اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من عزلة محلية للفطر *Aspergillus fumigatus* بأستخدام مولاس البنجر السكريكوسط غذائي

منهل صبيح عبدالله متي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، تكريت، جمهورية العراق

الملخص :

اجري هذا البحث لدراسة إنتاج بروتين احادي الخلية Single Cell Protein (SCP) من عزلة محلية للفطر *Aspergillus fumigatus* بأستخدام مولاس بنجر السكر كوسط غذائي واختبار سمية البروتين المنتج ، فقد تم الحصول على أعلى كتلة حيوية 25.71 غم / لتر من الوسط وأعلى نسبة بروتين49 % في اليوم الثامن من التحضين . كذلك أظهرت نتائج اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر *Aspergillus fumigatus* باستخدام الجرذان النرويجية البيضاء من نوع *Rattus norvigicus* ومن كلا الجنسين ان البروتين المنتج كان له تأثير سمي على ذكور وإناث هذه الجرذان المتغذية على العليقة المضاف اليها الخلايا الجافة للفطر بنسبة 15غم لكل 100 غم من العليقة المستخدمة في تغذية هذه الجرذان مسببا موتها خلال فترة قصيرة لم تتجاوز 24 ساعة من تغذيتها على العليقة المذكورة . اتضح من خلال نتائج البحث أيضا إن مخلفات بعض معامل الصناعات الغذائية من الممكن أن تستخدم كمصدر جيد للبروتين سواءا بصورة مباشرة للحيوان أو بصورة غير مباشرة للأنسان كما هو الحال بالنسبة لمولاس بنجر السكر المستخدم في هذه الدراسة والذي يمثل مخلفات صناعة السكر .

المقدمة :

يعد البروتين من المركبات الأساسية في تغذية الأنسان والحيوان في جميع مراحل النمو ويعاني عدد كبير من دول العالم وبخاصة الدول النامية من عجز في توفير البروتين ولم تستطع الطرائق التقليدية في انتاج البروتينات سواء الحيوانية منها أو النباتية من مواكبة الطلب المتزايد على البروتين بسبب الزيادة المطردة في عدد سكان العالم ، تلك الزيادة التي تفوق مئة مليون نسمة سنويا في الوقت الحاضر (4) . وقد بذلت جهود كبيرة لإيجاد بدائل وطرائق جديدة لحل هذه المشكلة منها استعمال طرائق حديثة في تربية الحيوانات وزراعة المحاصيل بالرغم من إن هذه الحلول ليست كافية للتغلب على هذا النقص المتزايد عاما بعد عام لذا ظهرت الحاجة الملحة لأيجاد مصادر غير تقليدية للأغذية تحتوي على نسبة عالية من البروتينات تستخدم في تغذية الأنسان والحيوان (13، 6) .

وقد نالت الأحياء المجهرية إهتماما كبيرا من قبل الباحثين في مجال إنتاج البروتين وقد اطلق على البروتين المنتج من الأحياء المجهرية (الأعفان والخمائر والطحالب والبكتريا) اسم بروتين احادي الخلية Single Cell Protein (SCP) وذلك بسبب المزايا التي تتمتع بها الأحياء أو الكائنات المجهرية الدقيقة (3،2).

إن استخدام المواد الطبيعية الرخيصة والمخلفات الصناعية لتنمية الكائنات المجهرية أظهر اتجاه أو توجيه عام ضمن الدراسات التطبيقية بالنسبة لأنتاج البروتين بوساطة هذه الكائنات فقد تم اختيار عدة نواتج طبيعية لهذا الغرض إذ استخدمت فضلات قصب السكر المعامل بهيدروكسيد الصوديوم لتحقيق أعلى كتلة حيوية وإنتاج للبروتين (10) بينما استخدم وسط المولاس ونقيع الذرة وسطا لنمو الكائنات المجهرية وإنتاج بروتين احادي الخلية (7) كما تم اختيار مولاس البنجر كوسط لأنتاج بروتين احادي الخلية (9) وأيضا اختير مولاس البنجر السكري لأنتاج بروتين احادي الخلية بأستخدام تقنية المزرعة المختلطة (5) وفي هذا البحث اختير مولاس البنجر كوسط لتنمية الفطر *A.fumigatus* لغرض إنتاج البروتين الاحادي الخلية وكذلك الاختبار الحيوي للبروتين المنتج على حيوانات التجارب .

المواد وطرائق العمل :

الكائن المجهري المستخدم :

استخدمت في هذا البحث إحدى العزلات المحلية للفطر *A.fumigatus* تم الحصول عليها من مختبرات كلية العلوم / قسم علوم الحياة / جامعة الموصل .

الأوساط الزرعية :

وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والأكار (PDA) :

استخدم هذا الوسط في تنمية وحفظ وتنشيط الفطر *A.fumigatus* وتم تحضيره بأخذ 200 غم من البطاطا الطازجة و المقشرة والمقطعة الى قطع صغيرة بشكل مكعبات ثم اضيف إليها 500 مل من الماء المقطر . تم غلي المزيج حتى النضج بعدها رشح المزيج بوساطة قطعة من الشاش واخذ الراشح واضيف اليه 20 غم من الدكستروز و 20 غم من الأكار واكمل الحجم الى لتر واحد بالماء المقطر . تم تعبئة الوسط حسب الحاجة وتعقيمه بالمؤصدة عند الضغط 1 كغم / سم^2 ودرجة حرارة 121 م؛ لمدة 20دقيقة . بعد التعقيم صب الوسط قبل أن يبرد في أطباق بتري وأنابيب اختبار تحت ظروف معقمة لمنع التلوث حيث وضعت أنابيب الأختبار بعد سد فوهتها بسدادات قطنية محكمة بشكل مائل لتكوين ال Slantوتركت بعد ذلك لتبرد ثم لقحت جميعها بالفطر *A.fumigatus* تحت ظروف معقمة ثم وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 28±م° لمدة اسبوع .

تحضير المعلق السبوري :

اضيف ماء مقطر معقم الى الأنابيب الحاوية على مستعمرات الفطر المائلة ثم رجت الأنابيب جيدا لغرض فصل السبورات عن المستعمرات بعد ذلك وضع المزيج في دورق معقم وتم أخذ 1 مل من المعلق السبوري بوساطة سحبه بماصة معقمة واضيف الى وسط المولاس المعقم بمعدل 1مل لكل دورق أي بمعدل 2 % .

وسط المولاس :

تم الحصول على مولاس بنجر السكر من المنشاة العامة لمعامل إنتاج السكر والخميرة في الموصل (تحتوي عينات المولاس التي جلبت على سكر كلي بحدود 50%) . حضر وسط المولاس المخفف بتركيز 5 % سكر كما اضيف إليه 2.5 غم من فوسفات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني وضبط الرقم الهيدروجيني عند 5. 6 . وزع وسط المولاس في دوارق حجم 250 مل بمقدار 50 مل / دورق وسدت فوهات الدوارق بسدادات قطنية محكمة وعقمت الدوارق بجهاز المؤصدة بعد ذلك تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت بلقاح الفطر (المعلق السبوري) بمقدار 1 مل من اللقاح لكل دورق بعدها وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ± 1م° وبمعدل هز 100دورة / دقيقة ، تركت الدوارق تحت هذه الظروف وسحبت على فترات معينة .

طرائق التحليل :

تقدير الوزن الجاف لخلايا الفطر A.fumigatus :

بعد انتهاء فترة التحضين المعينة سحبت الدوارق من الحاضنة واجريت عليها عملية ترشيح بوساطة قطعة شاش نظيفة ومعقمة ثم فصلت خلايا الفطر في أطباق بتري معلومة الوزن ووضعت في فرن كهربائي تحت درجة حرارة 80 م° لمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم وزنها وتحديد وزن الفطر الجاف بوساطة ميزان حساس (متلر طراز PC 180) بحاصل الفرق بين الوزنين .

تقدير المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر A.fumigatus :

تقدير المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر *A.fumigatus* بالاعتماد على طريقة Semi Microkjeldahl (A. O. A. C. ، 1980) .

اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر A.fumigatus :

تم اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر *A.fumigatus* بموجب طريقة منظمة الصحة العالمية (WHO) (Anon ، 1958) حيث تم أخذ (4) جرذان بالغة معلومة الوزن (الجرذان النرويجية البيضاء من نوع *Rattus norvigicus*) ومن كلا الجنسين وبعمر ستة أسابيع أضيف 15 غم من الخلايا الجافة للفطر *A.fumigatus* لكل 100 غم من العليقة المستخدمة في تغذية هذه الجرذان وبالمقابل استخدمت (4) جرذان أخرى معلومة الوزن ومن كلا الجنسين وبعمر ستة أسابيع أيضا أطعمت العليقة الخاصة بالتغذية من دون إضافة الخلايا الجافة للفطر *A.fumigatus* كعينات سيطرة وتم ملاحظة أعراض التسمم على الجرذان المضاف إلى عليقتها الخلايا الجافة للفطر *A.fumigatus* لمدة شهر واحد .

النتائج والمناقشة :

الوزن الجاف لخلايا الفطر A.fumigatus :

يبين الجدول 1 تأثير فترة التحضين على وزن الكتلة الحيوية للفطر *A.fumigatus* بعد *تنميته* على وسط مولاس البنجر حيث كانت استجابة الفطر واضحة جدا لوسط المولاس فقد إزداد النمو بزيادة فترة التحضين ووصل أعلى نمو للفطر في اليوم الثامن من التحضين حيث بلغ 25.71 غم / لتر من الوسط ، إن هذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج البرهاوي وسليمان (1988) .

الجدول (1): تأثير فترة التحضين على وزن الكتلة الحيوية ونسبة المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر *A.fumigatus* .

فترة التحضين بالأيام	وزن الكتلة الحيوية غم / لتر	المحتوى البروتيني غم / لتر	البروتين %
4	17.34 (0.22)	7.37	42.50
8	25.71 (0.13)	12.62	49.08
12	22.26 (0.18)	10.60	47.61

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات. أما النتائج بين القوسين فأنها تمثل الانحراف المعياري(S. D.) لهذه القيم.

المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر A.fumigatus :

يتضح من خلال نتائج البحث في الجدول1 إن المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر *A.fumigatus* إزداد بصورة متوازية مع نمو الفطر حيث إن زيادة عدد خلايا الفطر في وسط مولاس البنجر كان يقابلها زيادة في نسبة المحتوى البروتيني الكلي لخلايا الفطر وقد بلغت نسبة المحتوى البروتيني الكلي أقصاها 49 % في اليوم الثامن من التحضين وهناك العديد من البحوث التي تؤكد صحة هذه النتائج كما يبين Han (1975) وكذلك تم الحصول على محتوى بروتيني لعدد من الفطريات الناقصة قريب جدا لما تم الحصول عليه من خلال هذا البحث (El - Ashwah واخرون b ، a 1981) .

اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر A. fumigatus :

أظهر اختبار سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر *A.fumigatus* على الجرذان البيضاء النرويجية البالغة (بعمر ستة أسابيع) ومن كلا الجنسين بموجب طريقة منظمة الصحة العالمية (WHO) (Anon ، 1958) إن البروتين المنتج من الفطر كان ساما بالنسبة لذكور وإناث الجرذان البالغة المتغذية على العليقة المضاف اليها الخلايا الجافة للفطر بنسبة 15 غم لكل 100 غم من العليقة المستخدمة في تغذية هذه الجرذان مما أدى الى موتها خلال فترة قصيرة لم تتجاوز 24 ساعة من تغذيتها على العليقة المذكورة وبصورة مختلفة تماما عما هو عليه الحال عند تغذية ذكور وإناث الجرذان البالغة على العليقة الخاصة بالتغذية من دون إضافة الخلايا الجافة للفطر كعينات سيطرة لمدة شهر واحد إذ لم تظهر أية أعراض سمية على هذه الجرذان . ومن جانب أخر فقد لوحظ إن ذكور وإناث الجرذان البالغة المتغذية على العليقة الخالية من الخلايا الجافة للفطر بقيت محافظة على أوزانها مع حدوث زيادة مبدئية طفيفة في أوزانها بعد التغذية مقارنة بأوزانها قبل التغذية (الجدول 2) . ومن نتائج هذه التجربة يمكن الاستدلال على سمية بروتين احادي الخلية المنتج من الفطر *A.fumigatus* . ومن هذه النتيجة يستوجب ان نقول انه ليس جميع الفطريات يمكن ان تستخدم كمصدر بروتين احادي الخلية حيث إن سمية البروتين المنتج يتوجب ان تكون العلاقة الجوهرية الأولية في اباحة استخدام بروتين احادي الخلية في التغذية الحيوانية أو البشرية .

الجدول (2) : تأثير تغذية الجرذان البالغة بعمر ستة أسابيع على العليقة المضاف اليها الخلايا الجافة للفطر *A.fumigatus*

المعاملات	أوزان الذكور (غم)*			أوزان الإناث (غم)*		
	الوزن الابتدائي	الوزن النهائي	زيادة الوزن	الوزن الابتدائي	الوزن النهائي	الزيادة في لوزن

	(غم)	(غم)	(غم)	(غم)	(غم)
التغذية على العليقة المضاف اليها الخلايا الجافة للفطر	211.25	تسمم وموت	تسمم وموت	199.7	تسمم وموت
التغذية على العليقة الخالية من الخلايا الجافة للفطر (مقارنة)	211.25	215.75	4.5	199.7	204.5	4.8

*كل قراءة تمثل متوسط أوزان أربعة حيوانات.

المصادر:

1. البرهاوي، رياض خليل و سليمان عصام داود (١٩٨٨). بناء البروتين بواسطة الفطر *Aspergillus niger* من المولاس وعسل التمر (الدبس) ZANCO . المجلد (12)12: 1_7.
2. الحيدري، نظام كاظم عبد الأمير والمصلح، رشيد محجوب (1989) . الأحياء المجهرية الصناعية . مطابع التعليم العالي في الموصل / الموصل / العراق .
3. الخفاجي، زهرة محمود (١٩٩٠). التقنية الحيوية، مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر، الموصل/ العراق.
4. دلالي، باسل كامل (١٩٩٣). موضوعات مختارة من التكنولوجيا الحيوية، دار الكتب للطباعة والنشر. مطبعة جامعة الموصل / الموصل / العراق .
5. قاسم، محمد بشير إسماعيل و شكر، ولاء حمدون (2000). إنتاج بروتين الخلية الأحادية بوساطة مزرعة مختلطة من *Aureobasidium pullulans* و *Aspergillus niger* باستخدام مولاس البنجر السكري.
6. Al – Fassi , F. A. ; Kabli , S. A. ; Al – Garni , S. M.and Ghanem , K. M .(1996). Protein production from orange waste by mono and mixed cultuers. Bull. Of pure and Appl .Sci . 15 : 85 – 98 .
7. Anon . (1958). Procedures for Testing of Intentional Food Additives to establish their safety for use. Technical Report series. No. 144. Geneva: World Health organization , WHO .
8. A. O. A. C. (1980). Association of Official Agriculture Chemists. Official Methods of Analysis, 13th ed, Washington D. C. USA .
9. El -Ashwah,E.T. ;El-Shimi ,N. M.F.A.(1981 a). Studies on mycelial production and utilization from fungi imperficti . I . Enviromental conditions and large scale fermentation. Egypt. J. Microbiol . 16: 87 – 96 .
10. El – Ashwah , E. T. ; El – Shimi , N. M. and Ismail , F. A. (1981 b). Studies on mycelial productionand utilization from fungi imperfecti . II.Chemical evaluation and macaroni enrichment with biomass. Egypt.J. Microbiol. 16: 97 – 105.
11. El – Refai , A. H. ;Ghanem , K. M. and El – Gazaerly , M. A.(1986). Single cell protein production from beet molasses . J . Microbiol . 46 : 95 – 102 .
12. Hamissa , F. A. ; El – Diwany , A. I. Shaker , H. M. and El – Refai , A. H. (1984) . Improvement of the nutritional value of sugar – cane bagasse by simple solid state fermentation. Microbios Letters. 26 : 129 – 133 .
13. Han , Y. W. and A. W. Anderson., (1975). Semi solid fermentation of ryegrass straw. J. Appl. Microbiol. 30 (6) : 930 – 934 .
14. Zayed, G. (1991). Utilization of whey from reconstituted skim milk for single cell protein production. Cultured Dairy Products Journal. 26: 22 – 28.

Toxicity test for the Single Cell Protein produced from a local isolate from the fungus *Aspergillu fumigatus* by using sugar beet molasses as a medium

Manhal Sabeeh Abdulla Matee

Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

Abstract:

This investigation was carried out to study the production of Single Cell Protein (SCP) from a local isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus* using sugar beet molasses as medium and testing of the toxicity of the produced protein . Maximum biomass (25.71 gm / l medium), and a maximum protein percentage (49%) were obtained in the 8th day of incubation. Results of toxicity test of single cell protein produced by the fungus using the mature white Norwegian rats species *Rattus norvigicus*, males and females, showed that the produced protein has a toxic effect on males and females of rats fed on the diet which contain 15 gm / 100 gm of the dried cells of the fungus causing the death of all rats within a short time not exceeded 24 hour. It was clear from the results, that the wastes of some food industrial factories may be used as a good source of protein directly for animal or indirectly for man as in the sugar beet molasses that's used in this research which represent the wastes of sugar industry.