إنتاج بروتين الخلية الواحدة من فضلات البرتقال بواسطة المزارع المفردة والمختلطة

رعد حساني سلطان شمال يونس عبدالهادي ولاء حمدون شكر
قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/3/16 تاريخ القبول 2005/9/18

ABSTRACT

Five different fungal isolates were cultivated in a medium containing orange waste as a sole carbon source. Among fungal isolates, *Aspergillus niger* was superior in protein production (35.94 %) based on dry weight after 8 days of incubation. Effect of different concentrations of orange waste powder also were studied. Maximum fungus growth and protein production occurred at 4 %. Out of 3 yeasts, *Candida utilis* gave higher protein yields (33.05 %) after 5 days of incubation. In an attempt to increase production of protein, a mixed culture of *A. niger* and *C. utilis* was done. Inoculation of *C. utilis* after 4 days of inoculation of *A. niger* resulted in increasing production of protein to 42.17 %.

الخلاصة

تمت زراعة 5 عزلات فطرية مختلفة في وسط غذائي حاوي لمسحوق فضلات البرتقال بوصفه مصدرا وحيدا للكاربون. كان الفطر *Aspergillus niger* هو الأفضل من بين الانواع الفطرية التي اختبرت اذ بلغت كمية البروتين 35.94 % على أساس الوزن الجاف بعد 8 ايام من التحضين. كما درس تاثير التراكيز المختلفة من مسحوق فضلات البرتقال وقد تحقق في التركيز 4 % افضل نمو للفطر وأعلى إنتاج للبروتين. أعطت خميرة *Candida utilis* من بين ثلاث خمائر مختلفة أعلى كمية من البروتين بلغت 33.05 % بعد خمسة أيام من التحضين. وفي محاولة لزيادة إنتاج البروتين تم عمل مزارع مختلطة من الفطر *A. niger* والخميرة *C. utilis* وتبين أن تلقيح الوسط بخميرة *C. utilis* بعد أربعة أيام من زراعة الفطر أدى الى زيادة إنتاج البروتين الى 42.17 %.

المقدمة

تشير الإحصائيات الى ان نصف سكان العالم يعانون حاليا من مشكلة نقص الغذاء والتي تعد من اخطر المشكلات وان توفر احتياجات البشر من البروتين الحيواني بالكمية التي تتناسب مع التزايد الضخم في عدد السكان يعد أملا بعيد المنال (1 , 2 , 3 , 4 , 5). لذا اتجهت مجموعة من دول العالم في السنوات الأخيرة الى إنتاج بروتين الخلية الواحدة Single Cell Protein (SCP) أي بروتين الخلية الواحدة ذات المنشأ الجرثومي مثل الفطريات و الطحالب و البكتريا والخمائر (6 , 7). ان معدلات النمو المثالية لهذه الأحياء الدقيقة وقدرتها على التحويل الكفء للمواد الاساس وانتاج البروتين من هذه المواد الاساس الرخيصة الثمن جعلت الباحثين ينظرون الى عملية الانتاج هذه بأهمية بالغة (8).

اجريت دراسات عديدة بشان انتاج بروتين الخلية الواحدة بواسطة الأحياء المجهرية من مصادر كاربونية مختلفة (9 , 10 , 11 , 12 , 13). ولقد أعطي اهتمام خاص لاستخدام المزارع المختلطة في انتاج بروتين الخلية الواحدة التي لها فوائد في التحلل البايولوجي الكفء وانتاج البروتين من المواد الاساس اللكنوسيليلوزية (14). واستخدم باحثون عديدون اشكالا مختلفة من المزارع المختلطة لزيادة إنتاج البروتين (15 , 16 , 17 , 18 , 19).

ويتم في المملكة العربية السعودية التخلص من كميات كبيرة من فضلات البرتقال وهو المنتوج العرضي من استخلاص عصير البرتقال وذلك برميه في الصحراء مما يمكن ان يتسبب في عدد من مشكلات التلوث البيئي، كما يتم في قطرنا كذلك رمي فضلات البرتقال بعد استخلاص العصير منه مما يؤدي الى فقدان مواد كثيرة تدخل في تركيبه مثل السليلوز والسكريات. وبما ان اقتصاديات انتاج بروتين الخلية الواحدة تعتمد بالدرجة الأساس على الوسط الغذائي الذي يستخدم لتنمية الاحياء المجهرية، فان هذا العمل يعد محاولة للاستفادة من فضلات البرتقال بوصفها وسطا غذائيا أساسا لانتاج بروتين الخلية الواحدة.

مواد وطرائق العمل

1. الكائنات المستخدمة :

استخدمت في هذه الدراسة عزلات فطرية متعددة تعود الى اربعة اجناس هي: *Penicillium* spp. , *Fusarium solani, A. fumigatus, Aspergillus niger* والتي

تم عزلها من عينات مختلفة من التربة في مدينة الموصل. اما عزلة الفطر *Aureobasidium pullulans* فقد تم عزلها من اوراق نبات المشمش. اما عزلات الخمائر *Candida utilis* و*Candida lipolytica* فقد تم عزلها من البنجر السكري، في حين ان خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تم الحصول عليها من الشركة العامة للسكر والخميرة في الموصل.

2. تشخيص الفطريات :

تم تشخيص عزلات الفطريات بالاستعانة بطريقة Slide culture technique التي وصفها (20) وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر الاتية (21 , 22 , 23) ماعدا عزلة الفطر *A. pullulans* فقد شخصت مجهريا وتم التاكد من شكل الفطر الذي يتميز بتعدد الاشكال (Polymorphism).

3. تشخيص الخمائر :

تم تشخيص الخمائر *C. utilis* , *C. lipolytica* حسب طريقة (24).

4. اختبار سمية عزلة الفطر *F. solani* :

تم اختبار خلو هذه العزلة من أي تاثير سمي باستخدام طريقة (25) وذلك باستخدام كائنات ابتدائية مهدبة وحيدة الخلية هي *Tetrahymena pyriformis*.

5. ظروف حفظ العزلات :

حفظت عزلات الفطر وكذلك الخمائر بتنميتها على وسط اكار البطاطا والسكروز والاكار (PSA) بشكل مائل داخل انابيب اختبار (Slants) في الثلاجة بدرجة 4 سيليزية وتم تنشيط العزلات باعادة زراعتها كل اسبوعين.

6. الاوساط الزرعية :

6-1 وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار :

استخدم هذا الوسط لعزل الفطريات والخمائر وتشخيصها وحفظها. وقد حضر هذا الوسط من 200 غم من البطاطا و 20 غم من الكلوكوز و 20 غم من الاكار ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر.

6-2 الوسط القياسي :

استخدم هذا الوسط لتحضير لقاح الخميرة ويتكون هذا الوسط على النحو الاتي (غم/لتر): كلوكوز، 20; بيبتون، 5; مستخلص الخميرة، 2; فوسفات الكالسيوم ثنائية الهيدروجين، 2;

فوسفات الامونيوم الحامضية، 2 وكبريتات المغنسيوم المائية، 1. ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5 (17).

3-6 وسط مسحوق فضلات البرتقال :

تم جمع فضلات البرتقال من المطاعم التي تقوم باستخلاص عصير البرتقال، و فضلات البرتقال هي عبارة عن خليط من بقايا البرتقال التي تضم القشر واللب بعد اجراء العصر او الاستخلاص. تم تجفيف فضلات البرتقال عند 40 سيليزية باستخدام الفرن الكهربائي ثم طحنها باستخدام طاحونة من نوع

Wiley Mill, Model 4 Arthur II. Thomas Company, Philadelphia, P.A.,USA.

في قسم الثروة الحيوانية/ كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل. ثم تمرير المسحوق من خلال منخل قطر فتحاته 1 مل. تم حفظ المسحوق داخل عبوات محكمة الغلق تحت ظروف جافة. واستخدم مسحوق فضلات البرتقال بوصفه وسطا غذائيا، ولتحضير لتر واحد من هذا الوسط تمت اضافة مايأتي (غم/لتر) : $(NH_4)_2SO_4$, 20; KH_2PO_4, 2; $MgSO_4.7H_2O$, 0.3; $CaCl_2.6H_2O$, 0.3; $FeSO_4.5H_2O$, 0.01 و Orange Waste, 20. تم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.0 (15).

7. تحضير المعلق السبوري ولقاح الخميرة :

حضر المعلق السبوري من مستعمرة فطرية نقية بعمر اسبوع وتحت ظروف معقمة فقد اضيف الماء المقطر الى المزرعة الفطرية النامية في طبق بتري حاوي لوسط (PSA) ثم قشطت المزرعة الفطرية باستخدام قضيب زجاجي معقوف، رشح المعلق الناتج من خلال قطعة شاش. ثم اجري التخفيف المطلوب للوصول الى تركيز المعلق السبوري (5 x 10^5سبور/مل) بالاستعانة بشريحة العد Haemocytometer (26). اما لقاح الخميرة فقد حضر بنقل جزء من خلايا الخميرة النامية على وسط (PSA) الى دورق مخروطي سعة 250 مل من الوسط القياسي المعقم ووضع الدورق في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 28±2 سيليزية وسرعة هز 200 دورة/دقيقة مدة ثلاثة ايام.

8. الظروف الزرعية :

بعد تحضير الاوساط الزرعية تم توزيع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمقدار 50 مل لكل دورق وبمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة. سدت الدوارق باحكام بسدادات قطنية وعقمت بجهاز المعقام عند ضغط 1 كغم/سم^2 ودرجة حرارة 121 سيليزية مدة 20

دقيقة. تركت الدوارق بعد التعقيم لتبرد ثم لقح الوسط بلقاح الفطر المراد اختباره وبمعدل 2 % او 2 % (1 مل من المعلق السبوي +1 مل من لقاح الخميرة) من كل من الفطر والخميرة المستخدمة في التجربة. وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند 28±2 سيليزية وسرعة هز 200 دورة/دقيقة.

9. طرائق التحليل :

9-1 التركيب الكيميائي لمكونات مسحوق فضلات البرتقال :

9-1-1 تقدير نسبة السليلوز والهيميسيليلوز واللكنين :

قدرت نسبة السليلوز والهيميسليلوز واللكنين في مسحوق فضلات البرتقال حسب طريقة (27) باستخدام جهاز تقدير الالياف الخام Crude fiber apparatus.

9-1-2 تقدير المحتوى النايتروجيني :

تم تقدير المحتوى النايتروجيني بطريقة مايكروكلدال كما اوردها (27).

9-1-3 تقدير المحتوى البروتيني :

تم تقدير المحتوى البروتيني وذلك بضرب المحتوى النايتروجيني بالعامل 6.25.

9-1-4 تقدير المحتوى السكري (الكاربوهيدراتي) لمسحوق فضلات البرتقال :

تم اخذ 10 غم من المسحوق واضيف اليه لتر من الماء المقطر، حرك جيدا بواسطة المحرك المغناطيسي. اجري بعد ذلك التخفيف المناسب وتم تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي بحسب طريقة (28).

9-1-5 تقدير المحتوى الرطوبي :

تم وزن 10 غم من مسحوق فضلات البرتقال في طبق بتري جاف ونظيف ومعلوم الوزن ثم جفف عند درجة حرارة 80 سيليزية مدة 96 ساعة. ثم قدرت النسبة المئوية للمحتوى المائي بعد التجفيف (29).

9-1-6 تقدير نسبة الرماد :

تم اخذ وزن معلوم من مسحوق فضلات البرتقال وحرقها في فرن كهربائي عند درجة حرارة 600 سيليزية مدة 6 ساعات تم بعد ذلك تقدير النسبة المئوية للرماد (29).

9-2 تقدير الوزن الجاف :

بعد انتهاء مدة التحضين المطلوبة سحبت الدوارق على نحوعشوائي من الحاضنة وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق ثم اجريت عملية ترشيح للمزرعة الفطرية

باستخدام اوراق ترشيح جافة وموزعة مسبقا (او باجراء عملية الطرد المركزي لسائل المزرعة بمعدل 6000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة وجمعت خلايا الخميرة في اطباق صغيرة موزونة مسبقا) ثم وضع الغزل الفطري المعزول مع ورق الترشيح(خلايا الخميرة) في فرن كهربائي بدرجة 70 سيليزية مدة 24 ساعة. ثم بعد ذلك تم قياس الوزن الجاف.

3-9 تقدير السكر المتبقي :

قدرت كمية السكريات المتبقية حسب طريقة (28).

4-9 تقدير البروتين :

قدر المحتوى البروتيني اعتمادا على طريقة (30)، واستخدمت تراكيز مختلفة من Bovine-albumine لتحضير منحنى قياسي وحسبت النسبة المئوية على الوزن الجاف.

النتائج والمناقشة

1. التركيب الكيميائي لمسحوق فضلات البرتقال :

يبين الجدول (1) النسب المئوية لمكونات مسحوق فضلات البرتقال، اذ تشكل الالياف الخام التي هي عبارة عن السليلوز والهيميسليلوز 58.82 % منها، في حين بلغت نسبة اللكنين 15.17 %. اما البروتين الخام الذي حسب على اساس المحتوى النايتروجيني للمسحوق مضروبا بالعامل 6.25 فقد كانت نسبته قليلة وبلغت 2.60 % وكذلك الحال فيما يتعلق بكمية السكريات الكلية الذائبة اذ بلغت 3.72 %. اما الرطوبة فقد كانت مرتفعة إذ بلغت 9.66 % على العكس من ذلك كانت نسبة الرماد قليلة إذ بلغت 3.18 %. يلاحظ من الجدول ان نسبة السليلوز والهيميسليلوز كانت عالية في مسحوق فضلات البرتقال ويعزى ذلك الى ان مادة السليلوز تشكل اكبر مادة في تركيب الخلية النباتية.

ان هذه النتائج تتطابق مع ما توصل اليه (18 , 3) عند استخدامهم لفضلات قشور البرتقال وسطا غذائيا لانتاج SCP وذلك لمحتواها العالي من السليلوز والهيميسليلوز وانخفاض نسبة الكنين فيها. كما ان التركيب الكيميائي لمسحوق فضلات البرتقال مشابه الى درجة كبيرة للتركيب الكيميائي لعدد من المخلفات النباتية السليلوزية مثل قش الرز ومخلفات سيقان القطن ورؤوس الذرة وقرنات البازليا ونبات الكلغان (32 , 33 , 34).

الجدول (1) النسب المئوية للتركيب الكيميائي لمكونات مسحوق فضلات البرتقال

المكونات	النسبة المئوية %
Holocellulose	58.82
Lignin	15.17
Crude protein	2.60
Ash	3.18
Moisture	9.66
Total soluble sugars	3.72

2. تاثير مدد التحضين في نمو الفطريات المختلفة على وسط مسحوق فضلات البرتقال وانتاج بروتين الخلية الواحدة :

يظهر من ملاحظتنا لنتائج الجدول (2) تباين واضح بين هذه الفطريات في معدلات نموها وانتاجها لبروتين الخلية الواحدة ولمدد التحضين المختلفة. فقد ظهر واضحا الاختلاف في مقدار الوزن الجاف (الكتلة الحيوية للفطر + بقايا السليلوز) لكل فطر باختلاف مدد التحضين. وتم الحصول على اعلى كمية من الوزن الجاف (15.12 غم/لتر) للفطر *A. niger* عند مدة التحضين 8 ايام في حين بلغ اعلى وزن جاف (10.32 و 7.33 غم/لتر) للفطرين *A. fumigatus* و *Penicillium* spp. على التوالي ولمدة التحضين نفسها. في حين تحقق اعلى وزن جاف (13.76 غم/لتر) للفطر *F. solani* عند مدة التحضين 10 ايام. اما الفطر *A. pullulans* فقد حقق اعلى وزن جاف عند مدة التحضين 6 ايام وبلغت (10.15 غم/لتر). تشير النتائج هذه الى ان افضل مدة لنمو الفطريات تقع بين (6-10) ايام. اما ما يتعلق بانتاج الفطريات المستخدمة لبروتين الخلية الواحدة فمن الواضح ان هناك اختلافات فيما بينها في قدرتها على انتاج البروتين اذ تم الحصول على اعلى كمية من الفطر *A. niger* وبلغت 35.94 % من الوزن الجاف يليه الفطر *F. solani* الذي اعطى كمية بروتين مقدارها 30.95 %. اما اقل هذه الفطريات انتاجا للبروتين فكان الفطر *Penicillium* spp. وبلغت 20.61 % وكذلك أعطى الفطر *A. pullulans* كمية بروتين بلغت 21.34 %. اما ما يتعلق بكمية السكر المتبقي فقد لوحظ ان هناك انخفاضا في كمية السكر المتبقي للفطريات كافة كما ان كمية السكر المتبقي تنخفض بمرور مدة التحضين نتيجة لاستهلاك الفطريات للسكر وكان اقصى استهلاك للسكر عند الفطريات التي اعطت اعلى كمية من البروتين. اما فيما يخص الرقم الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي فقد لوحظ ان هناك انخفاضا فيه عن الرقم

الهيدروجيني الاولي للفطريات جميعا ولمختلف مدد التحضين. ويعزى الانخفاض في الرقم الهيدروجيني النهائي خلال مدد التحضين الى انتاج عدد من الحوامض العضوية في اثناء مدة التخمير. ونجد من خلال النتائج ان لمدة التحضين تاثيرا كبيرا في نمو الفطريات وانتاجها للبروتين ويعزى ذلك الى ان الفطريات في بداية مدة التحضين تحتاج الى مدة للتاقلم على الوسط الغذائي ولهذا يستمر نمو الفطر تصاعديا في بداية مدة التحضين من حيث توفر المصدر الكاربوني والنايتروجين وبقية المغذيات التي تحتاج اليها الخلية وعند وصول النمو الى اقصاه يكون الفطر قد استهلك اغلب مكونات الوسط الغذائي وحصل تراكم لنواتج الفعاليات الايضية مما يؤدي الى انخفاض النمو وانتاج البروتين. اما التباين بين الفطريات في النمو وانتاج البروتين فيعزى الى الاختلاف في قدرة هذه الفطريات على استغلال الوسط الغذائي ومدى ملاءمة الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي لهذه الفطريات مما يؤثر في انتاجها للبروتين. ان هذه النتائج مطابقة لما ذكره (35 , 36).

3. تاثير تراكيز مختلفة من مسحوق فضلات البرتقال على النمو وانتاج بروتين الخلية الواحدة لعزلة الفطر *A. niger* بعد 8 ايام من التحضين :

تمت في هذه التجربة زراعة عزلة الفطر *A. niger* في الوسط المحضر لمسحوق فضلات البرتقال باستخدام تراكيز مختلفة هي (2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 %) مدة 8 ايام من التحضين. ويتضح من نتائج الجدول (3) ان الزيادة في نمو الفطر لم تكن كبيرة عند استخدام التراكيز المختلفة اذ تم الحصول على كمية من الوزن الجاف مقدارها (15.58 غم/لتر) باستخدام اقل تركيز مستخدم في التجربة 2 % في حين كانت كمية الوزن الجاف (14.51 غم/لتر) عند التركيز الاعلى 8 %. اما اقصى كمية للوزن الجاف فبلغت (19.32 غم/لتر) عند استخدام التركيز 4 %. اما انتاج البروتين فقد كانت كمية البروتين عموما تزداد زيادة قليلة وعلى نحو تدريجي بزيادة تركيز مسحوق فضلات البرتقال الى حد التركيز 4 % الذي اعطى اقصى كمية للبروتين وبلغت 38.87 % وانخفضت كمية البروتين عند التركيز الاعلى المستخدم في التجربة 8 % الى 29.40 %. اما كمية السكريات المتبقية في الوسط فقد كانت انعكاسا واضحا لنمو الفطر وانتاجه للبروتين وللتراكيز المستخدمة جميعا وانخفض الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي في التراكيز القليلة المستخدمة ثم عاد إلى الارتفاع وعلى نحو طفيف بزيادة تركيز مسحوق فضلات البرتقال عن 5 %.

الجدول (2) تأثير مدد التحضين المختلفة في نمو وانتاج البروتين لعزلات الفطريات المستخدمة

الفطريات	مدة التحضين (يوم)	pH النهائي	الوزن الجاف (غم/لتر)	% البروتين بوصفه وزنا جافا	كمية البروتين (غم/لتر)	السكر المتبقي (غم/لتر)
A. niger	2	(0.12) 4.75	(0.01) 08.66	(0.02) 17.00	01.47	(0.09) 03.65
	4	(0.00) 4.67	(0.14) 09.38	(0.03) 26.32	02.46	(0.03) 03.24
	6	(0.02) 4.50	(0.05) 11.63	(0.08) 32.11	03.73	(0.00) 02.84
	8	(0.06) 4.35	(0.03) 15.12	(0.01) 35.94	05.43	(0.14) 01.00
	10	(0.13) 4.21	(0.17) 14.05	(0.01) 28.72	04.03	(0.04) 01.43
A. fumigatus	2	(0.12) 5.12	(0.03) 05.36	(0.15) 14.69	00.78	(0.22) 04.52
	4	(0.01) 4.93	(0.01) 06.18	(0.04) 18.25	01.12	(0.09) 03.64
	6	(0.12) 4.75	(0.02) 08.94	(0.22) 23.50	02.10	(0.02) 03.59
	8	(0.07) 4.26	(0.01) 10.32	(0.01) 23.85	02.46	(0.12) 02.54
	10	(0.01) 4.05	(0.13) 10.28	(0.09) 22.01	02.26	(0.07) 02.18
F. solani	2	(0.05) 4.80	(0.02) 07.84	(0.07) 15.39	01.20	(0.01) 04.81
	4	(0.11) 4.72	(0.00) 09.21	(0.02) 17.06	01.57	(0.06) 03.49
	6	(0.28) 4.60	(0.12) 10.45	(0.15) 21.72	02.26	(0.02) 03.42
	8	(0.18) 4.62	(0.22) 11.74	(0.01) 27.11	03.18	(0.21) 02.10
	10	(0.11) 4.22	(0.12) 13.76	(0.18) 30.95	04.25	(0.00) 02.63
Penicillium spp.	2	(0.05) 5.60	(0.18) 03.94	(0.03) 09.48	00.37	(0.12) 06.44
	4	(0.13) 5.76	(0.10) 05.12	(0.11) 11.92	00.61	(0.07) 04.57
	6	(0.02) 5.12	(0.26) 05.78	(0.17) 15.80	00.91	(0.21) 03.76
	8	(0.24) 4.75	(0.15) 07.33	(0.20) 20.61	01.51	(0.07) 02.29
	10	(0.03) 4.53	(0.09) 04.85	(0.05) 12.37	00.60	0.07) 02.02
Aureobasidium pullulans	2	(0.00) 4.76	(0.11) 03.64	(0.04) 13.53	00.50	(0.07) 06.86
	4	(0.06) 4.50	(0.18) 04.57	(0.32) 15.29	00.70	(0.02) 06.64
	6	(0.10) 4.51	(0.12) 10.15	(0.07) 21.34	01.45	(0.01) 04.47
	8	(0.03) 4.40	(0.08) 08.41	(0.04) 21.23	02.20	(0.01) 05.96
	10	(0.01) 4.38	(0.10) 08.27	(0.13) 19.34	01.99	(0.12) 05.90

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري(.S.D) .

ان هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (31) اذ ذكر ان افضل نمو واقصى انتاج لل SCP للفطر *Sporotrichum thermophile* كان بتركيز 4 % لفضلات البرتقال ولمدة تحضين 10 ايام. كما توصل (18) الى ان افضل نمو للفطر *A. niger* كان عند التركيز 4 % لفضلات البرتقال ولمدة تحضين 8 ايام، كذلك اعطى هذا التركيز لمسحوق نبات الكلغان اعلى نمو للفطر *F. solani*. ان هذه النتائج تؤكد ان الفطريات عموما تحتاج الى تركيز كاربوهيدراتي يتراوح بين (2-6 %) (37). في حين اكد (38) ان الكتلة الحيوية تبدا بالانخفاض في التراكيز العالية من المادة الاساس عند تنمية خميرة *C. utilis* على وسط زرعي من الحوامض العضوية وهذا يؤدي الى ان التراكيز العالية لاية مادة غذائية في وسط النمو تسبب تاثيرا في ايض الخلية مسببة تاثيرات ازموزية غير ملائمة يمكن ان تسبب حدوث ضغط ازموزي عال، كما ان ارتفاع تركيز المادة الاساس يؤدي الى زيادة تركيز المعادن الثقيلة الموجودة عادة في المخلفات النباتية مسببة تاثيرا ساما للفطر (7 , 39).

الجدول (3) تاثير تراكيز مختلفة من مسحوق فضلات البرتقال في النمو وانتاج البروتين لعزلة الفطر *A. niger* بعد 8 ايام من التحضين

تركيز مسحوق البرتقال %	pH النهائي	الوزن الجاف (غم/لتر)	% البروتين بوصفه وزنا جافا	كمية البروتين (غم/لتر)	السكر المتبقي (غم/لتر)
2	(0.03) 4.73	(0.17) 15.58	(0.02) 36.13	5.62	(0.15) 4.26
3	(0.11) 4.20	(0.15) 16.22	(0.10) 37.67	6.11	(0.21) 3.83
4	(0.28) 4.11	(0.10) 19.32	(0.18) 38.87	7.50	(0.02) 1.58
5	(0.10) 4.10	(0.02) 18.80	(0.21) 37.46	7.04	(0.14) 4.78
6	(0.10) 5.20	(0.00) 15.82	(0.00) 32.47	5.13	(0.14) 5.02
7	(0.06) 5.48	(0.05) 14.32	(0.06) 30.73	4.40	(0.11) 8.66
8	(0.02) 5.61	(0.13) 14.51	(0.71) 29.40	4.26	(0.06) 8.94

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري (.S.D) .

4. المقارنة بين عزلات الخمائر المختلفة :

اظهرت نتائج مقارنة انتاج بروتين الخلية الواحدة من عزلات الخمائر المختلفة بعد تنميتها على وسط مسحوق فضلات البرتقال خلال مدد التحضين المختلفة (الجدول 4) ان هناك فروقات قليلة في معدل نمو عزلات الخمائر المختلفة، ولوحظ حدوث زيادة تدريجية في مقدار الوزن الجاف بزيادة مدة التحضين، وكانت خميرة *C. utilis* الاكفأ من بين الخمائر المستخدمة في قدرتها على النمو على وسط مسحوق فضلات البرتقال وتحقق اعلى وزن جاف (8.47 غم/لتر) في اليوم الخامس من التحضين، في حين بلغ اعلى وزن جاف (7.42 و 7.01 غم/لتر) لخميرة *C. lipolytica* وخميرة *S. cerevisiae* في اليوم السادس من التحضين وعلى التوالي. اما فيما يتعلق بانتاج الخمائر المستخدمة لبروتين الخلية الواحدة فنلاحظ ان هناك تباينا كبيرا فيما بينها في قدرتها على انتاج البروتين اذ تم الحصول على اقصى انتاج للبروتين لعزلة الخميرة *C. utilis* وبلغت كمية البروتين 33.05 % على اساس الوزن الجاف وكان ذلك عند مدة التحضين 5 ايام تليها عزلة الخميرة *C. lipolytica* من حيث كمية البروتين وبلغت 30.79 % في الوزن الجاف عند مدة التحضين 6 ايام. كانت خميرة *S. cerevisae* اقل الخمائر انتاجا للبروتين (19.37 %). اما كمية السكر المتبقي في الوسط فقد كانت هناك عموما كمية لابأس بها من السكر في بداية مدة التحضين الا انها قلت عند حدوث اقصى نمو للخميرة وتحقيق اعلى انتاج للبروتين. اما فيما يخص الرقم الهيدروجيني النهائي فقد حدث فيه انخفاض عن الرقم الهيدروجيني الاولي ولمختلف مدد التحضين و يعزى هذا الى ان الخمائر عند نموها تنتج عددا من النواتج العرضية نتيجة لعمليات الايض المختلفة. ان هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه (18) عند استخدامه وسط مسحوق فضلات البرتقال لتنمية عزلات مختلفة من الخمائر.

الجدول (4) تاثير مدد التحضين المختلفة في نمو عـزلات الخمـائر المختلفـة وانتاجهـا للبروتين

الخمائر	مدة التحضين (يوم)	pH النهائي	الوزن الجاف (غم/لتر)	% البروتين بوصفه وزنا جافا	كمية البروتين (غم/لتر)	السكر المتبقي (غم/لتر)
C. utilis	2	(0.04) 4.60	(0.23) 4.77	(0.14) 22.26	1.06	(0.01) 4.22
	3	(0.02) 4.51	(0.17) 6.51	(0.05) 25.10	1.63	(0.08) 3.78
	4	(0.22) 4.00	(0.00) 7.35	(0.12) 28.73	2.11	(0.06) 3.70
	5	(0.07) 3.92	(0.02) 8.47	(0.07) 33.05	2.80	(0.02) 0.12
	6	(0.01) 3.55	(0.02) 6.59	(0.14) 25.80	1.70	(0.11) 1.10
C. lipolytica	2	(0.09) 4.88	(0.14) 3.80	(0.02) 20.61	0.78	(0.04) 3.12
	3	(0.04) 4.75	(0.03) 5.26	(0.16) 22.83	1.20	(0.01) 2.74
	4	(0.01) 4.50	(0.04) 6.39	(0.09) 24.75	1.58	(0.23) 2.52
	5	(0.12) 4.27	(0.13) 6.81	(0.21) 26.11	1.80	(0.04) 2.16
	6	(0.01) 4.12	(0.07) 7.42	(0.00) 30.79	2.28	(0.12) 2.06
S. cerevisiae	2	(0.21) 4.92	(0.14) 4.40	(0.16) 15.65	0.68	(0.05) 3.87
	3	(0.01) 4.67	(0.21) 5.79	(0.24) 17.42	1.00	(0.12) 3.63
	4	(0.04) 4.53	(0.12) 6.26	(0.31) 18.33	1.14	(0.08) 2.51
	5	(0.04) 4.10	(0.06) 6.47	(0.15) 18.95	1.22	(0.04) 2.37
	6	(0.12) 3.75	(0.05) 7.01	(0.12) 19.37	1.35	(0.01) 2.15

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري (.S.D) .

5. المزارع المختلطة للفطر *A. niger* وخميرة *C. utilis* :

تمت زراعة الفطر *A. niger* وخميرة *C. utilis* معا في وسـط مسـحوق فضـلات البرتقال في وقت واحد او فـي مـدد تحضـين مختلفـة اذ زرعـت الخميـرة *C. utilis* بعد 2 او 4 او 6 ايام من زراعة الفطر *A. niger* لملاحظة التاثير المتبادل بين كـل مـن الفطر والخميرة في انتاج البروتين. اظهرت نتـائج مقارنـة المـزارع المختلطـة للفطـر *A. niger* وخميرة *C. utilis* الاكثر انتاجا للبروتين خلال مدد التلقيح المختلفة ولمدة تحضين 8 ايام (الجدول 5). ان انتاج الوزن الجاف للمزارع المختلطة افضل من انتاج الوزن الجاف

للمزارع المفردة اذ تبين ان هناك زيادة في كمية الوزن الجاف في المزارع المختلطة عما هو في المزارع المفردة، كما اظهرت نتائج المقارنة اختلافا في كمية الوزن الجاف على اساس توقيت البدء في المزارع المختلطة اذ تم الحصول على اقصى انتاجية للوزن الجاف عند زراعة خميرة *C. utilis* بعد اربعة ايام من زراعة الفطر *A. niger* فقد بلغت كمية الوزن الجاف 15.68 غم/لتر ثم انخفضت لتصل الى 9.72 غم/لتر وذلك عند زراعة الخميرة بعد 6 ايام من زراعة الفطر. وبلغت كمية الوزن الجاف 11.89 غم/لتر عند زراعة الخميرة والفطر معا في وقت واحد على وسط مسحوق فضلات البرتقال. اما فيما يخص كمية البروتين فقد اتجهت نحو الزيادة وخاصة عند زراعة الخميرة بعد اربعة ايام من زراعة الفطر اذ تم الحصول على اقصى كمية للبروتين 42.17 % على اساس الوزن الجاف. اما بالنسبة لكمية السكر المتبقي في المزارع المختلطة فقد كانت انعكاسا للزيادة في الوزن الجاف وانتاج البروتين ففي الوقت الذي كان فيه النمو عاليا وانتاج البروتين في اقصاه كان هناك استهلاك كبير للسكر اذ نلاحظ انه لم يتبق سوى كمية قليلة جدا من السكر في المعاملات التي فيها زراعة الخميرة *C. utilis* بعد يومين من زراعة الفطر *A. niger*. اما الرقم الهيدروجيني النهائي فقد انخفض عن الرقم الهيدروجيني الاولي.

يتضح من نتائج هذه التجربة التاثير المتبادل بين الفطر والخميرة في المزارع المختلطة اذ كانت هناك منفعة متبادلة بينهما ذلك ان الفطر *A. niger* يقوم بانتاج انزيم السليوليز المسؤول عن تكسير السليلوز الى وحدات الكلوكوز الذي تقوم الخميرة بدورها باستغلاله لانتاج بروتين الخلية الواحدة. وهذا ما اكده كل من (40 , 41) اللذين أشارا إلى أن السليلوز عند تحلله يعطي السكريات البسيطة التي تشكل مصدرا كاربونيا لعدد كبير من الاحياء المجهرية المستعملة لانتاج SCP.

الجدول (5) المزارع المختلطة للفطر *A. niger* وخميرة *C. utilis* خلال مدة تحضين 8 ايام

عمر المزرعة المختلطة (يوم)	pH النهائي	الوزن الجاف (غم/لتر)	% البروتين بوصفه وزنا جافا	كمية البروتين (غم/لتر)	السكر المتبقي (غم/لتر)
0	(0.02) 4.01	(0.14) 11.89	(0.07) 37.46	4.45	(0.20) 2.16
2	(0.20) 3.25	(0.01) 13.03	(0.01) 38.66	5.03	(0.06) 0.95
4	(0.07) 3.75	(0.13) 15.68	(0.11) 42.17	6.61	(0.03) 1.23
6	(0.02) 4.27	(0.24) 09.72	(0.15) 31.32	3.04	(0.01) 1.25

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري (S.D.) .

المصادر

1. Hamissa F. A., El-Diwany A.I., Shaker H.M. and Al-Refai A. H. Improvement of the nutritional value of suger-cane bagasse by simple solid state fermentation. Microbies. Letters. The Faculty Press, Cambridge, 26: 129-133(1984).
2. El-Refai A. H., Ghanem K. M. and El-Sabaeny A. H., Single cell protein production from orange waste by *Sporotrichum thermophile* cultivated under optimal conditions. The Faculty Press, Cambridge, England. 63: 7-16(1990).
3. Khan M. Y., Dahot M. U. A., Khan M. Y., J. Islamic Academy of Sciences. 5: 39-43(1992).
4. Mulvihilli D. M. and Grufferty M. B., J. Food Protein and Lipds. 77: 93(1997).

5. التكريتي، نجلاء طارق حسن. رسالة ماجستير/كلية العلوم جامعة الموصل/ العراق(2001).

6. Litchfield H., J. Encyclo. Microbiol. Vol. 44, PP : 11-22(1992).

7. Ben-Hassan R. M. and Ghaly A.E., J. American Society of Agricultural Engineers. Vol. 38, PP: 1121-1127(1995).

8. El-Shawarby S. H., El-Zznzty E. A., El-Refai A.H.,Hamissa F.A. and Shaker H., Biological Wastes, 20: 273-200(1987).

9. Ivarson K. C. and Mortia H., J. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 43, PP: 643-647(1982).

10. Gokhale D. V., Patil S. G. and Bastawde K. B., Appl. Biochem. Biotechnol., 30: 99-109(1991).

11. Kuzmanova S., Vandeska E. and Dimitrovski A., J. Industrial Microbiol., 7:257-262(1991)..

12. Martin A. M., Goddard and Benister P., J. Food Agric., Vol. 61, PP: 363-370(1993).

13. El-Sayed S. M., Ghanem K. M. and Hassan A., Bull. Fac. Sci. Alex. Univ., 35: 293-302(1995).

14. De La Torre M., Conservation and Recycling. 5: 41-46(1982).

15. Ghanem K. M., Qatar Univ. Sci. J., 12: 85-88(1992).

16. Castillo M. R., Correa M. G., Linden J. C. and Tengerdy R. P. Biotech. Letters. 16: 967-72(1994).

17. المشهداني، يونس علي يونس. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل/ العراق (1995).

18. Al-Fassi F. A., Kabli S. A., Al-Garni S. M. and Ghanem K. M., Bull. of Pure and Appl. Scci. 15:85-98(1996).

19. متي، منهل صبيح عبدالله. رسالة ماجستير. جامعة الموصل/ العراق(2001)..

20. Booth C., Methods in Microbiology. Commonwealth, Surrey, England(1971).

21. Barnett H. L. and Hunter B. B. Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess Publishing Company. Minnesota(1972).

22. Streets R. B., The diagnosis of plant diseases. The University of Arizona Press(1975).

23. Pitt J. I. and Hocking A. D., Fungi and Food Spoilage. Academic Press, London(1985).

24. Lodder J. and Kreger-Van Rij N. J. W., The yeast, a taxonomic study. Interscience, New York(1952).

25. Hunter S. H., Baker H., Frank O. and Cox P., In: " Biology of Tetrahymena ". Ed. By Elliot A. M. Dowden. Huntchinson and Ross. Stroudsburg, Pennslvania(1973).

26. William S. M., Wold and Isamu Suzuki., Can. J. Microbiol, 22: 1083-1092(1976).

27. Van Soest P. J., Ana. Chem. J. 46: 829(1963).

28. Dubois M.,Gilles K. A., Hamilton J. K., Robers P. A. and Smith F., J. Anal. Chem. 28: 350-356(1956).

29. Anon E., Association of official analytical. Chemist, " Official Method of Analysis " 13 th ed., Washington, D. C. USA(1980).

30. Legatt-Bailey J., Techniques in protein chemistry. 2 nd ed., Elsevier Publishing Company. PP: 304-346(1967).

31. Ghanem K. M., El-Refai A. H. and El-Sabaeny A. H., Bull. Fac. Sci. Alex. Univ. 27: 277-293(1987).

32. Han Y. W. and Anderson A. W., J. Appl. Microbiol. Vol. 30. PP: 930-934(1975).

33. El-Refai A. H., Atella M. M. and El-Safty H. A., Agricultural wastes. 11: 105-113(1984).

34. الجبوري، شمال يونس عبد الهادي. رسالة ماجستير. جامعة الموصل/ العراق(1997)..

35. دنحا، رياض فرنسيس والخزرجي، طالب عويد. تغذية وعلم وظائف الفطريات. مطابع التعليم العالي في الموصل/ العراق(1995).

36. Ghanem K. M., El-Refai A. H. and El-Ghazaerly M. A., World J. of Microbiol. Biotechnol., 7: 365-371(1991).

37. الطائي، ورقاء سعيد قاسم. اطروحة ماجستير/ جامعة الموصل/ العراق(2000).

38. Maugeri-Filho F. and Goma G., Rev. Microbiol., Sao Paulo, 19: 446-452(1988).

39. El-Refai A. H., Ghanem K. M. and El-Gazaerly M. A., Chem. Microbiol. Technol. Lebensm, 9: 105-112(1985).

40. El-Nawawy A. S., El-Rayyes E., Daher R. and Tawheed A., Riyadh, Saudi Arabia, Nov. 12-15(1984).

41. Zayed G and Meyer O., Appl. Microbiol. Biotechnol., 45: 551-555(1996).