إنتاج البروتين من ناتج التحلل القاعدي لتبن الشعير بواسطة الفطر Aspergillus niger

د. فرج علي ابوشعالة ❖ منى مختار مليطان❖ أ.د. الهادي محمد صافار❖

الخـــلاصـــة:

أُجريتْ هذه الدراسة لتحديد إمكانية استخدام تبن الشعير المعامل بتراكيز مختلفة من هيدروكـــسيد الصوديوم، وذلك كوسطاً غذائياً لنمو الفطر ***A.niger*** وإنتاج بروتين أحادى الخلية عند فترات زمنية ودرجات حرارة مختلفة.

أظهرت النتائج أن معاملة تبن الشعير ب 6% هيدروكسيد الصوديوم عند درجة حرارة 40مْ لمدة 20 دقيقة، أعطت أعلى نسبة من السكريات البسيطة، والتي قدرت بحوالي 10.25%.

تبيّن من هذه الدراسة أن أفضل فترة تحضين لنمو الفطر لإنتاج البروتين كانت بعد أربعة عـــشر يوماً، وأن أفضل تركيز لأيون الهيدروجين pH الابتدائي لنمو الفطر وإنتاجه للبروتين هو 6.5 .

المقدمـــة Introduction :

تعد البروتينات بنوعيها النباتي والحيواني من أهم مكونات غذاء الإنسان والحيوان؛ إذ أنّها تدخل بطريقة مباشرة في تكوين أنسجة الكائن الحي بالإضافة إلى دورها في مساعدة أعضاء الجسم الحـــي في أداء وظائفها الحيوية (مسعود ووناده، 1983).

تختلف طرق تحضير البروتينات أحادية الخلية من منطقة لأخرى تبعاً لاختلاف المواد الأوليـــة المتاحة واللازمة لعملية الإنتاج (محمد والحبابي، 1989)، والمصادر الكربونيـــة التـــي تـــستخدمها الكائنات الحية المجهرية في إنتاج البروتين كثيرة ومتعددة، فمنها ما هو متجدد ويـــشمل المخلفـــات الزراعية والصناعية كالسليلوز والنشا والمولاس وغيرها، ومنها ما هو غير قابل للتجديد ويشمل الغاز الطبيعي والمواد الكيميائية المشتقة منه، وتمتاز المصادر الكربونية القابلة للتجديد –كبعض المخلفات

❖ جامعة 7 أكتوبر – كلية العلوم– مصراتة – ليبيا.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

الزراعية ومخلفات الغابات ومخلفات صناعة الأغذية- بأنها أقل تكلفة من المصادر الكربونية غير القابلة للتجديد (Arora *et al.*, 1991)، ومن الناحية الأخرى فإنّ تراكم هذه المخلفات يكون مصدراً كبيراً لتلوث الأراضي أو المجاري المائية، وبالتالي فإن استخدام هذه المواد في إنتاج بروتين أحادي الخلية يخدم غرضين هما: تصنيع بروتين يمكن استخدامه في التغذية البشرية أو الحيوانية، والمحافظة على البيئة من التلوث (Forage, 1977).

استخدمت الكائنات الدقيقة منذ زمن بعيد في أغذية الإنسان وأعلاف الحيوانات، وقد لعبت الكائنات الدقيقة دوراً مهماً في تصنيع الأغذية التي تعتمد على التخمر وإنتاجها مثل الكحولات والجبن ومواد أخرى، وبدأت صناعة البروتين أحادي الخلية في إنجلترا عام 1879 بتنمية الخمائر في أحواض مكشوفة لإنتاج خميرة الخبز الجافة. وخلال الحرب العالمية الثانية (1939-1945) قام العلماء الألمان بإنتاج لحم صناعي من خميرة *Torulopsis utilis* أو *Candida utilis*، حيث أضيفت إلى بيئة غذائية من المولاس والأمونيا مكونة مسحوقاً بروتينياً، ويرجع استخدام الفطريات في التغذية إلى ما قبل الميلاد، حيث استخدم الفراعنة بعض أنواع الفطريات لتكسب نكهة خاصة لشوربة فول الصويا (محمد والحبابي، 1989). ويتراوح التركيز الهيدروجيني الأمثل لنمو الفطريات من 5-7 (Reed and Nagodawithana, 1995).

يعد الفطر *A. niger* كائناً حياً مجهرياً صناعياً مهماً لإنتاج الأحماض العضوية والبروتينات أحادية الخلية بالتخمر; (Finkelstein *et al.*, 1989) (Ravinder *et al.*, 2003) ، كما يعتبر من أهم أنواع جنس الـ *Aspergillus* التي استخدمت في إنتاج الكتلة الحيوية والبروتين أحادى الخلية SCP من الفضلات الزراعية (Yigitoglu, 1992)، وقام Singh *et al.*, (1991) بإنتاج بروتين أحادى الخلية بواسطة الفطر *A. niger*، وقدرت نسبة البروتين المنتج بحوالي 34.4%.

تشكل المواد السليلوزية القسم الأكبر من المخلفات والمنتجات الثانوية الزراعية، التي كانت في الأصل مصدراً غذائياً للحيوانات (التارقي، 2006)، وتعد المواد السليلوزية على اختلاف مصادرها مصدراً جيداً لتنمية الأحياء المجهرية، وهذا لا يتم إلا بعد معاملة المصدر السليلوزي إمّا بطرق بيولوجية أو طرق كيميائية، لتحويله إلى سكريات قابلة للذوبان يستفيد منها الكائن المجهري مصدراً كربونياً لإنتاج الكثير من المركبات المرغوبة، مثل بروتين أحادي الخلية (1975) Cowling and Rao *et al.*, (1985) ; Cooney *et al.*, (1978) Humphrey *et al.*, (1977) ; Kirk, .

وتتم المعاملة الكيميائية للسليلوز باستخدام الأحماض أو القواعد المخففة، وتعد معاملة السليلوز بالقواعد (التحلل القاعدي) كهيدروكسيد الصوديوم من أنسب الطرق للحصول على السكريات الأحادية، حيث تعمل المواد القلوية على إزالة اللجنين وأشباه السليلوز، وتعمل على زيادة المساحة

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

السطحية عن طريق الإنتاج وتحوير التركيب البلوري للسليلوز (Peitersen, 1975a and Li , ; 1975 Azzam, 1992 ; Kristensen, 1978)، وقد استعملت بنجاح كمعاملة أولية في إنتاج بروتين أحادي الخلية (George and Ghose, 1983). حيث قام الباحث Peitersen, (1975b) بتنمية الفطر *T. viride* على تبن الشعير المعامل بالقاعدة، وتحصل على بروتين بنسبة 21.25%، كما بينت نتائج التجارب التي قام بها Chahal and Hawksworth, (1976) ; Chahal *et al.*, (1977) ; Chahal and Wang, (1978) أن نسبة البروتين تبلغ 25.4% من الوزن الجاف عند استخدام تبن الشعير غير المعامل مصدراً كربونياً لنمو الفطر *C. cellulolyticum* بينما وصلت إلى 40%عند معاملة تبن الشعير بتراكيز منخفضة من هيدروكسيد الصوديوم، بينما قام الباحثان (1983) George and Ghose, بتنمية الفطر *T. reesei* على تبن الشعير المعامل بالقاعدة وقدرت نسبة البروتين المنتج بحوالي 25.8%.

اقترح هذا البحث لدراسة إمكانية استخدام تبن الشعير في إنتاج بروتين أحادي الخلية.

المواد وطرائق العمل Materials and methods :

أ- المواد:

1. الميكروب المستخدم The microorganism.

استخدم في هذه الدراسة الفطر ***Aspergillus niger*** وتم الحصول عليه من كلية العلوم، جامعة القاهرة، جمهورية مصر العربية. وقد تم حفظه على وسط أجار مستخلص البطاطس والدكستروز **Potato Dextrose Agar (PDA)** داخل أنابيب اختبار بشكل مائل. ويتركب وسط PDA من(جرام/ لتر ماء مقطر):.

Potato, 200; Dextrose, 20; Agar, 15; pH 3.5

2. تنشيط الفطر Activation of the fungus.

تمت إعادة زراعة الفطر كل ثلاثة أسابيع على وسط **Czapek Dox Agar (CDA)** وتتم عملية التحضين عند درجة حرارة 28 $\pm$ 1مْ لمدة أربعة أيام ثم تحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4-7مْ .

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

3. الأوساط الزراعية Culture media.

1.3 وسط Czapek Dox Agar medium .

استخدم الوسط CDA المصنع من قبل شركة Oxoid ,u.k. لحفظ سلالة الفطر المختبرة. ويتركب هذا الوسط من (جرام/ لتر ماء مقطر):.

Sucrose, 30; Sodium nitrate, 3.0; Dipotassium hydrogen phosphate, 1.0 ; Magnesium sulphate, 0.5; Ferrous sulphate, 0.01; Potassium chloride, 0.5; Agar, 20.0; pH 3.5 (Oxoid, 1998)

2.3 وسط ناتج التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير

Alkaline hydrolysis product of barley hay powder medium

استخدم تبن الشعير مادة خاماً، وجفف بشكل جيد ثم قطع إلى أجزاء دقيقة وتم سحقه جيداً ومن ثم حفظ المسحوق في أكياس بلاستيكية صغيرة الحجم معقمة في مكان بارد إلى حين الاستخدام.

أجرى التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير باستخدام تراكيز مختلفة من هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) وهي 3 و4 و5 و6% وعند درجات حرارة مختلفة (40 و 60 و 80 و 100مْ) ولفترات زمنية متباينة (20 و 40 و 60 دقيقة) وذلك لإيجاد أفضل معاملة للحصول على أعلى تركيز سكري من ناتج التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير.

لغرض تحضير لتر واحد من هذا الوسط يحتوي على تركيز 10% سكر تم وزن 102.5جم من مسحوق تبن الشعير وأضيف إليه 1000 مل هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 6% ، ثم خلط المزيج جيداً ووضع في حمام مائي (Water Bath) عند درجة حرارة 40مْ لمدة 20 دقيقة (أفضل معاملة)، ثم رشح المحلول باستخدام الشاش، وأخذ الراشح ودعم ببعض المغذيات وهي (كبريتات الأمونيوم، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، كبريتات الماغنسيوم المائية، كلوريد الصوديوم، كلوريد الكالسيوم) وبمعدل (5.0 ، 1.0 ، 0.5 ، 0.1، 0.1 جم/لتر) على التوالي. ضبط تركيز أيون الهيدروجين للمحلول عند 6.5 باستخدام محلول 1 عياري حمض الهيدروكلوريك ومحلول 1 عياري هيدروكسيد الصوديوم وذلك باستخدام جهاز قياس تركيز أيون الهيدروجين.

ب- طرائق العمل Methods.

1. تحديد الكتلة الحيوية Biomass determination:

قدرت الكتلة الحيوية المنتجة خلال تجارب الدراسة بعد انتهاء مدة الحضانة المقررة وذلك بسحب الدوارق من الحضانة، وتم فصل الكتلة الحيوية بالترشيح وباستخدام أوراق ترشيح جافة موزونة

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

مسبقاً، ثم جففت بوضع الغزل الفطري المعزول مع أوراق الترشيح في فرن كهربائي (Oven) عند درجة حرارة 70مْ ولمدة 24 ساعة، وقدرت الكتلة الحيوية بدقة وذلك بفارق الوزن بين الكتلتين وباستخدام ميزان حساس.

2. تحديد نسبة السكر الأولى والمتبقي:

Determination of initial and residual sugar concentration

قدرت كمية السكر الأولى والمتبقية في وسط ناتج التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير باستخدام طريقة **Dubois *et al.*, (1956)** كما يلي:

1- أخذ 0.05 مل من المستخلص في أنبوبة اختبار جافة ونظيفة، وأكمل إلى 2 مل بالماء المقطر.

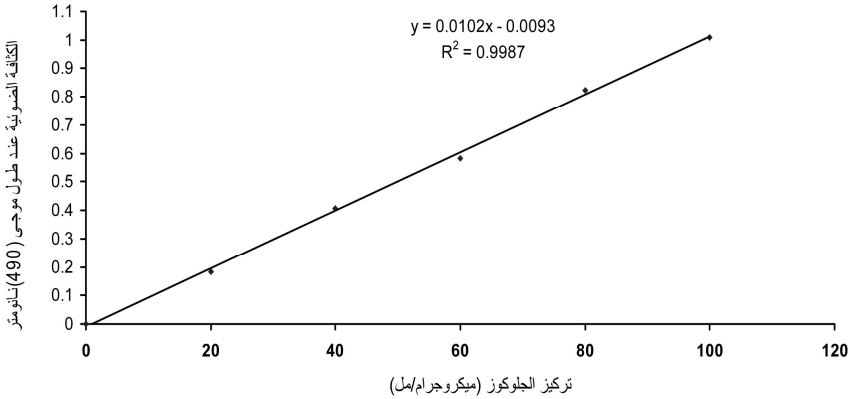
2- أضيف 1 مل من محلول الفينول الأبيض تركيزه 5%.

3- أضيف5 مل من حمض الكبريتيك المركز بواسطة مضخة ساحبة، ودفع الحامض على شكل تيار سريع على سطح المحلول داخل أنبوبة اختبار ليحدث خلط جيد.

4- تركت الأنابيب لمدة 10 دقائق في سكون، ثم رجت رجاً جيداً قبل وضعها في حمام مائي عند درجة حرارة 25-30مْ لمدة 20 دقيقة قبل أخذ القراءات، وظل اللون ثابتاً لعدة ساعات.

5- سجلت القراءات بواسطة جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) عند طول موجي 490 نانومتر.تم حساب تركيز السكر بالاعتماد على المنحنى القياسي شكل(1)، والمحضر باستخدام عدة تراكيز مختلفة من سكر الجلوكوز10-100 ميكروجرام/ مل. أضيف إلى كل تركيز 1 مل من محلول الفينول الأبيض تركيز 5% و5 مل من حمض الكبريتيك المركز، ثم وضعت في حمام مائي درجة حرارته 25-30مْ لمدة 20 دقيقة، ومن ثم قدرت الكثافة الضوئية Optical Density (O. D.) لكل تركيز بواسطة جهاز المطياف الضوئي. تم تقدير كمية السكر المتبقي في وسط التخمر بعد انتهاء كل تجربة وفصل الكتلة الحيوية للفطر وذلك باستخدام الطريقة السابقة.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.



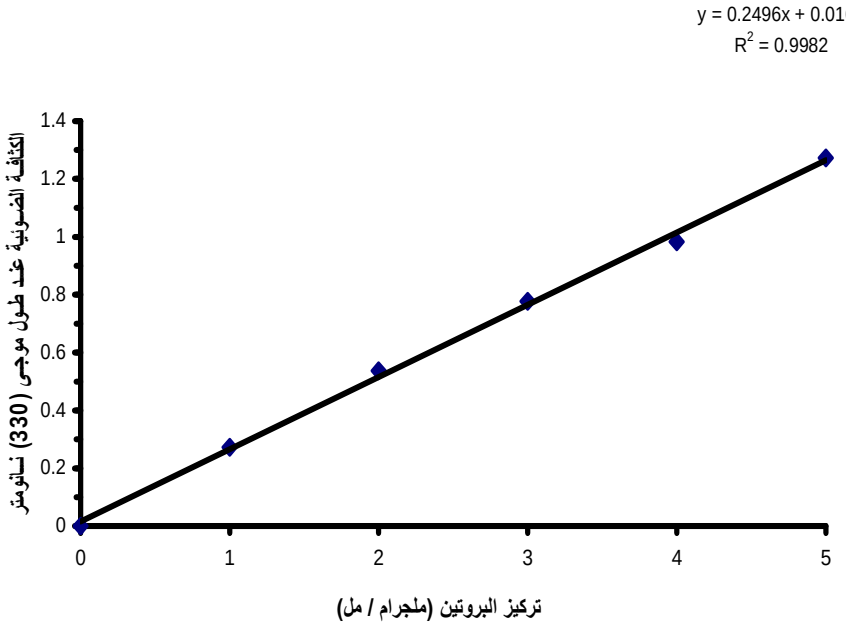
شكل (1) المنحنى القياسي لسكر الجلوكوز

3. تحديد المحتوى البروتيني Determination of protein content :

قُدّر المحتوى البروتيني الناتج من الفطر ***A.niger*** بالاعتماد على طريقة **Bailey, (1967)** وهي على النحو الآتي:

بعد عملية تجفيف الكتلة الحيوية للفطر عند درجة حرارة 70مْ لمدة 24 ساعة، أخذ 0.1 جم من الوزن الجاف ووضع في أنبوبة اختبار جافة ونظيفة وأضيف إليه 10 مل من محلول 1 عياري هيدروكسيد الصوديوم بمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة، ثم رجت الأنابيب بشكل جيد وتركت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة مع الرج من حين إلى آخر، وذلك لفصل البروتين من خلايا الفطر الجاف وإذابته .تم فصل البروتين في هيدروكسيد الصوديوم عن بقايا الفطر باستخدام جهاز الطرد المركزي (Desk Centrifuge) وبسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة. أخذ 1 مل من المحلول وأضيف إليه 3 مل من محلول 1 عياري هيدروكسيد الصوديوم و0.2 مل محلول بندكت، رجت الأنابيب بشكل جيد وتركت في درجة حرارة المعمل لمدة 15 دقيقة، ثم بعدها تم قياس الكثافة الضوئية للمحلول عند طول موجي 330 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي، وتم حساب تركيز البروتين بالاعتماد على المنحنى القياسي للبروتين باستخدام زلال البيض (Albumin-Bovin) الذي تم تحضيره بتراكيز مختلفة تتراوح بين 0.01,0.05 ملجرام/ مل. وأجريت الخطوات السابقة السالفة الذكر نفسها للحصول على المنحنى القياسي شكل (2).

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.



شكل (2) المنحنى القياسي للبروتين Albumin bovln

4. تحديد المحتوى الكيميائي التقريبي لمسحوق تبن الشعير:

The proper determination of chemical component of barley hay powder

تم إجراء تحديد المحتوى الكيميائي التقريبي لمسحوق تبن الشعير وذلك بمعامل التحليل الخاصة باللجنة الشعبية العامة للتفتيش والرقابة على الأغذية بمصراتة، وأجريت التحاليل بالاعتماد على الطرق القياسية (AOAC, 1984)، وهي تشمل:

1.4 تقدير المحتوى النيتروجيني لمسحوق تبن الشعير.

Estimation of nitrogen percentage for barley hay powder

قدرالمحتوى النيتروجيني لمسحوق تبن الشعير باستخدام طريقة Macro-kjeldahl

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

2.4 تقدير المحتوى البروتيني لمسحوق تبن الشعير.

Estimation of protein percentage for barley hay powder

تم تقدير المحتوى البروتيني بضرب المحتوى النيتروجيني المقدر بالطريقة السابقة في العامل 6.25.

3.4 تقدير نسبة الرطوبة.

Estimation of moisture percentage

قدرت نسبة الرطوبة حسب الطريقة التي وصفها الأبيض وأحمد، (1993) بأخذ 5 جم من مسحوق تبن الشعير في طبق خزفي، ثم جففت في فرن تجفيف كهربائي عند درجة حرارة 105مْ إلى أن وصلت إلى وزن ثابت، ومن الفرق بين الوزنين أمكن حساب كمية الرطوبة، وبالتالي نسبتها المئوية حسب المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة الرطوبة} = \frac{\text{الفرق في الوزن}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

4.4 تقدير نسبة الرماد.

Estimation of ash percentage

قدرت نسبة الرماد حسب الطريقة التي وصفها الأبيض وأحمد، (1993) بوزن 5 جم من مسحوق تبن الشعير في طبق خزفي سعته حوالي 50 مليلتر، ثم سخن الطبق عند درجة حرارة 100مْ حتى طرد ما به من ماء ثم أضيفت بضع قطرات من زيت الزيتون وسخن الطبق على لهب إلى أن وقف انتفاخ المحتويات، بعد ذلك نقل الطبق إلى فرن احتراق حيث تمت عملية الاحتراق عند درجة حرارة 525مْ وتم الحصول على رماد أبيض ثم بلل الرماد ببضع قطرات من الماء المقطر، ثم جفف على حمام مائي وأعيد حرقه في فرن الاحتراق ثانية عند درجة حرارة 525مْ أيضاً كررت عملية الاحتراق والتجفيف والوزن إلى أن تم الحصول على وزن ثابت، ومن ذلك أمكن حساب النسبة المئوية للرماد الكلي حسب المعادلة الآتية:

$$\text{نسبة الرماد} = \frac{\text{وزن الرماد}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

5. التجـــارب Experiments:

1.5 التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير.

تهدف هذه التجربة إلى الحصول على أعلى نسبة للسكر من خلال إجراء تحليل لمـــسحوق تـــبن الشعير وذلك باستخدام هيدروكسيد الصوديوم بالتراكيز (3 و 4 و 5 و 6%) ودرجات حرارة مختلفة (40 و 60 و 80 و100مْ) وفترات زمنية متباينة (20 و 40 و 60 دقيقة). أخذ 0.5 جم من مسحوق تبن الشعير،وأضيف إليه 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم باستخدام تـــأثير التراكيـــز والمعـــاملات المذكورة أعلاه، ثم رشح المحلول باستخدام ورق الترشيح، وغسلت بقايا المسحوق بقليل من المـــاء المقطر وذلك لاستخلاص معظم السكريات من المسحوق وتم استكمال حجم المحلول بالماء المقطر إلى حجم قياسي معلوم. باستخدام طريقة (**Dubois *et al* ., (1956** قدرت نسبة السكر كما ذكر سابقاً، وبهذا تمت عملية تحديد الظروف المثلى للحصول على أعلى نسبة من السكر من خـــلال اســـتخدام المعاملات المذكورة.

2.5 تأثير الفترات الزمنية المختلفة للتحضين على نمو الفطر *A.niger* وإنتاج البروتين.

تهدف هذه التجربة إلى تحديد أفضل فترة زمنية لغرض إنتاج أعلى كمية من البروتين وأفضل نمو للفطر، حيث تم تلقيح الدوارق المخروطية سعة 250 مل والتي تحتوي كل واحدة منها على 50 مـــل من وسط ناتج التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير بلقاح الفطر، ووضعت في الحضانة عند درجـــة 28±1مْ، وبمعدل ثلاث مكررات لكل فترة زمنية. رفعت المكررات بشكل عشوائي بعد 3 و 5 و 7 و 14 و 21 يوم من تلقيح الوسط الغذائي بالفطر، وتم تقدير الكتلة الحيوية للفطر وكميـــة البـــروتين ونسبته، ونسبة السكر المتبقى وتركيز أيون الهيدروجين النهائي بعد كل فترة زمنية.

3.5 تأثير درجات مختلفة من تركيز أيون الهيدروجين الابتدائي علـــى نمـــو الفطـــر وإنتـــاج البروتين.

تم إجراء هذه التجربة وباقي التجارب التالية اعتماداً على الفترة الزمنية التي أعطت أعلى كميـــة من البروتين، كما تهدف هذه التجربة إلى تحديد أفضل تركيز لأيون الهيدروجين لنمو الفطر وأعلـــى إنتاج لبروتين أحادي الخلية، حيث استخدمت درجات مختلفة من الرقم الهيدروجيني وهي على التوالي 5 و5.5 و6 و6.5 و7 بمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة. تم ضبط تركيز أيون الهيدروجين باستخدام محلول 1 عياري من هيدروكسيد الصوديوم ومحلول 1 عياري من حمض الهيـــدروكلوريك. لقحـــت الدوارق المخروطية المحتوية على 50 مل من وسط ناتج التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير بلقاح الفطر، ووضعت في الحاضنة الساكنة عند درجة حرارة 28 ±1مْ، واستمرت التجربة لمـــدة أربعـــة

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

عشر يوماً داخل الحضانة، ومن ثم سحبت جميع الدوارق وأجريت عليها جميع التحاليل من تقدير للكتلة الحيوية وكمية البروتين ونسبة السكر المتبقي وتركيز أيون الهيدروجين النهائي.

التحليل الإحصائي Statistical Analysis :

استخدم في تجربة التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير الاختبار الإحصائي لتحليل التباين في ثلاثة اتجاهات Three way analysis variance عند مستوى معنوية α=0.05، حيث صممت التجربة على أساس تأثير ثلاثة عوامل (تركيز القاعدة، ودرجة الحرارة، والفترة الزمنية) على مسحوق تبن الشعير، أمّا بقية التجارب فقد استخدم فيها التحليل الإحصائي لتحليل التباين في اتجاه واحد ONE WAY ANOVA عند مستوى معنويα=0.05 ، كما استخدم في جميع التجارب اختبار "Duncan" للفصل بين المتوسطات لكل معاملة عند مستوى معنوي α=0.05 (الساهوكي ووهيب، 1990).

أجرى التحليل الإحصائي لجميع التجارب بواسطة البرنامج الإحصائي Statistical Package of Social Science (SPSS) الإصدار (13).

النتائج Results :

1. المحتوى الكيميائي التقريبي لمسحوق تبن الشعير:

يبين الجدول (1) النسبة المئوية لبعض مكونات مسحوق تبن الشعير.

2. التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير القاعدي:

في هذه التجربة تمت معاملة مسحوق تبن الشعير بتراكيز مختلفة من المحلول القاعدي هيدروكسيد الصوديوم وبدرجات حرارة مختلفة ولفترات زمنية مختلفة أيضاً؛ وذلك لتحديد الظروف المثلى لعملية التحلل والحصول على أعلى نسبة من السكريات الذائبة، ومن خلال النتائج المبينة في الجدول (2) والأشكال(3 – 6) تبين أن هناك علاقة طردية بين تراكيز هيدروكسيد الصوديوم ونسبة السكريات الناتجة، حيث سجلت أعلى نسبة للسكريات (10.25%) عند تركيز 6% ،عندما تمت المعاملة بدرجة حرارة 40مْ ولمدة زمنية بلغت 20 دقيقة وبفارق معنوي عالٍ جداً ($P < 0.01$) عن التراكيز 5 و4 و3 % على التوالي، كما أظهرت النتائج أن لدرجة الحرارة تأثيراً عكسياً حيث تناقصت النسبة المئوية للسكر عند درجة الحرارة 60 ، 80 ، 100مْ عند المعاملة في زمن قدره 20 دقيقة مقارنة بما تم عند درجة الحرارة 40مْ، حيث بلغت (9.53 ، 9.03 ، 9.37) على التوالي، وبالتحليل الإحصائي وجد أن هناك فرقاً معنوياً عالياً جداً ($P < 0.01$) بين المعاملة عند درجة حرارة 40مْ وباقي المعاملات.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

ومن خلال ما سبق يتضح أنّ أفضل نسبة للسكريات الناتجة من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير هي 10.25 % ، وكان ذلك عند استخدام هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 6% عند درجة حرارة 40مْ ولمدة 20 دقيقة.

الجدول (1) المحتوى الكيميائي التقريبي لبعض مكونات مسحوق تبن الشعير

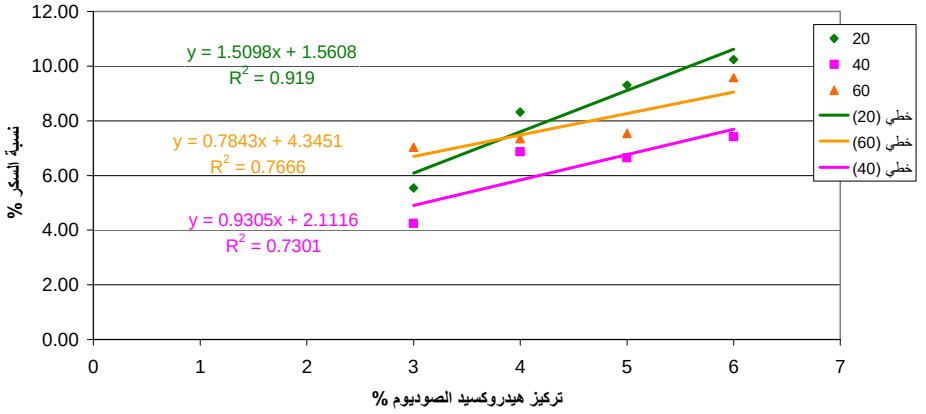
المكونات	النسبة المئوية (%)
المحتوى النيتروجيني	0.54
المحتوى البروتيني	3.4
الرطوبة	6.4
الرماد	6.53
الصوديوم	3.08
الكالسيوم	0.61

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

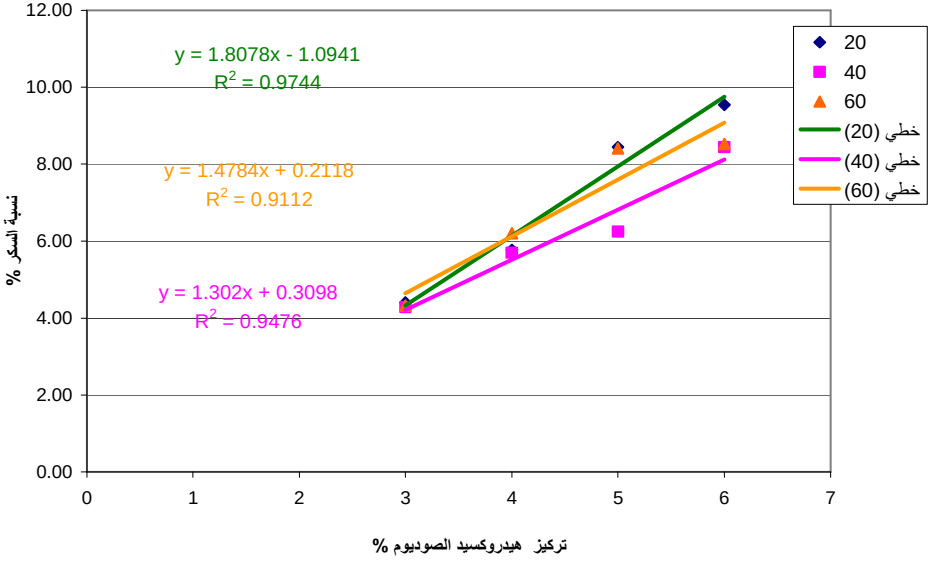
الجدول (2) النسبة المئوية للسكر الناتج من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير.

درجات الحرارة	40مْ			60مْ			80مْ			100مْ		
الزمن بالدقائق / التركيز%	20	40	60	20	40	60	20	40	60	20	40	60
3	5.53 0.32±	4.25 0.04 ±	6.70 0.24 ±	4.43 0.20 ±	4.30 0.10 ±	4.31 0.23 ±	7.20 0.98 ±	7.37 0.15 ±	7.49 0.06 ±	4.68 0.07 ±	5.36 0.24 ±	4.78 0.38 ±
4	8.34 0.40 ±	6.10 1.58 ±	7.33 0.39 ±	5.76 0.49 ±	5.69 0.19 ±	6.20 0.32 ±	7.24 0.13 ±	5.65 0.29 ±	5.53 0.16 ±	6.09 0.58 ±	6.77 0.38 ±	5.82 0.17 ±
5	9.29 0.49 ±	6.65 0.10 ±	7.53 0.19 ±	8.43 0.36 ±	6.23 0.68 ±	8.40 0.44 ±	8.08 0.51 ±	6.81 0.82 ±	9.18 1.003 ±	5.93 0.26 ±	9.10 0.52 ±	6.74 0.72 ±
6	10.25 0.34 ±	7.44 0.33 ±	9.58 0.47 ±	9.53 0.26 ±	8.43 0.35 ±	8.51 0.72 ±	9.03 0.08 ±	8.09 0.59 ±	9.31 0.30 ±	9.37 0.36 ±	7.74 0.59 ±	9.23 0.12 ±

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

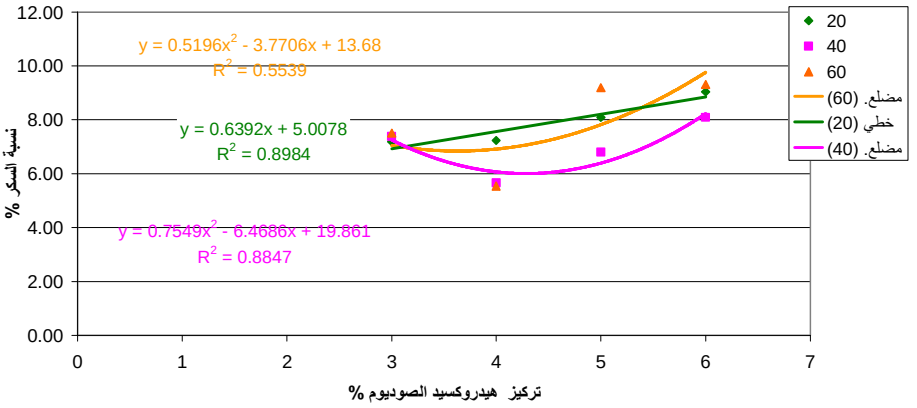


شكل (3) النسبة المئوية للسكر في الناتج من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير عند درجة حرارة 40 مْ

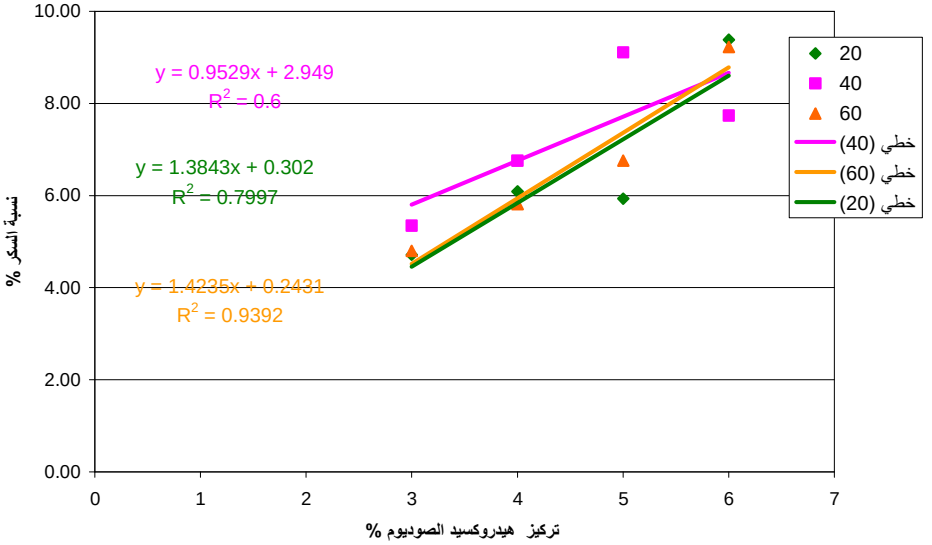


شكل (4) النسبة المئوية للسكر في الناتج من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير عند درجة حرارة 60 مْ

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.



شكل (5) النسبة المئوية للسكر في الناتج من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير عند درجة حرارة 80 مْ



شكل (6) النسبة المئوية للسكر في الناتج من التحلل القاعدي لمسحوق تبن الشعير عند درجة حرارة 100 مْ

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

3. تأثير الفترات الزمنية المختلفة للتحضين على نمو الفطر وإنتاج البروتين:

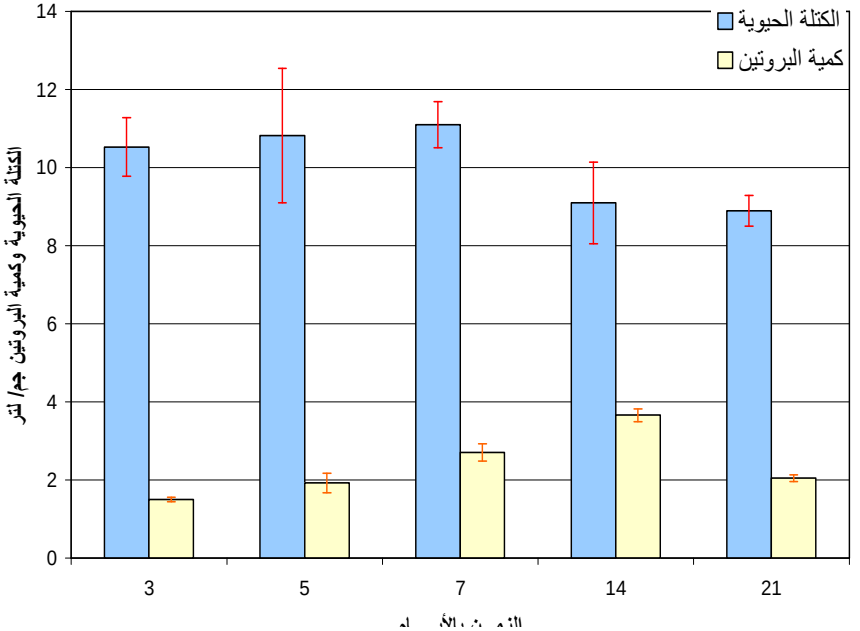
صممت هذه التجربة لتحديد الفترة الزمنية للحضانة المناسبة لنمو الفطر وإنتاج البروتين، ومن خلال النتائج المبينة في الجدول 3 والشكل 7 تبيّن أن نمو الفطر يتناسب طردياً مع زيادة الفترة الزمنية للحضانة حتى اليوم السابع، حيث بلغ نمو الفطر 11.10 جم/لتر، ومن ثَم تحولت العلاقة إلى عكسية، حيث لوحظ انخفاض في وزن الكتلة الحيوية بعد اليوم السابع، فقد أظهر الاختبار الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين متوسطات الكتلة الحيوية في جميع الفترات الزمنية للحضانة، كما بّينت النتائج أيضاً أن كمية البروتين تتناسب طردياً مع زيادة الفترة الزمنية للتحضين حتى اليوم الرابع عشر، حيث بلغ معدل إنتاج البروتين 3.66 جم/لتر وقدر بحوالي 39.07% من الوزن الجاف للكتلة الحيوية، ومن ثم انخفضت كمية البروتين في اليوم الحادي والعشرين إلى 2.05 جم/لتر. وقد أظهر الاختبار وجود فروق معنوية عالية جداً ($P < 0.01$) بين متوسطات كمية البروتين ونسبته في جميع الفترات الزمنية باستثناء فترات التحضين (5 و21 يوماً)، حيث لا توجد بينهما فروق معنوية لكمية البروتين، كمالا توجد فروق معنوية لنسبة البروتين بين فترتي التحضين 3 و5 أيام وكذلك الفترتين 7 و21 يوماً، لا توجد فروق معنوية لنسبة البروتين بين فترتي الحضانة (3 و5 أيام) وكذلك الفترتين (7 و21 يوماً)، أمّا فيما يتعلق بنسبة السكر المتبقي فقد أظهرت النتائج أن معدل استهلاك السكر يتناسب طردياً مع معدل نمو الفطر، حيث وصلت نسبة السكر المتبقي لأفضل معاملة إلى حوالي (2.21%)، فأظهر الاختبار الإحصائي وجود فروق معنوية عالية جداً ($P < 0.01$) لنسبة السكر المتبقي بين فترة الحضانة 21 يوماً وبقية فترات الحضانة، بينما لاتوجد فروق معنوية بين فترات الحضانة (3 و 5 و7 و14 يوماً). وعند قياس تركيز أيون الهيدروجين النهائي لوحظ ارتفاع قليل في جميع فترات الحضانة،فقد وصل الـ pH النهائي لأفضل معاملة إلى (6.18) مقارنة بالـ pH الابتدائية (6.00)، حيث أظهر الاختبار عدم وجود فروق معنوية بين متوسطات تركيز أيون الهيدروجين في جميع الفترات الزمنية للتحضين.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

الجدول (3) تأثير الفترات الزمنية المختلفة للتحضين على نمو الفطر وإنتاج البروتين

الفـــترة الزمنية بالأيام	الكتلة الحيوية جم / لتر	كمية البروتين جم/ لتر	نسبة البروتين %	نسبة السكر المتبقي %	تركيز أيون الهيدروجين (pH) النهائي
3	10.53 ± 0.75	1.50 ± 0.06	14.26 a ± 0.53	2.05 ± 0.12	6.11 ± 0.15
5	10.82 ± 1.73	1.92 ± 0.25	16.92 ab ± 0.71	1.88 ± 0.05	6.42 ± 0.16
7	11.10 ± 0.59	2.70 ± 0.22	24.45 ce ± 3.05	1.80 ± 0.06	6.35 ± 0.18
14	9.09 ± 1.05	3.66 ± 0.16	39.07 d ± 3.45	2.21 ± 0.47	6.18 ± 0.17
21	8.89 ± 0.39	2.05 ± 0.09	23.03 be ± 0.45	2.75 ± 0.08	6.15 ± 0.01

المتوسطات المتبوعة بحرف متشابه أو أكثر ليس بينها فروق معنوية باستخدام اختبار Duncan عند مستوى الثقة 5%



شكل (7) تأثير الفترات الزمنية المختلفة للتحضين على نمو الفطر وإنتاج البروتين

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

4. تأثير درجات مختلفة من تركيز أيون الهيدروجين الابتدائي pH على نمو الفطر وإنتاج البروتين:

يعد أيون الهيدروجين من العوامل المهمة لنمو الفطريات؛ حيث يمتاز كل فطر بمدى معين من تركيز أيون الهيدروجين الذي من خلاله يعطي أفضل نمو وإنتاج البروتين أحادي الخلية، وقد تبين من خلال الجدول (4) والشكل (8) أن معدل نمو الفطر وإنتاج البروتين يتناسب طردياً مع الزيادة في تركيز أيون الهيدروجين إلى أن يصل إلى 6.5، حيث بلغ الوزن الجاف للكتلة الحيوية للفطر 9.44جم/لتر وكمية البروتين 3.73 جم/لتر التي قدرت بنسبة 39.51% من الوزن الجاف، ومع ارتفاع الرقم الهيدروجيني عن 6.5 يبدأ نمو الفطر وإنتاج البروتين بالانخفاض، أي أنّ العلاقة تصبح عكسية حيث أظهرت نتائج الاختبار الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين متوسطات جميع الأرقام الهيدروجينية لكل من الكتلة الحيوية وكمية البروتين ونسبته.

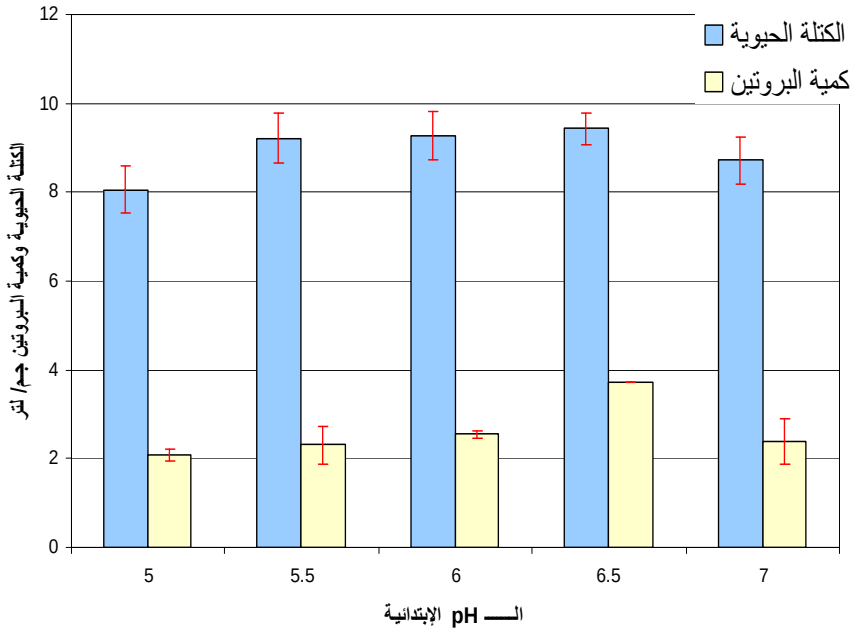
كما أوضحت النتائج أنّ معدل استهلاك السكر يتناسب طردياً مع زيادة الرقم الهيدروجيني، حيث وصلت نسبة السكر المتبقي لأفضل معاملة إلى حوالي 1.76 % ، فقد أظهر الاختبار وجود فروق معنوية عالية جداً ($P < 0.01$) لنسبة السكر المتبقي بين تركيز أيون الهيدروجين 6.5 والتراكيز الهيدروجينية 5 و 5.5 و 6 و 7، بينما لا توجد فروق معنوية بين تركيز أيون الهيدروجين (5.5 و6)، وبين 5.5 و 5 و 7.

أمّا فيما يتعلق بتركيز أيون الهيدروجين النهائي فقد لوحظ أنّ هناك انخفاضاً في تركيز أيون الهيدروجين النهائي في جميع المعاملات، حيث بلغ الـ pH النهائي لأفضل معاملة 5.64، وقد بيّن الاختبار الإحصائي وجود فروق معنوية عالية جداً ($P < 0.01$) بين متوسطات جميع التراكيز الهيدروجينية، باستثناء التراكيز الهيدروجينية 6 و6.5 و7 حيث لا توجد بينها فروق معنوية.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

الجدول (4) تأثير درجات مختلفة من تركيز أيون الهيدروجين الابتدائي (pH) على نمو الفطر وإنتاج البروتين

تركيز أيون الهيدروجين الابتدائي (pH)	الكتلة الحيوية جم / لتر	كمية البروتين جم / لتر	نسبة البروتين %	نسبة السكر المتبقي %	تركيز أيون الهيدروجين النهائي (pH)
5	8.06 ± 0.54	2.08 ± 0.13	25.92 ± 3.11	2.41 ± 0.23	4.93 ± 0.02
5.5	9.22 ± 0.58	2.31 ± 0.42	25.05 ± 5.31	2.16 ± 0.08	5.15 ± 0.13
6	9.27 ± 0.55	2.54 ± 0.09	27.50 ± 1.24	2.07 ± 0.19	5.77 ± 0.05
6.5	9.44 ± 0.36	3.73 ± 0.003	39.51 ± 0.003	1.76 ± 0.11	5.64 ± 0.04
7	8.71 ± 0.52	2.39 ± 0.51	27.27 ± 4.32	2.37 ± 0.02	5.69 ± 0.03



شكل (8) تأثير درجات مختلفة من تركيز أبون الهيدروجين الابتدائي (pH) على نمو الفطر وإنتاج البروتين

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

المناقشة Discussion :

يتضح من خلال أنّه بزيادة تركيز هيدروكسيد الصوديوم من 3 إلى 0.06 % تزداد نسبة السكريات المستخلصة من مسحوق تبن الشعير، وتتطابق هذه النتائج مع ما توصل إليه زوبي، (2005) عندما استخدم هيدروكسيد الأمونيوم بتراكيز 5.5 و6 و6.5 و7 لمعاملة مخلفات صناعة عصير التمر، ولقد بيّن الباحثان Carrizales and Saenz, (1986) أنّ استخدام محاليل قاعدية مخففة يؤدى إلى استخلاص أكبر كمية من السكريات عند معاملة مخلفات قصب السكر.

كما يتضح من النتائج أنّ لدرجة الحرارة تأثيراً عكسياً على نسبة السكريات الناتجة، وتتطابق هذه النتيجة مع ما توصل إليها زوبى، (2005) حيث تحصل على أعلى نسبة من السكريات عند درجة حرارة 40مْ.

كما بيّنت النتائج أنّ استخدام الفترات الزمنية العالية له انعكاس سلبي على معدل استخلاص السكريات، وتتطبق هذه النتائج مع ما توصل إليه Vazquez *et al*., (1993) ; Hatakka *et al*., (1976) ; بوزعكوك، (2002) حيث أكدوا أنّ الزيادة في الفترة الزمنية لمثل هذه المعاملات يؤدي إلى ظهور مواد كيميائية سامة مثل الفورفورال، والتي ينتج عنها إعاقة لعمليات التخمر من خلال التأثير على ظروف التجربة.

وعند دراسة تأثير الفترات الزمنية المناسبة لإنتاج البروتين بواسطة الفطر *A.niger* تبين أنّ الفطر ينتج أعلي كمية من البروتين بعد أربعة عشر يوماً من التحضين وعند درجة حرارة 28±1مْ، وبعد ذلك يقل إنتاج البروتين، وقد يعزى السبب في النقص التدريجي للبروتين المنتج بعد هذه الفترة من التحضين إلى نفاذ المصدر النيتروجيني في الوسط الغذائي، مما يؤدي إلى تحلل البروتين الذي تنتجه إنزيمات البروتينيز Protinase ، كما أن توقف النمو بعد اليوم الرابع عشر من التحضين قد يعود إلى نفاذ المصدر الكربوني، أو نتيجة للتغير في الرقم الهيدروجيني للوسط الغذائي، ممّا يؤدي إلى تراكم بعض المواد الكيميائية الضارة الناتجة من التفاعلات الأيضية للفطر. وتبدو هذه الدراسة مطابقة للنتائج التي توصل إليها (Abdul-Nour, 1984)، وتقارب هذه النتيجة ما جاء به Gibriel *et al*., (1981) عند دراستهم إنتاج بروتين أحادي الخلية من مسحوق نخالة القمح بواسطة الفطر *A. niger* و*A. terreus* ، حيث تبين أن أفضل فترة زمنية لإنتاج البروتين هو اليوم الخامس عشر من التحضين؛ وتتعارض هذه النتيجة مع ما توصل إليه Garg and Neelakantan, (1982) من أنّ أفضل فترة حضانة لإنتاج البروتين بواسطة الفطر *A. terreus* هي بعد أربعة أيام، كما تتعارض هذه النتيجة مع ما توصل إليه Anupama and Ravindra, (2001) من أنّ أفضل فترة تحضين لإنتاج

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

البروتين بواسطة الفطر *A. niger* هي بعد ثمانية أيام. وقد ترجع هذه الاختلافات إلى الاختلاف في نوع السلالة المستخدمة أو إلى نسبة السكريات والمغذيات الأخرى المضافة للوسط، وكذلك طبيعة التحضين.

وعند دراسة تأثير تركيز أيون الهيدروجين pH على نمو الفطر وإنتاج البروتين، تبيّن من خلال النتائج أن الرقم الهيدروجيني 6.5 هو أفضل تركيز لأيون الهيدروجين لنمو الفطر وإنتاج البروتين، وتتعارض هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Litchfield, 1979) بأنّ درجة الـ pH المثلى لنمو الفطر *A. niger* هي 3.4، كما تتعارض هذه النتيجة أيضاً مع ما جاء به Kuzmanova *et al.*, (1989) بأنّ أفضل نمو للفطر *A. niger* وإنتاج البروتين كان عند ال pH 5 ، وتفسير ذلك ما لوحظ من أنه هناك اختلافاً في الرقم الهيدروجيني الابتدائي لكل جنس أو نوع وحتى السلالة من أجل نمو أحسن وأيضاً فعّال (دنحا، والخزرجي، 1990).

Abstract:

Growth of *Aspergillus niger* on barley hay medium was studied by using standard methods for determination of dry biomass and total crude protein. Basic hydrolysis of the plant was done by using different concentrations of sodium hydroxide under different periods of incubation and different temperatures. The highest amount of sugars (10.25%) was achieved when 6% of NaOH was used for the treatment for 20 min, at 40 ˚c.

The highest amount of crude protein was reached after fourteen days of incubation with initial pH 6.5 .

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

المراجع

المراجع العربية:

1- الأبيض، يوسف عمرو وأحمد، عاشور أحمد (1993). دليل مختبرات الأغذية، طرابلس، ليبيا.

2- البصام، رعد (1996). التقنية الحياتية. دار الكندي للنشر والتوزيع، إربد، الأردن.

3- التارقي، زينب هارون محمد (2006). التكنولوجيا الحيوية والصناعات الغذائية. دار الكتب الوطنية، بنغازي، ليبيا.

4- الساهوكي، مدحت ووهيب، كريمة محمد (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر، الموصل، العراق.

5- بوزعكوك، إسماعيل حسين (2002). التحلل الحامضي لنبات القصبة *Phragmites australis* لإنتاج بروتين أحادي الخلية بواسطة الخميرة *Candida utilis* رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة قاريونس، بنغازي، ليبيا.

6- دنحا، رياض فرنيسو والخزرجي، طالب عويد (1990). تغذية وعلم وظائف الفطريات، مطابع جامعة الموصل، العراق.

7- زوبي، وفاء سالم (2005). إنتاج بروتين أحادي الخلية من نواتج التحلل القاعدي لمسحوق مخلفات صناعة عصير التمر بواسطة الفطر *Fusarium graminearum* رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة قاريونس، بنغازي، ليبيا.

8- محمد، عطا الله سعيد و الحبابي، عبد الكريم ناصر(1989).الأسس العلمية لتغذية الدجاج. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، كلية الزراعة.

9- مسعود، سميح و وناده، الطيب (1983). المشروع العربي المشترك لإنتاج بروتين أحادي الخلية، جدواه الفنية الاقتصادية، وقائع الندوة العالمية لإنتاج بروتين أحادي الخلية من المشتقات الهيدروكربونية لتغذية الحيوانات، الجزائر.

المراجع الأجنبية:

1-**Abdul nour, A. B.** (1984): Single cell protein production from cellulose waste. National committee for biological science. Sep.29th-4th Oct.

2-**AOAC,** (1984): Official methods of analysis. 14th edn. Association of official analytical chemists, Washington, DC.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

3-**Arora, D. D.; Mukerji, K. G. and Marth, E. H.** (1991): Handbook of applied mycology . Banaras Hind University. India.

4-**Azzam, A. M.** (1992): Pretreatment of agrocellulosic waste for microbial biomass production with defined mixed culture. J. of Environ. Sci. Engineering, A. 27 (7) : 1643-1654.

5-**Bailey, J. L.** (1967): Techniques in protein chemistry . 2nd ed., Elsevier Puplishing company, USA.

6- **Carrizales, V. and Saenz, D.** (1986): Protein enrichment of sugar cane pith using semisolid culture of *Chaetomium cellulolyticum*. Acta Cient. Venez., 37: 580-586.

7-**Chahal, D. S. and Hawksworth, D. L.** (1976): *Chaetomium cellulolyticum*, a new thermotolerant and cellulolytic *chaetomium*. Mycologia, 68 : 600-610.

8-**Chahal, D. S.; Swan, J. E. and Moo-Young, M.** (1977): Cellulase and protein production by *Chaetomium cellulolyticum* on wheat straw. Dev. Ind. Microbiol., 18 : 442-443.

9-**Chahal, D. S. and Wang, D. I. C.** (1978): *Chaetomium cellulolyticum* growth and behaviour on cellulose and protein production. Mycologia, 70 : 160-170.

10-**Cooney, C. L.; Wang, D. I. C.; Gordon, J. and Jimincz, M.** (1978):Simultaneous cellulose hydrolysis and ethanol production by a cellulolytic anaerobic bacteria . Biotech. Bioeng. Symp., 8 : 103.

11-**Cowling, E. B. and Kirk, T. K.** (1975): Properties of cellulose and ligno-cellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotech. Bioeng. Symp., 6 : 95-123.

12-**Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Robers, P. A. and Smith, F.** (1956): Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. J. Analyt. Chem., 28 : 350-356.

13-**Finkelstein, D. B.; Hershberger, C. L.; Queener, S. and Hegeman, G.** (1989): Protein secretion in *Aspergillus niger*, Genetics and molecular biology of industrial microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, DC.

14-**Forage, A. J.** (1977): Economic benefits of by- product utilization in animal feeding systems in developing countries : The production of single cell protein from agricultural wastes, New feed resources proceedings of atechnical on sultation held in Rome, FAO, Roma.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

15-**Garg , S. K. and Neelakantan , S.** (1982): Bioconversion of sugar cane bagasse for cellulose enzyme and microbial protein production. J. of Fd. Technol, 17 : 271-279.

16-**George, U. and Ghose, T. K.** (1983): Bioconversion of rice straw into improved fodder for cattle, The use of organic residues in rural communities. The United Nations University, Tokyo, Japan.

17-**Gibriel, A. Y.; Mahmoud, R. M.; Goma, M. and Abou-Zied, M.** (1981): Production of single cell protein from cereal by-products. Agri . Wastes, 3 : 229-240.

18-**Hatakka, E. A.; Mustranta, A. and Nybergh, P.** (1976): Acid hydrolysis of sunflower seed husks for production of single cell protein. Eur. J. Appl. Microbiol., 2(3) :163-173.

19-**Humphrey, A. E.; Morieira, A.; Armiger, W. and Zadriskie, D.** (1977): Production of single cell protein from cellulose wastes. Biotech. Bioeng. Symp., 7 : 45-64.

20-**Khan, M. Y., Dahot, M. U. and Khan, M. Y.** (1992): Single cell protein production by *Penicillium javanicum* from pretreated rice husk. J. of Islamic Academy of Sci., 5(1) : 39-43.

21-**Kristensen, T. P.** (1978): Continuous single cell protein production from *Cellulomonas sp* and *Candida utilis* grow in mixture on barley straw. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 5 (3) : 155-163.

22-**Kuzmanova, S.; Dimitrovski, A.; Vandeska, E. and Doneva, D.** (1989): Utilization of group waste by a two step cultivation of mould and yeast. Microbiology Skopj, Yugoslavia, 26 :159-164.

23-**Li, H. C.** (1975): Microbial proteins produced from pith. II. Effect of mixed cultures (of *Cellulomonas* and *Candida utilis*) on the production of single cell protein from bagasse pith. Rep. Taiwan Sugar Res. Inst., 67 : 37-51.

24-**Litchfield, J. H.** (1979): Production of single cell protein for use in food or feed, in microbial technology (peppler, H. J. and perlman, D., eds.). Academic Press, New York

25-**Peitersen, N.** (1975a)**:** Cellulase and protein production from mixed cultures of *Trichoderma viride* and a yeast. Biotechnol. Bioeng. Symp., XVII : 1291-1299.

26-**Peitersen, N.** (1975b): Production of cellulose and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 17 : 361-374.

27-**Rao, M.; Mishra, C.; Keskar, S. and Srinivasan, M. C**. (1985): Production of ethanol from wood and agricultural residues by *Neurospora crassa*. Enzyme Microb. Technol., 7 : 625-628.

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.

28-**Ravinder, R.; Rao, L. V. and Ravindra, P**. (2003): Studies on *Aspergillus oryzae* mutants for the production of single cell proteins from deoiled rice bran. Food Technol. Biotechnol., 41(3) : 243-246.

29-**Reed, G. and Nagodawithana, T. W.** (1995). Biotechnology enzymes, biomass, food and feed, Bibliographic (Citation), Germany, (9) : 168-235.

30-**Singh, A.; Abidi, A. B.; Agrawal, A. K. and Darmwal, N. S.** (1991): Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its Evaluation. Zentralblatt- Fuer- Microbiologie. 146(3) : 181-184.

31-**Vazquez, D.; Lage, M. A.; Parajo, J. C. and Alonso, J. L.** (1993): Evaluation of microorganisms for production of single –cell-protein. Alimentaria, 244 : 99-104.

32-**Yigitoglu, M.** (1992): Production of citric acid by fungi. J. Islam. Acad. Sci., 5: 100-106

Please purchase 'e-PDF Converter and Creator' on http://www.e-pdfconverter.com to remove this message.