عزل وتشخيص الفطر *Fusarium graminearum* ودراسة تأثير الأوساط المغذية في إنتاج البروتين والسم

ناريمان نعمة ، محمود كشتعاري ، محمد محمد

كلية الزراعة ، جامعة دمشق ، دمشق ، سوريا

*مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول

(تاريخ الاستلام: ٢ / ٦ / ٢٠٠٩ ---- **تاريخ القبول:** ٥ / ١ / ٢٠١٠)

الملخص

جرى في هذا البحث دراسة الظروف المثلى لإنتاج البروتين الفطري مخبرياً، حيث تم إكثار الفطر *Fusarium graminearum* ضمن شروط مخبرية محددة. إذ تم فيها أخذ عينات من جذور الذرة المصابة وتنمية مستعمرات الفطر في وسط Potato Dextrose Agar (P.D.A.). جرت عملية الإنتاج في ثلاثة أوساط مغذية مختلفة، تتمايز فيما بينها في تركيز الكلوكوز والأس الهيدروجيني، لبيان تأثيرها على بعض الخصائص الكيميائية للفطر (الرطوبة والرماد والألياف والسكريات والبروتين والسموم الفطرية) بالإضافة إلى الخصائص المورفولوجية. أظهرت النتائج أن نسبة البروتين المنتج أخذت قيمة عظمى في اليوم الثامن للإكثار، وذلك في جميع الأوساط المغذية، حيث بلغت هذه القيمة ٣٨,٠٤٣٥% في الوسط ذي التركيز الأعلى من الكلوكوز وعند الأس الهيدروجيني 5.5 – 5 = pH. كما وجد أن كمية السموم التي ينتجها الفطر ازدادت مع الأس الهيدروجيني، إلا أنها لم تتجاوز الحدود المسموح بها في أغذية الأطفال وفقاً لمعايير المفوضية الأوروبية.

الكلمات المفتاحية: البروتين الفطري، *Fusarium graminearum*، السموم الفطرية.

المقدمة:

مع التطور العلمي الذي حصل في المجال الميكروبيولوجي تم اكتشاف أحياء دقيقة ذات قيمة غذائية عالية من خلال ما تنتجه من مواد قابلة للاستهلاك البشري، أما بالنسبة إلى الفطريات فقد أكدت الدراسات والأبحاث أن الفطر *Fusarium graminearum* التابع لصف الفطريات الناقصة يعطي نسبة عالية من البروتين. ويتمتع البروتين الفطري بسبب محتواه العالي من الألياف الغذائية والمعادن والأحماض الأمينية الضرورية ومجموعة فيتامينات **B** بقيمة غذائية عالية، كما إن محتواه من الدهون المشبعة منخفض (١٩).

في بداية فترة البحث والتطوير من أجل إنتاج البروتين الفطري جرت دراسة أكثر من ٣٠٠٠ عزلة من الفطريات من أجل معرفة محتواها من البروتين والسموم وإيجاد الظروف المناسبة للنمو (بداية بالفطر Fusarium graminearum ثم بالفطر Fusarium venenatum) (١١)؛ كما أجريت اختبارات على الحيوانات المخبرية وبعض الناس المتطوعين لمعرفة إمكانية استخدامه كغذاء. وقد استغرقت هذه الأبحاث حوالي ١٢ سنة. ووجد أنه لا بد من تخفيض محتوى الـ RNA في الخلايا كي يصبح البروتين الفطري الناتج صالحاً للاستهلاك دون أن يكون له أعراض جانبية تذكر (13)؛ ويتم ذلك بتسخين الميسليا في وعاء منفصل إلى درجات حرارة أعلى من ٦٨ درجة مئوية، (حيث أن درجة الحرارة المثلى تقع بين ٧٢ و٧٨ درجة مئوية) لمدة تتراوح بين ٣٠ و ٤٥ دقيقة (١٧). بالإضافة إلى ذلك، فقد نتج عن هذه الأبحاث أن للبروتين الفطري قيمة غذائية يمكن مقارنتها بالبيض فيما يتعلق بمحتواه من الأحماض الأمينية (١٠) .ولكنه لا يحتوي الكوليسترول ومحتواه من الألياف عالٍ. ثم جرت اختبارات السمية والحساسية للمنتج (١٠، ١٤). وبسبب محتواه العالي من الألياف فإنه يساعد في تخفيض الكوليسترول في الدم (١٧)، مما يدعم تخفيض السعرات المتناولة (١٦، ٣). وقد اقترح أن يعتاد الناس على تناول البروتين الفطري كغذاء صحي (١٨).

وفيما يتعلق بالسموم المنتجة عبر عملية استقلاب الفطر *Fusarium graminearum* فقد وجد أنه ينتج السم *Zearalenone* (*ZEA*) بشكل أساسي (٨، ٩)، وإن القيم المسموح بتواجدها في المنتج الغذائي غير متوفرة لدى منظمة الصحة العالمية. وقد وضعت المفوضية الأوروبية القيم القصوى المسموح تواجدها في بعض المواد الغذائية المستهلكة في دول الاتحاد الأوروبي (٦)، وبلغ الحد الأعلى المسموح به في طعام الأطفال 20 µg/kg وفقاً لهذه القيم. ووفقاً للدراسات المتواجدة لدى منظمة الأغذية العالمية FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations)، فإن قيمة الحد الأعلى المسموح تناوله يومياً من هذا السم لكل كيلوغرام من وزن الشخص t-TDI-Value (Temporary total daily intake) هي ZEA TDI = 0.5 µg/kg bw/day (٤).

يهدف هذا البحث إلى دراسة الشروط المثلى لإنتاج البروتين الفطري مخبرياً، وذلك عن طريق إكثار الفطر *Fusarium graminearum* ضمن شروط مخبرية متحكم بها (في أوساط مغذية مناسبة لنموه). علاوة على ذلك سيتم (لأول مرة في سورية) تحديد السم الفطري الأساسي الذي ينتج عن نمو هذا الفطر ومناقشة مدى مطابقة البروتين الفطري الناتج للمواصفات المحددة له من قبل منظمة الصحة العالمية فيما يتعلق بنسبة السم.

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص الفطر:

أخذت عينات من جذور الذرة مع التربة المحيطة بها (من مزرعة كلية الزراعة، جامعة دمشق)؛ وتم تجريحها وإضافة الماء إليها، وحفظها في مكان مظلم عند درجة الحرارة ١٨–٢٠ درجة مئوية لمدة ٢٠ يوم؛ وجرى ترطيبها من وقت إلى آخر. استخدم الوسط Potato Dextrose Agar (P.D.A.) لتنمية الفطر، حيث زرعت عينة من المنطقة المصابة من جذر الذرة وحضنت عند الدرجة ٢٥ درجة مئوية لمدة أسبوع. ثم ظهرت مستعمرات على وسط الزرع، وللحصول على مزرعة نقية تم نقل جزء من المستعمرات الفردية بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة إلى الوسط المذكور وإعادة عملية الزرع حتى الحصول على طبق متجانس لا يحتوي إلا على الفطر المطلوب، تمت العملية في غرفة العزل والزرع.

تنمية الفطر وإنتاج البروتين:

جرت عملية الإكثار للحصول على الكتلة الحيوية للفطر وأبواغه بعد تحضير ثلاثة أوساط مغذية معقمة مختلفة من أجل معرفة الظروف المثلى لإنتاج البروتين الفطري. واستخدمت لهذا الغرض طريقة الدوارق المحضنة ضمن الرجاج. يبين الجدول (١) مكونات كل وسط والأس الهيدروجيني له. جرى توزيع الوسط المغذي في دوارق معقمة سعة كل منها ١٠٠٠ مل بواقع ٢٠٠ مل في كل دورق، وتم ضبط درجة الحرارة لتكون ٢٥ درجة مئوية خلال فترة الإكثار، وجرى التحكم بسرعة الرجاج بحيث تبقى ١٥٠ دورة / دقيقة. وبعد مرور ثمانية أيام على الإكثار عولج الفطر حرارياً عند درجة الحرارة ٦٤ درجة مئوية لمدة ٣٠ دقيقة من أجل تخفيض نسبة الـ RNA (٥)، ومن ثم فصلت الكتلة الحيوية عن الوسط باستخدام الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة (٨).

الجدول (١): مكونات الأوساط المغذية المحضرة في هذا البحث والأس الهيدروجيني، بالإضافة إلى مصادرها.

الوسط الأول	الوسط الثاني	الوسط الثالث
١ غ فوسفات ثنائية الأمونيوم $(NH_4)_2HPO_4$ ٣,٥ غ فوسفات أحادية البوتاسيوم KH_2PO_4 ١٠ غ غليسرول ٥ غ ملح الطعام NaCl ٤٠ غ كلوكوز $C_6H_{12}O_6$ ٢ غ كبريتات المغنزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ (pH = 4 – 4.5) المصدر (١)	٤٠ غ من الرز الطبيعي المطحون ٣٠ غ من الكلوكوز ١ غ من مستخلص الخميرة ١ ليتر من الماء المقطر (pH = 5 – 5.5) المصدر (٨)	١٠ غ من الكلوكوز ١ غ بيبتون من Casein ١ غ من مستخلص الخميرة ١ ليتر من الماء المقطر (pH = 6 – 6.5) المصدر (٨)

أخذت الكتلة الحيوية الناتجة وجرى تجفيفها حتى ثبات الوزن. وحددت الخصائص الكيميائية للفطر في اليوم الذي أعطى فيه أعلى إنتاجية من البروتين، حيث أخذت عينات بواقع ٢٥ – ٣٥ مل من الدوارق في كل من اليوم الخامس والسادس والسابع والثامن والتاسع والعاشر والحادي عشر وقدر فيها البروتين.

حددت الرطوبة بطريقة التجفيف حتى ثبات الوزن، وقدر الرماد باستخدام المرمدة حتى الوزن الثابت، والبروتين باستخدام جهاز كلداهل، والألياف بجهاز تقدير الألياف الآلي، والسكريات بطريقة فهلنغ؛ إن تفاصيل هذه الطرق والأسس التي تعتمد عليها موضحة في كتاب AOAC (٢).

كما جرى تحديد نسبة السموم في الكتلة الحيوية الناتجة باستخدام جهاز لقياس الفلورة من شركة VICAM المزود ببرنامج ZEARALAtest^{TM} لقياس كمية السم *Zearalenone*. وحيث أن الكشف عن هذا السم وتحديد كميته قد جرى لأول مرة في سورية، سنشرح فيما يلي، وبشكل مختصر، طريقة الكشف المتبعة:

١. يوزن ٢٠ غ من العينة ويضاف ٢ غ من الملح إليها، ثم يضاف ٥٠ مل من محلول (أسيتونتريل/ماء) بنسبة (١٠/٩٠) أو من محلول (ميتانول/ماء) بنسبة (٢٠/٨٠). بعد ذلك يتم تحرك المحلول بسرعة عالية لمدة دقيقتين؛ ومن ثم يرشح المحلول بورق ترشيح عادي.

٢. يمدد ١٠ مل من الخلاصة بـ ٤٠ مل من محلول Tween PBS ذي التركيز ٠,١%. بعدئذٍ يتم الترشيح عبر ورق ترشيح دقيق (ذي الفتحة ١ ميكرومتر).

٣. يؤخذ ١٠ مل من الرشاحة ويضاف إليها ١٠ مل من محلول Tween PBS ذي التركيز ٠,١%. ثم توضع في العمود، ويغسل العمود بـ ١٠ مل من الماء المقطر. يحل السم Zearalenone بـ ١ مل من الميتانول النقي (الخاص بـ HPLC) ويوضع المحلول في وعاء صغير (cuvette).

٤. يضاف ١ مل من المحفز (وهو aluminum chloride hexahydrate المنحل في الميتانول بنسبة ٢,٥غ/٥٠ مل) إلى الوعاء الصغير ويمزج مع العينة. يوضع المزيج الناتج في الجهاز وتؤخذ قراءة بعد ٣٠٠ ثانية (٥ دقائق).

النتائج والمناقشة:

استخدم الوسط Potato Dextrose Agar (P.D.A.) للحصول على سلالة نقية من الفطر *Fusarium graminearum*، فقد أثبتت دراسات سابقة (1) أن هذه السلالة تتصف بالمنافسة في الوصول إلى

المواد المغذية وتسلك سلوكاً كيميائياً معادياً لنمو أية أنواع أخرى في وسط الزرع، الأمر الذي يساعد في الحصول عليه نقياً.

وبعد متابعة تغير لون الوسط من الأبيض الشفاف إلى الوردي المتجانس في كامل الطبق والتأكد من عدم نمو أنواع أخرى ضمن الطبق، وذلك من خلال الدراسة المجهرية وشكل الأبواغ، يمكن القول أن النوع الذي حصلنا عليه هو *Fusarium graminearum*، حيث أن أبواغ هذا الفطر تمتاز عن أبواغ أصناف الفوزاريوم الأخرى بكونها تأخذ شكلاً مستقيماً نسبياً وغير منتفخة في الوسط (٧). يوضح الشكل (١) تطور نمو الفطر.

بعد ثلاثة أيام من التحضين

بعد خمسة أيام من التحضين

الشكل (١): تطور نمو فطر *Fusarium graminearum*.

وتمت أيضاً دراسة الصفات المورفولوجية للفطر المزروع؛ يوضح الشكل (٢) أبواغ الفطر *Fusarium graminearum* الميكروكونيدي والماكروكونيدي مكبرة ١٠٠٠ مرة.

الشكل (٢): أبواغ الفطر *Fusarium graminearum* الميكروكونيدي والماكروكونيدي مكبرة ١٠٠٠ مرة.

ويوضح الشكل (٣) أبواغ الفطر *Fusarium graminearum* الميكروكونيدي والماكروكونيدي، بالإضافة إلى المسليوم.

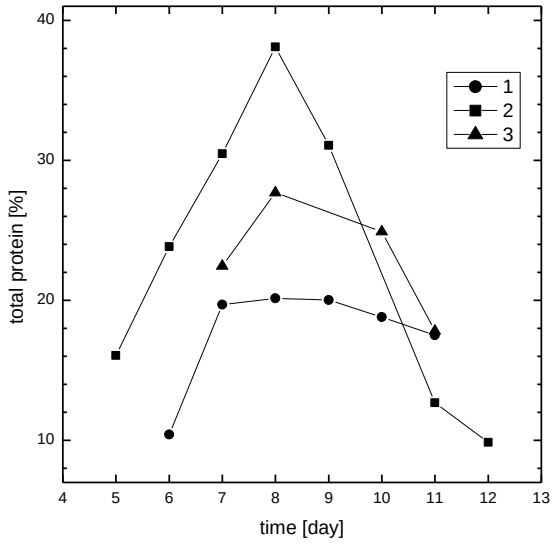
الشكل (٣): أبواغ الفطر *Fusarium graminearum* الميكروكونيدي والماكروكونيدي، بالإضافة إلى المسليوم مكبرة ١٠٠٠ مرة.

يتضح من الشكلين (٣) و (٤) أن أبواغ الفطر الناتجة تأخذ شكلاً مستقيماً نسبياً وغير منتفخة في الوسط، وهذا ما يميز أبواغ

الفطر *Fusarium graminearum* عن أبواغ أصناف الفوزاريوم الأخرى (٧). ويبين الشكل (٤) صورةً للكتلة الحيوية الناتجة المتميزة بلونها الوردي.

الشكل (٤): صورة للكتلة الحيوية الناتجة.

يظهر الشكل (٥) مقارنة بين نسب البروتين المنتجة عند كل من الأوساط المغذية الثلاثة المبينة في الجدول (١). ويرمز العدد الموجود ضمن الشكل (٥) إلى الوسط المغذي. يبين هذا الشكل أن النسبة العظمى لإنتاج البروتين تكون في اليوم الثامن للنمو في جميع الأوساط المغذية. علاوة على ذلك، فإن هذه النسبة تكون أكبر وتبرز بوضوح من أجل الوسط المغذي الثاني.



الشكل (٥): مقارنة بين نسب البروتين المنتجة عند كل من الأوساط المغذية الثلاثة المبينة في الجدول (١). يرمز العدد الموجود ضمن هذا الشكل إلى الوسط المغذي.

ودرست الخصائص الكيميائية للفطر محسوبة على أساس المادة الجافة تبعاً للوسط المغذي المستخدم. وقد بلغت النسبة المئوية للرطوبة ٨٦% في الوسط الأول و ٨٤,٣١% في الوسط الثاني و٨٥,٩٥٨% في الوسط الثالث. يبين الجدول (٢) ملخصاً للخصائص الكيميائية للفطر (تقدير الرماد والبروتين والألياف والسكريات) محسوبة على أساس المادة الجافة، عند استخدام الأوساط المغذية المبينة في الجدول (١).

الجدول (٢): الخصائص الكيميائية للفطر محسوبة على أساس المادة الجافة عند استخدام الأوساط المغذية المبينة في الجدول (١). وتمثل النتائج الموجودة في هذا الجدول متوسطات لثلاث قيم مقاسة.

الوسط	الأول	الثاني	الثالث
النسبة المئوية للرماد [%]	٨,٨١٨٣	١,٨١٦٤	٤,٠٢٨٤
النسبة المئوية للبروتين الكلي [%]	٢٠,٠٦٤	٣٨,٠٤٣٥	٢٧,٥٠٥
النسبة المئوية للألياف [%]	٣٠,٠٧٥	٣٠,٠٩٢٥	٢٧,٩٤٢
نسبة السكريات المرجعة [%]	٥	١,٢	٢,٩١٩
نسبة السكريات الكلية [%]	١٢,٠٦٤	١٣,٨٦٨	٧,٣٧٧

علاوة على ذلك، فقد جرى تقدير نسبة السم *Zearalenone* في الكتلة الحيوية الناتجة. يبين الجدول (٣) كمية السم التي تم الحصول عليها بالنسبة إلى المادة الجافة تبعاً للوسط المغذي المستخدم.

الجدول(٣): كمية السم Zearalenone التي تم الحصول عليها بالنسبة إلى المادة الجافة تبعاً للوسط المغذي المستخدم.

الوسط	القراءة [PPB]
الأول	٧,١٤
الثاني	٦,٣٧
الثالث	١٤,٢٤

إن نسبة السم المنتج عند نمو الفطر في الوسط الثاني (وهو الوسط الذي أعطى أعلى نسبة للبروتين) هي أدنى نسبة بين الأوساط الثلاثة المستخدمة، مما يشجع على استخدام الوسط الثاني في تحضير البروتين الفطري الغذائي.

الاستنتاجات:

تم في هذا البحث دراسة الظروف المثلى لإنتاج البروتين الفطري مخبرياً، حيث جرى لهذا الغرض إكثار الفطر *Fusarium graminearum* ضمن شروط مخبرية محددة:

- بينت النتائج أن أعلى إنتاجية للبروتين كانت عند تنمية الفطر في الوسط الثاني، حيث وصلت نسبة البروتين إلى ٣٨,٠٤%، ويعود السبب في ذلك إلى ارتفاع نسبة الكلوكوز في هذا الوسط (٣٠ غ/ل)، بالإضافة إلى وجود الرز المطحون (كمصدر للكلوكوز أيضاً)، مقارنة مع الوسطين الأول والثالث حيث كانت كمية الكلوكوز أقل.
- كما أثبتت النتائج أنه عند قيمة الأس الهيدروجيني pH = 5 – 5.5 ينشط الفطر ويعطي نسبة عالية من البروتين، كما هو الحال في الوسط الثاني.
- للأس الهيدروجيني علاقة بكمية السم التي ينتجها الفطر، فكلما ارتفعت قيمته، ازدادت كمية السموم التي ينتجها الفطر، ويتضح هذا جلياً من خلال الوسط الثالث (pH = 6 – 6.5) الذي أعطى كمية سموم أعلى مقارنة مع الوسطين الأول (pH = 4 – 4.5) والثاني (pH = 5 – 5.5).
- إن نسبة السم المنتج عند نمو الفطر في الوسط الثاني (وهو الوسط الذي أعطى أعلى نسبة للبروتين) هي أدنى نسبة بين الأوساط الثلاثة المستخدمة، مما يشجع على استخدام الوسط الثاني في تحضير البروتين الفطري الغذائي.
- إن نسبة السم التي أنتجها الفطر في هذا البحث أدنى من الحد المسموح به في أغذية الأطفال (20 µg/kg) وفقاً لمعايير المفوضية الأوروبية.

المصادر:

١. فؤاد بليدي، فادي الدخيل، نور العيسى، "دراسة إمكانية انتاج البروتين الفطري"، جامعة البعث، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية (٢٠٠٤-٢٠٠٥).

٢. Aoac 1990, Official methods of analysis – 15th, Association official analytical chemists, Inc USA

٣. Burley, V. J., Paul, A. W. & Blundell, J. E. 1993 Influence of a high-fibre food (myco-protein) on appetite: effects on satiation (within meals) and satiety (following meals). European Journal of Clinical Nutrition, Vol. 47. 409-418.

٤. Codex Alimentarius Commission 2000 Report of the thirty-second Session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Bejing, VR China, Position Paper on Zearalenone, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission (2001): Twenty-fourth Session Geneva, Switzerland

٥. Edelman, J., Fewell, A. & Solomons, G. L. 1983 Myco-protein – a new food. Nutrition Abstracts and Reviews in Clinical Nutrition, Vol. 53. 471-480.

٦. European Commision; Scientific Commitee On Food 2000 Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins, Part 2: Zearalenone (ZEA) SCF/CS/Cntm/Myc/22 Rev 3 Final.

٧ . Fusarium Interactive Key (Agr. & Agri. – Food, Canada), 1996, ISBN 0-662-24111-8.

٨. Knoll, A 2002, Entwicklung schneller Verfahren zur DNA-gestützten Detektion von Fusarien und Analyse ihrer Mykotoxinbildung, Technische Universität München.

٩. MARASAS, W F O, NELSON, P E., TOUSSON, T A 1984. Toxigenic Fusarium species: Identity and Mycotoxicology. University Park, PA: Pennsylvania State University Press.

١٠. Miller, S. A. & Dwyer, J. T. 2001, Evaluating the safety and nutritional value of mycoprotein. Food Technology, Vol. 55. 42- 47.

١١. O'donnell, K., Cigelnik, E. & Casper, H. H. 1998, Molecular phylogenetic, morphological and mycotoxin data support reidentification of the QuornTM mycoprotein fungus as Fusarium venenatum. Fungal Genetics and Biology, Vol. 23. 57-67.

١٢. Rodger, G 2001, Food technology, Vol. 55. No. 7, 36-41.

١٣. Solomons, G. L. 1987, Myco-protein: safety evaluation of a novel food. Archives of Toxicology Supplement, Vol. 11. 191-193.

١٤. Tee, R. D., Gordeon, D. J., Welch, J. A. & Taylor, A. J. N. 1993 Investigation of possible adverse allergic reactions to mycoprotein ('QuornTM'). Clinical and Experimental Allergy, Vol. 23. 257-260.

١٨. Wheelock, V. 1993 QuornTM: case study of a healthy food ingredient. British Food Journal, Vol. 95. 40-44.

19. Wiebe, M. G. 2002 Myco-protein from Fusarium venenatum: a well-established product for human consumption. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 58. 421-427.

١٥. Turnbull, W. H., Leeds, A. R. & Edwards, G. D. 1992 Mycoprotein reduces blood lipids in free-living subjects. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 55. 415-419.

١٦. Turnbull, W. H., Walton, J. & Leeds, A. R. 1993 Acute effects of myco-protein on subsequent energy intake and appetite variables. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 58. 507-512.

١٧. WARD, P. N. 1998 Production of food. Patent No. US5739030.

Isolation and classification of the fungus *Fusarium graminearum* and study the effect of cultivation media on the mycoprotein- and mycotoxin-production

Nariman Nehme , Mahmoud Kashtaary , Mohammad Mohammad
Faculty of Agriculture, Damascus University , Damascus , Syria
*Extracted from M.SC. thesis
(**Received:** 2 / 6 / 2009 ---- **Accepted:** 5 / 1 / 2010)

Abstract:
This research was conducted to study the optimal conditions for the laboratory production of myco-protein. For this purpose, the fungus *Fusarium graminearum* was cultured under controlled laboratory conditions. Samples of infected maize roots were taken, and colonies of this fungus were grown in Potato Dextrose Agar (P.D.A.). The cultivation process was performed in three different cultivation media, having their own glucose concentrations and pH-values, in order to show their effect on the chemical properties of the fungus (moisture, ash, fiber, sugar, protein, and myco-toxin) and its morphology. Results indicated that the myco-protein production has a maximum value in 8^{th} day of cultivation for all cultures: (38.0435%) when using the medium with the highest glucose concentration at a pH-value (5 – 5.5). Furthermore, it was found that the level of produced myco-toxin increases with increasing pH-value; but this level was still in the tolerated range for children food according to the standards of the European Commission.
key words: myco-protein, Fusarium graminearum, myco-toxtin