# تولید پروتئین تکیاخته با استفاده از کشت باکتری Lactobacillus acidophilus و قارچ Aspergillus nigerاز پساب کارخانه آرد ماهی کیلکا (استیک واتر)

صفر بىبىكم؛ عبدالمحمد عابديان \* و حبيب ا ... يونسى

aabedian@modares.ac.ir

دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ۳۵۲–۶٤٤۱۶ تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۹

#### چکیدہ

در این تحقیق اثر ضایعات کارخانه آرد ماهی (Stickwater) بعنوان محیط کشت بر تولید پروتئین تک یاخته با استفاده از باکتری Lactobacillus acidophilus و قارچ Aspergillus niger بررسی شد. دو تیمار شامل تیمار شاهد (محیط کشت استاندارد برای باکتری و قارچ) و تیمار استیک واتر (با ۱۰۰ درصد جایگزینی محیط کشت استاندارد) با سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. از روش یچ (Batch culture) برای تولید میکروار گانیسمها در مقیاس آزمایشگاهی استفاده گردید. میزان توده زنده، RNA ،COD و پروتئین در تیمار شاهد و استیکواتر در باکتری و قارچ در پیک رشد سنجش شد. همچنین در زمان حداکثر رشد ترکیب اسیدهای آمینه نمونههای باکتری و قارچ در دو تیمار مورد مقایسه قرار گرفت. میزان توده زنده، ACOD مدین در تیمار شاهد و استیک واتر بترتیب ۹/۱۴ گرم در لیتر، میزان کاهش COD شد. همچنین در زمان حداکثر رشد ترکیب اسیدهای آمینه نمونههای باکتری و قارچ در دو تیمار مورد مقایسه قرار گرفت. (۷۹ میزان توده زنده، ۵۳۳۰ میلی گرم درلیتر، میزان RNA بترتیب ۱۵/۲ و ۱۰/۵ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب ۱۳۷۲ و ۲۳۸۰ میلی گرم درلیتر، میزان RNA بترتیب ۱۵/۲ و ۱۰/۵ درصد و میزان پروتئین بترتیب ۲۰۱۳ و ۱۳۸۰ و ۲۳۸۰ میلی گرم درلیتر، میزان ANA بترتیب ۱۵/۲ و ۲۰/۱۵ درصد و میزان پروتئین بترتیب در تیمارهای شاهد و استیکواتر بترتیب ۱۳۸۹ و ۲۰۸۷ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب ۱۰۰ می در قارچ در تیمارهای شاهد و استیکواتر بترتیب ۹۳/۹ و ۲۰/۹ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب ۱۰۹۰ و ۲۰۵ میلی گرم در لیتر، میزان میزان RNA بترتیب ۹۲/۹ و ۲۰/۵ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب اسیدگلوتامیک و میلی گرم در لیتر، میزان میونین در کتری مقدار اسید آمینه در تیمار شاهد و استیکواتر بترتیب اسیدگلوتامیک و میونین بود. میزان متیونین در باکتری نسبت به آرد ماهی و گزارش FAO تفاوت چندانی نداشت. میزان میونین در قارچ از گزارش FAO کمی کمتر بود. مطابق نتایچ حاصله در این تحقیق جایگزینی ۲۰۱۰ درصد استیکواتر برای تولید باکتری از گزارش FAO کمی کمتر بود. مطابق نتایچ حاصله در این تحقیق جایگزینی ۲۰۱۰ درصد استیکواتر برای تولید باکتری

لغات کلیدی: توده زنده، میکروارگانیسم، پساب کارخانه آرد ماهی (استیک واتر)، اسیدآمینه

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup>نويسندهٔ مسئول

#### مقدمه

بطور کلی کشورهای در حال توسعه نیازمند افزایش تولید دام و طیور میباشند تا گوشت، شیر و دیگر محصولات پروتئینی آنها فراهم گردد (Rajoka et al., 2006). میکروارگانیسمهایی مانند مخمرها و باکتریهای اسیدلاکتیک صدها سال است که توسط انسانها مصرف می شود. در دهه گذشته، روش های جدیدی برای استفاده تولیدات حاصل از تخمیر میکروبی در غذای انسان و خوراک حیوانات توسعه یافته است. بعضی از تولیدات بدست آمده از چنین روشهایی را پروتئین تک یاخته (SCP) مینامند، که به سلولهای خشک شده میکرو ارگانیسمهایی مانند باکتریها، جلبکها و قارچها اطلاق شده و بعنوان منبع پروتئین در غذای انسان و خوراک دام و طیور استفاده می گردد (Soeder, 1978; Kuhad et al., 1997; Soeder, 1978) Molck et al., 2002) مطابق تحقيقات صورت گرفته، توليد یروتئین تکیاخته با استفاده از ضایعات محصولات مختلف یک منبع پروتئینی ارزانی را برای استفاده توسط انسان، دام و طیور فراهم مي كند (Molck *et al.*, 2002 ;Kuhad *et al.*, 1997). استفاده از باکتریها بعنوان SCP در مقایسه با دیگر میکروارگانیسمها به خاطر رشد سریع، میزان و کیفیت پروتئین بیشتر مورد توجه است (Chiou et al., 2001 ،Anupama & Ravindra, 2000). هرچند میزان بالای اسیدنوکلئیک بیشتر از ۱۶درصد وزن خشک آن، استفاده از آن در غذای انسان را محدود کرده است. استفاده از SCP توسط آبزیان و حیوانات مورد تایید قرار گرفته است ( & Anupama .(McNairey, 1984 ;Mølck et al., 2000 ;Ravindra, 2000 شواهد نشان میدهد که تولید مواد غذایی پروتئینی با کیفیت بالا و هزینه پایین امری ضروری برای موفقیت در صنایع آبزی پروری است. آرد ماهی منبع اصلی پروتئینی برای تغذیه ماهیان می باشد. با توجه به افزایش نیاز به آرد ماهی، تولید جهانی این محصول در دهه گذشته تا اندازهای ثابت باقی مانده است و بعید به نظر میرسد تولید آن افزایش یابد. افزایش آبزی پروری جهت رفع نیازهای جهانی گوشت نیاز به فرمولاسیون جیرههای با هزينه مناسب و پايدار دارد (Lunar et al., 2006). در واقع منبع پروتئینی اصلی برای غذاهای آبزیان آرد ماهی است که بطور معمول ۴۰۰-۲۵۰ گرم بر کیلوگرم غذاهای فرموله شده برای میگو و ماهیان گوشتخوار را تشکیل میدهد. با توجه به هزینه در حال افزایش تولید آرد ماهی و ناپایداری آنها در ذخیرهسازی طولانی مدت، ضروری است منبع پروتئینی

جایگزین شناسایی شود. استفاده از پروتئین میکروبی برای جایگزینی قسمتی از یروتئین مورد نیاز غذای ماهی مورد توجه قرار گرفته و راه حلی جدید برای برطرف نمودن این مشکل می باشد. با توجه به موارد ذکر شده و تولید مقادیر زیاد استیک واتر در کارخانجات تولید آرد ماهی در ایران و بدلیل پایین بودن هزینه تولید آن، استفاده از آنها بعنوان محیط کشت برای تولید بیویروتئین حائز اهمیت به نظر میرسد. این مقاله سعی دارد از این منبع ارزان قیمت به جای محیط کشتهای استاندارد و گرانقیمت در تولید باکتری و قارچ استفاده نموده و اثرات آن را بر رشد و کیفیت میکروارگانیزمهای تولیدی بررسی نماید.

## مواد و روش کار

پساب کارخانه آرد ماهی که از کارخانه آرد ماهی کیلکا مي رود بابلسر تهيه شد. ضايعات ابتدا خصوصيات فيزيكي و شیمیایی آن تعیین گردید. برای اندازهگیری پارامترهای نیتریت، آمونيوم، فسفات، نيترات، پتاسيم و كلسيم در استيكواتر از دستگاه فتومتر مدل (Palintest, 8000, England) و روش (APHA, 2003) استفاده شد. برای اندازه گیری کل ذرات معلق جامد (Total Suspended Solids (TSS، کل ذرات جامد Total Solids (TS)، كل ذرات جامد محلول (TDS) Total (TDS) Dissolved Solids، ذرات جامد معلق فرار (VSS) Volatile، ذرات Suspended Solids، كل ذرات جامد فرار (TVS)، كل Volatile Solids از روش (APHA, 2003) استفاده شد. اندازه گیری BOD و COD طبق روش (APHA, 2003) انجام شد. چربی با روش Bligh & Dyer (۱۹۵۹) و پروتئین با استفاده از روش كجلدال (AOAC, 2003) بدست آمد. پارامترهای مورد اشاره با سه تکرار سنجش شدند.

ATCC 4356,) Lactobacillus acidophilus باكترى PTCC 1643) از وزارت علوم، تحقيقات و فناوري، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران (مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی و عفونی) و قارچ Aspergillus niger (ATCC 821) از شرکت DSMZ آلمان بصورت خشک خریداری شد و به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور انتقال یافت. محیط رشد استاندارد مایع برای باکتری و قارچ بترتیب شامل مواد شیمیایی ذکر شده در جدول ۱ و ۲ بود.

مقدار مورد استفاده (گرم در لیتر)	مواد شیمیایی			
١.	Casein peptone			
۵	Yeast extract			
۲.	Glucose			
٢	$K_2HPO_4$			
۵	Sodium acetate			
٢	Diammonium citrate			
•/٢	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O			
•/•۵	$MnSO_4\!\times\!\!H_2O$			

جدول ۱: مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت استاندارد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

## جدول ۲: مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت استاندارد قارچ آسپرژیلوس نایگر

مقدار مورد استفاده (گرم در لیتر)	مواد شيميايي
٢	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
۰/۱۵	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
۰/۱۵	$MgSO_4$
۲۰	Sucarose

مدت زمان کشت برای باکتری و قارچ ۵ شبانهروز در انکوباتور (Liebherr, FKs2600, Germany) بود. برای این منظور از ارلن ۱۰۰ میلیلیتری استفاده شد. شرایط کشت از نظر دما و PH برای باکتری بترتیب ۳۷ درجه سلسیوس و ۶/۶–۶/۷ و برای قارچ بترتیب ۳۰ درجه سلسیوس و ۴/۵ بود. تیمارهای در نظر گرفته شده برای تولید باکتری و قارچ شامل تیمار شاهد (محیط کشت استاندارد) و ۱۰۰ درصد استیکواتر بود. برای همه تیمارها سه تکرار در نظر گرفته شد. در تیمارها و تکرارهای مختلف برای کشت باکتری از ارلنهای ۳۰۰۰ میلیلیتری و برای کشت قارچ از ارلنهای ۲۵۰ میلیلیتری استفاده شد. برای کشت قارچ ارلنهای هر تکرار پس از استریل شدن و تلقیح قارچ بر روی صفحه مغناطیسی همزن با سرعت ۱۰۰۳۳ قرار گرفتند.

این وضعیت در تمام مدت رشد قارچ برقرار بود. برای تعیین توده زنده در باکتری ۱۰ میلیلیتر و در قارچ ۱۰۰ میلیلیتر استفاده شد. نمونه در کنار شعله برداشته و در دور ۲۵۰۰rpm (g×۲۸۰) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد ( ,.Shojaosadati *et al* به مدت ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفت سپس به دسیکاتور انتقال و پس از خنک شدن، وزن آنها اندازه گیری گردید. میزان COD طبق روشهای استاندارد آب و پساب اندازه گیری شد (APHA, 2003).

ابتدا نمونههای حاصل از دو تکرار پس از رسیدن به حداکثر رشد برداشت و پس از دو بار شستشو با آب مقطر برای جداسازی ترکیبات نیتروژنی در فریز درایر خشک شدند. پروتئین به روش كجلدال (AOAC, 2003)، ميزان RNA به روش Puissant و Houdebine (۱۹۹۱) و پروفیل اسید آمینه طبق روش Norziah و Norziah (۲۰۰۰) سنجش شد. برای اندازه گیری RNA ابتدا کلیه وسایل مورد نیاز اتوکلاو شدند. سپس ۱۰۰ میلیلیتر از نمونه جدا شده در دور ۱۵۰۰rpm (g×۱۰۱) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. محلولهای RNX، کلروفرم، ایزوپروپانول و اتانول ۷۵ درصد برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. سپس نمونه با آب مقطر استریل به رقت ۱۰۰ رسانده شد و در طول موج JENWAY Spectrophotometer) با اسپکتوفتومتر (۲۶۰nm .63005 UV/Vis) قرائت شد. روش تعيين پروفيل اسيد آمينه شامل مراحل هیدرولیز نمونه با استفاده از اسید کلریدریک ۶ نرمال و مشتقسازی اسیدهای آمینه که برای اینکار از ۲۰-۱۰ میکرولیتر از محلول اتانول- آب- تری اتیل آمین (۲:۲:۱) استفاده شد. برای تجزیه کمی و کیفی اسیدهای آمینه سیستم Pico-tag Amino Acid Analysis مورد استفاده قرار گ فت.

برای اندازه گیری درصد رطوبت نمونه، ابتدا نمونه با وزن مشخص توسط پمپ خلاء از کاغذ فیلتر ۲۴۵۰ میکرون فیلتر (قبلاً وزن آنها اندازه گیری شده بود)، پس از خشک شدن کاغذ وزن آنها اندازه گیری شد. برای بدست آوردن وزن خشک، کاغذ فیلتر همراه نمونه در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس برای مدت ۲ ساعت قرار داده شده تا وزن آن ثابت گردد. برای محاسبه وزن خشک، وزن نهایی از وزن ابتدایی کسر و عدد بدست آمده بر وزن ابتدایی تقسیم گردید (AOAC, 2003).

جهت اندازه گیری خاکستر، کاغذ فیلتر حاوی نمونه که در تعیین درصد رطوبت و درصد ماده خشک بکار برده شد درون بوته چینی گذاشته سپس به داخل کوره (۵۰۰–۵۵۰ درجه سلسیوس) به مدت دو ساعت منتقل شده تا کاملاً خاکستر گردد. بعد برای رسیدن به وزن ثابت به داخل دسیکاتور منتقل و سیس عمل توزین انجام شد (AOAC, 2003).

برای تعیین نرمال بودن دادهها از آزمون -Kolmogorovo Smirnov استفاده شد. با توجه به نرمال بودن دادهها (P>0.05) از آزمون پارامتری آنالیز واریانس یکطرفه برای بررسی امکان وجود اختلافهای کلی و معنیدار بین گروههای مختلف استفاده شد. برای بررسی وجود اختلافها و تفاوتهای معنیدار بین میانگین نمونهها از آزمون چند دامنهای Tukey با سطح معنیداری ۹۵ درصد استفاده گردید.

### نتايج

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی استیک واتر در جدول ۳ ذکر شده است. مطابق جدول استیک واتر یا ضایعات کارخانه آرد ماهی حاوی مقادیر زیادی COD، پروتئین و سایر مواد معدنی و آلی است که میتواند مورد استفاده انواع میکروارگانیسمها قرار گیرد.

COD جدول ۴ حداکثر میزان توده زنده تولیدی و کاهش COD در باکتری و قارچ را نشان میدهد. همانطوری که از جدول مشخص میباشد بین تیمار شاهد و استیک واتر در فاکتورهای اندازه گیری شده اختلاف معنی دار (۹۵/۰۰) مشاهده شد.

جدول۵ میزان درصد رطوبت، ماده خشک، خاکستر، A. پروتئین و RNA را در باکتری L. acidophilus و قارچ

niger نشان میدهد. همان طوری که از جدول مشخص می-باشد بین تیمار شاهد و استیکواتر در فاکتورهای اندازه گیری شده اختلاف معنیدار (P<۰/۰۵) مشاهده شد. در باکتری و قارچ درصد ماده خشک و خاکستر در تیمار استیکواتر بیشتر از تیمار شاهد بود. در صورتیکه در دو نمونه درصد رطوبت، پروتئین و RNA در تیمار شاهد بیشتر از تیمار استیکواتر بود.

نتایج مربوط به آنالیز اسیدهای آمینه نمونه باکتری و قارچ در جدول ۶ نشان داده شده است. در باکتری بین مقادیر موجود اسيد آسپارتيک، سرين، فنيل آلانين و ليزين در تيمار شاهد و استیکواتر اختلاف معنیدار مشاهده شد. در صورتیکه در اسیدهای آمینه دیگر اختلاف معنیداری دیده نشد. بیشترین و کمترین مقدار اسید آمینه در تیمار شاهد بترتیب اسید گلوتامیک (۹/۴۳ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) و متیونین (۲/۱۶ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بود و در تیمار استیکواتر بترتیب اسید گلوتامیک (۹/۳۳ گرم در ۱۰۰ گرم یروتئین) و متیونین (۲/۰۳ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بدست آمده است. در نمونه قارچ مقادير مربوط به اسيد آسپارتيک، هيستيدين, متيونين، ايزولوسين، لوسين و ليزين بين تيمارهاى شاهد و استيكواتر اختلاف معنى دار داشتند. بيشترين و كمترين مقدار اسيد آمينه در تیمار شاهد بترتیب اسید گلوتامیک (۸/۰۷ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) و متیونین (۱/۴۳ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بود و در تیمار استیکواتر بترتیب اسید گلوتامیک (۷/۹۲ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) و متیونین (۱/۳۱ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) مشاهده شده است (اسیدآمینه تریپتوفان در فرآیند هیدرولیز اسيدي از بين ميرود).

غلظت	خصوصيات
100·±0·	پتاسیم (میلیگرم در لیتر)
て・て・土して・	کلسیم (میلیگرم در لیتر)
1±7.	سدیم (میلیگرم در لیتر)
77V± 7/79	نیترات (میلیگرم در لیتر)
•/V± •/•Y	نیتریت (میلیگرم در لیتر)
•/\£± •/•Y	آمونیوم (میلیگرم در لیتر)
۱۲/۱۵±۰/۱۸	فسفات (میلیگرم در لیتر)
720±720	COD (میلیگرم در لیتر)
YAVO·±Yo·	BOD (میلیگرم در لیتر)
•/•9٤± •/••١	چربی کل (میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)
$\vee$ •/ $\forall \forall \pm$ •/ $\forall$ •	پروتئین (در ۱۰۰گرم نمونه خشک)
٦/٣٦±٠/٠٤	pH
٤/٧١٢±•/•٣٠	کل ذرات جامد (میلی گرم در لیتر)
•/0£0± •/••9	کل ذرات جامد معلق (میلی گرم در لیتر)
٤/٨٢٧±٠/٠٣٥	کل ذرات جامد محلول (میلی گرم در لیتر)
•/٣٩\±•/••V	کل ذرات جامد فرار (میلی گرم در لیتر)
·/·90±·/··٣	ذرات جامد معلق فرار (میلی گرم در لیتر)

جدول ۳: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی استیک واتر کارخانه آرد ماهی کیلکا مورد استفاده در تحقیق

جدول ٤ : حداکثرتولید بیوماس و کاهش COD در باکتری و قارچ\*

Aspergil	lus niger	Lactobacillus	گونه		
حداکثر توده زنده	COD حداکثر کاهش	حداكثر تودەزندە توليدى	COD حداکثر کاهش	تيمار	
تولیدی (گرم در لیتر)	(میلیگرم در لیتر)	(گرم در لیتر)	(میلیگرم در لیتر)	(درصد استيکواتر)	
<sup>b</sup> ٦/٣١	<sup>b</sup> ٤٧٨••	<sup>b</sup> ٣/1٦	<sup>b</sup> ٣٣٢٧.	صفر	
<sup>a</sup> V/YA <sup>a</sup> 00Y···		<sup>a</sup> 0/17	۱		

\*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنیدار هستند (۹۰/۰۵).

جدول ۵: نتایج مربوط به درصد رطوبت، ماده خشک، خاکستر، پروتئین و RNA در باکتری و قارچ در تیمارهای مختلف<sup>\*</sup>

Aspergillus niger			Lactobacillus acidophilus				گونه			
درصد RNA	در <i>صد</i> پروتئين	درصد خاکستر	درصد مادہ خشک	درصد رطوبت	درصد RNA	درصد پرو تئين	درصد خاکستر	درصد ماده خشک	درصد رطوبت	تیمار (درصد استیک واتر)
<sup>a</sup> ٩/٣٦±•/•٥٧	<sup>a</sup> 01/W7±+/W1A	<sup>b</sup> ٣/٣•±•/•٢٨	<sup>b</sup> q٦/٥·±·/·٢٨	<sup>a</sup> ٣/٥٠±٠/٠٢٨	<sup>a</sup> 10/YV0±•/•£	<sup>a</sup> ٧١/١٣±٠/١٤١	<sup>b</sup> ٤/Y•±•/١٤١	<sup>b</sup> q٦/V٩±•/•٢٨	<sup>a</sup> ٣/٢١±٠/٠٢٨	صفر
<sup>b</sup> ٩±•/•٩٥	<sup>b</sup> ٤٨/٦٦±•/١٩•	<sup>a</sup> ٣/٤٩±٠/٠٥٦	<sup>a</sup> ٩٧/•٣±•/•٨٤	<sup>b</sup> Υ/٩٧±•/•Λ٤	۱٥/•٤٥±•/•	<sup>b</sup> ٦٨/٣٧±٠/١٤٨	a0/1.±./121	<sup>a</sup> ۹۷/۰٦±۰/۰٦٣	-	۱۰۰

\*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنیدار هستند (P<۰/۰۵).

	میگوی سفیدهندی*	(/.١٠٠)	قارچ (شاهد)	(/. ) • • )	(شاهد)	اسید آمینه
٨/٦٠	7/32 ± •/08	0/AT±•/•T0 <sup>b</sup>	0/9/±•/•۳0 <sup>a</sup>	٦/٣٨±٠/٠٢١ <sup>b</sup>	٦/٥٥±•/•٤٩ <sup>a</sup>	اسيدآسپارتيک
۱۳/٤ •	))/\\±•/\٣	٧/٩٢±•/•٥٦ <sup>a</sup>	$\wedge \cdot \vee \pm \cdot \cdot \cdot \cdot \vee \pi^a$	٩/٣٣±٠/٠٤٢ <sup>a</sup>	۹/٤٣±۰/۰۳٥ <sup>a</sup>	اسيد گلو تاميک
٤/١٠	٤/٨٨ ±٠/١٤	٣/١٣±•/•٢٨ <sup>a</sup>	۳/۲۲±۰/۰۲۱ <sup>a</sup>	۳/0٦±•/•۲۸ <sup>b</sup>	۳/٦٥±٠/٠٢١ <sup>a</sup>	سرين
٩/٣٠	٦/٧٣± ٠/١٩	۲/۱۲±۰/۰٤٩ <sup>a</sup>	۲/۲٤±۰/۰۱٤ <sup>a</sup>	0/٣٦±•/•٣0 <sup>a</sup>	0/20±•/•30ª	گلايسين
۲/۰۰	۱/۱۳±۰/۰٥	۱/۷۱±۰/۰۱٤ <sup>b</sup>	$1/VA\pm \cdot/\cdot\cdot V^a$	۲/۲۷±۰/۰۲۱ <sup>a</sup>	۲/۳۳±۰/۰٤۲ <sup>a</sup>	ھيستي <i>د</i> ين
٦/١٠	V/¥٤±•/۱۸	۲/٤٤±٠/٠٤٩ <sup>a</sup>	۲/0·±•/•٤۲ <sup>a</sup>	0/VE±•/•YA <sup>a</sup>	0/10±•/•40ª	آرژنين
۳/۸۰	۳/۲٦± •/•٩	٤/٣٠±٠/٠٢١ <sup>a</sup>	٤/٤·±•/•٢٨ <sup>a</sup>	٣/٣٧±•/•71 <sup>a</sup>	٣/٤٤±•/•٩٨ <sup>a</sup>	تره اونين
٦/٣٠	٤/٤٤± •/١٨	٣/٣٩±•/•٣٥ <sup>a</sup>	٣/0٦±•/•٤٢ <sup>a</sup>	٦/٢٥±•/•٤٢ <sup>a</sup>	٦/٣٥±•/•٥٦ <sup>a</sup>	آلانين
0/0 •	٦/٢٧± ٠/٣٣	٣/٤٦±•/•٤٩ <sup>a</sup>	٣/0/\±•/•7/	۳/00±•/•٤٩ <sup>a</sup>	۳/٦٦±٠/٠١٤ <sup>a</sup>	پرولين
۲/۸۰	۲/۹۹± ۰/۱	٣/٤٤±•/•٢٨ <sup>a</sup>	٣/٥٤±٠/٠٤٢ <sup>a</sup>	۲/٦٧±٠/٠۲٨ <sup>a</sup>	۲/ <b>۷۳±</b> ۰/۰۳۵ <sup>a</sup>	تيروزين
٤/٥٠	۲/۸۹± •/۱٤	۳/٤٥±•/•٤۲ <sup>a</sup>	۳/٦١±•/•۲ $^{a}$	٤/٤٥±•/•٤۲ <sup>a</sup>	٤/0 <b>4</b> ±۰/۰۳0 <sup>a</sup>	والين
۲/٤.	۱/۲۹ ± ۰/۱	$1/r \cdot v^b$	۱/٤٣±•/•۲۱ <sup>a</sup>	۲/•۳±•/•٤۲ <sup>a</sup>	۲/۱٦±۰/۰۳0 <sup>a</sup>	متيونين
•/٩•	•/٤٣±•/•٤	_	_	_	-	سىسىتئىن
۳/۸۰	۲/01±۰/11	$\gamma/\gamma \cdot \epsilon^{b}$	٣/٤٤±•/•٢٨ <sup>a</sup>	۳/٤٥±•/•۲۸ <sup>a</sup>	۳/٥٧±•/•۲٨ <sup>a</sup>	ايزولويسين
٦/٤٠	٤/٧ <b>٢</b> ± •/٣٤	0/12±•/•٣0 <sup>b</sup>	0/YV±•/•Y\ <sup>a</sup>	0/V0±•/•Y1ª	0/ <b>\</b> \$±•/•7\ <sup>a</sup>	لوسين
٣/٤٠	٤/٧ <b>٢</b> ± •/٣٤	۲/٩۲±•/•۲۸ <sup>a</sup>	۳/•7±•/•7٨ <sup>a</sup>	٣/٦٤±٠/٠٢٣ <sup>b</sup>	$\psi/\psi/\psi_{\star}/\psi_{\Lambda}^{a}$	فنيل آلانين
٦/٧٠	٦/١٧±٠/٣٨	٤/٣٠±٠/٠٣٥ <sup>b</sup>	٤/0·±·/·۲٨ <sup>a</sup>	٤/٦٧±٠/٠٣٥ <sup>b</sup>	٤/٨٣±•/•٢٨ <sup>a</sup>	لايزين
٣٧/٩٩	٣٤/٢	τλ/λλ	<b>۲۹/۹</b> 0	T0/TV	٣٦/٣١	جموع اسیدهای آمینه ضروری
٥٠	٤٣/٣٣	४९/४९	٣٠/١٩	٣٧/١٥	۳۷/۸۲	مموع اسیدهای بنه غیرضروری
•/٧٥	•/VA	•/٩٨	•/٩٩	•/٩٥	•/٩٦	ببت اسیدهای ینه ضروری به غیرضروری
	۱۳/٤٠ ٤/١٠ ٩/٣. ۲/٠. ٦/١٠ ٣/٨. ٦/٣. ٥/٥٠ ٢/٨. ٤/٥. ٢/٤. ٠/٩. ٣/٨. ٦/٤. ٣/٤. ٦/٧. ٣//٩.	$YT/E$ $Y/TA\pm \cdot/TT$ $E/I$ $E/AA \pm \cdot/TE$ $q/T'$ $T/VT \pm \cdot/Tq$ $Y/\cdot$ $1/TT \pm \cdot/.0$ $T/I$ $V/TE \pm \cdot/TA$ $T/I$ $V/TE \pm \cdot/Tq$ $T/I$ $V/TE \pm \cdot/Tq$ $T/I$ $V/TE \pm \cdot/Tq$ $T/T'$ $E/EE \pm \cdot/TA$ $0/0$ $T/TY \pm \cdot/Tq$ $T/A$ $T/Qq \pm \cdot/T$ $T/A$ $T/Tq \pm \cdot/Tq$ $T/E$ $T/A$ $T/A$ $T/Tq \pm \cdot/Tq$ $T/E$ $T/T$ $T/E$ $T/TE$ $T/E$ $T/TY + TTTTT$ $0.$ $ET/TTT$ $0.$ $ET/TTT$	$V''/E$ $V/TA\pm V/T$ $V/TE + V/T^{a}$ $E/1$ $E/AA \pm V/E$ $V''TE \pm V/T^{a}$ $V/T$ $V'TE \pm V/T$ $V'TE \pm V/T^{a}$ $V/T$ $V'TE \pm V/T^{a}$ $V'TT^{a}$ $V/T$ $V'TE \pm V/T^{a}$ $V'TT^{a}$ $V/T$ $V'TT^{a}$ $V'T^{a}$ $V/T$ $V'TT^{a}$ $V'TT^{a}$ <	$\begin{split} \mathbf{V}_{\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y},\mathbf{Y}$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$

جدول ۲ : میزان اسیدهای آمینه در باکتری L. acidophilus و در قارچ A. niger در تیمارهای مختلف و مقایسه با برخی از منابع پروتئینی دیگر \*

\*ستون با حروف مشابه بدون اختلاف معنیدار هستند (P>۰/۰۵).

\*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنیدار هستند (P<•/•8).

ىحث

میزان توده زنده از جمله شاخصهای اصلی برای تولید و رشد یک میکروارگانیسم است. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد

که استفاده از استیک واتر میزان تولید باکتری را نسبت به تیمار شاهد افزایش میدهد، این امر میتواند احتمالا" بدلیل بالا بودن میزان کربن آلی (COD) و دیگر مواد نیتروژنی در این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد باشد که موجبات رشد بهتر ارگانیسم را فراهم آورده است. در واقع نتایج نشان میدهد که در تیمار استیکواتر فرآیند متابولیکی بطور معنیداری افزایش یافته که در نتیجه این فرآیند متابولیکی میزان رشد سلول باکتری و نیز مصرف منابع کربن افزایش یافت. در مطالعهای که توسط Kurbanoglu و Kurbanoglu (۲۰۰۲) انجام گرفت مشخص شد که بیشترین توده زنده تولیدی (۷/۳ گرم در لیتر) از باکتری Bacillus cereus با استفاده از تیمار شاخ قوچ هیدرولیز شده بدست آمد. میزان کاهش COD نیز (۶۳ درصد) ۳۰۴۰۰ میلی گرم در لیتر بود. Schultz و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش نمودند که با استفاده از منبع آب پنیر بدون پروتئین در کشت باكترى Kluyveromyces marxianus CBS65560، ميزان ۱۳۵۰۰۰ COD میلی گرم در لیتر (۸۰ درصد) کاهش داشت. Nigam (۲۰۰۰) از ضایعات کارخانه کنسروسازی آناناس برای توليد قارچ Candida utilis استفاده نمود. ميزان توده زنده ۷ گرم در لیتر با ۵۵/۳ درصد پروتئین بدست آمد. میزان کاهش COD تا ۹۵–۹۰ درصد گزارش شد. همچنین Lee و ۲۰۰۱) Kim را با استفاده از *Candida utilis* را با استفاده از ملاس ۵/۱ گرم در لیتر اعلام نمودند. Zhang و همکاران (۲۰۰۸) با كشت گونه Trichoderma viride WEBL0702، از ضايعات کارخانه شرابسازی توانستند توده زنده به میزان ۵/۵۴ گرم در لیتر و کاهش COD به میزان ۶۵/۷ درصد بدست آورند.

میزان پروتئین و اسیدنوکلئیک در نمونه باکتری بترتیب ۶۸/۳۷ و ۱۵/۰۴درصد وزن خشک و در قارچ بترتیب ۴۸/۶۶ و ۹/۰۹ درصد وزن خشک بدست آمد. که با گزارشات صورت گرفته برای اپتیمم مقادیر پروتئین و RNA بترتیب به میزان ۳۹-۷۳ و ۱۱-۱درصد مطابقت دارد (Patil et al., 2000) و ۲۱-۱درصد مطابقت دارد

et al., 2007). در واقع باكترىها ميزان اسيدهاى نوكلئيك بالایی دارند که میتوانند بعنوان خوراک توسط حیوانات دریایی مورد استفاده قرار گیرند. زیرا آنها میتوانند با استفاده از آنزیم اوریکاز، اسیداوریک ماده حاصل از تجزیه اسیدنوکلئیک را به ترکیب غيرسمي تبديل كنند (Anupama & Ravindra, 2000; Gao et al., 2007). اما قابلیت استفاده در انسانها را ندارد در صورتی که خواسته شود از آن برای مصارف انسانی استفاده شود لازم است قبل از مصرف از طریق روشهای خاصی میزان RNA تا سطح قابل قبولی کاهش یابد. Yazdian و همکاران (۲۰۰۵) میزان پروتئین و RNA را در کشت باکتری RNA sp. بر روی سوبسترای گاز طبیعی بترتیب ۶۹/۳ و ۱۰/۷-۹/۵ درصد گزارش کرد. میزان RNA و DNA، ۱۰ درصد وزن خشک مخمر گزارش شد، از نظر ترکیب اسیدهای آمینه نیز متيونين كمترين و ليزين بيشترين مقدار را شامل شدند. ميزان پروتئين گونه Trichoderma viride حاصل از تفاله ليموترش Trichoderma و گونه (Gregorio et al., 2002) و گونه ۳۱/۹ WEBL0702 viride درصد حاصل از ضایعات آب پنیر بدون پروتئين (Zhang et al., 2008) و گونه Candida krusei به میزان ۵۰-۴۷ درصد (Konlani et al., 1996) و قارچ Scytalidium acidophilum حاصل از ضایعات کاغذی هیدرولیز شده ۲۷-۴۴ درصد (Ivarson et al., 1982) و گونه Rhizopus oligosporus حاصل از ضايعات مايع ابريشم طبيعي ۵۰/۲ درصد (Mahat, 1992) بدست آمد. گونه Schwanniomyces castellii B5285، با استفاده از ضايعات نشاستهای، پروتئین ۴۵/۶ درصد گزارش شد که در برخی از آنها اسيد آمينه متيونين بعنوان عامل محدود كننده بود (T···) Nigam .(Hongpattaraker & Kittikun., 1995) توانست با استفاده از تفاله هیدرولیز شده به میزان مناسب گونه Candida langeronii تولید نماید. میزان پروتئین ۴۸/۲ درصد و میزان ۸/۸ RNA درصد گزارش شد.

در برخی از مطالعات صورت گرفته اسیدآمینه متیونین بعنوان یک عامل محدود کننده در SCP شناخته شده است

(Shipman et al., 1975; Kim & Lee, 2000). پائین بودن میزان متیونین در اغلب میکروارگانیسمها گزارش شده است (Fabregas & Herrero, 1985; Ciferri, 1983; Riviere, 1977) علاوه بر این، مقدار متیونین گزارش شده در پروتئین تک یاخته نسبت به مقدار واقعی آن پائینتر است. زیرا متیونین در هیدرولیز اسیدی Fabregas & ;Menden & Cremer, 1970; Wender (Herrero, 1985). در این مطالعه میزان متیونین SCP در مقایسه با آرد ماهی و منبع FAO چندان تفاوتی نداشت و بعنوان یک عامل محدودکننده نبود. این موضوع شاید به نوع گونه و محیط کشت بستگی داشته باشد.

اسیدهای آمینه لوسین، متیونین و لیزین برای رشد ماهیان دریایی بسیار مهم هستند. لیزین محرک رشد جانوران دریایی گزارش شده است ( Stottrup & Mcevoy, 2003 ) گزارش شده است 2007). میزان لیزین در باکتری در تیمار شاهد و استیکواتر بترتیب ۴/۸۳ و ۴/۶۷ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین بود و در قارچ بترتیب ۴/۵۰ و ۴/۳۰ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین بود. Kim و ۲۰۰۰) Lee توانستند Rhodopseudomonas palustris را بصورت انبوه تولید نمایند. میزان پروتئین خام در حدود ۷۴-۷۲ درصد و پروفیل اسیدهای آمینه شبیه اسیدهای آمینه معرفی شده توسط FAO بود. Rajoka (۲۰۰۵) از باکتری Cellulomonas biazotea بعنوان SCP و از گیاهان بعنوان محيط كشت استفاده نمود. توده زنده حاصل شامل ۶۰ درصد پروتئین و ۱۰درصد RNA و همچنین حاوی تمام اسیدهای آمینه مطلوب به جز اسیدآمینه ایزولوسین که محدودکننده محسوب شد گزارش گردید. در مطالعهای که توسط Schultz و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از باکتری Kluyveromyces marxianus CBS65560 انجام گرفت نشان دادند اسیدهای آمينه والين، ايزولوسين، ترهاونين، فنيل آلانين و تيروزين نسبت به اسیدهای آمینه معرفی شده توسط FAO بالاتر است. گزارش Nigam (۲۰۰۰) نشان داد که ترکیب اسیدهای آمینه قارچ Candida utilis حاصل از ضايعات كارخانه كنسروسازى آناناس به جز در اسیدهای آمینه گوگرددار متعادل بوده است. Laborb و همکاران (۱۹۸۹) از روغن خرما برای کشت

Candida rugosa استفاده کردند. با توجه به میزان پروتئین (۹/۰۹ درصد)، پروفیل اسیدهای آمینه و میزان RNA (۹/۰۹ درصد) قارچ Aspergillus niger در محیط کشتهای مختلف در حد استاندارد بود و میتوان پیشنهاد کرد که گونهای مناسب برای تولید پروتئین تک یاخته است.

بیشترین توده زنده و کاهش COD در باکتری و قارچ در تیمار استیکواتر بدست آمد که نسبت به محیط کشت استاندارد بالاتر بود. با بررسی پروفیل اسیدآمینه بدست آمده برای تیمار شاهد و استیکواتر در باکتری و قارچ اختلاف معنیداری بین دو تیمار ذکر شده به جز در چند مورد مشاهده نشد. ترکیب اسیدهای آمینه در مقایسه با استاندارد FAO متعادل و در برخی موارد بالاتر بود. درصد رطوبت، پروتئین و متعادل و در باکتری و قارچ در تیمار شاهد بیشتر از تیمار استیکواتر بود. درصد ماده خشک و خاکستر در باکتری و قارچ در تیمار استیکواتر بیشتر از تیمار شاهد بود. با توجه به نتایج ذکر شده استفاده از ۱۰۰ درصد استیکواتر بعنوان جایگزین محیط کشت استاندارد برای تولید باکتری *L. acidophilus* قارچ *A. niger م*یاشد.

#### منابع

- **عابدیان ع.م.، ۱۳۸۰**. تاثیر سطوح مختلف پروتئین و انرژی جیره بر توان تولیدی میگوی سفیدهندی (Penaeus indicus) در شوریهای مختلف، دانشگاه تربیت مدرس، رشته شیلات، ۱۳۰ صفحه.
- Anupama P. and Ravindra P., 2000. Value-added food: Single cell protein, Biotechnology Advances. 18:459-479.
- AOAC (Association of Official Analitical Chemist), 2003. Official methods of analysis AOAC.
- APHA (Standard Methods for Examination of Water and Waste Water), 2003. 20<sup>th</sup> ed American Public Health Association, American Water Works Association Water., Environment Federation, Washington, DC, USA.

- Bligh E.G. and Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37:911-917.
- Chiou Peter W.S., Chiou S.W. and Chen C.R., 2001. Value of Aspergillus niger fermentation product as a dietary ingredient for broiler chickens. Animal Feed Science and Technology, 91:171-182.
- **Ciferri O., 1983.** *Spirulina*, the edible microorganism. Microbiology Reviews, 47:551-578.
- Fabregas J. and Herrero C., 1985. Marin microalgae a potential source of single cell protein (SCP). Applied Micobiology Biotechnology, 23:110-113.
- Gao L., Chi Z., Sheng J., Ni X. and Wang L., 2007. Single cell protein production from Jerusa artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aereus* G7a and its nutritive analysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 77:825-832.
- Gregorio A.D., Mandalari G., Arena N., Nucita F., Tripodo M.M. and Curto R.B.L., 2002. SCP and crude pectinase production by slurrystate fermentation of lemon pulps. Bioresource Technology, 83:89-94.
- Hongpattarakere T. and Kittikun A.H., 1995. Optimization of single cell protein production from Cassava starch using *Schwanniomyces casyellii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11:607-609.
- **Ivarson K.C. and Morita H., 1982.** Single cell protein production by the acid-tolerant fungus *Scytalidium acidophilum* from acid hydrolysates

of waste paper. Applied and Environmental Microbiology, 43(3):643-64.

- Kim J.K. and Lee B.K., 2000. Mass production of *Rhodopseudomonas palustris* as diet for aquaculture. Aquacultural Engineering, 23:281-293.
- Konlani S., Delgenes J.P., Moletta R., Traore A.
  and Doh A., 1996. Optimization of cell yield of *Candida krusei* SO1 and *Saccaromyces* sp, LK3G cultured in sorghoum hydrolysate. Bioresource Technology, 57:275-281.
- Kuhad R.C., Singh A., Tripathi K.K., Saxena R.K. and Eriksson K-E. L., 1997. Microorganisms as an alternative source of protein. Nutrition Reviews, 55: 65-75.
- Kurbanoglu E.B. and Algur O.F., 2002. Singlecell protein production from ram horn hydrolysate by bacteria. Bioresource Technology, 85:125-129.
- Laborb J.M., Dwek C., Ratomahenina R., Pina M., Graille J. and Galzy P., 1989. Production of single cell protein from palm oil using *Candida rugosa*. Mircen Journal, 5:517-523.
- Lee B.K. and Kim J.K., 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses different culture types. Aquaculture Engineering, 25:111-124.
- Lunar A.N., Craig S.R. and Mclean, 2006. Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. Aquaculture, 257:393-399.
- Mahat M.S. and Macrae I.C., 1992. *Rhizopus* oligosporus grown on natural rubber waste

۲٩

serum for production of single cell protein: A preliminary study. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 8:63-64.

- McNairney J., 1984. Modification of a novel protein product. Journal of Chemistry Technology & Biotechnology, 34B:206-214.
- Menden E. and Cremer H.D., 1970. Laboratory methods for the evaluation of change in protein quality. *In*: (A.A. Alnanes ed.), Newer methods of nutritional biochemistry with application and interpretation. Academic Press, New York, USA. pp.123-161.
- Molck A.M., Poulsen M., Christenswn H.R., Lauridsen S.T. and Madsen C., 2002. Immunoticity of nucleic acid reduced bioproteina bacterial derived single cell protein-in Wistar rats, Toxicology, 74:183-200.
- Nigam J.N., 2000. Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagassa hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16:367-372.
- Norziah M.H. and Ching C.Y., 2000. Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria chaggi*. Food Chemistry, 68:69-76.
- Patil R.S., Ghormade V. and Deshpande M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: An exploration. Enzyme Microbiology & Technology, 26:473-483.
- **Puissant C. and Houdebine L., 1991.** An improvement of the single method of isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Biotechniques, 8:148-149.

- Rajoka M.I., 2005. Production of single cell protein through fermentation of a perennial grass grown on saline lands with *Cellulomonas biazotea*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21:207-211.
- Rajoka M.I., Khan S.H., Jabbar M.A., Awan M.S. and Hashmi A.A., 2006. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishing with *Candida utilis* in continuosly aerated tank reactor. Bioresource Technology, 96:934-1941.
- Riviere J., 1977. Microbial proteins. *In*: (M.O. Moss and J.E. Smith eds.), Industrial applications of microbiology. Surrey University Press. pp.105-149.
- Schultz N., Chang L. and Hauck A., 2006. Microbial production of single cell protein from deproteinized whey concentrates. Applied Microbiology and Biotechnology, 69:515-520.
- Shipman R.H., Kao I.C. and Fan L.T., 1975. Singlecell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural by-products. Biotechnology, 17:1561–1570.
- Shojaosadati S.A., Khalilzadeh R., Jalilzadeh A. and Sanaei H.R., 1999. Bioconversion of molass stillage to protein as an economic treatment of this effluent. Resource, Conversion and Recycling, 27:125-138.
- Soeder C.J., 1978. Biochemical aspects of single cell protein. *In*: (J. Adler-Nissen, B.O. Eggum and H.S. Olsen eds.), Biochemical aspects of new protein food, 44. Pergamon Press. Oxford, 11<sup>th</sup> meeting, Kopenhagen. pp.63-72.

- Stottrup J.G. and Mcevoy L.A., 2003. Live feeds in marine aquaculture. Blackwell Science Ltd, UK. pp.322-333.
- Yazdian F., Hajizadeh S., Shojaosadati S.A.,
  Khalilzadeh R., Jahanshahi M. and Nosrati
  M., 2005. Production of single cell protein
  from natural gas: parameter optimization and

RNA evaluation. Iranian Journal of Biotechnology, 3:235-242.

Zhang Z.Y., Jin B., Bai Z.H. and Wang X.Y., 2008. Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. Bioresource Technology, 99: 3871-3876.

## Production of single cell protein from stickwater of kilka fish meal factory using *Lactobacillus acidophilus* and *Aspergillus niger* Bebekam S.; Abedian A.M.\* and Younesi H.

aabedian@modares.ac.ir

Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 64414-356 Noor, Iran Received: July 2010 Accepted: January 2011

Keywords: Biomass, Microorganism, Stickwater, Amino acids

### Abstract

We investigated production of single cell protein (SCP) from stickwater of kilka fish meal factory as medium using Lactobacillus acidophilus and Aspergillus niger. Stickwater was used instead of the standard media of bacterium and fungus in a batch culture method. Amount of biomass, COD, RNA and protein in the bacterium and fungus in control and stickwater treatments were investigated. In maximum growth time, amino acids profile of the bacterium and fungus were measured and compared between treatments. Bacterial biomass production in the control and stickwater treatments were 3.16 and 5.12g/l, COD reduction was 33270 and 53330mg/l, the measured RNA were 15.27% and 15.04%, the amount of protein were 71.13% and 68.37%, respectively. The difference between bacterium and fungus biomass production was slight. We found that the amount of the fungus biomass in control and stickwater were 6.31 and 7.28g/l, COD reduction were 47800 and 55200mg/l, RNA was 9.36% and 9.09%, the amount of protein were 51.36% and 48.66%, respectively. In both bacterium and fungus, the maximum and minimum amount of amino acid of the control and stickwater was glutamic acid and methionin. The amount of methionin in bacterium was not different with fish meal and FAO reference and in fungus was a little lower than FAO reference. According to the results, application of pure stickwater was suitable for production of Lactobacillus acidophilus and Aspergillus niger.

<sup>\*</sup>corresponding author