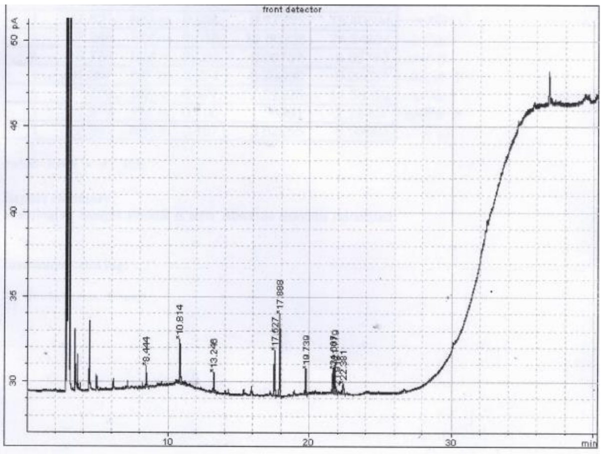
نتایج نشان می دهد مجموع آمینواسیدهای ضروری به غیر ضروری (شامل: لیزین، هیستیدین، آرژنین، والین، لوسین، ایزولوسین، فنیل آلانین، متیونین و ترئونین) برای محصول تولید شده ۳۷/۳۲ درصد (وزنی/وزنی) می‌باشد، در حالی‌که این میزان در محصول یونی‌پروتئین برابر ۳۱/۲ درصد (وزنی/وزنی) است. همچنین مقدار دو اسید آمینه غیر ضروری سیستئین برابر ۲/۳۸ و تیروزین ۳/۲۱ می باشد که نسبت به استاندارد FAO مقدار آن بالاتر می‌باشد. همچنین میزان اسیدآمینه لیزین تولید شده در این مقاله برابر ۵/۳۲ درصد می باشد که نسبت به استاندارد FAO مقدار بالاتری است. در جدول ۴ پروفایل آمینواسیدی محصولات مختلف پروتئینی با پروتئین تولید شده در این مقاله و استاندارد FAO با یکدیگر مقایسه شده است(وثوقی و همکاران، 1384).

جدول ٤: میزان آمینواسید پروتئین تک یاخته تولید شده از متانول، استاندارد FAO و سایر منابع پروتئینی

.	سیستئین	ایزولوسین	لوسین	لیزین	متیونین	فنیل آلانین	ترئونین	تیروزین	والین	منبع
استاندارد FAO	۲	۴/۲	۴/۸	۴/۲	۲/۲	۲/۸	۲/۸	۱	۴/۲	وثوقی و همکاران، 1384
کنجاله سویا	۰/۷	۲/۲	۳/۵	۲/۸	۰/۶	۲/۲	۱/۹	۰/۶	۲/۳	وثوقی و همکاران، 1384
پودر ماهی	۰/۷	۳/۲	۵	۴/۹	۱/۹	۲/۹	۳	۰/۹	۳/۷	وثوقی و همکاران،1384
تخم مرغ	۲/۴	۶/۷	۸/۹	۶/۵	۵/۱	۵/۸	۵/۱	۱/۶	۷/۳	وثوقی و همکاران، 1384
یونی پروتئین	۰/۴۶	۳/۱۷	۵/۴۵	۴/۰۷	۱/۹۴	۳/۰۶	۳/۲۳	۲/۳۹	۴/۲۲	وثوقی و همکاران، 1384
بیومس تولیدی از گاز طبیعی	۰/۵۰	–	۴/۱۰	۵/۹۰	۳/۶۰	۲/۵۰	۳/۱۰	۱/۷۰	۱/۵۰	Yazdian و همکاران، 2005
محصول تولیدی	۲/۳۸	۳/۲۶	۷/۶۹	۵/۳۲	۱/۰۲	۳/۹۲	۲/۷۴	۳/۲۱	۴/۲۲	این پژوهش

پروفایل اسید چرب

به منظور آنالیز پروفایل اسید چرب محصول از روش کروماتوگرافی گازی استفاده شد. در شکل ۴ کروماتوگرام اسید چرب‌های مختلف که با کروماتوگرافی گازی اندازه گیری شده اند نشان داده شده است



شکل ٤: کروماتوگرام پروفایل اسید چرب محصول تولید شده

چربی‌ها معمولا حاوی غلظت‌های بالایی از اسیدهای چرب زنجیر بلند شامل پالمتیک اسید، استئاریک، اولئیک و لینولنیک می‌باشند. پروفایل اسید چرب محصول تولیدی در جدول ۵ مقایسه شده است. مقدار اسید چرب اشباع پالمتیک اسید با ۱۶ کربن، در محصول تولیدی برابر ۲۴/۴۶ درصد (وزنی/وزنی) است که مقدار آن در یونی پروتئین ۴۹/۳ درصد (وزنی/وزنی) است. مقدار اسید میریستیک و اسید استئاریک به ترتیب با ۱۴ و ۱۸ کربن در محصول تولیدی بسیار بالا است. همچنین مقدار لینولئیک اسید و لینولنیک اسید به عنوان اسیدهای چرب غیر اشباع در محصول تولیدی به ترتیب برابر ۹/۲ و ۲/۲۹ درصد (وزنی/وزنی) بیان شده است.

چربی‌ها باعث بهبود راندمان تولید مثلی دام شده که این بهبود مستقل از بهبود وضعیت انرژی دام است. چربی‌ها به عنوان پیش‌ساز در سنتز پروژسترون (با افزایش آزاد سازی و سنتز کلسترول) و پروستاگلاندین (با تامین لینولئیک اسید و آراشیدونیک اسید) نقش مهمی را در افزایش باروری در گاوهای شیری ایفامی‌کنند که هردوتای آن‌ها باعث می‌شوند. اسیدهای چرب غیراشباع لینولئیک به عنوان ترکیباتی موثر در فعالیت‌های غشا و پیش ساز برای سنتز دیگر اسیدهای چرب غیر اشباع، که کلیدی برای تنظیم متابولیسم و فعالیت در غشای سلولی و ضروری برای زندگی همه پستانداران هستند، شناخته شده‌اند. مطالعات نشان داده اند که مقدار مورد نیاز برای رشد حیوانات ۸۸ میلی گرم لینولئیک اسید به ازای هر کیلوگرم وزن متابولیکی است (Kalinowski و همکاران، 2003 ؛ Coppock and Wilks، 1991؛ Pasdar و همکاران، 2018؛ Tholstrup و همکاران، 2004).

جدول ۵: مقایسه پروفایل اسید چرب محصول پروتئین میکروبی تولیدی با یونی پروتئین

	C10	C12	C14	C16	C16:1	C17	C18	C18:2	C18:3	منبع
محصول تولیدی	۵/۹۲	۱۲/۵۴	۵/۹۳	۲۴/۶۴	۱۳/۴	۸/۸۶	۵/۵۸	۹/۲	۲/۲۹	این پژوهش
دانه سویا	–	–	۰/۶	۶/۳۲	۰/۳۵	–	۷/۴۰	۵۳/۱۰	۸/۰۸	Collomb و همکاران، 2004؛ Peng و همکاران، 2010
دانه کلزا	–	–	۱/۶۲	۶/۲۳	۰/۸	–	۴/۱۱	۱۸/۲۸	۷/۷۹	Collomb و همکاران، 2004؛ Peng و همکاران، 2010
محصول یونی‌بیو	–	–	۴/۱	۴۹/۳	–	۶	۰/۳	–	–	https://www.unibio.dk

آنالیز عنصری

آنالیز عنصری با روش طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی انجام شد. دام و طیور علاوه بر پروتئین‌ها، کربوهیدرات، چربی‌ها و ویتامین، به مواد معدنی هم نیاز دارند. کلسیم، فسفر، منیزیم، منگنز، آهن، مس، روی از جمله عناصری می‌باشند که باید در خوراک دام و طیور وجود داشته باشند، که به استحکام استخوان، جلوگیری از کم خونی، افزایش رشد و کاهش مرگ و میر کمک می‌کنند. کمبود مواد معدنی می تواند مشکلات جدی برای سلامت دام و طیور به بار آورد (وثوقی و همکاران، 1384). در جدول ۶ عناصر موجود در نمونه تولیدشده در این مقاله بامحصول یونی پروتئین شرکت یونی بیو مقایسه شده است. درصد سدیم و پتاسیم در یونی پروتئین بیشتر از محصول تولیدی در این تحقیقات است. اما درصد روی نمونه تولیدی بیشتر از یونی پروتئین است (https://www.unibio.dk).

جدول ٦: مقایسه آنالیز عنصری محصول تجاری یونی پروتئین و محصول تولیدی (https://www.unibio.dk)

عناصر	یونی پروتئین (g/kg)	محصول تولیدی (g/kg)
فسفر (P)	۱۹	۱۸
گوگرد (S)	۵/۴	۶
کلسیم (Ca)	۲/۸	۳
پتاسیم (K)	۶/۹	۲/۶
منیزیوم (Mg)	۳	۴
سدیم (Na)	۷	۱/۶
آهن (Fe)	۰/۳۳۲	۰/۸
مس (Cu)	۰/۰۹۶	۰/۱۶
روی (Zn)	۰/۰۳۶	۲
کبالت (Co)	۰/۰۳۶	۰/۰۴
نیکل (Ni)	۰/۰۰۲	۰/۱۶
منگنز (Mn)	۰/۰۰۱	۰/۰۴

خاکستر

اندازه گیری خاکستر مواد غذایی به دلایل متعددی مهم است. محتوای خاکستر را می توان به عنوان یک شاخص کلی از کیفیت محصول در نظر گرفت. علاوه بر این، می توان با استفاده از اندازه گیری خاکستر مواد غذایی، تقلب در مواد غذایی را بررسی نمود. محتوای خاکستر غیر طبیعی زیاد نشان دهنده وجود مواد غیرآلی و غیر طبیعی است. از محتوای خاکستر کل ممکن است برای نشان دادن ارزش غذایی محصولات غذایی استفاده شود. به طور کلی اطلاعات تغذیه ای دقیق تری با انجام تغذیه و تحلیل اولیه روی خاکستر بدست می‌اید. میزان خاکستر در محصول تولیدی ۸/۲۹ درصد بود. این میزان در مواد خوراکی دیگر شامل: کنجاله سویا-۶/۳۴، پودر ماهی ۱۵/۴۰، کنجاله آفتابگردان ۶/۵۸، کنجاله تخم پنبه ۶/۶۸، سویا ۴/۹۰، کنجاله کانولا ۶/۸۲ و یونی پروتئین ۸/۶ درصد بود. با توجه موارد ذکر شده بیشترین درصد خاکستر مربوط به پودر ماهی می‌باشد. درصد خاکستر نمونه محصول حاصل از این پژوهش نسبتا قابل قبول می‌باشد.

نتیجه‌گیری و بحث

در این پژوهش تولید و ارزیابی پروتئین تک یاخته باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. برای این منظور از باکتری *متیلوفیلوس متیلوتروفوس* استفاده شد. سرعت رشد ویژه (μ) باکتری در ارلن برابر h^{-1} ۰/۰۳۱۲ می‌باشد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که سرعت رشد ویژه باکتری در فرمنتور برابر h^{-1} ۰/۰۴۷ می‌باشد که بیشتر از میزان سرعت رشد ویژه باکتری در ارلن است. سرعت رشد ویژه بدست آمده در این پژوهش با نتایج گزارش شده توسط سایر محققین برای باکتری های متیلوتروف قابل مقایسه می باشد (Yazdian و همکاران، 2005).

از مقایسه بین محصول تولیدی در این پژوهش و یونی‌پروتئین می توان نتیجه گرفت که محصول تولیدی کاندید مناسبی به عنوان مکمل غذایی برای خوراک دام و طیور می‌باشد. همچنین مقادیر اسید آمینه‌های موجود در پروتئین تک یاخته حاصل از این تحقیق نسبت به اسیدهای آمینه موجود در پروتئین میکروبی یونی بیو و منابع دیگر مقایسه شده است و نشانگر جایگاه مناسب محصول تولیدی می‌باشد. از لحاظ اهمیت اسیدهای آمینه می‌توان به میزان قابل توجه لیزین در این محصول اشاره کرد که ۵/۳۲ درصد می‌باشد. افزایش غلظت لیزین در جیره غذایی باعث بهبود هماگلوتیناسیون و افزایش ایمونوگلبولین‌های G و M می‌شود.

از اسیدآمینه‌های دیگر می‌توان به میزان بالای آلانین اشاره کرد که ۳/۶۱ درصد از پروتئین تولیدی می‌باشد. آلانین منبع مهمی برای تامین انرژی ماهیچه‌ها است. علاوه بر نقش آن در متابولیسم قندها و تولید آنتی‌بادی‌ها در سیستم ایمنی، اهمیت به سزایی در بافت همبند نیز دارد. کاهش آلانین باعث کاهش قند خون و تحلیل ماهیچه‌ها و خستگی مفرط می‌شود و نیز ابتلا به عفونت‌های ویروسی را افزایش می‌دهد (Han و همکاران، 1991).

مقادیر اسیدهای آمینه شاخه‌دار لوسین، ایزولوسین و والین که به ترتیب ۷/۶۹، ۳/۲۶، ۴/۲۲ درصد از پروتئین تولیدی به دست آمده است، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. این آمینواسیدها اثرات آنتاگونیستی را در عملکرد سیستم ایمنی کاهش می‌دهند (Aletor و همکاران، 2000). دو اسیدآمینه گوگرددار سیستئین و متیونین به ترتیب ۲/۳۸، ۱/۰۲ درصد اندازه‌گیری شد. این دو اسیدآمینه در تولید پوسته‌های محکم تخم پرندگان و رشد پرها نقش به سزایی دارد (Peganova، 2000).

چربی‌ها یکی از منابع ضروری در جیره غذایی دام‌ها می‌باشد، و در بسیاری از مواد خوراکی یافت می‌شود. چربی‌ها دارای نقش‌هایی مثل: منبع انرژی، در غشای فسفولیپیدی، تنظیم کننده بیان ژن از طریق اثر بر فعالیت گیرنده‌ها، سیگنالینگ درون سلولی و فعال سازی عامل رونویسی و پیش ساز واسطه‌های فعال زیستی نظیر پروستاگلاندین‌ها، لوکوترین‌ها، لیپوکسین‌ها و رزولین‌ها می‌باشد.

اسیدهای چرب غیر اشباع همانند اولئیک اسید، لینولئیک اسید و لینولنیک اسید در کاهش لیپیدهای خون و به خصوص کلسترول و همچنین کاهش فشار خون موثر است (Pasdar و همکاران، 2018). مقدار اسیدهای چرب اشباع ۶۳/۴۹ در محصول تولیدی می‌باشد که نسبت به منابع پروتئینی موجود نسبت قابل قبولی است (Collomb و همکاران، 2004؛ Peng و همکاران، 2010).

همچنین مقدار اسیدهای چرب غیر اشباع در محصول تولیدی ۲۴/۸۹ درصد می‌باشد.

درصد سدیم و پتاسیم در یونی پروتئین به ترتیب برابر ۷ گرم بر کیلوگرم و ۶/۹ گرم بر کیلوگرم که در محصول تولیدی به ترتیب برابر ۱/۶ گرم بر کیلوگرم و ۲/۶ گرم بر کیلوگرم است. اما درصد روی نمونه ۲ گرم بر کیلوگرم می‌باشد که بیشتر از یونی پروتئین است. درصد خاکستر محصول نسبت به محصول یونی پروتئین پایین‌تر است.

محققان دریافته‌اند که استفاده کافی از لیزین و تریپتوفان در غذای روزانه باعث ثبات در میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید پلاسمای خون می‌شود (Jarowski and Pytelewski، 1975). هارمز و راسل متوجه شدند که افزایش تریپتوفان در جیره غذایی پرندگان باعث افزایش وزن تخم‌های آن‌ها می‌شود (Aletor و همکاران، 2000). محققان دیگر نشان دادند که افزایش تریپتوفان در جیره غذایی باعث افزایش وزن و افزایش اشتها می‌شود (Peganova، 2000). در تحقیقاتی دیگر محققان میزان هیستیدین و تریپتوفان در جیره غذایی را بررسی کردند، دیدند که با افزایش هر دو اسیدآمینه در جوجه‌های گوشتی افزایش وزن و اشتها مشاهده شد (Han و همکاران، 1991؛ Harms and Russell، 2000).

با توجه به اینکه سویه مورد استفاده در این پژوهش فاقد هرگونه دستکاری ژنتیکی بوده و تولید پروتئین میکروبی با استفاده از آن نتیجه یک فرآیند طبیعی و غیرآلاینده می باشد؛ همچنین یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد محتوای اسیدهای آمینه پروتئین میکروبی تولیدی، تناسب بهتری با اسیدهای آمینه مورد نیاز برای تغذیه دام و طیور دارد، بنابراین محصول تولیدی می‌تواند بعنوان کاندید مکمل خوراک دام و طیور مد نظر قرار گیرد؛ اما به دلیل سرعت رشد کم سویه مورد استفاده در این تحقیق، لازم است نسبت به بهینه سازی شرایط کشت و یا استفاده از سویه‌های با سرعت رشد بیشتر در پژوهش‌های آتی و همچنین تحقیقات تکمیلی مانند ارزیابی ارزش غذایی، بی‌ضرری محصول و ارزیابی اقتصادی تولید در مقیاس بالا مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

وثوقی، م.، عالم‌زاده، ح.، اسدی‌شاد، ب. (۱۳۸۴). تولید پروتئین تک یاخته (SCP) از گاز طبیعی با مخلوط باکتریها. دهمین *کنگره ملی مهندسی شیمی ایران.*

Aletor, V. A., Hamid, I. I., Niess, E., and Pfeffer, E. (2000). Low protein amino acid supplemented diets in broiler chickens: effects on performance, carcass characteristics, whole body composition and efficiencies of nutrient utilisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(5), 547-554.

Choie, J. and Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 13-21.

Collomb, M., Sollberger, H., Bütikofer, U., Sieber, R., Stoll, W., and Schaeren, W. (2004). Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *International Dairy Journal*, 14(6), 549-559.

Coppock, C. E., and Wilks, D. L. (1991). Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. *Journal of Animal Science*, 69(9), 3826-3837.

Erdman, M. D., Bergen, W. G., and Reddy, C. A. (1977). Amino acid profiles and presumptive nutritional assessment of single-cell protein from certain lactobacilli. *Applied and environmental microbiology*, 33(4), 901-905.

Han, Y., Suzuki, H., and Baker, D. H. (1991). Histidine and tryptophan requirement of growing chicks. *Poultry Science*, 70(10), 2148-2153.

Harms, R. H., and Russell, G. B. (2000). Evaluation of tryptophan requirement of the commercial layer by using a corn-soybean meal basal diet. *Poultry Science*, 79(5), 740-742.

https://www.unibio.dk.

Jarowski, C. I., and Pytelewski, R. (1975). Utility of fasting essential amino acid plasma levels in formulation of nutritionally adequate diets III: Lowering of rat serum cholesterol levels by lysine supplementation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(4), 690-691.

Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts – the ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 97, 503–517.

Kalinowski, A., Moran Jr, E. T., and Wyatt, C. L. (2003). Methionine and cystine requirements of slow-and fast-feathering broiler males from three to six weeks of age. *Poultry Science*, 82(9), 1428-1437.

Khoshnevisan, B., Tsapekos, P., Zhang, Y., Valverde-Pérez, B., and Angelidaki, I. (2019). Urban biowaste valorization by coupling anaerobic digestion and single cell protein production. *Bioresource technology*, 290, 121743.

Kirk, P. L. (1950). Kjeldahl method for total nitrogen. *Analytical chemistry*, 22(2), 354-358.

Liu, K. (2019). Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination of ash content in algae and other biomass. *Algal Research*, 40, 101486.

Marshall, M. R. (2010). Ash analysis. *Food analysis*, 4, 105-116.

Nasseri, A. T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H., and Ghasemi, Y. (2011). Single cell protein: production and process. *American Journal of food technology*, 6(2), 103-116.

Parajó, J. C., Santos, V., Dominguez, H., Vázquez, M., and Alvarez, C. (1995). Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates. *Food Chemistry*, 53(2), 157-163.

Pasdar, Y., Barzegar, A., Soleymani, H., Azandaryani, A. H., and Darbandi, M. (2018). A Comprehensive Evaluation of Fatty Acid Content of Meat Products in Kermanshah. *International Journal of Health and Life Sciences*, 4(2).

Peganova, E. K. (2000). Interaction of various supplies of isoleucine, valin, Leucine and tryptoohan on the performance of laying hens," *US Natl. Instites Heal*., 100–105.

Peisker, M. (1999). Efficiency of a Lysine-Tryptophan blend as a Tryptophan source in animal nutrition. Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: *Basic Aspects and Applications*, 743-747.

Peng, Y. S., Brown, M. A., Wu, J. P., and Liu, Z. (2010). Different oilseed supplements alter fatty acid composition of different adipose tissues of adult ewes. *Meat science*, 85(3), 542-549.

Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., and Wiebe, M. G. (2017). Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Frontiers in microbiology*, 8, 2009.

Rudravaram, R., Chandel, A. K., Rao, L. V., Hui, Y. Z., and Ravindra, P. (2009). Bio (Single Cell) protein: issues of production, toxins and commercialisation status, *in Agricultural wastes, eds G. S. Ashworth and P. Azevedo (New York, NY: Hauppage)*, 129–153.

Sikander, A., Mushtaq, J,. Nazir, F,. and Sarfraz, H. (2017). Production and Processing of Single Cell Protein (SCP)—A review." *Eur. J. Pharm. Med*. 86-94.

Spalvins, K., Ivanovs, K., and Blumberga, D. (2018). Single cell protein production from waste biomass: review of various agricultural by-products.

Taylor, J. C., Lucas, E. W., Gable, D. A., and Graber, G. (1974). Evaluation of single cell proteins for nonruminants. In Single Cell Protein Proceedings of the International Symposium.

Thiex, N. (2009). Evaluation of analytical methods for the determination of moisture, crude protein, crude fat, and crude fiber in distillers dried grains with solubles. *Journal of AOAC international*, 92(1), 61-73.

Tholstrup, T., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Petersen, M., Høy, C. E., Lund, P., and Sandström, B. (2004). Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *The American journal of clinical nutrition*, 79(4), 564-569.

Vrati, S. (1984). Single cell protein production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluents of biogas plant. *Applied microbiology and biotechnology*, 19, 199-202.

Yazdian, F., Hajizadeh, S., Jahanshahi, M., Shoja, A. S., Khalilzadeh, R., and Nosrati, M. (2005). Production of single cell protein from natural gas: Parameter optimization and RNA evaluation. *Iranian Journal of Biotechnology*.