DOI:10.22092/VJ.2021.354071.1838
شماره ۱۳۵ تابستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تولید پروتئین هیدرولیز شده از کرم‌های ورمی کمپوست *Eisenia foetida* به منظور مصرف در فرایند تولید واکسن

• **حسین نوروزی‌مقدم (نویسنده مسئول)**
مربی پژوهشی، بخش تولید حیوانات آزمایشگاهی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق کشور ، سازمان تحقیقات ،آموزش و ترویج کشاورزی، تهران ، ایران
• **اقدس بنایی**
استادیارپژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۱-۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۴-۰۷
Email: hnoruzy@yahoo.com

چکیده

اساسی‌ترین کاربرد هیدرولیز پروتئینی تأمین نیتروژن برای محیط‌های کشت باکتری می‌باشد. نظر به این که سالانه حدود ۲۰۰ میلیون دوز واکسن انواع باکتری‌های کلستریدم در کشورما مورد مصرف می‌باشد و برای تولید این دوز واکسن ۱۶تن پروتئین هیدرولیز شده (پپتون) مورد نیاز می‌باشد. در حال حاضر این نیاز از طریق واردات تامین می‌گردد بنابراین دست‌یابی به دانش فنی تولید پپتون از منابع مختلف ارزان قیمت در کشور ضروری می‌باشد. با توجه به توسعه مزارع پرورش کرم ورمی‌کمپوست، ارزانی، دسترس بودن، داشتن پروتئین بالا در بدن، هیدرولیز پروتئین این جانور انجام شد. نمونه کرم‌ها از مزارع اطراف مشهد خریداری شدند برای تخلیه سیستم گوارش کرم‌ها به مدت ۲۴ساعت در ظرف دارای آب و شن تمیز قرار داده شدند. سپس با هموژنیزه کردن آن‌ها در آب برای مدت ۳۰ دقیقه سوسپانسیون همگن و یکنواختی از آنها فراهم شد. به دنبال آن با کلروفرم در دوزمان ۳۰ دقیقه‌ای در شرایط دمای ۲۵ سانتی‌گراد و دمای ۶۰ سانتی‌گراد حذف چربی از بافت پروتئینی انجام شد. با استفاده از فاز بخار اسید کلریدریک شش نرمال در درجه حرارت ۱۱۰ سانتی‌گراد در مدت ۱۰ ساعت هیدرولیز پروتئین انجام شد. خشک کردن کامل نمونه در مدت ۳ ساعت تحت شرایط خلاء با فشار یک بار در درجه حرارت ۷۰ سانتی‌گراد انجام شد. در این پژوهش از مقدار اولیه ۱۰ gr از کرم‌های ورمی کمپوست مقدار سه گرم پپتون تولید گردیده است. این مقدار پروتئین هیدرولیز تولید شده برابر ۳۰٪ از وزن اولیه کرم‌ها بوده است.

کلمات کلیدی: تولیدپپتون، اسیدهای امینه، منابع پروتئینی، هیدرولیز اسیدی، پروتئین کرم

Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 88-94

Production of hydrolyzed protein from vermicompost worms *Eisenia foetida* for use in vaccine production process

By: Noruzy Moghadam, H., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. and Banaei, A., Research Institute of Applied Sciences (RIAS), ACECR, Tehran, Iran

Received: 2021-04-03 **Accepted: 2021-06-28**

Emali: hnoruzy@yahoo.com

The most basic application of protein hydrolysis is nitrogen supply for bacterial culture media. Considering that about 200 million doses of Clostridium bacteria are used annually in our country and to produce this vaccine dose, 16 tons of hydrolyzed protein (peptone) is needed. Currently, this need is supplied through imports. Therefore, achieving the technical knowledge of peptone production from various inexpensive sources in the country is essential. Therefore, due to the development of vermicompost worm farms, inexpensiveness, availability, high protein in the body, hydrolysis protein of this animal was performed. Due to the development of vermicompost worm farms, inexpensiveness, availability, high protein in the body, protein hydrolysis of this animal was performed. Samples of worms were purchased from farms around Mashhad. For disposal of digestive system materials, worms were placed in a clean water and sand container for 24 hours. Then, by homogenizing them in water for 30 minutes, homogeneous suspension and uniformity of them were provided. Subsequently, chloroform was performed in two 30-minute times at 25c and 60c temperature, remove fat from protein tissue. Using six-normal hydrolytic hydrochloric acid vapor phase at 110c for 10 hours, protein hydrolysis was performed. Complete drying of the sample was completed in 3 hours under vacuum conditions with one bar pressure and 70°C. In this study, from the initial value of 10 gr of vermicomposting worms, three gr of hydrolyzed proteins were produced This amount of hydrolysis protein produced was 30% of the initial weight of worms.

Key words: Peptone production ,Amino acids, Protein sources, Worm protein, Acid hydrolysis

مقدمه

ضرورت هیدرولیز پروتئین

کشورهای در حال توسعه از نظر دسترسی و مصرف پروتئین‌هایی که ارزش غذایی بالایی دارند دارای مشکلات جدی در تامین غذا می‌باشند به طوری که متأسفانه، رژیم غذایی میلیون‌ها نفر در این کشورها بیشتر وابسته به استفاده از کربوهیدرات‌های تأمین کننده انرژی است اما این رژیم غذایی فاقد اسیدهای آمینه ضروری است و به نوعی از این نظر دارای محدویت می‌باشد.

بر همین اساس تلاش‌هایی برای بدست آوردن پروتئین از منابع غیر متعارف که بتوان از آنها در محصولات غذایی مختلف برای مصرف انسان استفاده کرد انجام شده است (۸). اساسی‌ترین عملکرد هیدرولیز پروتئین در کاربردهای بیوتکنولوژی تأمین منبع نیتروژن برای محیط‌های کشت باکتری در مقیاس صنعتی و تخصصی و همچنین برای کشت سلول‌های میکروبی، گیاهی، حیوانی و حشرات در مقیاس آزمایشگاهی و صنعتی است (۱۲).

تاریخچه هیدرولیز منابع پروتئینی

اولین هیدرولیز اسیدی پروتئین به منظور آنالیز اسیدهای آمینه در اوایل سال ۱۹۵۰ گزارش شده است(۱۱). اگرچه قبل از آن در سال ۱۸۲۰ اولین هیدرولیز اسیدی پروتئین انجام شده بود با این وجود چندین دهه طول کشید تا این فرایند تجاری‌سازی شود و هنوز هم این فرایند ادامه دارد (۶, ۱۲). در زمینه هیدرولیز پروتئین از منابع مختلف کارهای پژوهشی زیادی انجام گرفته است از جمله آنالیز پروتئین کرم‌های ورمی کمپوست (کرم قرمز کالیفرنیایی) به منظور تامین غذای انسان و حیوان انجام شده است(۸). همچنین آرد تهیه شده از کرم‌های ورمی کمپوست به دلیل این که دارای میزان بالایی از نیتروژن و پروتئین می‌باشند به عنوان یک منبع اقتصادی به منظور تولید اسید لاکتیک در شرایط تخمیری مورد استفاده قرار گرفته است(۳). سالانه از صید ماهیان دریایی تقریباً ۱۰۰۰۰۰ تن شامل مقدار زیادی ماهی‌های کوچک و فراوده‌های جانبی که معیارهای کیفیی لازم برای استفاده غذایی را ندارند به دست می آید. بنابراین، هیدرولیز پروتئین‌های ماهی استراتژی مناسبی برای تامین منافع اقتصادی از مواد زائد فرآوری ماهی به محصولاتی با کیفیت و ارزش بالا می‌باشد (۱۵). صنعت فرآوری ماهی تن دارای ۶۰٪ محصولات جانبی دور ریزشامل سر، استخوان و آبشش، گوشت تیره و خون می‌باشدکه از خون ماهی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده شده است علاوه بر این خون مرغ، خوک، گوزن، گوسفند و گاو هم به همین منظور مورد

استفاده قرار گرفته است(۹). امروزه پروتئین هیدرولیز شده ماهی به دلیل داشتن تعداد مناسبی از اسیدهای آمینه و پپتیدهای فعال زیستی که دارای ویژگی آنتی‌اکسیدان، ضد فشار خون، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی و پپتیدهای ضدمیکروبی می‌باشد مورد توجه بسیاری از متخصصان بیوتکنولوژی مواد غذایی قرار گرفته است. همچنین این پروتئین هیدرولیز شده قابلیت انحلال در آب را دارا می‌باشد و در آب گرم منعقد نمی‌شود (۱۳). تولید پروتئین هیدرولیز از محصولات جانبی ماهی تیلاپیای نیل و ارزیابی اثرات زمان‌های مختلف هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده انجام شده است (۲). علاوه بر اینها در ایران ضایعات امعاء و احشا ماهی قزال‌الای رنگین کمان و مرغ را تحت هیدرولیز با الکالاز قرار داده‌اند(۱۴). طرح تحقیقاتی با عنوان تهیه پپتون از پروتین سویا جهت محیط کشت واکسن انتروتوکسمی در سال ۱۳۷۶ در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شده است در این تحقیق هیدرولیز پروتئین‌های سویا با آنزیم تریپسین گزارش شده است(۴).

ارزیابی نسبی نیاز به منابع پروتئینی در موسسه رازی

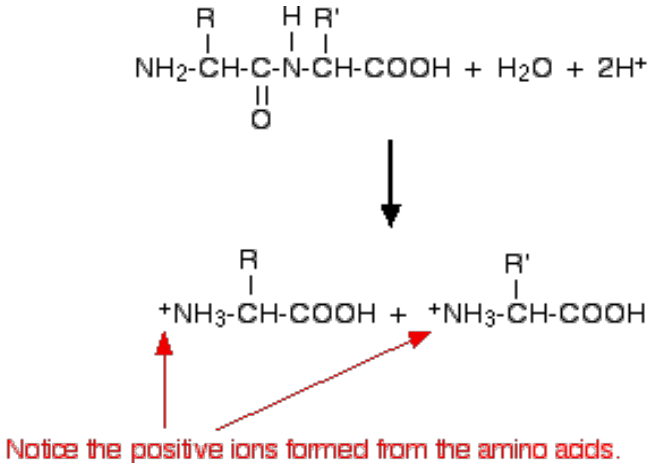
نظر به اینکه سالانه حدود ۲۰۰ میلیون دوز واکسن از انواع باکتری‌های کلستریدم در کشور مورد مصرف می‌باشد که این میزان نیاز کشور به واکسن انتروتوکسمی توسط موسسه رازی تولید و تامین می‌شود و از طرفی تولید این مقدار واکسن مستلزم در اختیار داشتن مقدار ۱۶ تن پروتئین هیدرولیز شده (پپتون) می‌باشد که این پپتون مصرفی در حال حاضر از طریق واردات تامین می‌گردد بنابراین دست‌یابی به دانش فنی تولید پروتئین هیدرولیز شده (پپتون) از منابع مختلف در کشور ضروری می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به این که مزارع تولید کود ورمی کمپوست با استفاده از کرم‌های *Eisenia foetida* به طور روزافزون در حال توسعه و گسترش می‌باشند همچنین به دلیل این که میزان پروتئین در این موجود زیستی بسیار زیاد می‌باشد به طوری که میزان پروتئین آن ۶۱/۸۵٪، چربی ۱۱/۱۳٪ ، خاکستر ۷/۸٪ در یک گرم وزن خشک تعیین شده است (۸). این پژوهش در اولویت اول به منظور دستیابی به دانش فنی تولید پروتئین هیدرولیز شده از یکی از منابع ارزان و قابل دسترس در کشور انجام گرفته است تا بتوان در چشم‌انداز آینده نسبت به رفع نیاز مصرف داخل کشور در تولید واکسن به این محصول اقدام کرد و زمینه‌های اشتغال و توسعه مزارع تولید کود و کرم در کشور را افزایش داد.

شیمی واکنش هیدرولیز پروتئین

در واکنش هیدرولیز پروتئین آنچه زیست‌شناسان به عنوان باند پپتیدی از آن نام می‌برند شیمی‌دان‌ها به عنوان باندآمیدی معرفی می‌کنند در یک آمید مشابه اتان آمید اتصال کربن نیتروژن در گروه آمید شکسته می‌شود و یک اسید کربوکسیلیک تشکیل می‌شود.

$$CH_3CONH_2 + H_2O + H^+ \longrightarrow CH_3COOH + NH_4^+$$

اگر همین واکنش روی پپتیدی که دارای دو اسید امینه است صورت گیرد



به جای یون آمونیوم از واکنش گروه NH۲ با یون هیدروژن دو یون مثبت از اسید امینه ایجاد می شود در هیدرولیز پروتئین در مقایسه با واکنش امید نیاز به یون‌های هیدروژن زیادی می‌باشد تا در هیدرولیز پروتئین برای تمام باندهای پپتیدی این اتفاق صورت گیرد(۱۶). هیدرولیز اسیدی پروتئین‌ها پروسه پرزحمتی است که معمولا در دمای به طور نسبی زیاد انجام می‌شود در این فرایند تعدادی از اسیدهای امینه از جمله تریپوفان به طور کامل هضم اسیدی می‌شوند و سیستئن، سرین، ترئونین به طور جزیی می‌شکنند(۱۰, ۱۲). اسپاراژین و گلوتامین به فرم اسیدی خود تبدیل می‌شوند(۱۷).

فرایندهای هیدرولیز

پس از هیدرولیز، "محصول هیدرولیزشده خام" ممکن است تحت پردازش بیشتری قرار گیرند. فرآیندهای پس از هیدرولیز شامل غیرفعال‌سازی گرما، اولترافیلتراسیون، هیدرولیز توسط پروتئازها و آنزیم‌های خاص می‌باشد. جدول ۱ فرایندهای اصلی پس از هیدرولیز و عملکرد را شرح می‌دهد(۷).

تولید پپتون

به پروتئین هیدرولیز شده پپتون نیز گفته می‌شود پپتون نتیجه هیدرولیز مواد پروتئینی می‌باشد پپتون‌ها کربن، نیتروژن، مواد معدنی و فاکتورهای رشد مورد نیاز برای پشتیبانی از فرایندهای متابولیک سلول‌های میکروبی و پستانداران را تأمین می‌کنند و در نتیجه باعث تکثیر و تولید سلول می‌شوند علاوه بر این از پپتون‌ها به عنوان جایگزین‌های سرمی و مکمل‌های محیطی در محیط کشت سلول‌های پستانداران استفاده شده است. منابع پروتئینی که به طور عموم به عنوان ماده اولیه در تولید پپتون استفاده می‌شود، شامل گوشت، کازئین و آب پنیر (پروتئین‌های شیر)، ژلاتین و سویا می‌باشند(۱۷).

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه کرم

نمونه کرم‌های مورد استفاده در این پژوهش از یکی از مزارع اطراف مشهد خریداری و در بستر طبیعی حاوی کود گاوی به صورت زنده به

بخش تحقیقات موسسه رازی شعبه مشهد انتقال داده شدند. جهت انجام پژوهش نمونه‌ها را از بستر طبیعی پرورش جدا کرده و برای مدت ۲۴ ساعت در ظرف آب حاوی شن الک‌شده تمیز جهت دفع مواد سیستم گوارش قرار داده شدند. حجم شن الک شده تمیز به میزان دو سوم از حجم ظرف نگهداری بوده است. پس ازگذشت این مدت کرم‌ها از ظرف تخلیه و در شرایط تربا ترازوی آزمایشگاهی سارتریوس (Sartorius) وزن شدند.

هموژنیزه کردن

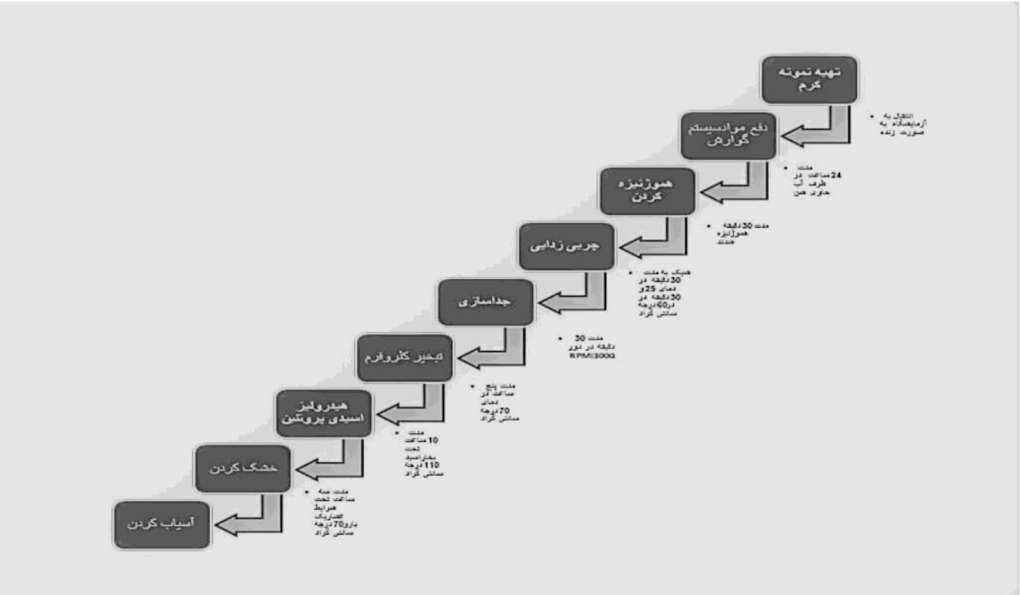
در مرحله بعد با دستگاه هموژنایزر (Lab Ohm Technic) کرم‌ها را برای مدت ۳۰ دقیقه در آب هموژنیزه کرده و سوسپانسیون همگن و یکنواختی از آنها فراهم شد. سپس برای سه تکرار شستشوی خونابه از محتویات همگن شده با آب شهری انجام شد.

چربی‌زدایی

برای انجام چربی‌زدایی محتویات بافتی باقی‌مانده کرم‌ها به استوانه مدرج انتقال داده شدند و معادل نصف حجم به آنها محلول کلروفرم مرک (Merck) اضافه گردید. سپس نمونه‌های محلول بافتی حاوی کلروفرم برای مدت ۳۰ دقیقه تحت شرایط دمای آزمایشگاه(۲۵ درجه سانتی گراد) با هات پلیت مگنت‌دار (Yellow Mag HS) شیکر شدند و در مرحله بعد زیر هود آزمایشگاهی جهان دانش برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حالی که همزمان نمونه‌ها شیکر می‌شد،

جدول ۱- فرایندهای اصلی پس از هیدرولیز.

فرایند	عملکرد
غیر فعال سازی گرما	غیر فعال سازی آنزیمهای پروتئولیتیک
اولترا فیلتراسون	برداشتن مولکولهای پپتیدی و پروتئینی دارای وزن مولکولی بالا
استفاده از آنزیمهای خاص	کاهش اسید امینه های خاص
هیدرولیز به وسیله اگزو پروتئاز	هیدرولیز بیشتر و کاهش تلخی
کربن فعال	کاهش تلخی
کروماتوگرافی جذبی	کاهش اسیدهای امینه اروماتیک



شکل۱- نمایش مراحل و شرایط فرایند فراوری هیدرولیز پروتئین.

قرار داده شدند و به دنبال آن نمونه بافتی برای مدت ۳۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ RPMI سانتریفیوژ شدند. محلول رویی شامل لایه آب و محلول زیری شامل کلروفرم باقی‌مانده از محتویات بافتی خارج گردیدند. سپس لایه‌های پروتئین ته نشین در لوله‌های سانتریفیوژبه هاون چینی منتقل و در اون ممرت(Memmert) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ساعت قرار داده شدند. در پایان این مرحله پروتیئن چربی‌زدایی شده، توزین گردید.

هیدرولیز اسیدی پروتئین

شکل ۲- نمایش کرم‌ها در بستر طبیعی محیط پرورش قبل از برداشت.

شکل ۳- الک کردن و آماده‌سازی شن‌های به طور نسبی هم اندازه به منظور استقرار کرم‌های زنده در آن.

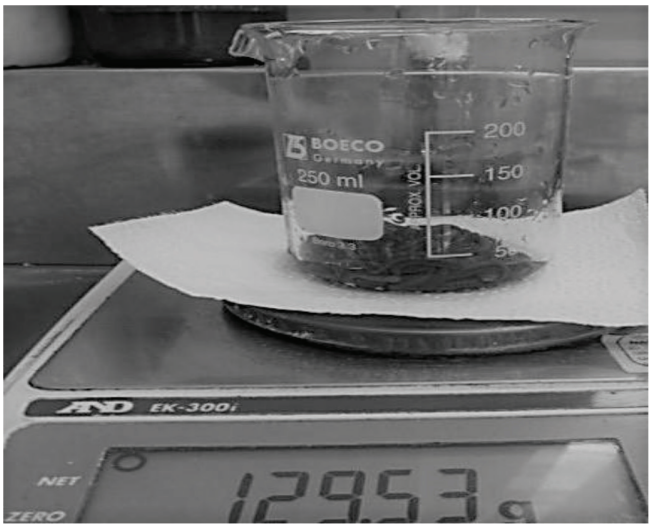
به منظور هیدرولیز اسیدی پروتئین باقی‌مانده بافتی چربی‌زدایی شده به یک لوله آزمایش درب باز منتقل شدند سپس در داخل یک شیشه پیرکس درپیچ‌دار اسید کلریدریک مرک (Merck) شش نرمال رقیق شده با آب به میزان چهاربرابر (حجمی/ وزنی) ریخته شد و لوله آزمایش حاوی بقایای بافتی در آن قرار داده شد(۱۶). جهت هیدرولیز اسیدی نمونه‌ها بافتی برای مدت ۱۰ ساعت در درجه حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد در ظرف دربسته در معرض حرارت شعله قرار داده شدند (۶).

خشک‌کردن

خشک‌کردن کامل نمونه پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۳ ساعت تحت شرایط خلاء با دستگاه میلی‌پور (Millipore) با فشار یک بار در درجه حرارت ۷۰ سانتی‌گراد با قرار دادان بر روی هات‌پلیت انجام شد. در پایان پس از خشک کردن پروتئین هیدرولیز شده تولیدی، آسیاب کردن آن انجام شد و پودر یکنواخت پروتئین تولید شده توزین گردید این آزمایشات با شرایط مشابه سه بار تکرار شده است.

نتایج

نتایج نشان داده که بهترین شرایط برای انتقال نمونه کرم‌ها به صورت زنده محیطی است که قبلا در آن زیست می‌کرده‌اند و همچنین نگهداری نمونه کرم‌ها در شن شسته الک شده و آب به مدت ۲۴ ساعت سبب دفع کامل بقایای فضولات از کرم‌ها شده است و شستشوی مواد دفع شده از کرم‌ها در دسترسی به باقی‌مانده بافتی تمیز برای ورود به مراحل تولید پروتئین حائز اهمیت می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳ و ۴). نتایج نشان داد تهیه محلول هموژن شده از بقایای بافتی در پیشبرد مراحل بعد موثر بوده است نتایج بیانگر این بوده است که واکنش کلروفرم به منظور چربی‌زدایی در دو زمان ۳۰ دقیقه‌ای در شرایط دمای ۲۵ سانتی‌گراد و



شکل۴- توزین کرم‌های زنده در ظرف آب وآمادگی برای تخلیه فضولات گوارشی قبل از ریختن شن الک شده در آن.

دمای ۶۰ سانتی‌گراد باعث جداسازی چربی از بافت پروتئینی شده است و از طرفی حرارت دادن نمونه در شرایط خشک در دمای ۷۰ سانتی‌گراد باعث تبخیر (دمای جوش کلروفرم ۶۱/۵ سانتی‌گراد) باقی مانده کلروفرم از نمونه شده است نتایج نشان داد هیدرولیز پروتئین در شرایط بخار یون‌های هیدروژن در حالتی که تماس مستقیم بین اسید و پروتئین نبوده است به طور کامل انجام شده است به طوری که در مجموع به طور متوسط از مقدار gr ۱۲کرم ترپس از شستشو، مقدار gr ۳ پپتون پودر شده تولید شده است که جزئیات تغییرات مقداری در فرایند تولید پروتئین هیدرولیز شده در جدول ۲ شرح داده شده است.

بحث

این تحقیق در قالب یک مطالعه پژوهشی آزمایشگاهی امکان تولید پپتون از یک منبع پروتئینی نظیر کرم را بررسی نموده است. بدون شک هرچه منبع پروتئینی مورد نظر برای تولید پپتون از خلوص پروتئینی بیشتری برخودار باشد کیفیت پپتون آن بالاتر و همچنین امکان تولید پپتون خالص ازآن راحت‌تر و کم هزینه‌تر خواهد بود آنچه واضح و مسلم است و در مقام قیاس پپتون کرم و سویا می‌توانیم بیان کنیم این است که میزان پروتئین در سویا کمتر از کرم می‌باشد به طوری که طبق گزارش‌ها میزان پروتئین در کرم ۶۱/۸۵٪ و چربی ۱۱/۳٪ در یک گرم وزن خشک تعیین شده است(۸). در حالی که سویای خشک دارای ۳۷٪ پروتئین و ۲۱٪ روغن و ۲۷٪ کربوهیدرات و مقادیری فیبر می‌باشد(۱). کنجاله سویا پس از استخراج روغن دارای حدود ۵۰٪ پروتئین و۳۰٪ تا ۳۵٪ کربوهیدرات است (۱, ۵). بنابراین سوای قیاس از جنبه‌های دیگر در خصوص میزان پروتیئن، انتخاب کرم به عنوان منبع پروتئینی نسبت به سویا ارجحیت دارد در کنار این مسله بحث استخراج پروتئین از منابع حیوانی و گیاهی تفاوت‌های عمده‌ای دارند از جمله این که منابع گیاهی نظیر سویا عموما در کنار پروتئین دارای مقادیر زیادی روغن و کربوهیدرات می‌باشند که برای تولید پپتون از آنها باید ابتدا این دو منبع را از بافت پروتئینی جداسازی کرده و سپس اقدام به تولید پپتون از پودر چربی‌زدایی شده سویا شود که جداسازی این دو مستلزم هزینه و مواد مصرفی زیادی می‌باشد و بنابراین انجام این دو فرایند قبل از تولید پپتون، هزینه‌های مرتبط با فرایند را افزایش می‌دهد. اگرچه تولید سویا نسبت به کرم ارزان‌تر می‌باشد ولی در فرایند تولید پپتون به روش هیدرولیز هزینه تولید پپتون از سویا در مقایسه با منابع پروتئنی حیوانی و کرم بیشتراست.نتایج به دست آمده از طرح تحقیقاتی با عنوان تهیه پپتون از پروتئین سویا در موسسه رازی مبین این مسله بوده است که در مقایسه با پپتون گوشت رشد باکتری در هر دو منبع پروتئینی یکسان بوده است ولی در بررسی توکسین تیپ‌های مختلف باکترهای کلستریدم پرفرنژنس ترشح اگزوتوکسین ناشی از کشت در محیط سویا در مقایسه با پپتون گوشت کمتر بوده است که این را ناشی از ضعف غنی اسید امینه پروتئین سویا می‌دانند به عبارتی این مسله ناشی از این است که نسبت اسید امینه‌های لازم برای تحریک و ساخت و ترشح اگزوتوکسین در سویا مناسب نمی‌باشد(۴). روش هیدرولیز سریع که بیشتر برای نمونه‌های با حجم اندک به کار برده شده است و در آن پروتئین جهت هیدرولیز در اتمسفری از یون‌های هیدروژن قرارداده می‌شوند(۱۶). در مقایسه با سایر روش‌های هیدرولیز نظیر هیدرولیز غوطوری در اسید و قلیا و آنزیمی بسیار کاراتر می‌باشد زیرا در عمل تماس مستقیم بین اسید و پروتئین برقرار نبوده است بنابراین در این حالت در مراحل بعد، نیازی به جداسازی اسید نمی‌باشد. اغلب کنترل هیدرولیز شیمیایی دشوار است و کیفیت فراورده تولیدی از آن کاهش می‌یابد(۹). به طوری که این فرایند باعث از بین بردن فرم ال اسیدهای امینه می‌شود(۶, ۷, ۱۵). بیشتر اوقات به دنبال هیدرولیز پروتیئن‌ها تعداد دو فراکشن ایجاد می‌شود که فراکشن اول شامل مقدار زیادی از اسیدهای امینه می‌باشد و فراکشن دوم شامل پپتیدهای فعال زیستی حاوی اسید امینه‌هایی که هیدرولیز نشده می‌باشد اما در اثر قرار گرفتن در معرض آنزیم‌های پروتئولیتیک این پپتیدها فعال می‌شوند(۷). اشکال روش هیدرولیز اسیدی این است که سبب از بین بردن اسید امینه تریپتوفان می‌شود(۱۵). علاوه بر این به صورت جزیی باعث تخریب اسید امینه میتونین می‌شود. از طرفی تحت این روش هیدرولیزی اسید امینه‌های گلوتامین به گلوتارات و اسید امینه اسپارژین به اسپارتات تبدیل می‌شوند (۶). روش‌های مختلفی برای افزایش بازفراوری تریپوفان بعد از هیدرولیز اسیدی گزارش شده است از جمله با اضافه کردن تیول، تریپتامین بازفراوری تریپتوفان انجام می‌شود

جدول ۲- جزئیات تغییرات مقداری در فرایند تولید پروتئین هیدرولیز شده.

مراحل فرایند	متوسط وزن به gr پس از سه تکرار
وزن پس از مرحله برداشت از بستر	۱۰
وزن ترپس از خروج از مرحله دفع مواد گوارشی	۱۲/۵
وزن تر پس از مرحله چربی زدایی	۸/۴
وزن خشک پس از مرحله چربی زدایی	۵/۲
وزن تر پس از مرحله هیدرولیز	۵/۶
وزن نهایی پس از مرحله خشک کردن	۳

یا قبل از هیدرولیز با اضافه کردن پریدین بوران (Pyridineborane) سبب احیا تریپتوفان به دی هیدرو تریپتوفان می‌شوند و یا برای بازفراوری تریپتوفان از اسید پی‌تلئوسولفونیک (p-toluensulfonic) استفاده شده است. تا کنون هیچ روش هیدرولیز پروتئین نتوانسته است به میزان۱۰۰٪ اسیدهای امینه را در دسترس قرار دهد(۱۱). بدون تردید تا دسترسی به فرایند صنعتی و تجاری‌سازی تهیه پپتون از کرم‌های ورمی‌کمپوست به منظور مصرف در فرایند تولید واکسن مطالعات پژوهشی بیشتر و کامل‌تری باید انجام شود. هیدرولیز اسیدی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در شکستن باندهای پپتیدی است و بنابراین استفاده از فاز بخار اسید کلریدریک شش نرمال در درجه حرارت ۱۱۰ سانتی‌گراد برای پروتئین کرم‌های ورمی کمپوست بسیار کار آمد بوده است در این فرایند به میزان ۳۰ ٪ از وزن اولیه کرم‌ها پروتئین هیدرولیز شده(پپتون) تولید گردیده است.

نتیجه‌گیری

هیدرولیز اسیدی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در شکستن باندهای پپتیدی است و بنابراین استفاده از فاز بخار اسید کلریدریک شش نرمال در درجه حرارت ۱۱۰ سانتی‌گراد برای پروتئین کرم‌های ورمی‌کمپوست بسیار کارآمد بوده است در این فرایند به میزان ۳۰ ٪ از وزن اولیه کرم‌ها پروتئین هیدرولیز شده (پپتون) تولید گردیده است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر حمیدررضا فرزین ریاست محترم موسسه رازی شعبه شمال شرق کشور در حمایت از این پژوهش سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

1- Al-bahri, M. B., S. A. AL-Naimi and S. H. Ahammed. 2009. The optimum conditions for production of soya peptone by acidic hydrolysis of soya proteins. thesis.

2- Bernardi, D. M., L. D. d. PARIS, F. Dieterich, W. R. BOSCOLO, C. SARY, A. SIGNOR, T. M. BERTOL and V. C. SGARBIERI. 2016. Production of hydrolysate from processed *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. *Food Science and Technology.* 36: 709-716.

3- Cock, L. S., C. A. R. Guerrero and M. A. R. Restrepo. 2013. The use of earthworm flour for lactic acid biomass production. *African Journal of Biotechnology.* 12.

4- Gahadkchee, H. F. 1997. Preparation of pepton soya protein,using in vaccine media. Final report or research plan.

5- Grieshop, C. M., C. T. Kadzere, G. M. Clapper, E. A. Flickinger, L. L. Bauer, R. L. Frazier and G. C. Fahey. 2003. Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7684-7691.

6- Hou, Y., Z. Wu, Z. Dai, G. Wang and G. Wu. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 8: 1-13.

7- McCarthy, A. L., Y. C. O'Callaghan and N. M. O'Brien. 2013. Protein hydrolysates from agricultural crops—bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture.* 3: 112-130.

8- Medina, A., J. Cova, R. Vielma, P. Pujic, M. Carlos and J. V. Torres. 2003. Immunological and chemical analysis of proteins from *Eisenia foetida* earthworm. *Food and Agricultural Immunology.* 15: 255-263.

9- Mongkonkamthorn NYM, S. Y., S. Makkhun, J. M. Regenstein, S.Wangtueai. 2020. Production of Protein Hydrolysate Containing Antioxidant and Angiotensin -I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities from Tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Blood journal processes.* 8: 1-22.

10- Moreno-Hernández, J. M., I. Benítez-García, M. A. Mazorra-Manzano, J. C. Ramírez-Suárez and E. Sánchez. 2020. Strategies for production, characterization and application of protein-based biostimulants in agriculture: A review. *Chilean journal of agricultural research.* 80: 274-289.

11- Mustățea, G., E. L. Ungureanu and E. Iorga. 2019. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: a short review. Ile 1: 131.132.

12- Pasupuleti, V. K. and S. Braun. 2008. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein hydrolysates in biotechnology*: 11-32.

13- Saputra, D. and T. Nurhayati. 2016. Production of Fish Hydrolysates Protein From Waste of Fish Carp (*Cyprinus Carpio*) by Enzymatic Hydrolysis. *ComTech: Computer, Mathematics and Engineering Applications.* 7: 11-18.

14- Taheri, A., S. Anvar, H. Ahari and V. Fogliano. 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian journal of fisheries sciences.* 12: 154-169.

15- Wisuthiphaet, N., S. Kongruang and C. Chamcheun. 2015. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *J Medical Bioeng.* 4.

16-https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/proteinhydrolysis.html.

17-https://studylib.net/doc/8277050/hydrolysis-to-hydrolysate.