مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

Single-Cell Protein Production by Species of Fungi For Bio-recycling of Marine Organisms Residues

Dr. Moufid Yassin*
Dr. Izdihar Ammar**
Dr. Badr Al ali ***
Rabee Raya****

(Received 21 / 1 / 2018. Accepted 6 / 6 /2018)

□ ABSTRACT □

Fungi used for the bio-recycling of marine residues, which isolated from the residues of marine organisms accumulated on shore .Marine remains of organisms were collected during the period 2015-2017. The work included physiochemical treatments and isolation of Fungi of each (*Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Trichoderma harzianum, Mucor circinelloides*) from the shore are adapted to the accumulated residues. These Fungi are characterized by their ability to secrete an enzymatic spectrum that degrades the compounds in these residues and build their protein-rich biomass through their metabolism. Results of The study showed a clear increase in total protein Where It reached in mixed cultures (*Trichoderma harzianum, Aspergillus niger*) (44.14)% In a solid nutrient culture from the remains of marine organisms. Suggesting that high content of protein can be produced in a small area of space, time and under available conditions and disposal of these residues and access to economically important materials.

Keywords: single-cell protein, Bio-recycling, remains of marine organisms, Species of Fungi

***Professor, Dept of Food Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
**** Professor, Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*****Assistant Professor, Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
****** Ph.D Student , Dept of Marine biology at HIMR, Tishreen University , Lattakia, Syria.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

استخدام أنواع فطرية في إعادة التدوير الحيوي لبقايا الأحياء البحرية بهدف انتاج البروتين وحيد الخلية

الدكتور مفيد ياسين*
الدكتورة ازدهار عمار**
الدكتور بدر العلي***
ربيع ريا****

(تاريخ الإيداع 21 / 1 / 2018. قبل للنشر في 6 / 6 / 2018)

□ ملخّص □

استخدمت أنواع من الفطريات معزولة من بقايا الأحياء البحرية المتراكمة على الشاطئ في إعادة التدوير الحيوي لهذه البقايا البحرية، جمعت البقايا خلال الفترة الممتدة من 2015– 2017، تضمن العمل معالجات فيزيوكيميائية لها وعزل لفطريات (*Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Trichoderma harzianum* ، *Mucor circinelloides*)متأقلمة مع هذه البقايا المتراكمة. تتميز هذه الفطريات بقدرتها على إفراز طيف أنزيمي مفكك للمركبات الموجودة في هذه البقايا، وبناء كتلتها الحيوية الغنية بالبروتين من خلال استقلابها لهذه المركبات. أظهرت نتائج الدراسة ارتفاعاً واضحاً في نسبة البروتين، حيث بلغت في المزارع المختلطة بالفطرين (*Trichoderma harzianum* و*Aspergillus niger*) (44.14)% في وسط زرعي مغذي جامد من بقايا أحياء بحرية. مما يشير الى إمكانية إنتاج كميات كبيرة من البروتين في حيز صغير من المكان والزمان وضمن شروط متاحة، والتخلص من هذه البقايا والحصول على مواد هامة اقتصادياً.

الكلمات المفتاحية: البروتين وحيد الخلية، التدوير الحيوي، بقايا أحياء بحرية، أنواع فطرية

* أستاذ، قسم الكيمياء الغذائية والتحليلية، كلية الصيدلة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
** أستاذة، قسم البيولوجيا البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
*** مدرس، قسم البيولوجيا البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
**** طالب دكتوراه، قسم البيولوجيا البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مقدمة :

يعد التخلص من بقايا الأحياء البحرية مشكلة بيئية حيث أن حرقها لا يشكل حلاً ناجعاً، كما أن عملية تفككها الطبيعية بطيئة، يشكل البروتين والكيتين وكربونات الكالسيوم نسبة 90% من الوزن الجاف للبقايا البحرية Pal *et al.*, (2014). يواجه استخدامها كغذاء فوري عدة مشاكل أهمها احتواؤها على نسبة بروتين منخفضة وقلة الاستفادة من العناصر الغذائية الموجودة فيها، لذلك تحتاج هذه البقايا لعمليات المعالجة الكيميائية والحيوية التي تزيد من عملية الاستفادة من مكوناتها الغذائية (Septinova *et al.*, 2012).

طورت تقانات عديدة لإعادة الاستفادة من هذه البقايا بما تحويه من مركبات كيميائية هامة ومنها تقانة انتاج البروتين وحيد الخلية (single-cell protein) الذي يعد منتج صديق للبيئة لأن هذه التقانة تعتمد على نمو أحد الأحياء الدقيقة على بقايا المخلفات، مما يساعد في إعادة تدويرها، وتتميز هذه الأحياء بمحتوى بروتيني عالي إضافة إلى الكربوهيدرات، الفيتامينات والأحماض الأمينية خاصة الميثيونين واللايسين المحدودة في الغذاء الحيواني والنباتي *et* (Gour *al.*, 2015). يطلق مصطلح البروتين وحيد الخلية على البروتين المنتج من الأحياء الدقيقة، ويشمل البروتين المستخرج أيضاً من مزيج من المستعمرات أو مستعمرات تعود للخمائر أو الفطريات أو الجراثيم أو الطحالب الدقيقة (Tesfaw and Assefa, 2014). إن ميزات الكائن المستخدم في إنتاج البروتين وحيد الخلية أن يكون غير ممرض للإنسان والحيوان، ويتمتع بمعدل نمو عالي وكتلة حيوية عالية وانجذاب للركيزة أو ملاءمته لها، والقدرة العالية على استخدام، واستهلاك ركائز معقدة وتبسيطها والاستقرار خلال النمو، مدى تحمل عالي للحرارة ودرجة الحموضة (pH)، ومحتوى مرتفع من البروتين ومتوازن من الأحماض الأمينية، ومنخفض من الأحماض النووية وقابلية الهضم والاستساغة، وغير سام ويعطي كميات كبيرة من البروتين في مجال صغير من المكان والزمان بعيد عن تحديات التغيرات البيئية من الجفاف والفيضانات والتغيرات الفصلية (Upadhyaya *et al.*, 2016).

أظهرت دراسات عديدة أن الـ *Trichoderma reesei* و *Aspergillus niger* من أهم الفطريات المستخدمة في التقانات الحيوية المفككة للبقايا الحيوية لما لهما من طيف واسع من الأنزيمات الفعّالة، واستخدما سوياً في دراسات عدة (Ahamed and Vermette, 2008). فقد تم انتاج البروتين الفطري من مخلفات الرز باستخدام الفطر *Trichoderma harzianum* وسجلت أعلى نسبة من البروتين الخام 49.50% والبروتين الصافي 32.00% ونسبة الحمض النووي الريبي 0.325% ومحتوى 16 حمض أميني تظهر نسبة عالية من اللايسين (lysine) ونسبة منخفضة من الميثيونين والفينيل الانين (Sibtain *et al.*, 2017).

في دراسة أخرى، أجريت الحلمهة الأنزيمية لبقايا قشور القريدس باستخدام النوع الفطري *Myrothecium verrucaria NCIM* 903 واستخدم الغلوكوز أمين الناتج عن عملية الحلمهة كركيزة لإنتاج البروتين وحيد الخلية وذلك باستخدام فطر خميرة *Saccharomyces cerevisiae* وكانت الكتلة الحيوية الناتجة 9.5غ/ل، ونسبة البروتين والأحماض النووية 61% و3.1% على التتالي (Vyas And Deshpande، 1991)

وفي دراسة أخرى عزل النوع *Aspergillus terreus* من الرمال الشاطئية وحددت الشروط المثلى لإعادة تدوير بقايا الأحياء البحرية بهدف إنتاج أنزيم الكيتيناز وتحديد نشاطه، وقد استخدمت في تلك الدراسة عدة بقايا أهمها قشور السرطانات، القريدس وحراشف الأسماك (Krishnaveni and Ragunathan, 2014)، وفي دراسة مشابهة عزلت مجموعة من الأحياء المفككة للكيتين من أوساط بحرية مختلفة من رمال الشاطئ والمياه والرسوبيات لاختبار قدرة هذه الأحياء على استخدام بقايا قشور القريدس بأشكالها المختلفة (كيتين خام، كيتين غروي، بقايا قريدس مجففة

ومطحونة) (Brzezinska *et al*., 2010) كما اختبرت قدرة *Trichoderma viride* على إعادة تدوير بقايا القريدس لإنتاج أنزيم الكيتيناز المضاد للفطريات المرضية (Sharaf *et al*., 2012).

يعد الجنس *Trichoderma* واحد من أهم الفطريات المنتجة لأنزيم الكيتناز والبروتيناز والذي يفرز كميات كبيرة من الأنزيمات في شروط بيئية وتجريبية كثيرة، حيث يفرز الفطر *Trichoderma harzianum* سبعة أنواع من الأنزيمات المفككة للقشور الكيتينية، تضم نوعين من N-acetylglucosaminidases، وأربعة أنواع من Endochitinases، ونوع من Chitobiosidase، لذلك يعد هذا الفطر من أفضل الأحياء المفرزة للأنزيمات والأكثر نشاطاً وكفاءةً من الأحياء الأخرى (Teoh Lay Sin, 2008).

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث

تعد سرعة إنتاج البروتين وحيد الخلية من الأحياء الدقيقة أكبر بكثير من نمو الخلايا الحيوانية والنباتية، وهي لا تحتاج إلى مساحات كبيرة وتحتوي على بروتين ذو قيمة غذائية عالية. إضافة إلى الكفاءة العالية في تحويل الركيزة (المخلف) من مواد لا قيمة لها إلى بروتين نوعي غني بالأحماض الأمينية، يمكن أن يحل مكان البروتين التقليدي النباتي والحيواني، وبناء عليه تم في هذه الدراسة التركيز على المعالجة البيوكيميائية باستخدام الفطريات المعزولة من الرمال الشاطئية المتأقلمة مع البقايا البحرية المتراكمة على الشاطئ، كون هذه الفطريات تتميز بقدرتها على إفراز طيف أنزيمي مفكك للمركبات الموجودة في هذه البقايا، واستقلابها بشكل جيد للحصول على كمية كبيرة من البروتين المكون الأساسي لكتلتها الحيوية .

أهداف البحث

1- عزل مجموعة من الفطريات المتأقلمة مع بقايا الأحياء البحرية .

2-معالجة بقايا بعض الأحياء البحرية باستخدام طيف من الفطريات المعزولة لإنتاج البروتين وحيد الخلية منها وبالتالي إغناء المحتوى البروتيني الكلي.

3-دراسة بعض العوامل المؤثرة في إنتاج هذا البروتين.

طرائق البحث و مواده

1- تحضير بقايا الأحياء البحرية للمعالجة البيوكيميائية

جمعت بقايا لأحياء بحرية من شاطئ اللاذقية (بجوار المدينة الرياضية)، شملت بقايا قشور سرطانات وقريدس غسلت بالماء ثم جففت بفرن التجفيف على الدرجة 60 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، ثم طحنت بآلة طحن كهربائية للوصول الى أحجام صغيرة منها (الشكل:1)، ونخلت على مناخل ذات أقطار مختلفة للوصول الى تجانس في حجم البقايا المطحونة، وفصلت الى حجوم مختلفة بين(250 ميكرومتر إلى 2 ميلميتر)، واستخدمت طرائق الحلمهة الحمضية باستخدام حمض كلور الماء بتركيز (1.25N) والحلمهة القلوية باستخدام هيدروكسيد الصوديوم (1N) .

الشكل (1): مخلفات من بقايا بحرية قبل و بعد طحنها ومعالجتها كيميائياً.

2- عزل الفطريات الشاطئية

أخذت عينة من الرمال الشاطئية الحاوية على بقايا أحياء بحرية متراكمة على الشاطئ وجففت وزرعت على وسط Potato Dextrose Agar، وحضنت لمدة أسبوع بدرجة حرارة 28 درجة مئوية، ثم عزلت المستعمرات الفطرية وتم تنقيتها للحصول على مستعمرات نقية من كل فطر، وصنفت الأنواع الفطرية اعتماداً على خصائصها المورفولوجية والبيومترية (لون وجهي المستعمرة، سرعة نمو المستعمرة، حوامل الأكياس البوغية، والحوامل الكونيدية، الأبواغ الكونيدية ، الأكياس البوغية شكلها، أحجامها، الأبواغ أشكالها، ألوانها)، وصنفت اعتماداً على المفاتيح التصنيفية الآتية: (Watanabe, 2002; Domsch *et al.*,1980). واختبرت قدرتها على النمو على وسط تشابيك المعدل والمكون من الكيتين المأخوذ من بقايا الأحياء البحرية كمصدر كربوني ونتروجيني في الوسط الذي يتكون من (غ /1 لتر ماء مقطر: كيتين 5، كبريتات الامونيوم 3، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدرجين1، كبريتات المغنزيوم المائية 0.5، كلوريد البوتاسيوم 0.5، كبريتات الحديد المائية 0.01 ، آغار15)

3- تحضير البادئ الحيوي:

حضرت معلقات من المستعمرات الفطرية النقية المعزولة التي تم تنميتها على أوساط الزرع الجاهزة (التي لايتجاوز عمر المستعمرة فيها الأسبوع) حيث نقلت إلى مصل فيزيولوجي (كلوريد الصوديوم 0.9%)، ثم أخذ 1 مل من المعلق وحسب عدد الأبواغ أو الخلايا بوساطة شريحة تعداد الخلايا (NEUBAUER) وأضيف البادئ إلى الأوساط المحضرة (10^6 خلية / مل) (Yalemtesfa *et al.*, 2010)

4- دراسة تأثير بعض العوامل في انتاج البروتين:

أ- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من بقايا الأحياء البحرية في وسط فطري مغذي سائل

أضيف التراكيز المختلفة (0.5، 1، 2، 5غ) من مطحون مخلفات بحرية محضر سابقاً إلى 100مل من الوسط الزرعي (غ /1 لتر ماء مقطر: كبريتات الأمونيوم 3، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدرجين (K_2HPO_4) 1، كبريتات المغنزيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$)0.5، كلوريد البوتاسيوم0.5، كبريتات الحديد المائية ($FeSO_4 .7H_2O$) 0.01)، رجت بشكل جيد، ضبطت pH الابتدائية عند قيمة 5.5-6 للفطر باستخدام محلول قلوي أو حمضي حسب الحاجة، وغلفت جيداً بالقطن وورق الألمنيوم، وعقمت بالاوتوغلاف على الدرجة 121 درجة مئوية لمدة ربع ساعة، تركت لتبرد، وحقنت بالبادئ الحيوي من الفطريات المعزولة (تركيز 10^6 خلية / مل). بعد ذلك وضعت على هزاز بمعدل 150rpm في حاضنة عند درجة حرارة 28 درجة مئوية لمدة أسبوعين، ثم وزعت العينات على أنابيب اختبار، ووضعت في مثقلة تعمل بمعدل 6000 rpm لمدة ربع ساعة، وفصلت الكتلة الحيوية الناتجة من وسط التخمر السائل،

وجففت عند درجة حرارة 80 درجة مئوية وحسب الوزن، وحفظت في البراد على الدرجة 4 لحساب نسب البروتين فيها (Kam *et al.*, 2012).

ب- دراسة تأثير التخمر المتسلسل باستخدام الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*

استخدمت بعض أوساط تفكيك المزارع الفطرية السابقة كأوساط استكملت فيها الخميرة عملية التفكيك والاستفادة من الأوساط السابقة، حيث زود كل وسط بمصدر للمغذيات (0.4 غ كبريتات الامونيوم، 0.4 غ فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين)، وضبطت درجة الـ pH على 4.5–5 عن طريق حمض كلور الماء تركيز20%، وعقمت بالأوتوغلاف، وحقنت بالخميرة *Saccharomyces cerevisiae* (الجاهزة)، ووضعت في هزاز عند 200 rpm ضمن حاضنة عند الدرجة 30 درجة مئوية لمدة 72 ساعة (Aggelopoulos *et al.*،2014)

ت- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من بقايا الأحياء البحرية في وسط مغذي فطري جامد ونصف جامد.

أضيف البادئ من الفطريات إلى وسط تشابيك (بدون مصدر كربوني فيه) مع المخلفات المعقمة والتي شملت بقايا بحرية مختلطة وفق النسب التالية (1:2 , 1:3 ,1:4 , 1:5 w/v) تشابيك: مخلفات معقمة (مختلطة، سرطانات، قريدس) وحضنت عند الدرجة 28 درجة مئوية لمدة أسبوعين بعد الانتهاء من الحضن جففت على درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة 24 ساعة، وحفظت بدرجة 4 درجة مئوية لحين اجراء تحاليل البروتين(Amar، 2001)

ث- تأثير المصدر النتروجيني على نمو الفطريات في وسط زرعي مغذي جامد

استخدمت عدة مصادر نتروجينية في الزراعة منها نترات الصوديوم، كبريتات الأمونيوم، نترات البوتاسيوم، مستخلص الخميرة، بيبتون، واستخدمت مزراع مختلطة من الفطريات مع كل المصادر النتروجينية (Anupama & Ravindra, 2001).

ج- تحديد تركيز البروتين في المعاملات المدروسة

تم استخلاص البروتين الكلي باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5N) أضيف للكتلة الحيوية عند درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة 5 دقائق، ثم تجمع بالمثقلة 6000 rpm للحصول على معلق من البروتين، وحفظ بالبراد بالدرجة 4 درجة مئوية لحين التحليل باستخدام جهاز كلدال وطريقة البيوريت (AOAC, 2005)

النتائج والمناقشة:

1- الفطريات المعزولة من الرمال الشاطئية:

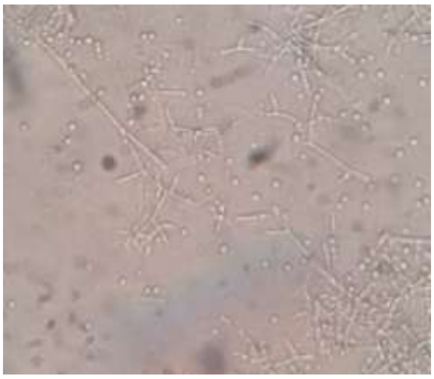
عزلت أربعة أنواع فطرية من الرمال الشاطئية في مكان تجمع بقايا الأحياء البحرية على شاطئ المدينة الرياضية في اللاذقية، وصنفت كالآتي:

-*Trichoderma harzianum*: المستعمرة سريعة النمو على وسط PDA، الوجه العلوي للمستعمرة أبيض قطني في البداية يتحول إلى اللون الأخضر الغامق مع تشكل حلقات دائرية المركز، في حين يبقى الوجه السفلي أخضر، الأبواغ الكونيدية بيضوية إلى كروية تتوضع على فاليدات قصيرة ذات تفرع سواري عدد من 2–4 (الشكل: 2).

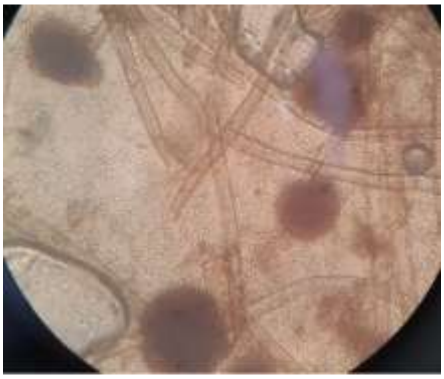
-*Aspergillus niger* : المستعمرة سريعة النمو على وسط PDA، لونها أسود داكن، حوامل الأبواغ الكونيدية مستقيمة، الحويصلة كروية، الرأس الكونيدي يترتب شعاعياً، الذنيبات مرتبة في صفين، الأبواغ الكونيدية كروية إلى شبه كروية خشنة المظهر بنية إلى سوداء اللون (الشكل: 3).

- *Aspergillus terreus*: المستعمرة سريعة النمو على وسط PDA، لونها رمادي إلى بني محمر، حوامل الأبواغ الكونيدية مستقيمة شفافة ملساء، الحويصلة نصف كروية، الرأس الكونيدي يترتب عمودياً الذنيبات في صفين، الأبواغ الكونيدية كروية أو اهليليجية الشكل (الشكل: 4).

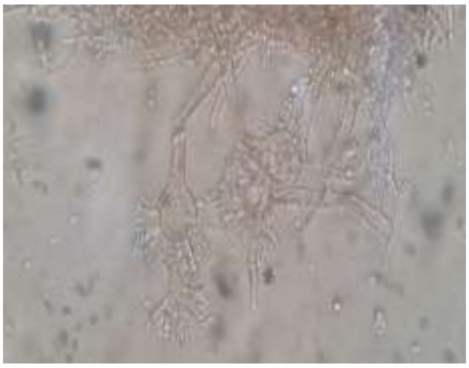
- *Mucor circinelloides*: المستعمرة سريعة النمو تملأ الطبق على وسط PDA، بيضاء اللون ثم تصبح رمادية إلى بنية داكنة، كثيفة القوام قطنية المظهر، الوجه السفلي كريمي داكن، حامل الأكياس البوغية شفاف، التفرعات طويلة أو قصيرة ومنحنية غالباً، الأكياس البوغية بيضوية الشكل، أبواغ الاكياس البوغية وحيدة الخلية شفافة كروية (الشكل: 5).



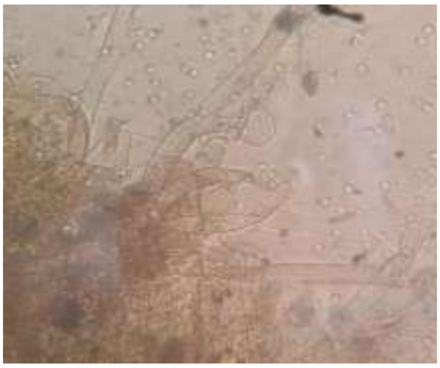
الشكل (2): فطر *Trichoderma harzianum*



الشكل (3): فطر *Aspergillus niger*



الشكل (4): *Aspergillus terreus*



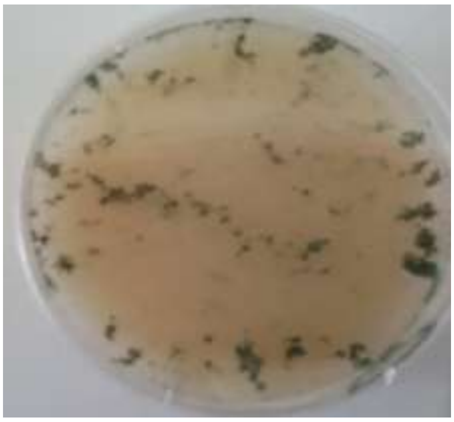
الشكل (5): *Mucor circinelloides*

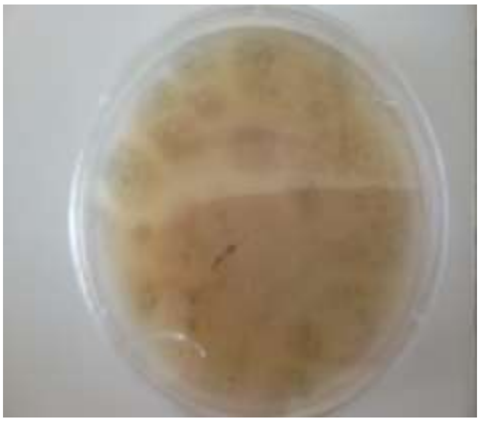
صنفت الفطريات حتى مستوى النوع وتم تحديد الفصائل والرتب التي تتبع لها كما هو وارد في الجدول (1).

الجدول (1): الوضع التصنيفي للفطريات المعزولة:

Kingdom	Class	Order	Family	Genus	Species
Fungi	Zygomycetes	Mucorales	Mucoraceae	*Mucor*	*Mucor circinelloides*
	Deuteromycetes	Moniliales	Moniliaceae	*Aspergillus*	*Aspergillus niger*
					Aspergillus terreus
				Trichoderma	*Trichoderma harzianum*

كما لوحظ نمو ميسليوم للفطريات المعزولة على وسط تشابيك المعدل (بقايا الأحياء البحرية مصدر الكربون والنتروجين) وخاصة للفطرين *Trichoderma harzianum* ، *Aspergillus niger* لكن ليس بمعدل كثافة نمو هذين الفطرين على وسط تشابيك (الشكل:6).

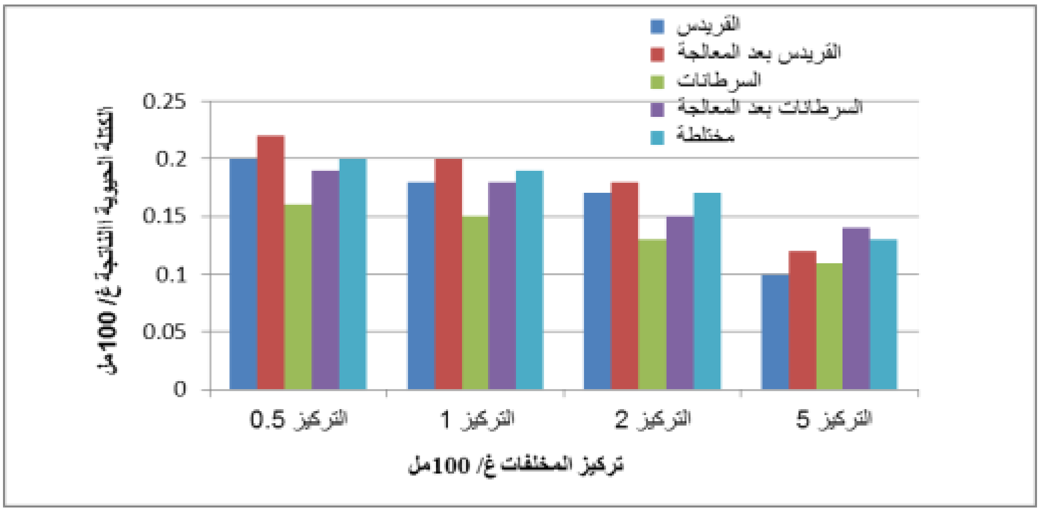




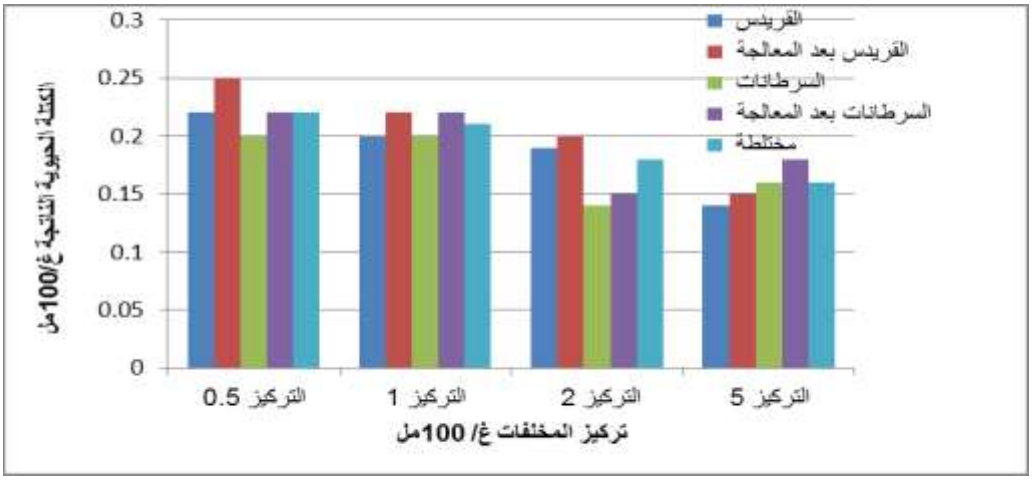
الشكل (6): نمو كل من فطر *Trichoderma harzianum* و*Aspergillus niger* على وسط تشابيك المعدل

2- تأثير تراكيز مختلفة من بقايا الأحياء البحرية في وسط فطري مغذي سائل

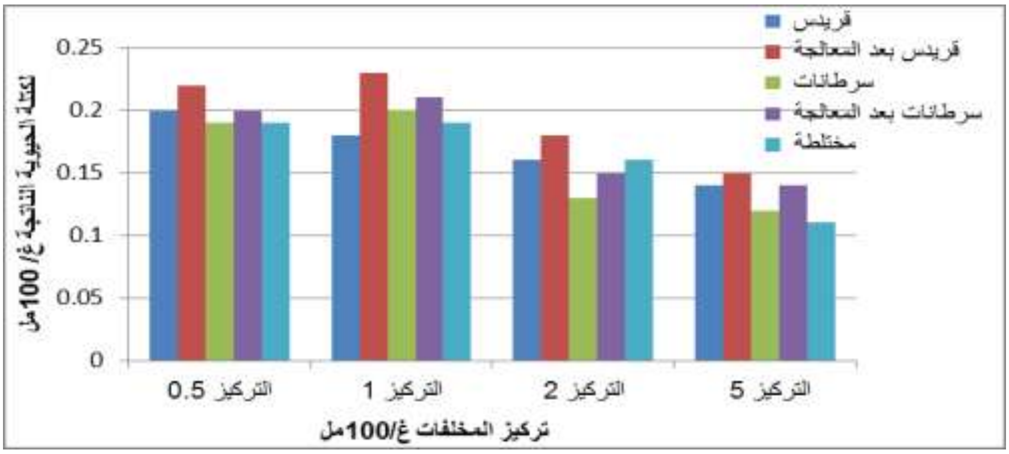
أوضحت النتائج كما هو موضح في الأشكال (7،8،9،10) نمو الفطريات الآتية *Aspergillus niger* ، *Aspergillus terreus*، *Trichoderma harzianum* ، *Mucor circinelloides* على أوساط ذات تراكيز مختلفة من المخلفات، وتناقص الكتلة الحيوية الناتجة بعد عملية الحضن مع ارتفاع تراكيز هذه المخلفات دون الأخذ بعين الاعتبار نوع الفطر. بالإضافة إلى أن الكتلة الحيوية للفطريات النامية على المخلفات البحرية المضاف إليها قشور القريدس كانت أعلى من الكتلة الحيوية للفطريات النامية على المخلفات المضاف إليها قشور السرطانات البحرية، كما لوحظ ازدياد الكتلة الحيوية عند معالجة المخلفات كيميائياً قبل استخدامها كركيزة لنمو الفطريات، فاستخدام الحلمهة الحمضية والقلوية للمخلفات تزيد من نسبة السكريات القابلة للتخمير في هذه المخلفات، والتي تكون بمتناول الفطريات التي تستخدمها كمصدر وحيد للكربون في عملية النمو وبناء الكتلة الحيوية، كما أن تدعيم مكونات الوسط بالأملاح والمواد الإضافية تزيد من قدرة الفطريات على النمو واستهلاك المصدر الكربوني المتوفر في البقايا الشاطئية لزيادة انتاج الكتلة الحيوية، وبالتالي نسبة البروتين، وتعتبر عملية الطحن للبقايا باعتبارها معاملة فيزيائية تسبق المعاملة الكيميائية المتمثلة بالحلمهة الحمضية والقلوية عملية مهمة جدا ًتزيد من قابلية المخلفات على التحلل الأنزيمي وذلك لأن الطحن يقلل من حجم الجزيئات ويزيد المساحة السطحية المعرضة للأنزيم وبالتالي يسمح للماء والأنزيم بالتغلغل إلى التركيب الدقيق للمخلفات.



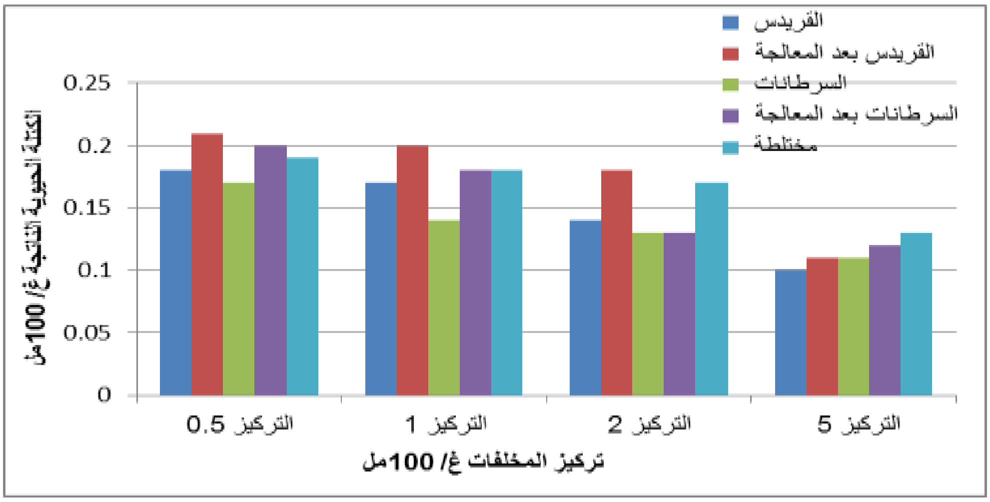
الشكل (7): تأثير تركيز ونوع المخلفات في الكتلة الحيوية الناتجة عن نمو فطر ***Aspergillus niger***



الشكل (8): تأثير تركيز ونوع المخلفات في الكتلة الحيوية الناتجة عن نمو فطر ***Trichoderma harzianum***



الشكل (9): تأثير تركيز ونوع المخلفات في الكتلة الحيوية الناتجة عن نمو فطر ***Mucor circinelloides***

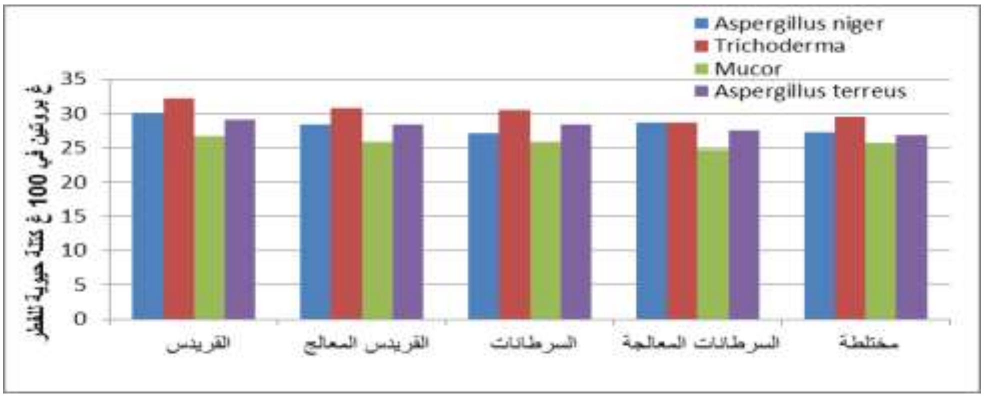


الشكل (10): تأثير تركيز ونوع المخلفات في الكتلة الحيوية الناتجة عن نمو فطر ***Aspergillus terreus***

يلاحظ من الأشكال(7–10) أن أفضل النتائج المسجلة للكتلة الحيوية تراوحت بين (0.20–0.25) غ/100مل لدى معظم الفطريات والتي ظهرت عند التركيزين المنخفضين (0.5،1)غ/100مل من مختلف الركائز المستخدمة، وهذا يمكن أن يفسر بأن هذه التراكيز هي التراكيز الأفضل لعمل الأنزيمات المفرزة، وهذا ما ظهر في العديد من الأبحاث التي بينت أن التركيز الأفضل كان بين (1– 1.5)% (Felse and Pands، 2000) ، وفي دراسات أخرى بين (0.2–0.5)% (Suraini *et al.*, 2008)، كما أن أعلى كتلة حيوية للفطريات النامية على المخلفات كانت للفطر *Trichoderma harzianum* (0.25غ/100مل) عند تراكيز (0.5% من مخلفات القريدس بعد المعالجة)، ثم الفطر *Mucor circinelloides* (0.23 غ/100مل) عند التركيز (1% مخلفات قريدس بعد المعالجة)، ثم الفطر *Aspergillus niger* (0.22 غ/100مل)، ثم الفطر *Aspergillus terreus* (0.21 غ/100مل) عند تركيز (0.5% مخلفات قريدس بعد المعالجة)، بينت النتائج أن أفضل المخلفات المستخدمة هي بقايا القريدس التي تعد الأفضل في تركيبها الكيميائي كونها مصدر كربوني ونتروجيني في آن واحد وأكثرها ملائمة لعمل الفطريات المستخدمة في الدراسة. في حين أن استخدام مخلفات القريدس والسرطانات في ركيزة واحدة مختلطة لم تلائم عمل الفطريات، وأعلى كتلة حيوية سجلها فطر *Trichoderma harzianum* كانت 0.22غ/100مل عند تركيز 0.5%، وقد يعود ذلك إلى أن الفطر *Trichoderma harzianum* يفرز سبعة أنواع من الأنزيمات المفككة للقشور الكيتينية، وبالتالي يعد من أفضل الأحياء وأكثرها نشاطاً وكفاءةً في إفراز الأنزيمات المفككة. تزداد عملية إنتاج الأنزيمات المفككة من الفطريات في معظم الدراسات بعد اليوم الثامن من أهمها أنماط من الكيتناز مثل Endochitinase الذي يفكك الكيتين إلى سلاسل مختلفة الطول، وExochitinase الذي يحرر المونوميرات والغلوكوز أمين، ويعد فطر *Mucor circinelloides* مثالاً على هذه الفطريات المفرزة للأنزيمات المفككة خلال نموه الأسي (Teoh Lay Sin., 2008).

أما المعالجة الكيميائية للمخلفات فقد سجلت الكتلة الحيوية قيماً تفوق القيم على الركائز غير المعالجة، وهذا يدل على أن عملية المعالجة الكيميائية للمخلفات ساهم في تبسيط وتفكيك المخلفات وسهولة استقلابها من قبل الأحياء المستخدمة.

فما يخص مقارنة نتائج نسب البروتين في الكتلة الحيوية للفطريات المستنبتة على بقايا الكائنات البحرية، لم تظهر فروقات كبيرة في نسب البروتين لكل فطر مع تغير نوع المخلفات (الشكل:11).

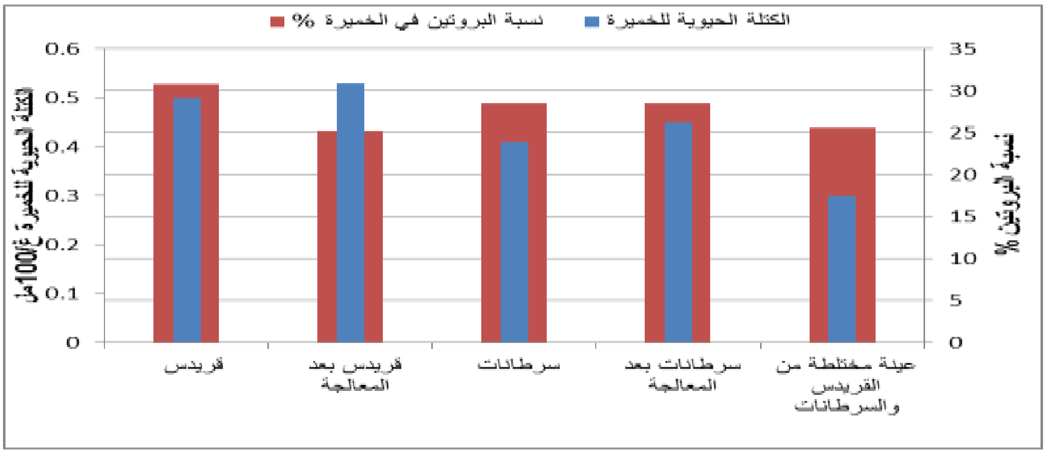


الشكل (11): مقارنة لنسب البروتين في الكتلة الحيوية للفطريات المستنبتة على المخلفات المختلفة

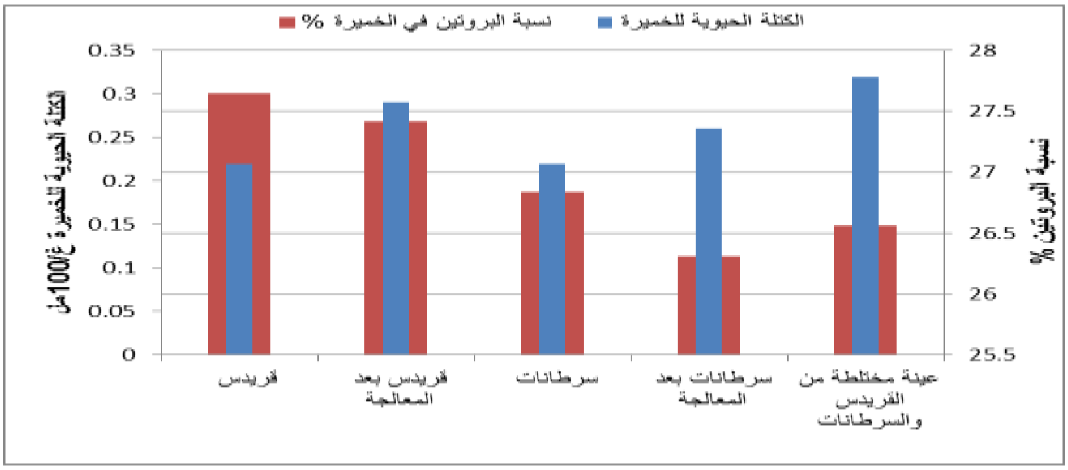
سجلت أعلى نسبة بروتين في فطر *Trichoderma harzianum* ثم *Aspergillus niger* ثم *Aspergillus terreus* ثم *Mucor circinelloides* (32.22،30.04،29.02، 26.66)% على التتالي ولم يلحظ أي فروق كبيرة في نسب البروتين لكل فطر مع تغير نوع المخلفات. تتميز هذه الفطريات بقدرتها على التأقلم مع تحلل بقايا الحيوانات البحرية القشرية وقادرة على إنتاج أنزيم البروتيناز المفكك للبروتين الموجود في المخلفات وقادرة على إنتاج أنزيم الكيتيناز المفكك للكيتين وتحويله إلى غلوكوز أمين الذي يمكن أن يستخدم كمصدر كربوني ونتروجيني لبناء كتلتها الحيوية (Amar, 2001).

3- تأثير التخمر المتسلسل باستخدام الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*

أظهرت نتائج التخمر المتسلسل باستخدام خميرة *Saccharomyces cerevisiae* أن الكتلة الحيوية الناتجة للخميرة النامية على وسط تفكيك المزارع الفطرية لفطر *Trichoderma* كانت أعلى من تلك المسجلة على وسط تفكيك المزارع الفطرية لفطر *Aspergillus* في حين كانت نسب البروتين متقاربة تقريباً (الشكلين 12،13).



الشكل (12): الكتلة الناتجة من الخميرة ونسب البروتين فيها نتيجة عملية التخمر المتسلسل بـ *Trichoderma harzianum* +*S. cerevisiae*.



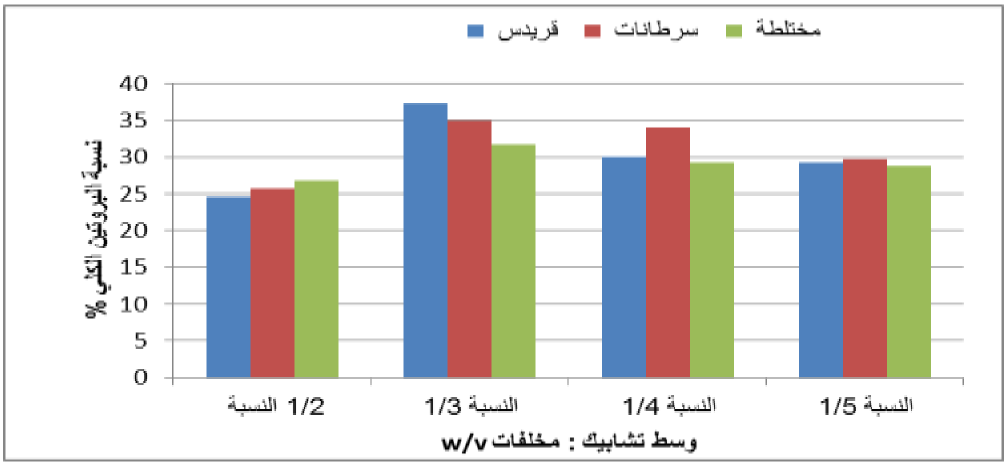
الشكل (13): الكتلة الناتجة من الخميرة ونسب البروتين فيها نتيجة عملية التخمر المتسلسل بـ *Aspergillus niger* + *S. cerevisiae*

أظهر استخدام بعض أوساط تفكيك المزارع الفطرية السابقة كأوساط لنمو الخميرة، بعد الانتهاء من عملية الحضن، زيادة في الكتلة الحيوية للخميرة الناتجة حيث بلغت0.53 غ/ 100مل عند استخدامها مع فطر *Trichoderma harzianum* على وسط بقايا القريدس بعد المعالجة، وبالتالي قدرتها على استكمال عملية النمو التي بدأتها الفطريات قبلها واستخدامها لنواتج الحلمهة في مزارع الفطريات كوسط نمو لها وسجلت أعلى نسبة بروتين في فطر الخميرة 30.77% في مزرعة *Trichoderma harzianum* و *S.cerevisiae* وكانت أقل مما لوحظت في دراسة التخمر المتسلسل بـ *T. reesei* والخميرة *S. cerevisiae* حيث ازدادت قيمة البروتين في تلك الدراسة من 9.55 % إلى 40.3 % (Haddadin *et al.*, 1999)

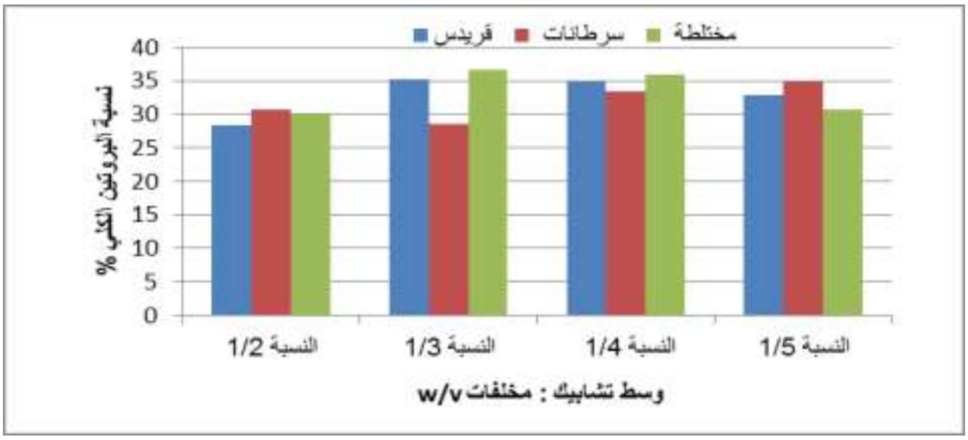
4- تأثير تراكيز مختلفة من بقايا الأحياء البحرية في وسط مغذي فطري جامد ونصف جامد

تتميز الزراعة الجامدة أن الركيزة رطبة وغير منحلة بالماء وغير معلقة في سائل، بينما تكون الزراعة نصف الجامدة منحلة أو مغمورة بالسائل، تشكل الركيزة مصدراً للكربون والنتروجين والأملاح، ولها القدرة على امتصاص الماء، وبالتالي تأمين الاحتياجات الحيوية من الماء الذي تحتاجه الأحياء الدقيقة أثناء نموها عليها. أهم ما يميز الزراعة الجامدة الإنتاجية العالية وبساطة متطلباتها وسهولة التطبيق، والتي تتميز بقدرة الأحياء الدقيقة على إنتاج طيف أنزيمي، واستقلابها لما تحويه المخلفات من مركبات، والنمو بغزارة عليها، وقدرتها على زيادة البروتين في الوسط الحاوي للمخلفات الذي تنمو عليه كركيزة أو مصدر كربوني ونتروجيني.

بينت النتائج أن أعلى نسب بروتين كلي بلغت 37.31% للفطر *Trichoderma harzianum* على مخلفات القريدس عند التركيز (1:3) كما هو موضح في الشكل (14) و36.64% للفطر *Aspergillus niger* على المخلفات المختلطة عند التركيز (1:3) كما هو موضح في (الشكل: 15).



الشكل (14): نسب البروتين الكلي في مزرعة الفطر *Trichoderma harzianum* الناتجة عن عملية التخمر الجامدة ونصف الجامدة باستخدام ركائز من مخلفات مختلفة



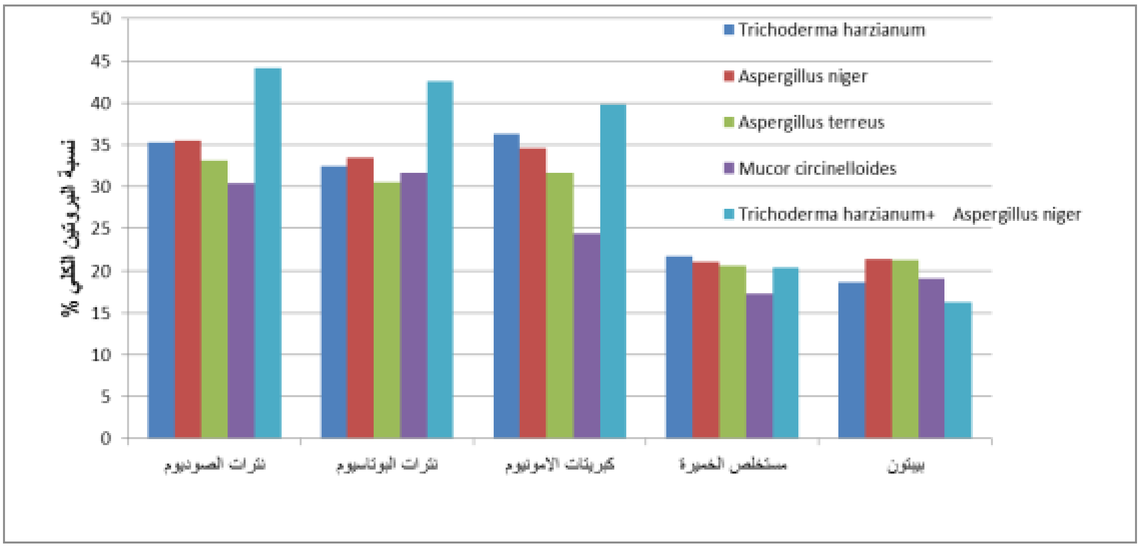
الشكل (15): نسب البروتين الكلي في مزرعة الفطر *Aspergillus niger* الناتجة عن عملية الجامدة ونصف الجامدة باستخدام ركائز من مخلفات مختلفة

تعد الرطوبة والأوكسجين عاملان هامان في الزراعة الفطرية، حيث تعزى الإنتاجية الكبيرة عند الزراعة على الأوساط الفطرية المغذية الجامدة مقارنة مع الأوساط الفطرية المغذية السائلة إلى النسبة العالية للأوكسجين، وهذا بدوره يؤدي إلى تحسين القيمة الغذائية للمخلفات، وزيادة قابلية استساغتها وهضمها، لتستخدم لاحقاً كعلف حيواني، كذلك تلعب الرطوبة دوراً كبيراً في نشاط الأحياء الدقيقة، حيث أن ارتفاع الرطوبة يمنع تزويد الأحياء الدقيقة بالأوكسجين ويفسح المجال أمام التلوث بأحياء دقيقة أخرى ذات نشاط غير فعال، في حين أن انخفاض الرطوبة يعيق نمو الأحياء الدقيقة، وبالتالي انخفاض نشاط إفرازها للأنزيمات، وضعف احتمال وصولها للمغذيات (Amar, 2001).

4-1- تأثير المصدر النتروجيني على انتاج البروتين:

تم استخدام مصادر مختلفة من النتروجين لمعرفة تأثير مصدر النتروجين على نسبة البروتين الناتجة لدى الفطريات المستنبتة، فقد أظهرت النتائج أن أعلى نسبة بروتين سجلت في مزرعة الفطر *Trichoderma harzianum* عند استخدام كبريتات الأمونيوم، في حين لوحظ أن المزرعة المختلطة ومزرعة الفطر *Aspergillus niger* ومزرعة الفطر *Aspergillus terreus* كان المصدر النتروجيني الأفضل نترات الصوديوم، بينما في مزرعة الفطر *Mucor circinelloides* كانت نترات البوتاسيوم، وكانت أقل نسبة بروتين عندما تم استخدم ماء الببتون

كمصدر للنتروجين في مزرعة *Trichoderma harzianum* والمزرعة المختلطة، بينما كان مستخلص الخميرة في مزارع الفطريات الأخرى (الشكل:16).



الشكل (16) تأثير اختلاف مصدر النتروجين في نسب البروتين الناتجة في أوساط الفطريات المدروسة

سجلت المزارع المختلطة بالفطرين *Trichoderma harzianum* و *Aspergillus niger* أعلى نسبة من البروتين بلغت قيمتها (44.15%). بالمقارنة مع المزارع المفردة أبدت المزارع المختلطة فعالية في تفكيك المركبات والاستهلاك الكبير لمصدر الكربون وإنتاجية عالية للبروتين وتكيف كبير مع الشروط المتغيرة للوسط ، إذ يمكن التغلب على شروط التغذية المحدودة عن طريق التكافل بين الأحياء في المزرعة المختلطة، وذلك عن طريق التكامل بين عمل الأنزيمات، إذ أن عمل إحداها يشكل ركيزة لعمل الأنزيم الآخر، وهناك ارتباط كبير بين فعالية الأنزيمات المفككة، ونسبة الكتلة الحيوية الناتجة ففي دراسة لمزرعة مختلطة بين فطري *A. niger* , *T. reesei* كانت نسبة الكتلة الحيوية الناتجة 21.2غ/ل كبيرة مقارنة مع نسبة الكتلة الحيوية الناتجة عن مزرعة مفردة بالفطريات حيث بلغت القيمة 11.2 غ/ل، وبزيادة بلغت 91%، يفسر ذلك أنه في المزرعة المفردة لا يستطيع الكائن الحي تفكيك كل الركيزة أو المخلف في حين يمكن أن تكون المنتجات الاستقلابية لأحد الأحياء ركيزة لعمل الكائن الآخر في المزرعة المختلطة (Tesfaw and Assefa, 2014).

في دراسات مماثلة لهذه الدراسة أيضاً، كانت معظم السلالات المعزولة فيها من البيئة البحرية قادرة على النمو على الوسط المحضر من بقايا قشور القريدس كمصدر مغذي وحيد، وسجلت أعلى نسبة من البروتين وبلغت (70.4%) في مزرعة الخميرة Candida M15 وكانت أعلى من نسبة البروتين المسجلة في هذه الدراسة، كما استخدم فطر خميرة *Pichia kudiavzevii* لتحويل الكيتين المستخرج من المخلفات البحرية إلى بروتين وحيد الخلية Ferrer (*et al.*, 1996). كما قام كل من Tom و Carroad (1981) بتطوير طريقة لإعادة تدوير المخلفات الكيتينية للقشريات إلى بروتين خمائري وحيد الخلية استخدم كغذاء في مزارع الحيوانات، حيث تمكن من تحويل مخلفات القشريات عبر الأنزيمات المحلمهة إلى بروتين وحيد الخلية باستخدام فطر خميرة *Pichia kudriavzenii*

إن البيئة البحرية غنية جداً بالمواد الكيتينية وتعد مصدراً جيداً للأحياء المتأقلمة مع المخلفات والمفككة لها، تمتاز هذه الأحياء الدقيقة بقدرتها على تمثيل عدة مصادر كربونية وإفراز طيف واسع من الأنزيمات المحللة إضافة لاحتوائها على نسب عالية من البروتين في وزنها الجاف.

الاستنتاجات والتوصيات

- تم عزل الفطريات (*Aspergillus niger*، *Aspergillus terreus*، *Trichoderma harzianum*، *Mucor circinelloides*) من الرمال الشاطئية.
- سجلت أعلى كتلة حيوية للفطريات المعزولة المستخدمة في الوسط الزرعي المغذي السائل بالتركيزين (0.5،1) غ/100مل من بقايا الأحياء البحرية.
- أظهرت المزارع المختلطة (*Trichoderma harzianum* و *Aspergillus niger*) أعلى نسبة في زيادة البروتين في الكتلة الحيوية المختمرة بلغت (44.14)%.
- سجلت أعلى نسبة من البروتين الكلي للفطر *Trichoderma harzianum* باستخدام الزراعة الجامدة على بقايا المخلفات بالتركيز(1:3) بلغت 37.31%.
- تساهم الزراعة المتسلسلة في زيادة انتاج الكتلة الحيوية للخميرة *Saccharomyces cerevisiae* بلغت 0.53 غ/100مل في وسط بقايا القريدس بعد المعالجة .
- تبين أن ركيزة بقايا قشور القريدس تعد الأفضل لإنتاج البروتين الحيوي.

لذلك من الضروري الاستفادة من بقايا الأحياء البحرية المتراكمة على الشاطئ أو الناتجة عن الصناعات الغذائية ووضعها في حيز الاستثمار .

المراجع

- AGGELOPOULOS,T.; KATSIERIS,K.; BEKATOROU,A. AND PANDEY,A. *Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production.* Food Chemistry, Vol.145, 2014, 710–716.
- AHAMED, A.AND VERMETTE,P. *Enhanced enzyme production from mixed cultures of Trichoderma reesei RUT-C30 and Aspergillus niger LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor* . Biochemical Engineering Journal. vol. 42, 2008, 41–46.
- AMAR,B. *fermentation of prawn shell waste and application of its product as dietary ingredient for the indian white prawn ,penaeus indicus (h. milne edw ards)* .Cochin University of Science and Technology. 2001.
- ANUPAMA AND RAVINDRA, P. *Studies on production of single cell protein by Aspergillus niger in solid state fermentation of rice bran*. Braz. Arc. Biol. Tec. Vol. 44, No. 1, 2001, 79-88.
- AOAC, 2005. *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.*
- BRZEZINSKA,M.;WALCZAK,M.;LALKEORCZYK,E.ANDDONDERSKI,W. *Utilization of Shrimp-Shell Waste as a Substrate for the Activity of Chitinases Produced by Microorganisms*. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 19, No. 1 ,2010, 177-182.

- DOMSCH,K.;GAMS, W.AND ANDERSON, T. H. *compendium of soil fungi (voll) Academic press* , London 1980,pp859.
- FELSE, P.A. AND PANDS,T. *Production Of Microbial Chitinases* **.**Arevisit Bioprocess Eng, Vol.23, 2000,127-134.
- FERRER,J.; PAEZ,A.G.; MARMOL, A. Z.; RAMONES, A. E.; GARCIA, A. H. AND FORSTER, C. F. *Acid Hydrolysis Of Shrimp-Shell Wastes And The production Of Single Cell Protein From The Hydrolysate*. Bioresource Technology .vol. 57 , 1996, 55-60.
- GOUR, S.; NUPUR, M.; ANURADHA,S. AND PRADEEP,B. *Single Cell Protein Production: A Review* . International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. vol. 4, No. 9, 2015, 251-262.
- HADDADIN, M.S.; ABDULRAHIM, S.M.; AL-KHAWALDEH,G.Y. AND ROBINSON,R.K. *Solid-state fermentation of waste-pomace from olive processing* .Chem.Technol. Biotechnol. Vol.74, No.7 ,1999, 613-618.
- KAM,S.; KENARI,A. AND YOUNESI,H. *Production of Single Cell Protein in Stickwater by Lactobacillus acidophilus and Aspergillus niger*. Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol.21, 2012,403–417.
- KRISHNAVENI, B. AND RAGUNATHAN, R. *Chitinase production from marine wastes by Aspergillus terreus and its application in degradation studies*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. vol.3, No.1, 2014, 76-82.
- PAL,J.; VERMA,H.; MUNKA,V.; ;MAURYA,S.; ROY, D.; KUMAR,J. *Biological Method of Chitin Extraction from Shrimp Waste an Eco-friendly low Cost Technology and its Advanced Application*. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. vol. 1, No. 6, 2014, 104-107.
- SEPTINOVA, D.; KURTINI,T. AND TANTALO,S. *Evaluation the Usage of Treated Shrimp Waste as Protein Source in Broiler Diet.* Animal Production 12 vol. 1, 2012, 1-5.
- SHARAF, M.; EL-SARRANY,A. AND EL-DEEB,M. *Biorecycling of shrimp shell by Trichoderma viride for production of antifungal chitinase*. African Journal of Microbiology Research. Vol. 6 No.21, 2012,4538-4545.
- SIBTAIN, A.; MUSTAFA,G.; ARSHAD,M. AND RAJOKA,M. *Fungal Biomass Protein Production from Trichoderma harzianum Using Rice Polishing*. BioMed Research International . Vol.1, 2017, 1-9.
- SURAINI, A.; TEOHLAY,S.; NOORJAHAN,A. ;NEELAM,S. AND TEOH LAY,S. *Microbial Degradation of chitin Materrials by Trichoderma virens UKM1*. Journal of biological Sciences.Vol. 8, No.1,2008, 52-59.
- TEOH LAY SIN,S. *degradation of shrimp waste using chitinase produced by trichoderma virensUKM1 through media selection* . Submitted to the School of Graduate Studies, Universiti Putra Malaysia, in Fulfilment of the Requirements for the Degree of Master.2008.
- TESFAW,A. AND ASSEFA,F. *co-culture: Agreat promising method in single cell protein production* . Biotechnology and molecular Biology reviews . vol. 9, No. 2, 2014,12-20
- TOM,S. AND CARROAD.A . *Effect of Reaction Conditions on Hydrolysis of Chitin by Serratia marcescens QMB 1466 chitinase*. Feed Sci. Technol. vol. 37, 1981, 59.
- UPADHYAYA,S.;TIWARI,S.AND ARORA, N.K. SINGH D.P. *Microbial Protein: A Valuable Component for Future Food Security*. Microbes and Environmental Management. vol. 10, 2016, 260-278.

- VYAS,P. AND DESHPANDE,M. *Enzymatic Hydrolysis Of Chitin By Myrothecium Verbucaria Chitinase Complex And Its Utilization To Produce Scp* . J. Gen. Appl. Microbiol. Vol. 37, 1991, 267-275.
- WATANABE,L. *pictoril atals of soil and seed fungi :morphologies of cultured fungi and key to species 2nd* . CRCPress LLC, New york ,&London 2002 ,506.
- YALEMTESFA,B. ; ALEMU,T. AND SANTHANAM ,A. *Solid substrate fermentation and conversion of orange waste in to fungal biomass using Aspergillus niger KA- 06 and Chaetomium Spp KC-06* **,** African Journal of Microbiology Research. Vol. 4, No.12 , 2010, 1275-1281**.**