إنتاج البروتين أحادي الخلية (SCP) بالتخمر الصلب لمخلفات نباتية مختلفة مع فطر *Trichoderma viride* واستخدامه في تغذية الهامستر *Mesocricetus auratus*

أحمد شهاب أحمد لافي

قسم علوم الحياة– كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الأنبار

الخلاصة

يهدف هذا البحث إلى إنتاج البروتين أحادي الخلية باستعمال أوساط غذائية محضرة من مخلفات نباتية مختلفة كوسط غذائي وهي (نبات الحمض *Schanginia aegyptiaca* ، نبات الشمبلان *Ceratophyllum demersum*، سعف النخيل Data-palm leaves ، كوالح الذرة corn cobsوتبن الحنطة Wheat Straw)، اتبعت طريقة تخمرات الحالة الصلبة، وباستخدام فطر *Trichoderma viride*.

تم الحصول على عدة عزلات من الترب الزراعية المأخوذة من منطقة الجزيرة في مدينة الرمادي كفوءة في إنتاج الكتلة الحيوية لفطر *Trichoderma viride*، انتخبت منها أكفأ عزلة لغرض استخدامهما في إنتاج البروتين أحادي الخلية وكانت أهم النتائج التي تم الحصول عليها ما يلي:

1. أفضل وسط غذائي تكون من مستخلص نبات الحمض مع مسحوق سعف النخيل.
2. حصل على أفضل نمو لعزلة الفطر *T. viride* وكان معدل قطر النمو هو 11.4 سم عند pH=6 ودرجة حرارة 35م˚ وسعف نخيل بتركيز 3% كمصدر كاربوني وبتركيز لقاح 3% وبعد 6 أيام حضن.
3. تميزت المخلفات النباتية المستعملة ضمن أوساط تنمية عزلة الفطر بمحتواها الجيد من النتروجين والسكر والفسفور والبروتين الكلي.
4. أظهرت النتائج لبعض صفات ومكونات البروتين الميكروبي المنتج إن محتواه من البروتين الخام و الكربوهيدرات والحامضين النووين RNA وDNA كانت (24.69%، 31.95 %، 3.86%) على التوالي.

في حين أحتوى البروتين المنتج من العزلة 16حامضاً امينياً وبلغت كمية الأحماض الأمينية 82.5 غم/100غم بروتين، وتميزت بالمحتوى العالي من الحامض الاميني Aspartic إذ بلغ 16.13 غم. كما أظهرت الفحوصات خلو المنتج من السموم التي يمكن أن تنتجها الفطريات.

أظهرت التجربة الحيوية باستعمال البروتين أحادي الخلية المنتج مايكروبياً بالتخمرات الصلبة ضمن عليقة تغذية حيوانات الهامستر حصول زيادة معنوية في أوزان الحيوانات وعند كافة نسب الاستبدال، إذ كان أعلى وزن للحيوانات بعد 7 أسابيع من التجربة وبنسبة استبدال 100% وبلغ معدل الوزن النهائي 86.41 غم.

Produce the single cell protein (SCP) by the solid cultures methods from the different plant extracts wastes with *Trichoderma viride* and using in feed of Hamster *Mesocricetus auratus*

A. Sh. A. Lafi
Dep. of Biology- College of Education for Pure Sciences\ University of Anbar

Abstract

The Aim of this study to produce Single Cell Protein (SCP) by the use of the different plant extracts as nutrient media (*Schanginia aegyptiaca*, *Ceratophyllum demersum*, Data-palm leaves, corn cobs, Wheat Straw), the fermentation of the followed by solid Fermentation.

Efficient isolates were obtained to produce biomass of the fungi, *Trichoderma viride*, the best efficient isolate were selected for the use in producing single cell protein and the results showed the following:

1. The best nutrient medium was obtained from *Schanginia aegyptiaca* and Data-palm leaf powder extract.
2. The best growth diameter was obtained from isolate on the solid media and was 11.4cm under pH= 6 and 30˚C with the data-palm leaf extract at a concentration of 2.5% as a carbon source and fungal percent of 3% after six days of incubation.
3. The used extract in growth media for the fungal isolate were characterized by good content in their nitrogen, sugar, phosphorus and total protein.
4. Results showed that the produced microbial protein components were 24.69% as crude protein; and 31.95% of carbohydrates and 3.86% of RNA and DNA.

The produced protein from isolate contained 16 amino acids and their quantity was 82.5gm/100gm protein. Tests indicted that the produced protein were free of fungal toxins. The bioexperiment of using single cell protein produced microbially by fermentation of the solid media within the hamster (*Mesocricetus auratus*) diet showed a significant increase in their weights in all diet substitution. The highest average weights were 86.41gm for the isolate at 100% substitution after seven weeks.

المقدمة

ينتج البروتين أحادي الخلية Single Cell Protein (SCP) من قبل الأحياء المجهرية ضمن مواد الأيض الأولية ويعد شكلاً خاصاً من إنتاج الكتلة الحيوية (1). وينتج هذا البروتين باستخدام أحياء مجهرية عديدة منها الخمائر والفطريات الأخرى والطحالب والبكتريا بوساطة التخمرات سواء كانت الصلبة أم السائلة كما أنه من الممكن إنتاجه باستعمال المزارع النقية أو المختلطة ويستخدم في تغذية الحيوانات المختلفة بل أن قسم منه يمكن أن يستخدم كغذاء حتى للإنسان، كما أصبح البروتين أحادي الخلية في السنوات الأخيرة من مصادر الغذاء المهمة في مجموعة كبيرة من البلدان (2). وذكر (3) أن مصطلح البروتين أحادي الخلية أستعمل لأول مرة من قبل البروفيسور Carol Wilson وبدء الإنتاج لأول مرة أبان الحرب العالمية الثانية في ألمانيا. ويمكن أنتاج هذا النوع من البروتينات بكلف اقتصادية قليلة باستخدام النفط الخام، وان يحل بنسب مختلفة ضمن العلائق المعدة لتغذية الحيوان بديلاً عن العلائق التقليدية وأهمهافول الصويا، ولكن هذا الإنتاج يمكن أن يتأثر سلبياً بارتفاع أسعار النفط الخام، كما لُ أنتاج الكتلة الحيوية و استخلاص البروتين الخام منها مهم لسببين أولهما كون هذا البروتين مصدر مهم لتغذية الحيوانات والإنسان والسبب الثاني كون عملية الإنتاج هذه تستعمل فيها كميات كبيرة ومتنوعة من

المخلفات الزراعية والصناعية كمواد أساس في عملية الإنتاج وهذا يعني تخليص البيئة من تراكم كميات كبيرة من هذه المخلفات واستعمالها في الحصول على منتجات ذات فائدة اقتصادية (4).

وبين (5) إلى أن من ايجابيات إنتاج البروتين أحادي الخلية هي سهولة استخلاص البروتين من الكتلة الحيوية للأحياء المجهرية المنتجة له، ولكن ما يعاب على هذه البروتينات هي احتوائها على مستويات عالية من الأحماض النووية، وبالنسبة لارتفاع محتوى البروتين أحادي الخلية من الأحماض النووية وخاصة RNA أكده أيضاً (3) وأشار إلى أن الضرر الناتج من ارتفاع نسبة الأحماض النووية ينعكس على ارتفاع نسبة حامض اليوريك في بلازما الدم وبالتالي يسبب مشاكل وأمراض للكلى خاصة في الإنسان.

تتميز الفطريات من بين الأحياء المجهرية بتميز الكثير من أجناسها وأنواعها في إنتاج البروتين أحادي الخلية، وأشارت العديد من البحوث والدراسات إلى ذلك، إذ أشار (6) إلى أمكانية إنتاج البروتين أحادي الخلية بواسطة فطر *Trichoderma viride* وباستعمال مخلفات الليمون.

أما (7) فقد أنتج البروتين أحادي الخلية بتخمر مخلفات الذرة بوساطة فطر *Trichoderma viride* واستعمل البروتين المنتج في تغذية الحيوانات وبنجاح كما استخدم فطر *Trichoderma* من قبل (8) في إنتاج الكتلة الحيوية وحصل على أعلى إنتاج بإضافة 5 مللتر/لتر لقاح وبمدة حضن 91 ساعة وجمعت الكتلة الحيوية بترشيح المزرعة عبر دورق ترشيح.

أما (9) فقد أنتج الكتلة الحيوية لفطر *Trichoderma harzianum* باستعمال المخلفات الزراعية عند درجة حرارة 25م° ومدة حضن 15 يوم، أما (10) فقد استعمل المزارع المغمورة في إنتاج الكتلة الحيوية لفطر *T. viride* وتخمير المخلفات الزراعية مثل كوالح الذرة وحصل على أفضل إنتاج عند إضافة 45غم/ لتر من المخلفات الزراعية وعند درجة حرارة 30م° ورقم هيدروجيني 6 ومدة حضن 5أيام وا ٍضافة 1 مللتر لقاح بكثافة 10^3 علماً إن إضافة تراكيز عالية من اللقاح سببت زيادة في إنتاج البروتين وكان المصدر النتروجيني المضاف هو كبريتات الأمونيوم وعزلت الكتلة الحيوية باستعمال ورق الترشيح ثم غسلت وجففت عند درجة حرارة 60 م° وكانت الكتلة الحيوية المنتجة حوالي 13.6 غم / لتر.

أما من ناحية الأوساط المستعملة في إنتاج البروتين أحادي الخلية فقد أشارت العديد من البحوث والدراسات إلى الإمكانية الكبيرة في استعمال المخلفات الزراعية والصناعية في إنتاج بروتين واطئ الكلفة، إذ أشار (5) إلى أمكانية إنتاج البروتين مايكروبياً باستعمال تراكيز مختلفة من الشرش، علماً إن الشرش يعتبر من مخلفات صناعة الألبان وهو يعتبر ملوث كبير للبيئة وخاصة عند رميه في المياه وبالتالي بالإمكان استعماله لإنتاج بروتين واطئ الكلفة.

كما أشار (3) إلى أنه حصل على محتوى عالي من البروتين عندما أستعمل مخلفات الذرة وفول الصويا، كما أستعمل (11) مخلفات نبات الموز في إنتاج البروتين أحادي الخلية.

ومن ناحية القيمة الغذائية للبروتين المنتج ومحتواه فقد أشارت معظم الدراسات إلى إن البروتينات أحادية الخلية المنتجة مايكروبياً تحتوي جميع الأحماض الأمينية الأساسية ألا أن محتواها يكون في بعض الأحيان منخفضاً من الأحماض الأمينية الكبريتية (12).

كما أشار (13) إلى وجود أمكانية واسعة في استخدام الفطريات في إنتاج البروتينات أحادية الخلية لكون هذه الفطريات تستطيع أن تنمو على أوساط رخيصة ومتوافر ة في البيئة واستخدم فطري *Aspergillus* و *Trichoderma* في إنتاج هذه البروتينات من مخلفات الحشائش وتراوحت كمية البروتين الخام بين 200–233 غم/كغم وكان البروتين المنتج ذو محتوى عالي من الأحماض الأمينية وكذلك محتواه العالي من فيتامين B، في

حين وجد (14) أن البروتين أحادي الخلية المنتج باستخدام فطر *Arachniotus* sp. بتنميته على المولاس كان محتواه من البروتين الخام بين 25–26% و5% أحماض نووية، وهذا ما أكده (3) الذي أكد بصورة واضحة إن البروتينات أحادية الخلية المنتجة من قبل الفطريات كان محتواها من معظم الأحماض الأمينية الأساسية عالياً قياساً بالبروتينات المنتجة من قبل كائنات حية أخرى حيوانية أو نباتية وكان واضحاً المحتوى العالي من اللايسين والمثيونين والسستين والثريونين والارجنين.

وأوضح (15) إن البروتين المنتج باستعمال المزارع المختلطة من فطر *T. viride* والخميرة وبتخمير تبن الشعير أحتوى على نسبة جيدة من الأحماض الأمينية الأساسية.

ومن جانب أخر وباعتبار إن البروتين أحادي الخلية يعتبر من الأغذية غير التقليدية وللإمكانية التي أوضحناها سابقاً في إنتاجه بكلف واطئة فقد أجريت العديد من الدراسات والبحوث على استعماله في تغذية الحيوانات وأدخل في تركيبة العديد من العلائق المستعملة في تغذية الحيوانات، هذا على الرغم من ظهور بعض المشاكل التي ترافق هذه الاستعمالات، فقد ذكر (16)أن ذكور الجرذان وا إناثها المغذاة على البروتين أحادي الخلية بنسب استبدال 10، 20، 30%من الغذاء الطبيعي الكلي نمت بصور ة طبيعية ولم تؤد هذه التغذية إلى حدوث نمو غير طبيعي في معدلات التغذية أو الصفات الدموية المقدرة للجرذان.

كما استعمل (17) البروتين المنتج عن طريق التخمير بالمزارع الصلبة في تحضير علائق لتغذية الجرذان Albino rats وبنسبة استبدال 50% و100% وغذيت الجرذان لمدة أسبوعين وحصل على نتائج معنوية في الزيادة الوزنية للجرذان المغذاة على الغذاء المحضر من استبدال 50% من البروتين المنتج.

واستعمل (3) البروتين أحادي الخلية المنتج مايكروبياً ضمن عليقة لتغذية الخنازير وبنسب استبدال 12، 18، 20%من العليقة الأساسية المكونة من الذر ة وفول الصويا وأظهرت نسبة الاستبدال 20%تفوقاً واضحاً في زيادة وزن الخنازير بعد 25 يوماً من التغذية.

إن إنتاج البروتين أحادي الخلية مايكروبياً يجعل الأحياء المجهرية ومكوناتها جزءاً من الغذاء أو الغذاء بأكمله ولكون عملية استعمال البروتين في تغذية الإنسان ليس لها تاريخ قديم، لذلك فإن هذه المنتجات تبقى بعيدة عن الاستعمال كغذاء للإنسان بشكل مباشر ويركز حالياً على استعماله كعلف حيواني لأن التقييدات المفروضة على الحيوانات تكون أقل كما إن التحسس الذوقي للحيوان غير مهم لذلك روج لاستعمال فضلات متعددة ومتنوعة في إنتاج البروتين الميكروبي (18).

وفي مجال آخر أنتج (19) البروتين أحادي الخلية بتنمية فطر *Aspergillus niger* على المخلفات السائلة الناتجة من تصنيع حامض الكلوتاميك، واستعمل البروتين الميكروبي المنتج كمصدر بروتيني بتغذية أفراخ الدجاج لمدة 6 أسابيع بإضافته للعليقة بمعدلات 0.0 و47 و95 و142 و189 غم بروتين أحادي الخلية/كغم علف، مع إضافة معاملات من بروتين فول الصويا والذرة بمعاملات 0.0 و35.5 و71 و106.5 و142 غم/كغم علف، وأظهرت النتائج وجود زيادة في وزن الأفراخ في المراحل الأولى من التغذية وبفروق معنوية مقارنة بمعاملات السيطرة كذلك أظهرت النتائج إن القياسات من الهيموكلوبين وأعداد كريات الدم الحمر ونشاط الأنزيمات الدموية في حالات طبيعية عدا وجود انخفاض غير معنوي عند زيادة الكميات المستعملة من البروتين الميكروبي وفي المراحل الأخيرة من التغذية، ووجد الباحث أن الزيادة الوزنية في إنتاج اللحم من الأفراخ ترتبط طرديا مع زيادة كمية البروتين الميكروبي وفق المعادلة التالية:

$$(Y=2.88+0.0137X) \quad (R^2=0.88;\ P<0.05).$$

Y = إنتاج اللحم من الأفراخ X = كمية البروتين الميكروب R^2 = معامل التحديد (مربع قيمة الأرتباط)

المواد وطرائق العمل

- **عزل الفطريات:** تم الحصول على مجموعة عزلات من فطر *Trichoderma viride* كفوءة في إنتاج البروتين أحادي الخلية من الترب الزراعية المأخوذة من منطقة الجزيرة في مدينة الرمادي ومن ثم شخصت حسب الطريقة المشار إليها في (20)، إذ تم الحصول على 8 عزلات انتخبت العزلة الأكفأ منها لغرض استخدامها في هذا البحث.
- **المخلفات النباتية:** استعملت كوالح الذرة، سعف النخيل، تبن الحنطة ونبات الشمبلان كمخلفات نباتية متوفرة في البيئة بل وتعتبر من الملوثات البيئية في تنمية الفطريات وا ٍنتاج البروتين أحادي الخلية كمصدر كربوني ومصدر للطاقة، إذ جمعت كوالح الذرة، سعف النخيل وتبن الحنطة من المناطق الزراعية، في حين جمع نبات الشمبلان من مياه نهر الفرات في مدينة الرمادي، نظفت هذه المخلفات وجففت هوائياً ثم قطعت إلى قطع صغيرة وجففت في فرن كهربائي عند 70م° لمدة 48 ساعة ثم تم طحنها ونخلها في منخل سعة ثقوبه 2 مليمتر، وقدرت فيه كل من (النتروجين، السكر، الفسفور، الرماد والبروتين الكلي) وحسب ما مذكور في (21) كما استعمل مسحوق نبات الحمض المجهز وفق الطريقة السابقة لتهيئة المخلفات النباتية واستعمل لتدعيم الأوساط المستعملة في تنمية الفطريات وا ٍنتاج البروتين أحادي الخلية.
- **وسط الإنتاج:** أضيفت الأملاح والأيونات المعدنية التالية إلى وسط النمو والإنتاج وفي جميع مراحل الدراسة لغرض تدعيم هذه الأوساط وتوفير الظروف الجيدة لنمو العزلات والحصول على الإنتاج الأفضل $(NH_4)_2SO_4$ (2.0g/L)، KH_2PO_4 (1.0g/L)، $MgSO_4.7H_2O$ (0.5g/L) و$ZnSO_4.7H_2O$ (0.1g/l).
- **قابلية العزلة على إنتاج البروتين أحادي الخلية:** لغرض التعرف على قابلية العزلة المنتخبة على إنتاج البروتين الميكروبي وتحويل المخلفات النباتية إلى كتلة حيوية وبالتالي إنتاج البروتين الميكروبي حضر مستخلص مسحوق نبات الحمض مع مستخلصات كل من المخلفات النباتية المستعملة إذ وزن 20 غم من المسحوق المجفف لكل من نبات الحمض وبقية المخلفات النباتية ثم نقع كل منها في 200 مللتر ماء مقطر مع التسخين على درجة حرارة 80 م° لمدة ساعتين ثم أجريت عملية عصر وترشيح باستعمال قطعة قماش بيضاء اللون وأكمل الراشح لكل منها إلى 1 لتر بالماء المقطر وأضيف لكل منها 15 غم أكار وأذيبت مكونات الوسط جيداً وعقم باستعمال الموصدة وصبت في أطباق بتري بقطر 15سم ولقحت الأطباق بنقل 1 مللتر من اللقاح السبوري في مركز الطبق للعزلة المنتخبة وبثلاث مكررات للمعاملة الواحدة وحضنت عند درجة حرارة 30 م° ولمدة 4 أيام، اعتمد معدل قطر نمو العزلة على الوسط لتحديد الإنتاج الأفضل وحسب نوع المصدر الكربوني المستعمل.
- **تحسين ظروف الإنتاج:** لغرض الحصول على أفضل نمو للعزلة الفطرية وبالتالي الحصول على أعلى كتلة حيوية تم تطبيق ظروف الإنتاج التالية:

1. الرقم الهيدروجيني للوسط: 4، 5، 6، 7، 8، 9.
2. درجة حرارة الحضن (م°): 20، 25، 30، 35، 40.
3. تركيز المصدر الكربوني: استعملت التراكيز التالية للمصدر الكربوني الذي تم اختياره على ضوء الفقرات السابقة 1%، 1.5%، 2%، 2.5%، 3%.
4. حجم اللقاح: 1%، 2%، 3%، 4%.
5. مدة الحضن (يوم): 3، 4، 5، 6، 7.

- **تحضير وسط الإنتاج:** على ضوء النتائج المتحصل عليها في الفقرة السابقة اعتمدت أفضل الظروف الملائمة لنمو الكتلة الحيوية وا ٍنتاج البروتين أحادي الخلية لغرض تطبيقها عند إنتاج البروتين في الأوساط السائلة.

حضر الوسط السائل باستعمال مسحوق المخلفات التي أعطت أفضل إنتاج بالنسبة لنوع المصدر الكربوني وبنسبة 1:1 مع مسحوق نبات الحمض مع إضافة الايونات والأملاح المذكورة سابقاً إلى وسط الإنتاج.

وزع الوسط السائل بواقع 200 مللتر في دوارق حجمها سعة 500 مللتر وعقمت الأوساط بالموصدة ولقحت بلقاح العزلة المنتخبة، حضنت عند درجة الحرارة الملائمة ولمدة الحضن المنتخبة وبعدها تم الحصول على الكتلة الحيوية عن طريق ترسيبها باستعمال جهاز طرد مركزي بسرعة 6000 دورة/ دقيقة ولمدة 45 دقيقة ثم غسلت الكتلة الحيوية بالماء المقطر المعقم وجففت عند درجة حرارة 70 م˚ لمدة 24 ساعة، ومن ثم حضرت كميات من البروتين أحادي الخلية لغرض استعماله في التجارب الحيوية اللاحقة إذ جمعت الكتلة الحيوية التي تم ترسيبها وتجفيفها وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م˚ لحين الاستعمال وذلك حسب (22).

- **تحديد صفات وخواص البروتين المنتج:** استعملت الطريقة المذكورة في (23) لغرض الكشف عن قابلية أي من العزلتين على إنتاج السموم وذلك بالمقارنة مع العزلات المنتجة للسموم.

شخص محتوى البروتين أحادي الخلية المنتج من الأحماض الأمينية وبطريقة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) وحسب الطريقة الموضحة في (21) ومن ثم قدرت كمية كل من هذه الأحماض الأمينية باستعمال جهاز مبرمج وهو محلل الأحماض الأمينية التلقائي Automatic Amino acid وحسب الطريقة المذكورة في (24). كذلك استخلصت الأحماض النووية DNA, RNA من البروتين المنتج بإتباع طريقة الترسيب بالملح المحورة المذكورة في (25). قدر محتوى البروتين المنتج من الدهون حسب الطريقة الموصوفة في (26)، وقيست قابلية الذوبان للبروتين المنتج حسب الطريقة الواردة في (27)، وقدرت كمية الرماد حسب الطريقة المذكورة في (26). قدر النتروجين الكلي للكتلة الجافة تبعاً للطريقة الواردة في (23) واحتسبت قيمة البروتين حسب المعادلة :

كمية البروتين = كمية النتروجين X 6.25

كذلك قدر السكريات بإتباع الطريقة الموصوفة في (28)، وقدر الفسفور الكلي حسب ما جاء في (29).

- **التجربة الحيوية:** أجريت التجربة الحيوية في مختبرات قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة الانبار و استخدمت حيوانات الهامستر *Mesocricetus auratus* والتي تم الحصول عليها من القطر السوري الشقيق في التجربة الحيوية إذ هيأت أقفاص لتربيتها بقياس 25× 25 × 40 سم فرشت أرضيتها بنشارة الخشب، انتخب 9 حيواناً بعمر 3 أسابيع بعد الفطام مباشرة ومتقاربة في الوزن وزعت بواقع 3 حيوانات في كل قفص وتم تغيير فرش نشارة الخشب كل 3 أيام.

حضرت العلائق العلفية المستعملة بعد طحن كل مادة على حدة بواسطة مطحنة، وخلطت المواد الأولية المكونة للعليقة بخلاط كهربائي، أجريت معاملات استبدال بروتين فول الصويا الموجود في العليقة بنسب 50، 100% بالبروتين أحادي الخلية المنتج من قبل العزلة المنتجة، وأصبح عدد العلائق المجهزة 3 علائق مع معاملة السيطرة وحفظت كل عليقة على حدة في كيس بلاستيكي وحفظت العلائق في المجمدة لحين استعمالها.

وضعت الحيوانات في أقفاص التربية وجهزت العلائق بعد تجويع الحيوانات ليوم واحد للتطبيع على التغذية بالعلائق، استمرت التجربة مدة 7 أسابيع، غذيت خلالها الفئران بنسبة 5% من وزنها وقدمت العليقة على 3 وجبات في اليوم عدا يوم الوزن من كل أسبوع فلم تقدم لها عليقة صباحية إلا بعد وزن الحيوانات (30).

أجريت التحاليل الإحصائية باستعمال برنامج Genestat 32. متعددة العوامل واستعمال قيم أقل الفروقات المعنوية للمقارنة بين المتوسطات وعند 5%.

النتائج والمناقشة

- **عزل وتشخيص الفطريات:** تم الحصول على 8 عزلات فطرية ذات كفاءة جيدة في إنتاج الكتلة الحيوية، انتخبت العزلة الأكفاء من بينها لغرض استعمالها في هذه الدراسة، وأظهرت الصفات الزرعية والمجهرية والتشخيصية الأخرى إنها تعود للفطر *Trichoderma* عزلت من الترب الزراعية وجميعها لها كفاءة جيدة في إنتاج الكتلة الحيوية وبالتالي البروتين أحادي الخلية، وأظهرت صفاتها التشخيصية إنها تعود للفطر *Trichoderma viride*، تم تشخيص الفطريات وفق ما جاء في المراجع الخاصة بتشخيص الفطريات ومنها (20).
- **ظروف النمو وا ٍنتاج البروتين أحادي الخلية:** يظهر جدول (1) بعض مكونات المخلفات النباتية المستعملة كأوساط لتنمية العزلات الفطرية، إذ شكلت هذه المكونات أوساطاً جيدة لنمو العزلات الفطرية وكان واضحاً النمو الجيد وا ٍنتاج الكتلة الحيوية على جميع هذه الأوساط، مما يعني إمكانية استعمال المخلفات النباتية والزراعية في تنمية العزلات الفطرية وا ٍنتاج البروتين أحادي الخلية وهذا يتفق مع ما ذكره كل من (6، 7، 8، 9، 11)، إذ بلغ أعلى قطر للنمو على هذه الأوساط 5.7 سم عند استعمال مسحوق سعف النخيل ولفطر *T. viride* جدول (2)، ويعود السبب في تفوق سعف النخيل إلى احتواءه على نسبة عالية من الكربوهيدرات والتي تعد مصدراً مهماً لبناء الكتلة الحيوية للفطر وتزويده بالطاقة اللازمة للنمو.

جدول (1) بعض مكونات الأوساط المستعملة

المكونات	مسحوق نبات الحمض	مسحوق كوالح الذرة	مسحوق نبات الشمبلان	مسحوق سعف النخيل	مسحوق تبن القمح Ws
نيتروجين (%)	1.58	1.12	2.43	1.86	2.47
السكر (%)	5.6	5.3	6.2	7.8	6.8
فسفور (غم/ كغم)	0.53	0.62	0.84	0.95	0.99
الرماد (%)	22.93	23.14	21.96	22.54	14.06
البروتين الكلي (%)	9.81	7.0	15.2	11.6	15.46

أظهرت التجارب الخاصة بتحسين ظروف النمو وا ٍنتاج الكتلة الحيوية والبروتين أحادي الخلية إن أفضل رقم هيدروجيني لنمو العزلة المنتخبة هو الرقم pH=6 إذ بلغ قطر النمو 5.8 سم لفطر *T. viride* جدول (2)، هذا يتفق مع ما ذكره (10) الذين وجدا أن أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج البروتين أحادي الخلية كان 6.5 و6 ويعود السبب في ذلك إلى إن معظم الفطريات تميل إلى النمو الأفضل عند الأرقام الهيدروجينية التي تميل للحموضة وبالتالي ستعطي كتلة حيوية أفضل.

في حين أشارت النتائج الخاصة بدرجات الحرارة المثلى لنمو العزلة المنتخبة إلى إن أفضل درجة حرارة لنموهما كانت 35م° إذ بلغ قطر النمو 6.5 سم للعزلة *T. viride* جدول (2)، وهذا يتفق مع ما وجده (10، 7، 6)، وتشير نتائج جدول (2) إلى إن أفضل تركيز للمصدر الكربوني (سعف النخيل) المستعمل كوسط لنمو العزلة هو3%، إذ بلغ قطر منطقة النمو 8.4 سم وهذا يتفق مع ما ذكره (15) الذي أشار إلى زيادة إنتاج البروتين أحادي الخلية من قبل فطر *Trichoderma* مع زيادة تركيز المصدر الكربوني والذي كان تبن الشعير في دراسته، إن

زيادة تركيز المصدر الكربوني يعني زيادة في تجهيز العناصر اللازمة لنمو الفطر وبناء الكتلة الحيوية وكذلك زيادة المصدر المجهز للطاقة اللازمة لنمو الفطر، كما تظهر النتائج في الجدول السابق إن أفضل حجم للقاح المستخدم في الدراسة كان 3% إذ بلغ معدل قطر منطقة النمو 10.2 سم لفطر *T. viride* ، ويلعب تركيز اللقاح وكثافته دوراً مهماً في نمو الفطر إذ إن انخفاض التركيز يعني انخفاض في النمو وبالتالي قلة في إنتاج الكتلة الحيوية للفطر، في حين أن الزيادة الكبيرة لتركيز اللقاح وكثافته تعني زيادة في التنافس ما بين خلايا الفطر على استهلاك المصدر الكربوني وبالتالي فإنه لا يعني زيادة مطلقة في النمو مع زيادة تركيز اللقاح.

وأخيراً أعطت مدة الحضن مؤشراً جيداً على زيادة نمو الفطريات*وا* إن أفضل مدة حضن لعزلة الفطر *T. viride* كانت 6 أيام وبلغ قطر منطقة النمو حوالي 11.4 سم جدول (2)، وهذه المدة تتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت في معظمها أن أفضل مدة لحضن الفطريات لأجل الحصول على أفضل نمو وأعلى إنتاج للكتلة الحيوية هي 5 أو 6 أيام (10، 7).

من خلال أفضل النتائج التي حصلنا عليها من تطبيق تحسين ظروف الإنتاج فقد اعتمدت أفضل ظروف الإنتاج من أجل تطبيقها في إنتاج البروتين أحادي الخلية لاستعماله في التجربة الحيوية جدول (2).

جدول (2) معدل أقطار النمو للعزلة *T. viride* على وفق ظروف النمو (سم)

pH					
pH	4	5	6	7	8
T. viride	3.7	4.7	5.8	5.3	4.6
درجة الحرارة م°					
درجة الحرارة م°	20	25	30	35	40
T. viride	4.17	5.5	5.8	6.5	6.2
نوع المصدر الكربوني					
نوع المصدر الكربوني	كوالح الذرة	شمبلان	سعف النخيل	تبن الحنطة	PDA*
T. viride	3.4	4.3	5.7	5.1	6.5
تركيز المصدر الكربوني					
تركيز المصدر الكربوني	%1	%1.5	%2	%2.5	%3	%3.5
T. viride	5.1	6.1	6.5	7.8	8.4	7.5
حجم اللقاح					
حجم اللقاح	%1	%2	%3	%4		
T. viride	8.6	9.3	10.2	10.1		
مدة الحضن					
مدة الحضن	3	4	5	6	7	
T. viride	9.6	10.2	10.7	11.4	11.4	
LSD>0.05, pH=0.934, Temp=0.268, CS=0.118, CC=0.0984, I=0.0512, Time=0.103						

*** علماً إن الوسط PDA استعمل لغرض المقارنة فقط.**

- **صفات ومكونات البروتين أحادي الخلية:** يوضح جدول (3)بعض صفات ومكونات البروتين المنتج من قبل عزلة الفطر *T. viride* وتشير النتائج إلى إن نسبة البروتين الخام المنتج بلغت 24.69%، وهذه النتيجة

تقترب مع ما وجده (7) في حين إن نسبة البروتين الخام المنتج كانت أقل مما وجده (15) وقد يعود السبب إلى اختلاف ظروف الإنتاج ونوعية الأوساط المستعملة وكذلك نوع العزلات الفطرية المستخدمة في الإنتاج.

ويلاحظ من نفس الجدول إن نسبة الكربوهيدرات ضمن البروتين الميكروبي المنتج كانت 31.95% سم لعزلة الفطر *T. viride*، في حين بلغت نسبة الدهون المستخلصة بالإيثر 1.60%، كذلك أظهرت النتائج الخاصة بمحتوى البروتين المنتج من الأحماض النووية إن نسبة الحامض النووي RNA كانت 2.59%، في حين بلغت نسبة الحامض النووي DNA 1.27%، وبلغ مجموع النسبتين 3.86% والملاحظ إن هذه النسب جيدة وضمن الحدود المسموح بها في إنتاج البروتينات أحادية الخلية وهي مؤشر جيد على إيجابية الصفات التي يحملها البروتين المنتج، كما إن هذه النسب أقل مما حصل عليه (12) الذي بلغت نسبة الأحماض النووية في البروتين المنتج من قبل الفطريات وبتخمرات الحالة الصلبة حوالي 7.2%.

أما نسبة الرماد فقد بلغت وكما موضح في الجدول (3) حوالي 21.88% لعزلة الفطر و*T. viride* وهي نسبة تبدو مرتفعة وقد يعود السبب إلى طبيعة الوسط المستعمل في إنتاج البروتين أحادي الخلية والمكون بنسبة كبيرة من مخلفات سعف النخيل.

جدول (3) بعض صفات ومكونات البروتين الميكروبي المنتج

الصفة أو المكون %	البروتين الميكروبي المنتج *T. viride*
البروتين الخام	**%** 24.69
الكاربوهيدرات	**%** 31.95
الدهو ن	**%** 1.60
RNA	**%** 2.59
DNA	**%** 1.27
RNA + DNA	**%** 3.86
الرماد	**%** 21.88
قابلية الإذابة	–

يبين جدول (4) الخاص باختبار فحص السمية للبروتين المنتج والتي أجريت بطريقة Thin Layer Chromatography (TLC) وباستخدام العزلة *Aspergillus flavus* للمقارنة باعتبارها عزلة مشخصة في إنتاج السموم وباستعمال الكاشف المظهر الخاص بكل نوع وتحت الأشعة فوق البنفسجية أظهرت هذه النتيجة خلو راشح إنتاج العزلة من السموم في ظروف التجربة المستعملة مما يؤكد جانب السلامة في استعمال هذه العزلة في إنتاج البروتين أحادي الخلية وبالتالي استعمال هذا البروتين في عمليات التغذية.

جدول (4) نتائج فحص إنتاج السموم من قبل عزلات الدراسة

رمز العزلة	كاشف 2,4, DNP	الأشعة فوق البنفسجية	
		254 nm	366 nm
T. viride	–	–	–
A. flavus	برتقالي	ازرق	ازرق

أما جدول (5) فيوضح تنوع الأحماض الأمينية في البروتين الميكروبي المنتج من قبل العزلة تحت الدراسة، إذ بلغ مجموع الأحماض الأمينية في البروتين المنتج من قبل فطر *T. viride* حوالي 82.5 غم/100 غم بروتين، ومن خلال ملاحظة نوعية الأحماض الأمينية الأساسية ومنها الحامض الأميني Aspartic الذي كان محتواه الأعلى في هذا البروتين والتي بلغت 15.78غم، كما أحتوى هذا البروتين على نسب جيدة من الأحماض الأمينية الأساسية وهذه النتائج تتفق مع ما وجده (3) الذي أكد على إن البروتين أحادي الخلية المنتج من قبل الفطريات يتميز بمحتواه العالي من الأحماض الأمينية الأساسية وغير الأساسية علماً بأن معظم الدراسات تؤكد على إن البروتين أحادي الخلية المنتج يختلف بخصائصه باختلاف الكائن المجهري المستعمل والمحتويات الغذائية التي يحتويها وسط الإنتاج وطريقة تنمية هذه الكائنات (3).

جدول (5) نوعية وكمية الأحماض الأمينية في البروتين أحادي الخلية المنتج من كل من العزلتين (غم/ 100غم)

Amino acid	*T. viride* SCP
Leucine	4.11
Tyrosine	6.38
Isoleucine	6.91
Valine	5.78
Methionine	6.12
Glutamine	2.42
Cystine	2.79
Glycine	6.58
Lycine	4.99
Threonine	6.11
Proline	6.85
Tryptophan	2.39
Alanine	1.56
Aspartic	16.13
Ornitine	1.76
Histidine	1.35
Total	% 82.5

- **التجربة الحيوية:** يبين جدول (6) بوضوح إن استعمال البروتين أحادي الخلية في تغذية حيوانات الهامستر ضمن عليقة وبنسب استبدال مختلفة مع فول الصويا والبروتين المنتج من قبل الفطر ***T. Viride*** أعطى زيادة معنوية واضحة في وزن حيوانات الهامستر ومع زيادة عمر الحيوان واستمرار تغذيته على هذا البروتين، إذ بلغ أعلى وزن للحيوانات بعد 7 أسابيع من التجربة وكان حوالي 86.41 غم باستعمال البروتين المنتج وبنسبة استبدال 100% بدلاً عن فول الصويا، وكما يبين جدول (7) نسب مكونات العلائق التجريبية المستعملة في التجربة (30).

هذه النتائج تشير بوضوح إلى الأهمية الكبيرة لهذا المنتج في تغذية الحيوانات، علماً أنه لم تظهر آية أعراض مرضية على الحيوانات هذه وتبين جميع النتائج في جدول (6) التفوق الواضح للبروتين الميكروبي على البروتين النباتي وقد يعود ذلك إلى زيادة كفاءة التحول منه إلى وزن في جسم الحيوان قياساً بالبروتين النباتي وهذه النتيجة تتفق مع ما وجده (3، 31).

جدول (6) معدل وزن حيوانات الهامستر المغذاة من البروتين أحادي الخلية (غم)

فول صويا :SCP	الزمن يوم							
	0	7	14	21	28	35	42	49	المعدل
0.0: 1.0	22.53	30.11	36.13	45.69	52.63	58.39	64.93	70.53	47.62
T. v. 1.0 : 1.0	21.99	32.15	43.78	53.46	60.15	68.43	75.39	81.11	54.56
T. v.1.0 : 0.0	22.27	33.26	44.92	56.91	64.94	73.75	81.95	86.41	58.05
المعدل	22.26	32.65	42.75	52.47	61.002	69.56	76.87	82.12	–
LSD>0.05: SCP=1.096, Time=2.131, Iso=0.847									
SCP : البروتين أحادي الخلية Time : الزمن Iso : تأثير العزلة									

جدول (7) نسب مكونات العلائق التجريبية لحيوانات الهامستر (كغم/10 كغم) بحسب (30)

مكونات العلائق التجريبية %	المقارنة	البروتين الميكروبي المنتج *T. viride*	
	Control	%50	%100

مركز بروتين نباتي (فول الصويا)	4.00	2.00	0.00
بروتين أحادي S.C.P.	0.00	2.00	4.00
ذرة صفراء	5.64	5.64	5.64
زيت	0.05	0.05	0.05
فيتامينات	0.02	0.02	0.02
أملاح معدنية	0.02	0.02	0.02
مضاد فطور	0.02	0.02	0.02
كالسيوم	0.20	0.20	0.20
كلوريد الصوديوم	0.05	0.05	0.05

المصادر

1. الخفاجي، زهرة محمود. (2008). التقنية الحيوية الميكروبية. (توجهات جزيئية). وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/ جامعة بغداد.
2. Matelbs, S. R. I. & S. E. Tannebaum. (2008). Single Cell Protein. Economic Botany. J., 22 (1): 42-50.
3. Beker, P. M. (2008). Single Cell Protein in diets for Weanling pigs. Anim. Sci. Group-Nutrion and Food.
4. Zahangir Alana, N. M. & Mond E. M. (2005). Microbial Single Cell Protein. Am. J. of Appl. Sci., 4 (7): 363-370.
5. Schuitz, N.; Chang, L.; Hauck, A.; Reuss, M. & Syldatk, C. (2005). Microbial production of Single Cell Protein from deprotenized Whey Concentrates. J. Applied Mic. and Biotech., 69(5): 515-520.
6. Gregorio, A. D.; Mandalari, G.; Arena, N.; Nucita, F.; Tripodo, M.M. & Curto, R.B. (2002). SCP and crud pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. Bioresource Technol., 83 (2): 89-94.
7. Toshiaki, S.; Tomoyasu, H. & S. Omura. (2008). Corn cap Residues as a potential Source of Single Cell Protein. Kinetics of *Trichoderma viride* cellobiase Action. ACC. Chem. Res., 41(2):302-314.
8. Stevenson, D. M. & Weiver, P. J. (2002). Isolation and Characterization of a *Trichoderma* Strain Capable of fermenting Cellulose to ethanol. Appl. Microbial Biotechnol., 59:721-726.
9. Matei, G. M. & Matei, S. (2008). Research on isolation Characterization and testing the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Botrytis cinerea* for biological control of Plant Pathogens. Biotechnol & Biotechnol. EQ. SE Special Edition/On-Line
10. Al-Taweil, H. I.; Bin Osman, M.; Aidil, A. H. & Yussof, W. M. (2009). Optimizing of *Trichoderma viride* culturation in submerged state fermentation. Am. J. of Appl. Sci., 6 (7): 1277-1281.
11. Yabaya, A. & Ado, S. A. (2008). Mycelial Protein Production by *Aspergillus niger* using Banana Peels. Sci. World. J., 3(4):
12. Ravindra, P. (2009). The effect of De-Oiled Rice bran for Single Cell Protein Production using Fungal Cultures under Solid State Fermentation. Int. J. of Food Engineering., 5:
13. Padmaja, G. & Balagopalan, C. (1990). Evaluation of Single Cell Protein enriched cassava waste as an energy source in broiler ration. FAO Corporate Document Repository.
14. Baig, T. T.; Sheik, M. A. & Ali, S. M. (2002). Bioconversion of filter press cake (Mud) of sugar cane to Biomass protein and its biological evaluation. Pak. J. Biol. Sci., 5 (10): 1052-1055.

15. Nicolai, P. (2005). Cellulase and Protein production from mixed cultures of *Trichoderma viride* and Yeast. Biotechnol. and Bioengineering.,17 (9):1291-1299.
16. Al-Awadhi, N. M.; Razzaqu, M. A.; Jonker, D.; Banat, I. M. & Hamdan, I.Y. (1995). Nutritional and Toxicological Evaluation of Single-Cell Protein Prodced From *Bacillus* sp. KISRI-TM1A in Rats. J. of Food Quality., 18 (6): 495-509.
17. Devrajan, A.; Vindo, K. J.; Kuldeep, G.; Chander, Sh. & Brij, B. L. (2004). Evaluation of Apple Pomace Based Reconstituted Feed in Rats After Solid State Fermentation and Ethanol Recovery. Brazilian Archives of Biol. and Technol., 47 (1): 93-106.
18. الخفاجي، زهرة محمود. (1990). التقنية الحيوية. ط1. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر.
19. Chioupeter, W. S.; Chiu, S. W. & Chen, C. R. (2001). Value of *Aspergillus niger* fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. Anim. Feed Sci. and Technol., 91: 171-182.
20. Bradley, N. (2003). Soil Microbiology- *Trichoderma* – Biol. CSFS 4684. Spain.
21. Sawhney, S. K. & Singh, R. (2000). Introductory Practical biochemistry. Narosa publishing House, New Delhi, India.
22. Anupama, A. & Ravindra, P. (2001). Studies on Production of Single Cell Protein by *Aspergillus* in Solid State fermentation of Rice Bran. Brazilian J. Biol. and Technol., 44 (1):
23. Grost-Allman, C. P. & Steyn, P. S. (1979). Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. J. Chromatography., 195: 325-331
24. كرزة، أحمد محمد خير. (1990). مبادئ الكيمياء الحيوية لنينجر. (مترجم) المجلد الأول. منشورات جامعة حلب، كلية الطب. مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية. مطبعة أبن خلدون. دمشق.
25. Pospiech, A. & Neuman, S. (1995). Salting out procedure for isolation of genomic DNA. Bioresource. Tech., 90:134-141.
26. AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of official Analytical Chemists, Washington Dc. 1018.
27. Gierhart, D. L. & Potter, N. N. (1978). Effect of ribonucleic acid removal methods on composition and functional properties of Candida utilis. J. Food Sci., 43: 1705-1713.
28. Dubois, M. J.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A. & Smith, F. (1965). Colorimetric method for determination sugar and related substance. Annual. Biochem., 28 (3): 350-356.
29. Murphy, J. & Riley, J. P. (1962). A modified Single Solution method for the determination of phosphate in natural waters anal. Chem. Acta., 27: 31-36
30. Herrero, C.; Abalde, J. & Fabregas, J. (2005). Nutritional properties of four marine micro algae for albino rats. J. of Appl. Phycol., 5 (6): 573-580.
31. Barnate, H. L. (1960). Illustrated genera of imperfect fungi, Burgess Publishing Com . U.S.A.