مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة .العدد الاول ، المجلد الثالث ، 2009

ISSN: 1991-8941

إنتاج البروتين أحادي الخلية (SCP) بالتخمر الصلب لمخلفات نبات الحمض مع فطر *Aspergillus niger* واستعماله في تغذية أسماك الكارب *Cyprinus carpi*

أدهام علي عبد* ، عبد الله خلف العيسى** ، ظافر فخري عبد القادر*** ، أحمد شهاب أحمد***
جامعة الانبار- كلية الزراعة.
جامعة البعث - كلية الزراعة- الجمهورية العربية السورية
جامعة الانبار/ كلية التربية للعلوم الصرفة.

تاريخ الاستلام: 2008/12/29 تاريخ القبول: 2009/5/20

الخلاصة

أجري هذا البحث لإنتاج بروتين أحادي الخلية وزيادة محتوى مخلفات نبات الحمض (*Schanginia aegyptiaca*) من البروتين الميكروبي الخام بتنمية عزلات من فطر ***Aspergillus niger*** على وسط غذائي من مسحوق نبات الحمض وبعض مخلفات معامل الألبان والتمور بطريقة المزارع الصلبة باستعمال نظام التخمرات الصلبة في الحاضنة، مع تحديد بعض الظروف الملائمة للإنتاج من حيث مكونات الوسط ونسب المواد المدعمة ومدة الحضن، والعزلة الأفضل في الإنتاج.

فحصت مكونات المنتج من بروتين أحادي الخلية واستعمل بنسب استبدال للبروتين النباتي في تحضير علائق أسماك الكارب (***Cyprinus carpi***)، وكانت النتائج الآتية:

1- الحصول على 10 عزلات محلية من فطر ***A. niger*** تستوطن نبات الحمض (***Schanginia aegyptiaca***) انتخبت منها 3 عزلات اعتماداً على معدل قطر نموها الذي تراوح بين (5.60-6.40) سم على وسط PDA، وانتخبت العزلة Is-8 التي شخصت على أنها تعود للفطر ***A. niger*-P8** مع العزلة ***A. niger*-S** .

2- أدت عملية ترطيب وسط مسحوق الحمض بالشرش ومستخلص مخلفات التمور والتخمير بطريقة التخمرات الصلبة إلى تضاعف معدل نسبة البروتين في الوسط خمس مرات و ظهرت أعلى نسبة 8.14% مع الترطيب بالشرش واستخدام العزلة ***A. niger*-P8** .

3- أحتوى البروتين المنتج على نسبة منخفضة من الأحماض النووية RNA وDNA بلغ مجموع نسبتيهما 3.10% و3.72% في بروتين المنتج للعزلتين ***A. niger*-P8** و***A. niger*-S** على التوالي، وتبين عدم احتواء المنتج على المواد السامة

4- واحتوى البروتين المنتج على 15 حامض أميني وبلغ معدل كمية الأحماض الأمينية 64.95 و63.39 غم/100غم من البروتين، وأظهر تحليل البروتين الميكروبي احتوائه على أعلى محتوى من الحامض الأميني Aspartic 14.29 و12.32غم/100غم بروتين للعزلتين ***A. niger*-P8** و***A. niger*-S** على التوالي.

5- حققت نسبة الاستبدال 50% بروتين فول الصويا بالبروتين الميكروبي ***A. niger*-P8** المنتج أعلى معدل في وزن أسماك الكارب المغذاة عليه بمعدل وزن 26.22 غم للسمكة بعد 35 يوم من التغذية وبفارق 5.7% عن معاملة السيطرة.

كلمات مفتاحية: البروتين أحادي الخلية ،تخمر صلب ، نبات الحمض ، *Aspergillus niger* ، تغذية أسماك الكارب *Cyprinus carpi*

المقدمة

انتشر إنتاج بروتين أحادي الخلية في معظم بلدان العالم وعلى النطاق الإقليمي اهتمت منظمة الأقطار العربية المصدرة للبترول (أوابك) منذ عام 1976 بهذا الصناعة الجديدة، إذ أنشئ مشروع عربي مشترك وبطاقة إنتاجية مقدارها 100 ألف طن سنويا (1).

أوضح (2) أن بروتينات أحادية الخلية تحوي جميع الأحماض الأمينية الأساسية إلا أن محتواها يكون منخفضاً من الأحماض الأمينية الكبريتية. و وجد (3) أن محتوى بروتينات أحادية الخلية المنتجة من تنمية الأعفان مرتفعة الأحماض الأمينية الكبريتية فضلاً عن توفيرها لجميع الأحماض الأمينية الأساسية.

تميز الفطر ***Aspergillus niger*** في إنتاج بروتين أحادي الخلية إذ استخدمه (4) بتنمية الفطر على السكر الموجود في مخلفات معامل البيرة لإنتاج هذه البروتينات. أما (5) فقد استخدم فطر ***A. niger*** في إنتاج بروتين أحادي الخلية من مخلفات تبن القمح بتنميته

على مصادر سليلوزية أجريت معالجة ارتباطها بمواد اللكنين ودعمت بمصدر نتروجيني KNO3 بمعدل 0.04 غرام/ غرام وسط وحصل على أعلى إنتاج للبروتين بعد مدة حضن (3-5) أيام، أما (6) فقد استخدموا عزلة الفطر AS101 ***A. niger*** في أنتاج البروتين أحادي الخلية باستعمال كوالح الذرة وأحتوى المنتج على 30.4% من البروتين الخام، وعمل (7) محاولة لإنتاج البروتين أحادي الخلية من فطر ***A. niger*** بتنميته على مخلفات الرز كمصدر كربوني، و وجد أن أفضل إنتاج 45 ملغم/غم من المصدر الكربوني مع التدعيم بالمصدر النيتروجيني نترات الصوديوم.

تطرح معامل تصنيع التمور سنوياً آلاف الأطنان من المخلفات الثانوية على شكل نوى وألياف أو ما يعرف بثفل التمر (Date pulp) تحتوي هذه المخلفات على نسبة عالية من السليلوز والهيميسليلوز وعلى نسب بسيطة من الدهون والبروتينات وعلى بعض السكريات التي يمكن استعمالها كمصدر كربوني لإنتاج بروتين أحادي الخلية (8). أستعمل (9) مخلفات التمور بدلا عن عصير التمر في تنمية الفطر ***A. niger*** عند درجة حرارة 30°م وبلغت الكتلة الحيوية الجافة المنتجة للفطر 3 غم/لتر.

يعرف الشرش على انه المحلول الذي يتخلف عن صناعة الجبن ويحتوي الشرش على سكر اللاكتوز وهو المكون الرئيس للمواد الصلبة في الشرش ويشكل حوالي (4.5-6.5%) من سائل الشرش كما يحتوي على حامض اللاكتيك وبمقدار 0.15% (10). وأوضح (11) إمكانية استعمال الشرش في إنتاج بروتين أحادي الخلية من تنمية خميرتي ***Candida curvata*** و ***Trichosporon cutaneum*** ، أما (12) فقد أشار إلى أمكانية استعمال الشرش لإنتاج بروتين أحادي الخلية من خميرة ***K. fragillis*** أما (13) فقد استعمل الشرش في الحصول على منتجات حيوية وأوضحوا أن محتوى الشرش كان 5% لاكتوز ، 19% بروتين، 1.9% دهون و 0.9% أملاح وكميات صغيرة من الفيتامينات.

من الخصائص الأساسية التي يتميز بها البروتين أحادي الخلية هي محتواه من الأحماض الأمينية ونوعية هذه الأحماض، وقد أوضح (14) أن القيمة الغذائية لبروتينات الخميرة الناتجة من النمو على كسبة فول الصويا أفضل بمحتواها البروتيني من حامض اللايسين. وأشار (15) إلى أن البروتين المنتج بوساطة فطر ***A. niger*** وباستعمال نخالة القمح وكوالح الذرة ومخلفات الرز تضمن نسبة عالية من الحامض الأميني Methionine ، في حين وجد (16) أن البروتين المنتج بوساطة فطر ***A. oryzae*** كان محتواه مرتفعاً من الأحماض الأمينية Lysine, Threonine, Cystine و Tryptophan.

استعملت بروتينات الخلية الواحدة في تغذية الأسماك مثل الكارب العادي ***Cyprinus carpio* L** التي تتطلب مستوى بروتيني بحدود 37% (17) ، كما استعملت في تغذية اسماك البلطي ***Orechromes nilficus*** والتي تحتاج في غذائها إلى مستوى بروتيني 35% (18). وذكر (19) أن أفضل مستوى بروتيني لأسماك المياه الدافئة يتراوح بين 30-36%، بينما وجد (20) أن احتياج سمكة القطان ***Barbus xanthopterus*** والشبوط ***B. grupus*** والبني ***B. sharpyi*** من البروتين بلغت 40% و 35% و 31% على التوالي. أما البروتين الخام اللازم لإدامة الجسم يكون بحدود 1- 2 غم / كغم وزن الجسم لأسماك المياه الدافئة.

وقام (21) بإنتاج خميرة ***Candida utilis*** بعد تنميتها على مخلفات مصانع الأسماك واستعمل الكتلة الحيوية الناتجة مصدراً بروتينياً في تغذية إحدى أنواع اسماك البلطي ***Oncorhnchus mykiss***.

نبات الحمض ***Schanginia aegyptiaca*** من النباتات الحولية ويتكاثر بالبذور، الساق قائمة ومتفرعة من القاعدة، صلدة ملساء خالية من الزغب (22).

أشار (23) إلى إن نبات الحمض ينمو في جميع أنواع الترب، وينتشر في المناطق الزراعية القريبة من مصادر المياه وكذلك في الأماكن ذات الترب الطينية الخصبة. ويوجد على هيئة أفراد بين محاصيل الجت والمخاليط العلفية وفي بساتين الفاكهة والخضار، حالياً ينتشر هذا النبات في كافة مناطق العالم.

استهدفت الدراسة الحالية ما ياتي:

1- عزل وتشخيص الميكروب الفطري من نبات الحمض ***Schanginia aegyptiaca*** لاستخدامه في إنتاج البروتين أحادي الخلية SCP.

2- انتخاب العزلة الكفوءة في الإنتاج.

3- محاولة زيادة نسبة البروتين في محتوى نبات الحمض من خلال تدعيم الوسط باستعمال مصادر محلية لمخلفات تبن القمح ومخلفات الشرش والتمور.

4- تهيئة الظروف المناسبة للإنتاج بخلط نسب مختلفة من المصادر الكربونية واستعمال مدة وطريقة التخمير الملائمة .

5- تحديد مكونات وخواص بروتين أحادي الخلية المنتج.

6- دراسة صلاحية استعمال بروتين أحادي الخلية المنتج في تجارب حيوية.

المواد وطرائق العمل

تحضير مسحوق نبات الحمض (Sa)

تم جمع نبات الحمض النامي بصورة طبيعية من الحقول المجاورة لمباني جامعة الانبار خلال المدة 9/1 لغاية 2006/10/1 ، وهي مرحلة نضج النبات ذو لون أصفر مسود أطرافها ثم جففت على درجة حرارة 65°م لمدة 48 ساعة ثم قطع نبات الحمض إلى أجزاء صغيرة مررت عبر منخلين سعة ثقوبهما 4 و2 ملم وجمعت الأجزاء الواقعة بين المنخلين (4 و2 ملم) وحللت مكوناته المبينة في جدول (1).

الشرش Whey (Wh) :

استعملت مخلفات معامل الألبان الناتجة من صناعة جبن الحليب وحصل عليها من معمل ألبان الروضة الأهلي في مدينة حمص، رشح بقطعة قماش ابيض اللون ورمز له Whey (Wh) وأجريت عملية تقدير مكوناته المبينة في الجدول(1).

مخلفات التمور Date Wastes (Dw) :

استعملت مخلفات التمور الناتجة من صناعة الدبس في تدعيم الأوساط، إذ جلبت المخلفات وجففت هوائيا، وحضر المستخلص المائي لها بنقع 1.0 كغم من مخلفات التمور المجففة في 2.0 لتر من الماء المقطر لمدة 24 ساعة بعدها سخنت على درجة حرارة 80 م لمدة ساعتين و رشح النقيع وركز بالحرارة لحين الحصول على محلول رائق، قدرت بعض مكوناته (جدول 1) ورمز له Date Wastes (Dw).

مصادر العزلات:

جمعت عينات من نباتات الحمض المصابة بالفطر (تلون أطراف النباتات بلون أسود) خلال شهر تشرين الأول 2006، وأجريت عملية تقطيع الأطراف المصابة باستعمال سكين معقم بطول 1-2 ملم ونقلت أجزاء منها إلى طبق يحتوي على الكحول الأثيلي 70% لمدة دقيقة ثم نقلت إلى طبق أخر يحتوي على الماء المقطر المعقم ثم لقحت منها أوساط PDA المحضرة في أطباق زجاجية(10 أطباق) بمعدل قطعة واحدة للطبق (24)، وحضنت بدرجة حرارة 28 ْم لمدة 96 ساعة اختيرت ثلاثة عزلات فطرية حققت أعلى معدلات نمو بدلالة قطر المستعمرة على سطح الطبق (25)، كذلك حصل على عزلة فطرية من مختبر الأحياء المجهرية لكلية العلوم/ جامعة الانبار، تعود للفطر ***Aspergillus niger*** المعزولة من تربة مدينة الرمادي (Ramadi Soil)، ورمزت ***A.niger*-S** .

غربلة العزلات:

اختيرت العزلات الكفوءة في إنتاج الكتلة الحيوية وزرعت على وسط غذائي حضر بوزن 20 غم من المسحوق المجفف لنبات الحمض المنخول بمنخل 2 ملم ثم نقع في 200 مل ماء مقطر وسخن لمدة 2 ساعة على درجة حرارة 80°م ثم أجريت عملية العصر والترشيح باستعمال قطعة قماش بيضاء اللون، وأكمل حجم الراشح إلى 1.0 لتر ماء مقطر وأضيف إلى الوسط 15.0 غم أكار ثم أذيبت مكونات الوسط جيداً وعقم باستعمال الموصدة، ثم صب الوسط في أطباق زجاجية ولقح الوسط بالعزلات المنتخبة Is-8 وIs-4 وIs-3 و***A. niger*-S** بنقل قطع بقطر 2 ملم من نمو العزلة المحفوظة على وسط مائل PDA إلى وسط الطبق (26)، ثم حضنت في درجة حرارة 28 ْم لمدة 6 أيام، انتخبت العزلتين التي حققت أعلى معدل لقطر النمو على الوسط.

شخصت العزلتين المنتخبتين اعتمادا على مفاتيح التصنيف والتشخيص الواردة في المصادر الآتية للتعرف على العزلتين على مستوى الجنس والنوع (27 و28) ، وشملت فحوصات التشخيص :-

الخواص المزرعية، الفحوصات المجهرية والفحوصات الكيموحيوية، ورمزت العزلتين المنتخبتين بعد تشخيصهما ***A. niger*-P8** و ***A. niger*-S**.

قدرة العزلتين المنتخبتين على تحسين محتوى الأوساط المحضرة من البروتين :

حضّرت أوساط باستعمال مسحوق نبات الحمض الذي رطب بالماء المقطر أو الشرش أو مستخلص مخلفات التمور مع مراعاة عدم وصول درجة الترطيب إلى درجة الماء الحّر في الوسط، ثم وزعت بمعدل 100 غم في دوارق زجاجية حجم 250 ملم وعقمت الأوساط في الدوارق باستعمال الموصدة، ثم لقحت من لقاح العزلتين بمعدل 3 ملليتر/100غم وسط، وأجريت عملية تجانس للقاح مع الوسط عن طريق تحريك الأوساط الملقحة بالرج لمدة 30 دقيقة، ثم حضنت في درجة حرارة 28°م لمدة زمنية 4 و5 و6 و7 و8 يوم، اعتمدت قيم البروتين المقدر في الوسط بطريقة كلدال بتقدير النتروجين الكلي× 6.25 (29).

تأثير تدعيم مسحوق نبات الحمض على إنتاج الكتلة الحية ونسبة البروتين:

لغرض الحصول على مسحوق نبات الحمض المحسن محتواه من البروتين، حضر مسحوق النبات ودعم بمستخلص مخلفات التمور المبين مواصفاته في جدول 1 وبنسبة 1:1 ، ثم وزع الوسط بمعدل 100 غم في دوارق زجاجية حجم 250 مليلتر وعقمت الأوساط بالمؤصدة ولقحت بمعدل 3 مليلتر من اللقاح السبوري للعزلة ***A. niger*-S** ، كما حضر مسحوق نبات الحمض ودعم بسائل الشرش المبين مواصفاته في جدول 1 وبنسبة 1:1 وكما ورد أعلاه، ثم عقم بالمؤصدة ولقح من اللقاح السبوري للعزلة ***A. niger*-P8** بمعدل 3

ميللتر وحضنت الدوارق لكلا العزلتين في درجة حرارة 28°م لمدة 8 أيام وتم تقليب الوسط عن طريق رج الدوارق لمدة 30 دقيقة يوميا، ثم قدرت نسبة البروتين (30). نقلت محتويات الدوارق في أكياس بلاستيكية (بولي اثيلين معقمة) وخزنت في ثلاجة بدرجة حرارة 4°م لحين الاستعمال.

التحاليل والقياسات

استعملت الطريقة الواردة في (31) للكشف عن السموم في إنتاج العزلتين مقارنة بالعزلة ***A. flavus*** منتجة للسموم.

وشخصت الأحماض الأمينية في البروتين أحادي الخلية المنتج بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، وحسب الطريقة الواردة في (29).

قدرت كمية الأحماض الأمينية باستخدام جهاز مبرمج يسمى محلل الأحماض الأمينية التلقائي Automated Amino acid Analyzer وحسب الطريقة الواردة في (32).

كما استخلصت الأحماض النووية DNA و RNA من الكتلة الحيوية لكل من العزلتين ***A. niger*-P8** و***A. niger*-S** بإتباع طريقة الترسب بالملح المحورة التي أوردها (33)، وقدر محتوى البروتين أحادي الخلية من الدهون و الرماد بإتباع الطريقة المذكورة في (34)، وقيست قابلية الذوبان للبروتين الميكروبي المنتج حسب الطريقة الواردة في(35).

التجربة الحيوية

استخدمت أسماك الكارب العادي (Common Carp) ***Cyprinus carpi***، تم الحصول على أصبعيات الأسماك من مزرعة أسماك أهلية في مدينة حمص (مزرعة أبو يوسف الزنبق)، وأجريت التجربة بمختبرات كلية الزراعة بجامعة البعث، وذلك في المدة بين 9/5 – 2007/10/10 (5 أسبوع).

قسمت الأسماك إلى 3 مجاميع تشتمل كل منها على 5 أسماك وضعت في أحواض زجاجية بقياس 25×25×40 سم، وبعد استقرار الأسماك وضعت في حمام مائي يحوي على ملح الطعام بنسبة 3% لحين ظهور إجهاد واضح بأسلوب سباحتها للتخلص من معظم الطفيليات الخارجية.

تمت أقلمة الأسماك بشكل تدريجي على العلائق المصنعة وبالنسب المبينة في (17) ، لم يقدم العلف في اليوم الأول من وضعها في أحواض التجربة وفي اليوم الثاني قدم العلف بنسبة 1% من وزن الجسم لمدة 3 أيام ثم زيدت النسبة إلى 2% لمدة أربعة أيام ثم إلى 3% لمدة 6 أيام بعدها إلى 4% لمدة 7 أيام أخرى ثم إلى 5% إلى نهاية التجربة. وزع عدد مرات التغذية على وجبتين في اليوم وقد وزنت الأسماك في بدء التجربة ونهاية كل أسبوع (36).

النتائج والمناقشة

نمو نبات الحمض وانتشاره وأصابته بالفطريات:

يصل معدل الوزن الجاف لنبات الحمض 0.500 كغم/نبات ويحتوي على معدل 9.78 كغم بروتين/طن جدول(1)، وتعد عملية زيادة محتواه من البروتين فرصة لزيادة أهمية استعماله في تغذية الحيوانات.

أظهرت نتائج الدراسة أن بعض الفطريات تتمكن من النمو والانتشار على النبات، إذ تنتشر الإصابة الفطرية على النبات والتي تظهر بتلون أطراف النبات باللون الأسود والقهوائي الذي يعبر عن تواجد سبورات الفطريات.

أظهرت نتائج تشخيص العزلات المستخدمة أنها تنتمي إلى صف الفطريات الناقصة Deuteromycetes لجنس ***Aspergillus*** ويضم هذا الجنس العزلتين التي رمز لهما بالرمز ***A. niger*-P8** و ***A. niger*-S**، وقد وصل معدل قطر منطقة النمو لهما على وسط مستخلص الشعير 10 و 9.7 سم على التوالي.

ومن ملاحظة مكونات نبات الحمض الموضحة في جدول 1 أنه يحتوي على كمية من السكريات بلغت 5.6% التي تعد مصدراً مهماً لبناء الكتلة الحية والطاقة للفطريات النامية، لذلك تمكنت الفطريات من إصابة هذه النباتات والنمو على مكوناته.

قدرة العزلات على استهلاك المصدر الكربوني في مسحوق نبات الحمض:

أظهرت النتائج المبينة في جدول 2 قدرة العزلات على النمو على الوسط الصلب المحضر من مسحوق نبات الحمض وبلغ أعلى معدل لقطر النمو 3.2 سم مع العزلة Is-8 خلال اليوم السادس للحضن في درجة حرارة 28°م . فيما تراوح معدل قطر نمو العزلات ***A.niger*-S.** والعزلة Is-4 والعزلة Is-3 بين (2.8-2.1 سم)، وعند مقارنة نتائج معدل قطر النمو للعزلات على وسطPDA مع معدل قطر نمو العزلات المتحقق على وسط مسحوق النبات الصلب (جدول 2)، تبين حصول انخفاض في معدل قطر النمو بنسبة 50% للعزلتين Is-8 وIs-3 ، كما انخفض معدل النمو بنسبة 52.0% و63.7% مع العزلتين ***A.niger*-S.** وIs-4 على التوالي. وهذا ما يؤكد إمكانية العزلات على النمو واستعمال مكونات الوسط المحضر من نبات الحمض، إلاّ أنه لم يصل إلى معدلات النمو المتحققة بالنمو على مكونات الوسط PDA. وهذا ما يشير إلى عدم قدرة مكونات الوسط المحضر من نبات الحمض بتوفير احتياجات الفطر المطلوبة لتحقيق معدل النمو الحاصل على وسط PDA. وهذا يؤكد أهمية تحسين مكونات الوسط بتدعيمه ببعض المواد، لغرض تحقيق أفضل كفاءة

لاستعمال هذه المصادر في إنتاج البروتين أحادي الخلية وإن اختيار الوسط الملائم يعتمد على كلفة المواد الأولية ومعامل تحويلها إلى بروتين أحادي الخلية (37).

تأثير تدعيم الوسط بمستخلص التمور والشرش في المحتوى البروتيني:

أظهرت النتائج المبينة في جدول 3 إن نسبة البروتين في الوسط بعد التخمير بالعزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** بلغ 5.75% و 5.70% (57.5 و 57.0 كغم بروتين/طن) على التوالي بزيادة قدرها 5 مرات عن محتوى مسحوق النبات من البروتين قبل التخمير.

كما أظهرت عملية معاملة مسحوق نبات الحمض بالترطيب من الشرش أو مخلفات التمور زيادة في نسبة البروتين في الوسط إذ بلغت 6.76% عند الترطيب بالشرش وتنمية العزلة **A.niger-P8** ، كذلك بلغت نسبة البروتين 6.40% عند الترطيب بمستخلص مخلفات التمور واستخدام العزلة **A.niger-S** ، كما تبين أن نسبة البروتين تزداد بزيادة مدة الحضن وتحققت أعلى نسبة لبروتين أحادي الخلية في الوسط في مدة تخمير 7 و 8 يوم إذ بلغت 6.71% و 6.83% على التوالي، وتبين أن أفضل نسبة بروتين تحققت 8.35% عند استعمال العزلة **A.niger-P8** وترطيب الوسط بالشرش في مدة حضن 8 يوم، بينما بلغت نسبة البروتين 7.95% في الوسط عند استعمال العزلة **A.niger-S** وترطيب الوسط من مستخلص التمور والحمض مدة 8 يوم.

وتؤكد هذه النتائج التي تحققت زيادة في محتوى الوسط من البروتين بنسبة زيادة 71.1% و 54.0% عند المعاملتين الأفضل مقارنة بمعاملتي السيطرة على التوالي. وتظهر نسبة الزيادة المتحققة في بروتين أحادي الخلية أهمية تدعيم مكونات الوسط بالشرش أو مستخلص مخلفات التمور التي تزيد من قدرة الفطريات على النمو واستهلاك المصدر الكربوني المتوفر في مسحوق نبات الحمض لزيادة إنتاج الكتلة الحيوية وهذا ما أكده (38). كذلك استطاع (39) زيادة كفاءة عملية التخمير في أوساط عالية السكر بإضافة مصدر نتروجيني، وأكد ذلك (36 و 12) باستعمال مخلفات التمور والشرش في إنتاج بروتين أحادي الخلية.

بعض صفات ومكونات البروتين الميكروبي المنتج:

توضح النتائج المبينة في الجدول (4) أن نسبة البروتين الخام في الكتلة الحيوية المنتج بالتخمرات السائلة وصل 32.56% و 32.12% لنوعي الفطر **A.niger-P8** و **A .niger-S** على التوالي، كذلك تبين أن نسبة الكربوهيدرات بلغت 38.10% و 36.50% في المنتج من التخمير السائل للعزلتين أعلاه على التوالي، وتراوحت نسبة الدهون المستخلصة بالإيثر 2.84% و 2.22% في منتجات التخمرات السائلة على التوالي (جدول 4).

كذلك وجد أن نسبة الأحماض النووية في المنتج السائل ضمن الحدود الدنيا والتي تراوحت 5.32 و 5.18% للعزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** على التوالي، حيث كانت نسبة RNA أعلى من نسبة DNA في كلا المنتجين.

وأظهرت النتائج وصول نسبة الرماد 14.52% و 14.16 % في منتج العزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** على التوالي. وأظهرت النتائج أن قابلية الإذابة للمنتج تراوحت بين 3.10% و 3.21% للعزلتين على التوالي.

وتوضح هذه النتائج أن مواصفات البروتين أحادي الخلية المنتج باستعمال فطر **A.niger-P8** وفطر **A.niger-S** ، وهذه النتائج تتفق مع نتائج مكونات المنتج و كذلك كانت كمية الأحماض النووية ضمن المنتج ضمن الحدود المسموح بها لاستعمال البروتين أحادي الخلية ولا يتطلب إجراء عملية إزالة لهذه الأحماض النووية (40).

بعض مكونات البروتين الميكروبي من الأحماض الأمينية:

أظهرت النتائج المبينة في جدول (5) تنوع وتعدد الأحماض الأمينية في البروتين الميكروبي إذ بلغ مجموع قيم الأحماض الأمينية 81.04 و 80.50 غم/100غم للبروتين المنتج للعزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** .

وأظهرت النتائج وجود 15 حامضاً أمينياً أساسياً توزعت بكميات مختلفة كان أعلى معدل معنوي للحامض الأميني Aspartic والذي تراوحت كميته بين (16.12 و 15.62) غم/100غم في المنتج للعزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** على التوالي. تلاه محتوى البروتين المنتج من الحامض الأميني Isolucine إذ بلغ معدل كميته (7.52 و 6.95) غم/100غم للعزلتين أعلاه على التوالي.

وبلغت كمية الحامض الأميني Methionine (6.24 و 6.45) غم/100غم في البروتين المنتج للعزلتين **A.niger-P8** و **A.niger-S** على التوالي، بينما وصل معدل محتوى البروتين من الحامض الأميني Cysten (2.42 و 2.81) غم/100غم للمنتج العزلتين على التوالي.

وأوضحت النتائج عدم وجود فروق معنوية بكمية ونوعية الأحماض الأمينية المنتجة في بروتين العزلتين المستعملة. وهذا أكده (16) الذين وجدوا أن البروتين المنتج بوساطة الفطر ***A. oryzae*** يتميز بمحتوى مرتفع من الأحماض الأمينية السستين، الثايروسين، اللايسين والتربتوفان. وتعد مكونات الوسط ونوع الكائن مهمة في نسب ومكونات البروتين من الأحماض الأمينية (40).

وأظهرت نتائج اختبار فحص السموم للعزلتين ***A. niger*-P8** و ***A. niger*-S** والتي أجريت بطريقة TLC وباستعمال العزلة ***A. Flavus*** للمقارنة (مشخصة في إنتاج السموم) واستعمال الكاشف المظهر الخاص بكل نوع وتحت الأشعة فوق البنفسجية (41) خلو راشح إنتاج العزلات من السموم في ظروف التجربة المستعملة مما يؤكد جانب السلامة في استعمال هذه العزلات في إنتاج بروتين أحادي الخلية.

تأثير استعمال البروتين الميكروبي *A.niger*-P8 في تغذية أسماك الكارب:

يوضح الشكل 1 والجدول 6 أن أفضل معدل لوزن الأسماك تحقق عند استبدال بروتين فول الصويا بالبروتين الميكروبي ***A.niger*-P8** بنسبة 1:1 (50%) إذ بلغ معدل الوزن 20.31 غم/سمكة محققاً نسبة زيادة وزنيه بلغت 2.68% عن معاملة السيطرة (جدول 6).

كذلك ازداد معدل الوزن بزيادة معدل عمر الأسماك المغذاة إذ تحقق أعلى معدل وزني بلغ 25.43 غم/سمكة بعد 35 يوماً من بدء التجربة للأسماك المغذاة (جدول 6).

بينما حققت المعاملة المؤلفة من نسبة استبدال 1:1 (50%) أفضل زيادة وزنيه للأسماك المغذاة بلغت 26.22 غم/سمكة بعد 35 يوماً من بدء التجربة للأسماك المغذاة، وقد أدت إلى حصول نسبة زيادة بلغت 5.7% في وزن الأسماك مقارنة بمعاملة السيطرة. وقد لوحظ أن استبدال البروتين النباتي بالبروتين الميكروبي بنسبة 100% أدى إلى زيادة وزنيه مقارنة بمعاملة السيطرة إلا إنها كانت اقل بنسبة 4.32% عن معاملة الاستبدال بنسبة 50%، وربما يعود ذلك إلى إن استساغة الأسماك لاستهلاك البروتين الميكروبي تكون عند نسبة استبدال 50% هي الأفضل في ظروف البحث الحالية، وجاءت نتائج هذا البحث أفضل من نتائج بعض الدراسات التي استعملت بروتينات أحادية الخلية في تغذية أسماك الكارب ***Cyprinus carpi*** والتي تطلبت مستوى بروتيني بحدود 37% (17).

وذكر (20) أن البروتين الخام اللازم لإدامة الجسم يكون بحدود 1-2 غم/كغم من وزن الجسم لأسماك المياه الدافئة، وتوصل إلى نسبة استبدال البروتين الميكروبي تصل إلى نسب 40% و35% و31% لأسماك القطان Barbus xanthopterus والشبوط B. grupus والبني B. sharpyi على التوالي.

كما توصل (42) إلى نسبة استبدال 45% مع إبقاء 20% من فول الصويا و15% من المركزات البروتينية لتغذية أفضل لأسماك التيلابيا ***Oreochromis mossambicus peters*** لمدة ستين يوماً.

وربما تعود الاستجابة لمستويات أعلى لنسبة الاستبدال من البروتين أحادي الخلية المنتج في هذه الدراسة لتواجد المكونات الأولية لنبات الحمض وتبن القمح بنسب جيدة مع البروتين الذي استعمل في تحضير عليقه الأسماك، وهذا ما أكدته دراسة (20) باستخدامه بروتين نباتي من فول الصويا بنسبة 20%ومركزات علفية من نبات البرسيم الأمر الذي زاد نسبة الاستبدال للبروتين الحيواني في تغذية الأسماك.

المصادر

1- نقشو، نسرين مروان (2002). تأثير استخدام المخلفات الناتجة عن بعض الصناعات الزراعية على اصطناع البروتينات وحيدات الخلية باستخدام سلالات من خميرة Candida utilis . رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة دمشق.

2-Abraham, M.J.; Srinivasan, R.A. (1980). Utilization of whey for production of microbial protein and lipid. J. Microbiol. Abstracts. 9 (6): 40 - 46

3- الجنابي، خالد جاسم محمد (1998). إنتاج البروتين من الفطرين Mucor heimalis والعفن Trichoderma viride من مخلفات التمور. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة – جامعة البصرة.

4- Christians, C.; C. Couvaraki ; S. C. Georgopoules ; B. Macris and Vomroyanni, V. (1975). Protein content and amino acid composition of certain fungi evaluated for microbial protein production. Appl. Microbiol. 29 (2): 250-254.

5- Chahal, D. S.; N. Moo-Young and G. S. Dhillon (1979). Bioconversion of Wheat straw and Wheat straw components in to Single-Cell Protein. Can. J. Microbiol. 25 (7): 793-794.

6- Singh, A.; A. B. Abidi; A. K. Agrawal, and N.S. Darmwal (1991). Single cell protein production by Aspergillus niger and its evaluation. Zentralbl Mikrobiol. Vol. 146 (3): 181-184.

7- Anupama, A. and P. Ravindra (2001). Studies on Production of Single Cell Protein by Aspergillus in Solid State fermentation of Rice Bran. Brazilian J. Biology and Technol. 44 (1): 79-88.

8- Cabib, G.; J. Humberto ; A.G. Silva and E. Rodolfo (1983). The use of sugar cane stillage for single cell protein production. J. Chem.Tech.Biotech. 33: 21-28.

9- العجيلي، عمر محمد حسن (2005). استعمال تقنية ميكروبية في إنتاج حامض الاوكزاليك من عصير التمر. رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة الانبار.

10- Stirland, J. V. (1978). Processing and marketing of whey (a) whey processing. J. of Society of Dairy Tech. 31 (2): 91.

11- Moon, N.J.; E.G. Hammond and B.A. Glatz (1978). Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protein. J.Dairy Science. 61: 1537-1547.

12- Ghaly, A.E.; M. Kamal and A. Avery (2004). Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of Kluyveromyces fragilis in cheese whey under ambient conditions. J. Microbiol. Biotechnol. 19 (7): 741-749.

13- Sugai, M.; N.Takakuwa ; M. Ohnishi ; I. Arai ; T. Urashima and Y. Oda (2006). Selection of lactic yeast producing glucosylceramide from cheese whey. E-mail: yujioda@obihiro.ac.jp

14- عباس، محمد رياض (1988). الأعلاف غير التقليدية في علائق الحيوانات الزراعية. مترجم. مطبعة جامعة بغداد.

15- Gabriel, A.Y.; R.M. Mahmoud ; M. Goma and M. Abou-Zaid (2003). Production of single cell protein from cereal by products. Agricultural Wastes. 3 (3): 229-240.

16- Ravindar, R.; L.V. Rao and R. Pogaku (2003). Studies on Aspergillus oryzae Mutants for the Production of Single Cell Proteins from Deoiled Rice Bran. Food Technol. Biotechnol. 3: 243-246.

17- Ogino, C. and K. Saito (1970). Protein requirement in fish. The utilization of dietary protein by young carp. Bull. Jap. Soc. Science. Fish. 36: 250-254.

18- Davis, T.A. and R.R. Stickney (1978). Growth responses of Tilapia aurea to dietary protein quality and quantity. Trans. Am. Fish soc. 107 (3): 479-483.

19- Lovell, R.T. (1979). From ulating diets for aquaculture species feed stuffs, 51: 29-32.

20- الشماع، عامر علي؛ صالح، خليل إبراهيم؛ عبد الرزاق، محمد عادل؛ الاشعب، سلمان، علي حسين وجياد، إحسان سمير (1998). تحديد الاحتياجات الغذائية لصغار ثلاثة أنواع من الأسماك العراقية القطان Barbus xanthopterus والشبوط B. grypus والبني B. sharpyi. مجلة أباء للأبحاث الزراعية. المجلد 8، العدد 2، ص 210-215.

21- Martin, M. A.; S. Goddard and P. Bemibster (2006). Production of Candida utilis biomass as aquaculture feed. J. science food Agricul. 61(3): 363-370.

22- Martin, A.C. and W.D. Barkley (1968). Seed Identification Manual. Oxford and IBH Publishing company, India.

23- الخشن، علي علي وخضر، فؤاد حسن (1957). قواعد تربية النباتات. دار المعارف. مصر.

24- Booth, C. (1971). Introduction to general methods, In: Methods in Microbiology. Vol. 4, Academic press inc. London.

25- Benson, H.J. (1998). Microbiological Application. 7th Ed. WCB McGraw-Hill, USA .P.510-55.

26- Domsch, K. H. ; W. Grams and T. H Aderson (1980). Compendium of Soil Fungi. Vol . L. Acudemic press . London .

27- Barnate, H.L.(1960). Illustrated genera of imperfect fungi , Burgess Publishing Com . U.S.A .

28- Barron, G.L. (1983). The genera of hyphomyceles from soil .Reborte Krieger publishing Company Florida.

29- Sawhney, S.K. and R. Singh (2000). Introductory Practical biochemistry. Narosa publishing House, New Delhi, India.

30- Watanabe, T. (2002). Soil and Seed Fungi. Second Edition. CRC Press.

31- Grost-Allman, C.P. and P.S. Steyn (1979). Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. J. Chromatography. 195: 325-331.

32- كرزة ، أحمد محمد خير (1990). مبادئ الكيمياء الحيوية لينجر.(مترجم) المجلد الأول.منشورات جامعة حلب، كلية الطب.مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية. مطبعة أبن خلدون. دمشق.

33- Pospiech A. and S. Neuman (1995). Salting out procedure for isolation of genomic DNA. Bioresource Technol. 90: 134-141.

34- AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of official Analytical Chemists, Washington Dc. 1018.

35- Gierhart, D.L. and N.N. Potter (1978). Effect of ribonucleic a cid removal methods on composition and functional properties of Candida utilis. J. Food science. 43: 1705-1713.

36- الفراجي، جمال خلف عطية (2006). إنتاج معززات حيوية وبروتينات وحيدة الخلية من خميرة الخبز Saccharomyces cerevisiae وبكتريا حامض اللاكتيك Streptococcus thermopilus واختبارهما تغذويا في نمو اصبعيات الكارب العادي Cyprinus carpio L. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة – جامعة بغداد.

37- الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب (1989). الأحياء المجهرية الصناعية. بيت الحكمة، جامعة بغداد.

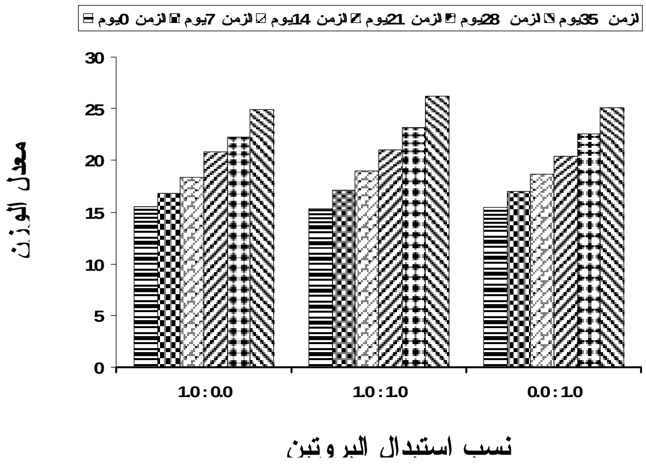
38- Evans, H.I. (1989). Yeast strain for baking. In: yeast technology edited by Spencer, J.F. and Spencer, D.M., 1st ed. Springer verlay, London.

39- Arizon, J. and A.G. Gehaedler (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the liquid fermentation process. Canadian J. Microbiol. 48: 965-970.

40- Ohta, S.; S.B. Maul ; A.J. Sinskey and S.R. Tannenbaum (1971). Characterization of a heat shock process for reduction of the nucleic acid content of *Candida utilis*. J. Appl. Microbiol. 22: 415-420.

41- فليح , أنوار سالم .(1981). بعض المحاولات لرفع مستوى إنتاج بروتين الخلية الواحدة من مخلفات بنجر السكر المحلية . رسالة ماجستير, كلية العلوم –جامعة الموصل.

42- Olvera-novoa, M.A.; C.A. Martinez- Palacios and L. Olvera (2003). Utilization of Torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for Tilapia (Oreochroms mossambicus peters) fry. J. Aquaculture Nutrition. 8 (4): 257-264.



شكل 1 معدل وزن الأسماك المغذاة من البروتين أحادي الخلية للعزلة *A. niger*-P8

جدول 1 بعض مكونات الأوساط ومواد التدعيم المستعملة

المكونات	مسحوق نبات الحمض	شرش طبيعي	مستخلص مخلفات التمور
نيتروجين %	1.58	2.65	1.02
السكر %	5.6	6.20	3.96
فسفور غم \ كغم	0.53	1.21	0.075
الرماد %	22.93	---	---
البروتين الكلي%	9.81	16.56	6.37
الرقم الهيدروجيني	---	4.00	5.40

جدول 2 معدل أقطار نمو العزلات على وسط PDA و وسط مسحوق نبات الحمض خلال 4 أيام (سم)

رقم العزلة	وسط PDA	وسط مسحوق نبات الحمض	رقم العزلة	وسط PDA	وسط مسحوق نبات الحمض
Is-1	3.50	- - -	Is-7	4.20	- - -
Is-2	4.00	- - -	Is-8	6.40	3.20
Is-3	5.60	2.40	Is-9	3.10	- - -
Is-4	5.80	2.10	Is-10	2.70	- - -
Is-5	2.60	- - -	*A. niger*-S	- - -	2.80
Is-6	3.05	- - -			

جدول 3 نسبة البروتين في الوسط الصلب المخمر (%)

العزلات	الأوساط	مدة الحضن يوم						المعدل
		0	4	5	6	7	8	
A. niger-S	ماء مقطر	3.0	4.18	4.60	4.80	5.20	5.15	4.48
	شرش	3.25	6.28	6.61	6.91	7.05	7.15	6.20
	مخلفات تمور	3.25	5.95	6.46	7.30	7.83	7.95 *	6.40
المعدل للعزلة *A. niger*-S		3.13	5.47	5.88	6.33	6.69	6.75	5.70
A. niger-P8	ماء مقطر	3.00	4.06	4.28	4.65	4.82	4.88	4.28
	شرش	3.25	6.36	6.88	7.26	8.14	8.35 *	6.76
	مخلفات تمور	3.25	5.95	6.82	6.98	7.25	7.51	6.27
المعدل للعزلة *A. niger*-P8		3.13	5.45	5.99	6.29	6.76	6.91	5.75
المعدل مدة الحضن		3.13	5.46	5.93	6.31	6.71	6.83	-
LSD P> 0.05 Isolate =n.s. M =0.45, Time= 0.31, IM= 0.12, IT= 0.22, M,T= 0.214, IMT= 1.31								

جدول 4 بعض صفات ومكونات البروتين الميكروبي المنتج

الصفة أو المكون %	منتج التخمر الصلب		LSD P> 0.05
	A. niger -S	*A. niger* -P8	
البروتين الخام	25.94	24.94	3.15
الكاربوهيدرات	33.4	31.4	2.16
الدهون	1.38	1.45	0.43
RNA	2.65	2.14	0.64
DNA	1.16	1.05	0.34
RNA + DNA	3.72	3.19	0.98
الرماد	21.41	20.25	2.41

جدول 5 نوع وكمية الأحماض الأمينية في البروتين أحادي الخلية المنتج للعزلتين (غم \ 100 غم)

Amino acid	تخمرات المزارع الصلبة		LSD P> 0.05
	A. niger -P8	*A. niger*-S	
Leucine	3.25	3.32	0.21
Tyrosine	4.62	4.12	0.22
Isoleucine	4.35	3.85	0.31
Valine	5.21	4.65	0.12
Cystine	1.56	2.13	0.23
Glycine	3.51	4.12	0.24
Histidine	3.22	2.25	0.15
Lycine	4.31	3.87	0.14
Methionine	6.21	5.61	0.21
Threonine	5.31	5.12	0.25
Aspartic	12.32	14.20	1.02
Proline	5.81	5.31	0.32
Glutamic	2.12	2.01	0.081
Tryptophan	2.15	1.98	0.14
Alanine	1.00	0.85	0.21
Total	64.95	63.39	-

جدول 6 معدل وزن الأسماك المغذاة من البروتين أحادي الخلية للعزلة A. niger P8 (غم)

فول صويا : SCP-p8	الزمن يوم						المعدل
	0	7	14	21	28	35	
1.0 : 0.0	15.50	16.85	18.33	20.81	22.30	24.90	19.78
1.0 : 1.0	15.36	17.13	18.97	20.98	23.20	26.22	*20.31
0.0 : 1.0	15.44	17.00	18.66	20.46	22.57	25.16	19.88
المعدل	15.44	16.997	18.656	20.544	22.692	25.431	
LSD P>0.05 SCP = 0.452 , TIME = 0.639 , SCP*TIME = 1.108							

Produce the single cell protein (SCP) by the solid culture method from Schanginia aegyptiaca wastes with *Aspergillus niger* and use in feeding of carp fish (*Cyprinus carpi*)

Idham A. Assaffii Abdullah Kh. Al-issa Daffer F. Al-Rawii Ahmed Sh. A Lafi

E.mail: al.rawi-daffer@yahoo.com

Abstract: The study was conducted to produce the single cell protein and to increase the content of ***Schanginia aegyptiaca*** wastes from the parent microbial protein was to grow isolates from (***Aspergillus niger***) by the use of nutrient media of ***Schanginia aegyptiaca*** powder and wastes of dairy factories and dates wastes by using incubators and solid fermentation. The suitable conditions for production such as components media, percentage of support materials, time of incubation and best isolate for production were determined.

Yield components of single cell protein were checked. The yield, was then used in specified ratios of replacement for the vegetable protein in the preparation of carp fish (***Cyprinus carpi***) food. The results were as follows:-

1-Obtaining 10 local isolates inhabiting ***Schanginia aegyptiaca***, three of them were selected depending on the ratio of growth diameter which ranged between (5.60-6.40) cm on PDA media, The Is-8 isolate has been selected and diagnosed to belong to fungi ***A. niger*-P8** with ***A. niger*-S** isolate.

2-Wetting the powder media of ***Schanginia aegyptiaca*** with Whey and extract of dates wastes and fermented in a solid culture doubled the percentage of the protein in the media up to (5) times. The highest percentage 8.14% was obtained when wetting with Whey and by the use of ***A. niger*-P8** isolate**.**

3-The produced protein contained low percentage of nucleic acids RNA and DNA. The totals of their percentage were 5.18% and 5.32% in liquid culture protein, and 3.10% and 3.72% in solid culture protein for ***A. niger*-P8** and ***A. niger*-S** isolates, respectively, revealed that production are free from toxins.

4- The microbial protein produced contained 15 amino acids. The rates of the amino acids were 64.95 and 63.39 g/100g of protein, the analysis of the microbial protein showed the highest content of Aspartic; 14.29 and 12.32 g/100g of protein for ***A. niger*-P8** and ***A. niger*-S** isolates, respectively.

5-The percentage of replacement 50% of Soya bean with the microbial protein ***A. niger*-P8** produced gave the highest rate in the weight of carp ***Cyprinus carpi*** 26.22 g per fish after 35 days of feeding with a difference 5.7% compared to control treatment.