شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۷، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
صفحات ۱۲-۱

تولید پروتئین و چربی تک‌یاخته حاصل از کشت تلفیقی مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در پساب حاصل از کارخانه تولید آردماهی کیلکا (استیک واتر)

حمیده امیراسدی موالو[۱]، سید ولی حسینی[۲*]، مهرداد فرهنگی [۲]، محمد علی نعمت الهی[۳]، کامران رضایی توابع[۲]

۱. فارغ التحصیل دکتری، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، ایران
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، ایران
۳. استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران ، کرج، ایران دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۱

چکیده

تولید استیک‌واتر به‌عنوان پساب کارخانه‌های تولید آرد ماهی یکی از مشکلات این صنایع است که در صورت رهاسازی در طبیعت می‌تواند مشکلات زیست‌محیطی فراوانی ایجاد نماید. با این حال پساب مذکور به‌دلیل وجود مواد آلی فراوان می‌تواند مادهٔ اولیهٔ مناسبی برای تولید مواد با ارزش افزودهٔ بالا مانند پروتئین و چربی‌های تک‌یاخته‌ای باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی تولید پروتئین و چربی تک‌یاخته‌ای و کاهش میزان بار آلی (پروتئین و چربی) از پساب کارخانهٔ تولید آرد ماهی کیلکا (استیک‌واتر) از طریق کشت ناپیوسته (Batch culture) مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* انجام شد. پنج تیمار با نسبت‌های مختلف مخمر و قارچ در محیط استیک واتر تهیه و برای بررسی زی‌توده از روش شمارش سلولی استفاده شد. همچنین میزان روغن و پروتئین باقی‌مانده در پساب پس از تخمیر بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی تحلیل شد. نتایج نشان داد که مخمر به‌عنوان میکروارگانیسم شاخص از نظر ذخیرهٔ چربی قابلیت رشد بالاتری روی پساب در مقایسه با قارچ به‌عنوان میکروارگانیسم ذخیره‌کنندهٔ پروتئین در مدت ۱۲۰ ساعت را دارد ($P<۰/۰۵$) و در زمان کوتاه‌تری قادر به تولید زی‌تودهٔ میکروبی خواهد گردید. همچنین مشخص شد که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* در کشت انفرادی قابلیت رشد بالاتر و کاهش روغن بیشتری از پساب را دارد. نتایج نشان داد در کشت تلفیقی (۷۵ درصد مخمر-۲۵ درصد قارچ) توانایی میزان پروتئین باقی‌مانده بیشتر از سایر تیمارها کاهش داشت. در مجموع مخمر مورد پژوهش چه در کشت انفرادی و چه در کشت تلفیقی توانایی رشد و حذف مواد آلی بیشتری را نسبت به قارچ از خود نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که استیک‌واتر قابلیت استفاده به‌منظور تولید پروتئین و چربی‌های تک‌یاخته‌ای را دارد و با استفاده از میکروارگانیسم‌ها می‌توان تا حدی از بار مواد آلی موجود در پساب را کاهش داد.

واژگان کلیدی: مخمر، قارچ، استیک‌واتر، پروتئین چربی تک یاخته

* نویسنده مسئول: سید ولی حسینی
Email: hosseini.seyedvali@gmail.com

Journal of Fisheries
Vol. 77, No. 1, Spring 2024
pp. 1-12

Production of Singl Cell Proteine and Singl Cell Oil from the co- culture of *Yarrowia lipolytica* yeast and *Aspergillus niger* fungus in the effluent from Kilka (Stick water) fishmeal production plant

Hamideh Amirasadi mavaloo[1], Seyed Vali Hosseini[2*], Mehrdad Farhangi[2], Mohammad Ali Nematollahi[3], Kamran Rezaei Tavabe[2]

1. Ph. D graduate, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 27-Jul-2023 **Accepted: 11-Jan-2024**

Abstract

From an environmental point of view, one of the major problems of the fish meal industry is discharges of stickwater (SW), an intermediate product from pressing process of fish meal, which is rich in organic matter and nutrients and can be used as a substrare for Recovery and valorization such as single cell protein and lipid. In this study, *Yarrowia lipolytica* and *Aspergillus niger* were used to produce single cell protein (SCP) and single cell oil (SCO) using Kilka stick water as the source of medium. The pattern of the yeast and fungus growth was studied by plate count method. Also the amount of remaining oil and remaining protein was analyzed for values of total protein, and total lipid. Data was analyzed by randomized complete block design and the results showed that yeast, as a fat-storing microorganism, had a higher ability to grow on SW, compared to protein-storing fungus within 120 hrs and produced more microbial biomass in a shorter time. 100% yeast treatment had the highest SW lipid reduction rate (more than 50%, equivalant to 21.7 mg/L) in 120 hrs, while 100% fungus treatment showed the lowest rate. Regarding SW protein reduction, 75% yeast-25% fungus treatment had the highest rate. Overally, *Yarrowia lipolytica* in single culture had the highest growth and SCO production and 75% yeast-25% fungus mixed culture treatment had the highest SCP production. Based on the results obtained from this study, application of pure Kilka stick water is suitable for production of SCP and SCO and reduction of its organic matter as wastewater.

Key words: Yeast, Fungus, Single cell protein, Single cell oil

* Corresponding author: Seyed Vali Hosseini Email: hosseini.seyedvali@gmail.com

۱. مقدمه

پساب تولیدی حاصل از صنایع فرآوری انواع آبزیان، حاوی آلاینده‌های مختلفی به اشکال کلوئیدی، محلول و ذرات معلق در اندازه‌های متفاوت و با حجم زیاد است که مشکلات فراوانی را برای محیط‌زیست ایجاد می‌نمایند (Wang *et al*., 2004). آرد ماهی[1] یکی از محصولات کارخانه‌های فرآوری آبزیان است که با پختن و آسیاب کردن ماهی کامل و یا اجزاء آن‌ها با حرارت‌دهی تا حدود ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌منظور کاهش مقدار آب و تغلیظ روغن از مواد خام تهیه و با درصدهای مختلف در تولید خوراک دام، طیور و آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bechtel, 2005). در خط تولید آرد ماهی کیلکا سه نوع محصول شامل آرد ماهی، روغن ماهی و آب ماهی تغلیظ‌شده یا استیک‌واتر[2] به‌دست می‌آید. در فرآیند تولید آرد ماهی به‌ازای هر ۱۰۰۰ کیلوگرم ماهی کیلکا ۵۰۰ لیتر استیک‌واتر تولید می‌شود (Pordeli *et al*., 2011). در برخی کارخانه‌ها تولید آرد ماهی که دستگاه دکانتر در اختیار دارند استیک‌واتر تولیدی، تغلیظ و مجدد در ترکیب آرد ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد که باعث افزایش کیفیت آرد ماهی می‌گردد، با این حال در مراکز تولید آرد ماهی از ماهی کیلکا اغلب از این دستگاه استفاده نمی‌شود. از طرفی، با رها شدن استیک‌واتر در محیط اطراف کارخانه‌های تولید آرد ماهی مشکلات زیست‌محیطی فراوانی به‌وجود آمده و باعث فعال شدن میکروب‌های پروتئولیتیک و ایجاد بوی بد و زننده می‌گردد. بار مواد آلی به‌خصوص چربی و پروتئین استیک‌واتر بسیار زیاد است و این نوع پساب‌ها بایستی قبل از ورود به رودخانه‌های محلی، از طریق تأسیسات تصفیه‌ای پالایش گردند. در حال حاضر چندین روش فرآوری شامل روش‌های فیزیکو-شیمیایی برای تیمار استیک‌واتر وجود دارد، اما هرکدام با مشکلاتی همراهند. به‌علاوه، تبخیر استیک‌واتر باعث تولید مادهٔ چسبناکی می‌شود که مدیریت آن بسیار مشکل است و در هنگام خروج از لوله‌ها آن‌ها را مسدود می‌کند (Sifuentes *et al*., 2011). یکی از روش‌های مؤثر در تیمار استیک‌واتر، تیمار زیستی است که منجر به تولید محصولات با ارزش افزودهٔ بالا از جمله پروتئین و چربی‌های تک‌یاخته‌ای می‌گردد.

پروتئین تک یاخته‌ای (SCP)[3] و یا چربی تک‌یاخته‌ای (SCO)[4] به سلول‌ها یا ترکیبات پروتئین و چربی استخراج شده از سلول‌های میکروارگانیسم‌ها (باکتری، جلبک، قارچ، مخمر) اطلاق می‌شود که می‌توانند مورد مصارف خوراکی برای انسان، دام، طیور و آبزیان قرار گیرند (Sharif *et al*., 2021). محدودهٔ وسیعی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید SCP و SCI با استفاده از منابع ارزان قیمت، پساب‌ها و پسماندها را دارند.

گونهٔ *Yarrowia lipolytica* یک مخمر روغنی[5] و به‌شدت هوازی است. این مخمر می‌تواند چربی‌ها را به‌صورت درون‌سلولی (بیش از ۵۰ درصد وزن خود) ذخیره کند (Azin *et al*., 2022). این گونه دارای کاربردهای زیستی فراوانی از جمله توان تولید سوخت است. از مخمر *لیپولتیک* به‌عنوان یک مخمر مدل، برای تخریب بستر آبگریز و تغلیظ چربی‌ها استفاده شده است (Beopoulos *et al*., 2009). در تصفیهٔ زیستی پساب کنسرو ماهی‌های روغنی آب شور نشان داده شده است که از ۵۰/۲ درصد پروتئین و چربی حاصل از زی‌تودهٔ مخمر، ۱۶/۵ درصد آن مربوط به اسیدهای آمینه ضروری است. همچنین اسید لینولنیک و اسید ایکوزاپنتانوئیک به‌عنوان اسیدهای چرب ضروری امگا ۳ و اسید لینولئیک به‌عنوان اسید چرب امگا ۶ ضروری در پروفایل اسیدهای چرب آن مشاهده شده است (Azin *et al*., 2022).

قارچ *Aspergillus niger* نیز یکی از مهمترین

[1] Fish meal
[2] Stick water
[3] Singl Cell Proteine
[4] Singl Cell Oil
[5] Oleaginous

قارچ‌های رشته‌ای هوازی است که سال‌ها از آن به‌عنوان پروتئین تک‌یاخته‌ای برای تبدیل زیستی و تصفیهٔ زباله استفاده شده است و بسیاری از آنزیم‌های مفید با استفاده از تخمیر صنعتی توسط این قارچ تولید می‌شوند (Schuster *et al*., 2002). در مطالعات اخیر نشان داده شده است که برای تولید پروتیین تک‌یاخته با استفاده از سبوس برنج به‌عنوان بستر، تلقیح قارچ باعث افزایش میزان پروتئین‌خام در محتوای پروتئین به‌دست آمده از سبوس برنج خواهد شد و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* بالاترین میزان پروتئین خام (۱۰/۶۳ درصد) را در مقایسه با هشت قارچ دیگر تلقیح شده از خود نشان داده است (Valentino *et al*., 2016).

پساب صنایع فرآوری آبزیان از جمله استیک‌واتر به‌لحاظ بار مواد آلی بالا یکی از بسترهای جذاب برای تولید این محصولات است (Kam *et al*., 2012). نتایج مطالعهٔ کشت قارچ *Aspergillus niger* و باکتری *Lactobacillus acidophilus* روی استیک‌واتر نشان داد که قارچ مربوطه بسیار سریع‌تر از باکتری مذکور رشد کرده و نیاز اکسیژن شیمیایی (COD) را با سرعت بیشتری کاهش می‌دهد. این کاهش در مورد *L. acidophilus*، ۸۵/۶ درصد و در مورد *A. niger*، ۹۷/۹ درصد بود (Kam *et al*., 2012). همچنین مقادیر متوسط گزارش شده از کاهش COD توسط مخمر *Candida utilis* (۹۵-۹۰٪) در مقایسه با مخمر *Trichoderma viride* WEBL0702 (۶۵/۷٪) روی پساب کارخانه کنسرو آناناس و پساب کارخانهٔ شراب‌سازی بیشتر بود (Zhang *et al*., 2008). در مطالعهٔ دیگری کاهش ۸۰ درصدی COD توسط *Kluyveromyces marxianus* CBS65560 روی منبع کنسانترهٔ آب‌پنیر شیرین و ترش بدون پروتئین به‌عنوان سوبسترا گزارش شده است (Schultz *et al*., 2006). مطالعه‌ای با هدف بررسی پتانسیل مخمر روغنی *Yarrowia lipolytica* برای تصفیهٔ زیستی پساب کنسرو ماهی‌های روغنی و شور جهت ارزیابی ویژگی‌های زی‌تودهٔ مخمر برای تولید بیودیزل و مکمل خوراک دام انجام شد. کشت این گونه در پساب باعث کاهش ۸۵ درصدی COD در طی ۷ روز گردید. به‌علاوه، سایر شاخص‌ها شامل اکسیژن مورد نیاز زیستی (۵۹٪)، نیترات (۵۱٪)، سولفیت (۵۰٪)، کل مواد جامد معلق (۸۵٪)، سختی کل (۱۵/۶٪)، روغن (۶۸/۲٪) و فسفر کل (۹۱٪) در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Azin *et al*., 2022).

کشت‌های تلفیقی برای تولید پروتئین‌های تک‌یاخته‌ای در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند، زیرا می‌توان آن‌ها را برای ویژگی‌ها و عملکردهای خاص که جهت کاربردهای صنعتی مانند تخمیر، زیست‌پالایی و تولید سوخت‌های زیستی مفید هستند، غربال کرد. کشت‌های مخلوط همچنین هنگام تلاش برای تفکیک دگرگونی‌های شیمیایی حاصل از متابولیسم میکروبی بسیار مفیدند (Garcia, 2016). دانشمندان کشف کردند که باکتری‌ها می‌توانند از طریق اتصالات غشایی به سلول‌های باکتری دیگر متصل شوند. نتایج مذکور نشان داد که باکتری‌ها می‌توانند از این اتصالات برای تغییر مواد مغذی در میان سلول‌های متصل استفاده کرده و در نتیجه به توزیع عملکردهای متابولیکی در جوامع میکروبی کمک کنند (Pande *et al*., 2015). کشت مخلوط دو باکتری *Rhodocyclus gelatinosus* و *Rhodobacter sphaeroides* عملاً برای تولید SCP[1] از ضایعات کاساوا عملکرد بالایی را نشان داد (Noparatnaraporn *et al*., 1987).

استیک‌واتر کارخانه‌های تولید آرد ماهی در ایران نیز مشکلات فراوانی را برای صاحبان این صنعت و محیط‌زیست ایجاد نموده است. همچنین تولید پروتئین‌ها و چربی‌های تک‌یاخته‌ای از طریق کاهش بار آلی این پساب می‌تواند چشم‌انداز روشنی در راستای تولید محصولات با ارزش افزوده در کنار پالایش محیط‌زیست باشد. بنابراین پژوهش حاضر در نظر دارد تا با استفاده از پروتئین‌های تک‌یاخته‌ای استیک‌واتر حاصل از یکی از کارخانه‌های آرد ماهی در کشور را به‌گونه‌ای اصلاح نماید تا از اثرات مضر زیست‌محیطی آن بکاهد.

[1] Single-cell protein

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. محل انجام آزمایش

این مطالعه به روش کشت تلفیقی با تلقیح میکروارگانیسم در استیک‌واتر (به‌عنوان محیط کشت) کارخانهٔ آرد ماهی کیلکا شرکت به‌دانه واقع در استان مازندران و شهرستان بابلسر(شهرک صنعتی میرود) انجام شد.

۲.۲. روش کار و تیمارها

۲۰ لیتر از پساب درون بطری‌های آب در جعبه‌های حاوی یخ برای خنک نگه‌داشتن به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان آماده‌سازی میکروارگانیسم‌ها و کشت میکروبی در فریزر در دمای ۱۸- سانتی‌گراد نگهداری شد شد و از روش Bath culture برای تولید میکروارگانیسم‌ها در مقیاس آزمایشگاهی استفاده گردید. (Sifuentes *et al*., 2011). کشت‌های میکروبی به روش طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در پنج تیمار و سه تکرار به‌صورت کشت مخمر ۱۰۰ درصد (تیمار۱)، قارچ ۱۰۰ درصد (تیمار۲) و ترکیب مخمر ۵۰ درصد–قارچ ۵۰ درصد (تیمار۳)، مخمر ۲۵ درصد–قارچ ۷۵ درصد (تیمار۴) و مخمر ۷۵ درصد–قارچ ۲۵ درصد (تیمار۵) روی استیک‌واتر به‌عنوان محیط‌کشت انجام شد. استیک‌واتر در داخل ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری به مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید (Kam *et al*., 2012). میزان چربی و پروتئین‌خام پساب به روش استاندارد (AOCA2002) اندازه‌گیری شد. به‌منظور تهیهٔ پیش‌کشت ابتدا مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* و *آسپرژیلوس نایجر* در محیط PDA کشت داده شدند. مخمر به‌مدت ۴۸ ساعت و قارچ ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شده و سپس در محیط PDB پیش کشت آماده‌سازی شد. به‌منظور گرماگذاری از دستگاه لرزاننده با دور ۱۶۰ rpm و دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ روز استفاده گردید (Azin *et al*., 2022). در ادامه در هر تیمار از محیط مایع قارچ و مخمر به‌میزان ۵ درصد تلقیح به‌صورت استریل انجام و به‌مدت ۵ روز روی دستگاه لرزاننده با دور ۱۶۰ rpm در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد (Azin *et al*., 2022).

۳.۲. شمارش سلولی و تعیین ترکیب بیوشیمیایی نمونه‌ها

هر ۲۴ ساعت مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محیط جهت انجام تعیین شمارش سلولی، سنجش چربی و پروتئین باقی‌مانده در پساب به‌صورت استریل نمونه‌برداری گردید. به‌منظور تعیین تعداد مخمر و قارچ از روش پلیت‌کانت (رقت سلولی) در محیط کشت PDA استفاده گردید (Feldsine *et al*., 2002). به‌منظور سنجش میزان روغن کل باقی‌مانده از روش استخراج با حلال استفاده شد (Siddiquee & Rohani, 2011). اندازه‌گیری میزان پروتئین‌خام به روش برادفورد انجام و به‌منظور رسم منحنی استاندارد از رقت‌های سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان یک پروتئین شاخص استفاده شد (Harlow and Lane 2006).

۴.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تحلیل داده‌ها از تجزیه واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر[1] استفاده شد. شاخص‌های مخمر، قارچ و یا ترکیبی از این دو به‌عنوان عامل بین فردی[2] و شاخص زمان به‌عنوان عامل درون فردی[3] بودند. از بسته ezANOVA برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار R و برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح عامل بین فردی از آزمون توکی استفاده شد (α= ۰/۰۵).

[1] Repeated-measures ANOVA
[2] Between-subject factors
[3] Within-subject factor

۳. نتایج

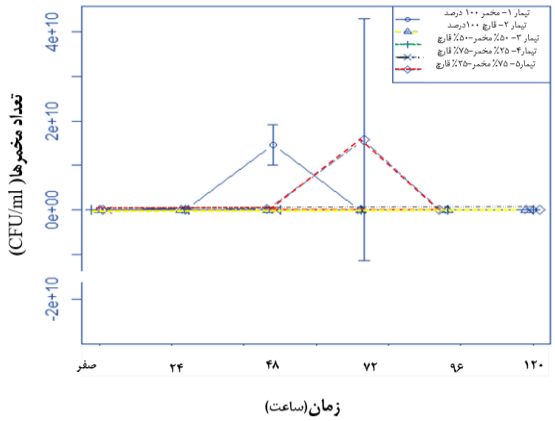
۱.۳. بررسی زی‌توده از طریق شمارش سلولی

نتایج بررسی زی‌توده و روند رشد سلولی در تیمارهای آزمایشی در ادامه ارائه شده است.

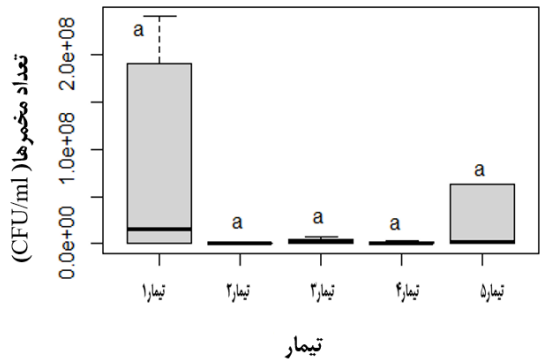
۲.۳. رشد مخمر

بیشترین میزان رشد مخمر در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت، در تیمارهای مخمر ۱۰۰ درصد (۶۸۷۵۰ برابر تعداد اولیهٔ سلول‌ها) و تیمار ترکیبی ۷۵ درصد مخمر-۲۵ درصد قارچ (۱۳۷۵ برابر تعداد اولیهٔ سلول‌ها) اتفاق افتاد (شکل ۱). با این وجود، در ارزیابی نتایج رشد سلولی مخمر در پساب بین تیمارها و زمان اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر مقدار مخمر وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۱. نمودار تغییرات در تعداد مخمر در تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف.

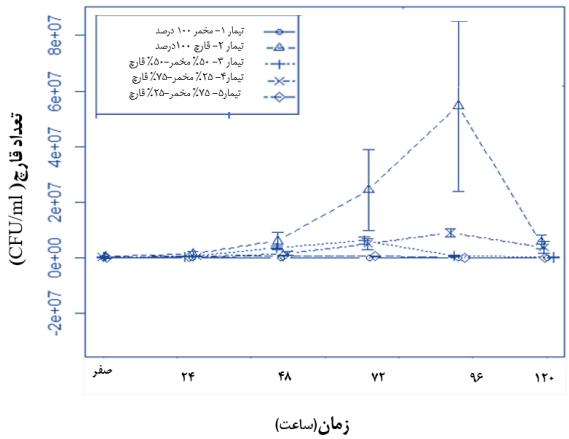


شکل ۲. نمودار تعداد مخمرها در تیمارهای مختلف در پایان آزمایش.

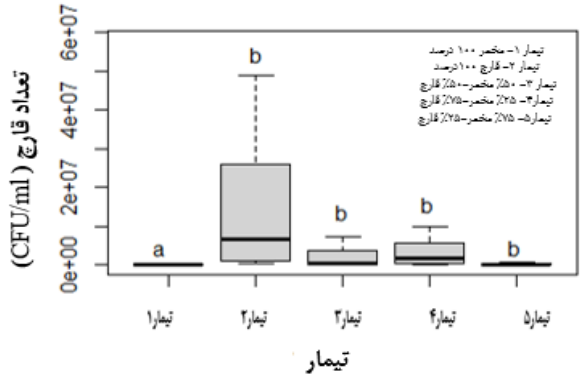
شمارش قارچ در تیمار قارچ ۱۰۰ درصد بیشترین تغییرات را نشان داد (شکل ۳). بدین‌صورت که از زمان صفر تا ۹۶ ساعت روند صعودی (۹۵/۳ برابر تعداد اولیهٔ سلولی) و پس از آن روند نزولی را نشان داد. سایر تیمارها تغییرات زمانی چشمگیری را نشان ندادند. در ارزیابی نتایج رشد سلولی قارچ در پساب بین تیمارها و زمان اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای

آزمایش از نظر تعداد قارچ وجود داشت و تیمار مخمر ۱۰۰ درصد تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳. روند تغییرات در تعداد فارچ در تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف.



شکل ۴. مقایسهٔ تعداد فارچ در تیمارهای مختلف.

۳.۳. بررسی تغییرات روغن و پروتئین در استیک‌واتر

۱.۳.۳. تغییرات مقدار روغن باقی‌مانده

تمام تیمارها روند نزولی در مقدار روغن باقی‌مانده را نشان دادند (شکل ۵). مقدار روغن در نمونهٔ اولیه ۴۰ گرم در لیتر در زمان صفر بود. بیشترین میزان افت مقدار روغن باقی‌مانده در تیمار مخمر ۱۰۰ درصد (۱۸/۳ گرم در لیتر در زمان ۱۲۰) و کمترین میزان کاهش آن در تیمار قارچ ۱۰۰ درصد (۳۳/۲۲ گرم در لیتر درزمان ۱۲۰) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین مقدار روغن باقی‌مانده در پساب بین تیمارها و زمان‌های مختلف مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

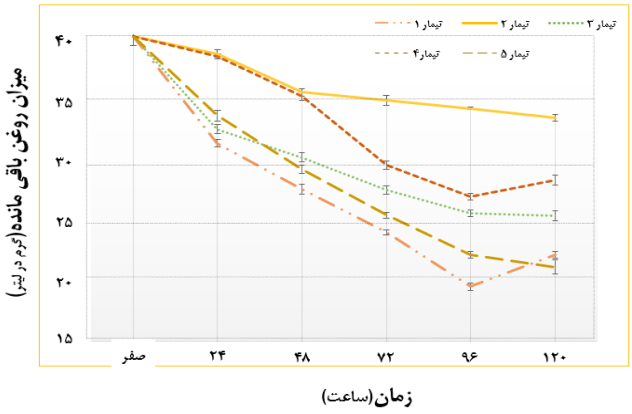
نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر مقدار روغن باقی‌مانده وجود داشت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۶. **نمودار**). بیشترین مقدار روغن در تیمار مخمر ۱۰۰ و کمترین آن در قارچ ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف از نظر مقدار روغن باقی‌مانده وجود داشت ($P<۰/۰۵$) (شکل ۶). بیشترین مقدار روغن در تیمار مخمر ۱۰۰ و کمترین آن در قارچ ۱۰۰ درصد مشاهده شد.

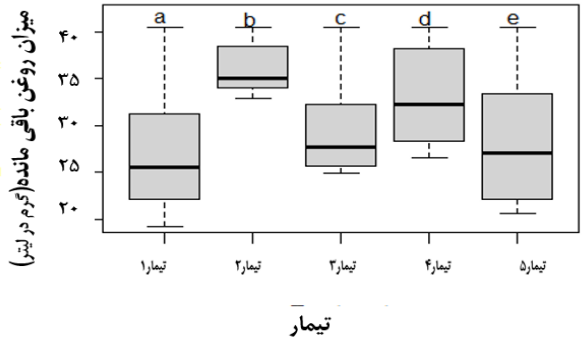
۲.۳.۳. تغییرات مقدار پروتئین باقی‌مانده

مقدار پروتئین باقی‌مانده در کلیهٔ تیمارها (به‌جز تیمار

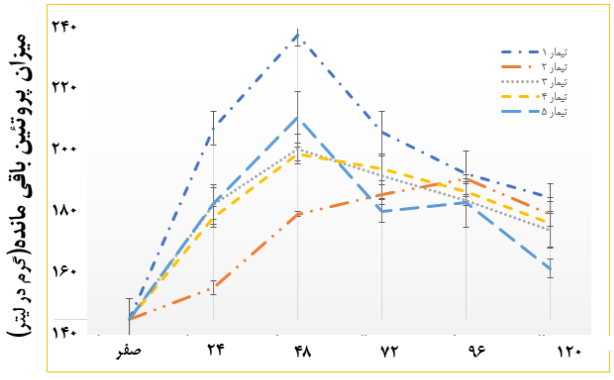
قارچ ۱۰۰ درصد) از زمان صفر (۱۴۵/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تا ۴۸ ساعت روند صعودی و پس از آن روند نزولی نشان داد (شکل ۷). در تیمار قارچ ۱۰۰ درصد روند صعودی تا زمان ۹۶ ساعت ادامه یافت. از میان تیمارها، مخمر ۱۰۰ درصد به بالاترین غلظت رسید (۲۳۷/۷۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و تیمار ۷۵ درصد مخمر–۲۵ درصد قارچ بیشتری کاهش پروتئین در زمان ۱۲۰ ساعت (۱۶۱/۷۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را نشان داد. نتایج میزان پروتئین باقی‌مانده در پساب بیانگر این بود که بین تیمارها و زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$).



شکل ۵. نمودار روند تغییرات مقدار روغن باقی‌مانده در تیمارهای مختلف در زمان‌های مختلف.

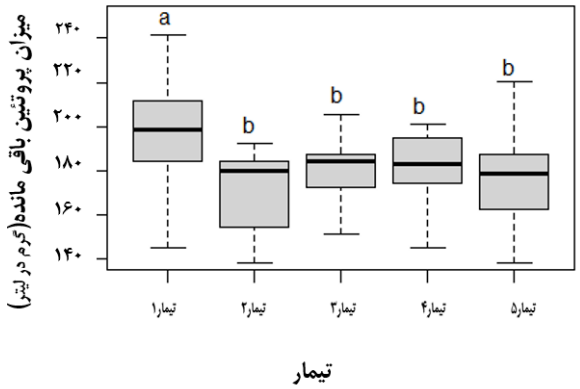


شکل ۶. نمودار مقایسهٔ مقدار روغن باقیمانده در تیمارهای مختلف.



شکل ۷. نمودار روند تغییرات در مقدار پروتئین باقی‌مانده در پساب تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف.

شواهد حاکی از این بود که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر مقدار پروتئین باقی‌مانده وجود داشت ($P<۰/۰۵$). (شکل ۸). بدین‌صورت که مقدار پروتئین باقی‌مانده در تیمار مخمر ۱۰۰ درصد تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت.



شکل ۸. نمودار مقایسهٔ مقدار پروتئین باقی‌مانده در تیمارهای مختلف.

۴. بحث

با افزایش تولید پروتئین از منابع گوشت و لبنیات همچنان تقاضای رو به رشد پروتئین به‌طور پایدار برآورده نشده و نیاز به راه‌حل‌های جدیدی در این زمینه احساس می‌شود (Boland, 2013). تولید پروتئین از میکروارگانیسم‌ها و استفاده از آن‌ها به‌عنوان غذا می‌تواند یک راه‌حل و جایگزین مناسبی برای پروتئین ماهی و سویا باشد (Bratosin, 2021). پساب‌هایی مانند استیک‌واتر یکی از سوبستراهای غنی از مواد آلی برای تولید پروتئین و چربی تک‌یاخته‌ای محسوب می شوند و در عین حال اثرات مضر و مخرب روی زیست‌بوم و محیط‌زیست (در صورت رهاسازی بی‌ضابطه به محیط‌زیست) دارند و نیازمند صرف انرژی بالایی‌اند (Yang, 2005). پژوهش حاضر نشان داد که مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* (تا ۶۸۷۵۰ برابر تعداد اولیهٔ سلول در محیط‌کشت) و قارچ *آسپرژیلوس نایجر* (تا ۹۵/۳ برابر تعداد اولیهٔ سلول در محیط‌کشت) توانایی رشد در محیط استیک‌واتر را داشته و در مدت زمان کمی می‌توانند میزان بالایی پروتئین و یا چربی تک‌یاخته‌ای تولید نمایند، البته در این بین مخمر توانایی بیشتری از خود نشان داد. این قابلیت حتی در زمان کشت ترکیبی نیز مشاهده شده و این مخمر قابلیت استفاده از محیط و تولید بالای سلولی را در زمان کم (۴۸ ساعت) و حتی در شرایط رقابتی داراست. همچنین قارچ مذکور در شرایط کشت انفرادی در زمان بیشتری (۹۶ ساعت) قابلیت تولید داشت که البته این میزان بسیار کمتر از رشد زی‌توده و تولید مخمر بود. همچنین جذب روغن و پروتئین پساب توسط این دو میکروارگانیسم نشان داد که مخمر توانایی بالاتری در کشت انفرادی داشته و توانست بیش از ۵۰ درصد (از ۴۰ گرم در لیتر به ۱۸/۳ گرم در لیتر) میزان روغن در پساب را کاهش دهد و در تیمار ترکیبی با قارچ نیز بیشترین میزان کاهش پروتئین را داشت که قابلیت بالای این مخمر را در تولید چربی تک‌یاخته‌ای و پالایش پساب حاوی چربی و پروتئین نشان می‌دهد.

در تأیید استفاده از مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* برای کاهش بار مواد آلی پساب‌ها در مطالعات اخیر از *Y. lipolytica* برای تصفیهٔ پساب شستشوی ماهی تن خام و رقیق‌شده در تونس استفاده شده است. پس از ۷ روز انکوباسیون، میزان اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD) و کل کربن آلی به‌ترتیب ۷۵ درصد و ۷۴ درصد در نمونه‌های پساب خام

کاهش یافت (Hamimed *et al*., 2021). در پژوهشی دیگر از مخمر روغنی*Y. lipolytica* EBL13 برای تصفیهٔ زیستی پساب کنسرو ماهی روغنی و ارزیابی ویژگی‌های زی‌تودهٔ مخمر برای بیودیزل و تولید مکمل خوراک دام استفاده شد. مخمر مذکور در پساب باعث کاهش ۸۵ درصدی اکسیژن مورد نیاز شیمیایی در طی ۷ روز شد. به‌علاوه، اکسیژن مورد نیاز زیستی (۵۹٪)، نیترات (۵۱٪)، سولفات (۵۰٪)، مواد جامد معلق (۸۵٪)، سختی کل (۱۵/۶٪)، روغن (۶۸/۲٪) و فسفر کل (۹۱ درصد) نسبت به نمونه‌های تیمار نشده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. با این حال، pH و آمونیاک افزایش یافت. با تولید ۵۰/۲ درصد محتوای سلولی (پروتئین و چربی) حاصل از زی‌توده این مخمر را می‌توان به‌عنوان یک گزینهٔ ایده‌آل برای تصفیهٔ پساب کنسرو ماهی و تولید بیودیزل و مکمل‌های خوراک دام معرفی کرد (Azin *et al*., 2022). پتانسیل‌ها و قابلیت‌های ۱۳۷ سویه مخمر برای تشکیل SCP (پروتئین تک‌سلولی) با کشت آن‌ها بر روی محیط تخمیر، حاوی روغن دیزل به‌عنوان تنها منبع کربن برای انتخاب کارآمدترین جدایه‌های مخمر ارزیابی شد. در بین ۶۷ گونهٔ مورد مطالعه، *Candida tropicalis* و *Yarrowia lipolytica* از نظر میزان تولید SCO[1] روی روغن دیزل (به‌عنوان تنها منبع کربن) کارآمدترین آن‌ها تشخیص داده شدند. حداکثر بازده در ۱۶۸ ساعت برای غلظت روغن دیزل در محدودهٔ ۱۳۰-۴۰ میلی‌لیتر گزارش شد. این پژوهش می‌تواند تأکیدی بر نتایج به‌دست آمده در مورد کاهش روغن در استیک‌واتر در پژوهش حاضر باشد.

همچنین مطالعات روی استیک‌واتر نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر* توان تولید ۴۸/۶۶ درصد پروتئین همزمان با کاهش ۹۷/۷ درصد COD در این پساب را داشته است (Kam *et al*., 2012). همچنین از این قارچ در تولید پروتئین تک‌یاخته‌ای از سوبستراهای مختلفی مانند ضایعات موز (افزایش محتوی پروتئین از ۶ تا ۱۸ درصد) (Baldensperger *et al*., 1985)، تخمیر فیبر در باقی‌مانده سیب‌زمینی (۲۸ درصد محتوای پروتئینی تولید شده (Liu *et al*., 2013)، تولید پروتئین تک سلولی حاوی ۳۰/۴ درصد پروتئین خام از ضایعات ذرت تیمار شده (Singh *et al*., 1991) و تولید زی‌توده از استیک‌واتر (۷/۲۹ گرم درلیتر) (Kam *et al*., 2012)استفاده شده است.

طبق نتایج به‌دست آمده از مطالعات اخیر می‌توان مخمر یاروویا را به‌عنوان یک مخمر با قابلیت رشد بالا و جذب روغن از پساب‌های روغنی معرفی نمود. لازم به ذکر است در خصوص قارچ *آسپرژیلوس* هرچند که در مطالعه حاضر نسبت به مخمر یاروویا کارآیی بالایی از خود نشان نداد، اما در مطالعات گذشته نشان داده شده است که این قارچ از کارآیی بالایی در تولید پروتئین تک‌یاخته‌ای برخوردار بوده و به‌نظر می‌رسد به‌دلیل رشد کند این قارچ بهتر است تا در دوره‌های زمانی طولانی‌تری مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین رشد کند قارچ نسبت به مخمر می‌تواند عامل کاهش کارآیی قارچ نسبت به مخمر در تولید زی‌توده و حذف مواد آلی باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج کلی پژوهش حاضر نشان داد که استیک واتر قابلیت استفاده جهت تولید پروتئین و چربی تک‌یاخته را داشته و می‌توان با استفاده از میکروارگانیسم‌های چربی‌دوست مانند *Yarrowia lipolytica* میزان قابل توجهی بایومس میکروبی و چربی تک یاخته تولید نمود و از بار آلودگی این پساب کاست. همچنین مشاهده شدکه کشت‌های تلفیقی می‌توانند در افزایش تولید پروتئین و چربی تک‌یاخته مؤثر باشند هر چند که بایستی ترکیب میکروارگانیسم‌های بیشتری بر روی استیک واتر آزمایش گردد تا نتایج واضح‌تری به‌دست آید. میزان بالای مواد آلی در استیک واتر باعث می‌شود تا میکروارگانیسم‌ها یا موجودات تک‌سلولی کارایی کامل و صد درصد در پالایش این محیط نداشته باشند و رشد آن‌ها دچار محدودیت

[1] Singl Cell Oill

گردد. به‌همین دلیل پیشنهاد می‌شود تا جهت استخراج روغن و پروتئین این مادهٔ غنی از ترکیب میکروارگانیسم‌های متفاوت، تعداد میکروارگانیسم‌های بیشتر و روش‌های تکمیلی فیزیکی و شیمیایی نیز استفاده شده و یا با توجه به میزان چربی و پروتئین بالا به‌طور مستقیم برای استفاده در خوراک موجودات تکامل یافته‌تر آزمایش گردد. با این وجود، پیشنهاد می‌شود که روش‌های دیگر کشت تلفیقی دو گونه در پژوهش حاضر نیز جهت بررسی جذب پروتئین و چربی از استیک‌واتر در پژوهش‌های دیگری مورد بررسی دقیق‌تری قرار گیرد.

۵. تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر حمید مقیمی جهت مشاوره در زمینهٔ مباحث میکروبیولوژی و جناب آقای دکتر هادی پورباقر جهت راهنمایی در خصوص آنالیز داده‌ها و طرح آماری کمال تشکر و قدردانی را داشته و از سایر عزیزانی که ما را در این مسیر یاری نمودند سپاسگزاریم.

۶. منابع

References

Azin, E., Moghimi, H., Dastgheib, S.M.M. et al. Biovalorization of wastewater of fish canning process by Yarrowia lipolytica for biodiesel and animal feed supplement production. Biomass Conv. Bioref. (2022). https://doi.org/10.1007/s13399-022-03025-8Baldensperger, J., Le Mer, J., Hannibal, L., Quinto, P., 1985. Solid state fermentation of banana wastes. *Biotechnology letters*, 7(10), 743-748.https://doi.org/10.1007/BF01032289.Bechtel, P. J., 2005. Propertieis of stickwater from fish processing byproducts. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 14(2), 25-38. DOI: 10.1300/J030vl4n02_03

Beopoulos, A., Chardot, T., Nicaud, J.-M., 2009. Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie* 91(6), 692-696. DOI: 10.1016/j.biochi.2009.02.004

Boland, M.J., Rae, A.N., Vereijken, J.M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A.R.H., van Boekel, M.A.J.S., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J., & Hendriks, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science and Technology* 29(1), 62-73. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.07.002

Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W.H., 2002. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC International* 85(5), 1187-1200. DOI: 10.1093/jaoac/85.5.1187

Garcia, S. L. 2016. Mixed cultures as model communities: hunting for ubiquitous microorganisms, their partners, and interactions. *Aquatic Microbial Ecology* 77(2), 79-85. DOI: 10.3354/ame01789

Hamimed, S., Barkaoui, T., Trabelsi, I., Landoulsi, A., Chatti, A., 2021. High-performance biological treatment of tuna wash processing wastewater using Yarrowia lipolytica. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 1545-1554. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10586-6.Kam, S., Kenari, A. A., & Younesi, H., 2012. Production of single cell protein in stickwater by Lactobacillus acidophilus and Aspergillus niger. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 21(5), 403-417. DOI: 10.1080/10498850.2011.605539

Liu, B., Song, J., Li, Y., Niu, J., Wang, Z., Yang, Q., 2013. Towards industrially feasible treatment of potato starch processing waste by mixed cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnolog* 171(4), 1001-1010. DOI: 10.1007/s12010-013-0401-1

Noparatnaraporn, N., Trakulnaleumsai, S., Silveira, R. G., Nishizawa, Y., Nagai, S., 1987. SCP production by mixed culture of Rhodocyclus gelatinosus and Rhodobacter sphaeroides from cassava waste. *Journal of Fermentation Technology* 65(1), 11-16. DOI: 10.1016/0385-6380(87)90059-8

Pande, S., Shitut, S., Freund, L., Westermann, M., Bertels, F., Colesie, C., Bischofs, I. B., Kost, C., 2015. Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature Communications* 6(1), 1-13. DOI: 10.1038/ncomms7238 |

Pordeli, H.R., Safari, R., Hosseeini, S.H., 2011. Single Cell Protein Production From Kilka Stick Water by Lactic Acid Bacteria. *Food Technology & Nutrition* 8(3), 78-87. Schultz, N., Chang, L., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., 2006. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Applied microbiology and Biotechnology* 69(5), 515-520. DOI: 10.1007/s00253-005-0012-z

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., Van Dijck, P., 2002. On the safty of Aspergillus niger–a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 426-435. DOI: 10.1007/s00253-002-1032-6

Sharif, M., Zafar, M.H., Aqib, A.I., Saeed, M., Farag, M.R., Alagawany, M., 2021. Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. *Aquaculture* 531, 735885. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735885

Siddiquee, M. N., Rohani, S., 2011. Experimental analysis of lipid extraction and biodiesel production from wastewater sludge. *Fuel Processing Technology* 92(12), 2241-2251. DOI: 10.1016/j.fuproc.2011.07.018

Sifuentes, C.O.G., Aguilar, R.P., y Gisela, J.C.R.S., Ruíz, C. 2011. Stickwater multi-step treatment: effect on organic material removal. *Biotecnia* 13(1), 10-16.

Singh, A., Abidi, A., Agrawal, A., Darmwal, N., 1991. Single cell protein production by Aspergillus niger and its evaluation. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 146(3), 181-184. DOI: 10.1016/S0232-4393(11)80178-2

Valentino, M., Ganado, L., & Undan, J., 2016. Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate. *Advances in Applied Science Research* 7, 68-72. DOI: 10.3390/su13169284

Wang, L.K., Hung, Y.T., Lo, H.H., Yapijakis, C., 2004. *Handbook of industrial and hazardous wastes treatment*. CRC Press. https://books.google.com/books.Yang, Q., Yang, M., Zhang, S., Lv, W. 2005. Treatment of wastewater from a monosodium glutamate manufacturing plant using successive yeast and activated sludge systems. *Process Biochemistry* 40(7), 2483–2488. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.009

Zhang, Z.Y., Jin, B., Bai, Z. H., Wang, X.Y., 2008. Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. *Bioresource Technology* 99(9), 3871-3876. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.10.047