View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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

صفر بی‌بی‌کم؛ عبدالمحمد عابدیان* و حبیب ا... یونسی

aabedian@modares.ac.ir

دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور صندوق پستی: ٣٥٦-٦٤٤١٤

تاریخ دریافت: تیر ١٣٨٩ تاریخ پذیرش: دی ١٣٨٩

چکیده

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 ١٠٠ درصد جایگزینی محیط کشت استاندارد) با سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. از روش بچ (Batch culture) برای تولید میکروارگانیسم‌ها در مقیاس آزمایشگاهی استفاده گردید. میزان توده زنده، COD، RNA 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 تولیدی در باکتری در تیمار شاهد و استیک واتر بترتیب ٣/١٦ و٥/١٢ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب ٣٣٢٧٠ و ٥٣٣٣٠ میلی‌گرم درلیتر، میزان RNA بترتیب ١٥/٢٧ و ١٥/٠٤ درصد و میزان پروتئین بترتیب ٧١/١٣ و ٦٨/٣٧ درصد بدست آمد. این مقادیر برای قارچ کمی متفاوت بود بطوریکه میزان توده زنده تولیدی در قارچ در تیمارهای شاهد و استیک‌واتر بترتیب ٦/٣١ و ٧/٢٨ گرم در لیتر، میزان کاهش COD بترتیب ٤٧٨٠٠ و ٥٥٢٠٠ میلی‌گرم در لیتر، میزان RNA بترتیب ٩/٣٦ و ٩/٠٩ درصد و میزان پروتئین بترتیب ٥١/٣٦ و ٤٨/٦٦ درصد بدست آمد. در هر دو باکتری و قارچ بیشترین و کمترین مقدار اسید آمینه در تیمار شاهد و استیک‌واتر بترتیب اسیدگلوتامیک و متیونین بود. میزان متیونین در باکتری نسبت به آرد ماهی و گزارش FAO تفاوت چندانی نداشت. میزان متیونین در قارچ از گزارش FAO کمی کمتر بود. مطابق نتایج حاصله در این تحقیق جایگزینی ١٠٠ درصد استیک‌واتر برای تولید باکتری *Lactobacillus acidophilus* و قارچ *Aspergillus niger* مناسب می‌باشد.

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

* نویسندهٔ مسئول

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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 می‌شود. در دهه گذشته، روش‌های 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 می‌گردد (Kuhad *et al*., 1997 ;Soeder, 1978; Molck *et al*., 2002) مطابق تحقیقات صورت گرفته، تولید پروتئین تک‌یاخته با استفاده از ضایعات محصولات مختلف یک منبع پروتئینی ارزانی را برای استفاده توسط انسان، دام و طیور فراهم می‌کند (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 & Ravindra, 2000; Mólck *et al*., 2000; McNairey, 1984). شواهد نشان می‌دهد که تولید مواد غذایی پروتئینی با کیفیت بالا و هزینه پایین امری ضروری برای موفقیت در صنایع آبزی‌پروری است. آرد ماهی منبع اصلی پروتئینی برای تغذیه ماهیان می‌باشد. 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 آبزی‌پروری جهت رفع نیازهای جهانی گوشت نیاز به فرمولاسیون جیره‌های با هزینه مناسب و پایدار 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 پروتئین مورد نیاز غذای ماهی مورد توجه قرار گرفته و راه حلی جدید برای برطرف نمودن این مشکل می‌باشد. 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 بیوپروتئین 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 می‌رود بابلسر تهیه شد. ضایعات ابتدا خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین گردید. برای اندازه‌گیری پارامترهای نیتریت، آمونیوم، فسفات، نیترات، پتاسیم و کلسیم در استیک‌واتر از دستگاه فتومتر مدل (Palintest, 8000, England) و روش (APHA, 2003) استفاده شد. برای اندازه‌گیری کل ذرات معلق جامد (Total Suspended Solids (TSS، کل ذرات جامد (Total Solids (TS، کل ذرات جامد محلول (Total Dissolved Solids (TDS، ذرات جامد معلق فرار (Volatile Suspended Solids (VSS، کل ذرات جامد فرار (Total Volatile Solids (TVS از روش (APHA, 2003) استفاده شد. اندازه‌گیری BOD و COD طبق روش (APHA, 2003) انجام شد. چربی با روش Bligh & Dyer (۱۹۵۹) و پروتئین با استفاده از روش کجلدال (AOAC, 2003) بدست آمد. پارامترهای مورد اشاره با سه تکرار سنجش شدند.

باکتری *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356, PTCC 1643) از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، 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.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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

مواد شیمیایی	مقدار مورد استفاده (گرم در لیتر)
Casein peptone	۱۰
Yeast extract	۵
Glucose	۲۰
K_2HPO_4	۲
Sodium acetate	۵
Diammonium citrate	۲
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲
$MnSO_4 \times H_2O$	۰/۰۵

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

مواد شیمیایی	مقدار مورد استفاده (گرم در لیتر)
NH_4NO_3	۲
KH_2PO_4	۰/۱۵
$MgSO_4$	۰/۱۵
Sucarose	۲۰

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 ۶/۲-۶/۷ 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 ۱۰۰rpm 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 (۲۸۰×g) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (Shojaosadati *et al.*, 1999). پس از گذشت این زمان قسمت ته‌نشین شده در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفت سپس به دسیکاتور انتقال و پس از خنک شدن، وزن آنها اندازه‌گیری گردید. میزان COD طبق روش‌های استاندارد آب و پساب اندازه‌گیری 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 کجلدال (AOAC, 2003)، میزان RNA به روش Puissant و Houdebine (۱۹۹۱) و پروفیل اسید آمینه طبق روش Norziah و Ching (۲۰۰۰) سنجش شد. برای اندازه‌گیری RNA ابتدا کلیه وسایل مورد نیاز اتوکلاو شدند. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه جدا شده در دور ۱۵۰۰rpm (۱۰۱×g) 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 ۲۶۰nm با اسپکتوفتومتر (JENWAY Spectrophotometer 63005 UV/Vis.) قرائت شد. روش تعیین پروفیل اسید آمینه 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 گرفت.

برای اندازه‌گیری درصد رطوبت نمونه، ابتدا نمونه با وزن مشخص توسط پمپ خلاء از کاغذ فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر (قبلاً وزن آنها اندازه‌گیری شده بود)، پس از خشک شدن کاغذ وزن آنها اندازه‌گیری 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).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

جهت اندازه‌گیری 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 سپس 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.

نتایج

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.

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 اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده شد.

جدول۵ میزان درصد رطوبت، ماده خشک، خاکستر، پروتئین و RNA را در باکتری *L. acidophilus* و قارچ *A. niger* نشان می‌دهد. همان‌طوری که از جدول مشخص می‌باشد بین تیمار شاهد و استیک‌واتر در فاکتورهای اندازه‌گیری 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 اسید آسپارتیک، سرین، فنیل‌آلانین و لیزین در تیمار 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 پروتئین) و متیونین (۲/۰۳ گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بدست آمده است. در نمونه قارچ مقادیر مربوط به اسید آسپارتیک، هیستیدین, متیونین، ایزولوسین، لوسین و لیزین بین تیمارهای شاهد و استیک‌واتر اختلاف معنی‌دار داشتند. بیشترین و کمترین مقدار اسید آمینه 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 اسیدی از بین می‌رود).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

جدول ٣: خصوصیات فیزیکی و شیمیایی استیک واتر کارخانه آرد ماهی کیلکا مورد استفاده در تحقیق

خصوصیات	غلظت
پتاسیم (میلی‌گرم در لیتر)	١٥٥٠±٥٠
کلسیم (میلی‌گرم در لیتر)	٢٠٦٠±١٢٠
سدیم (میلی‌گرم در لیتر)	١٠٠±٢٠
نیترات (میلی‌گرم در لیتر)	٢٢٧± ٢/٢٩
نیتریت (میلی‌گرم در لیتر)	٠/٧± ٠/٠٢
آمونیوم (میلی‌گرم در لیتر)	٠/١٤± ٠/٠٢
فسفات (میلی‌گرم در لیتر)	١٢/١٥±٠/١٨
COD (میلی‌گرم در لیتر)	٦٤٥٠٠±٦٤٥
BOD (میلی‌گرم در لیتر)	٢٨٧٥٠±٢٥٠
چربی کل (میلی گرم در ١٠٠ گرم نمونه)	٠/٠٩٤± ٠/٠٠١
پروتئین (در ١٠٠گرم نمونه خشک)	٧٠/٣٣±٠/٣٠
pH	٦/٣٦±٠/٠٤
کل ذرات جامد (میلی گرم در لیتر)	٤/٧١٢±٠/٠٣٠
کل ذرات جامد معلق (میلی گرم در لیتر)	٠/٥٤٥± ٠/٠٠٩
کل ذرات جامد محلول (میلی گرم در لیتر)	٤/٨٢٧±٠/٠٣٥
کل ذرات جامد فرار (میلی گرم در لیتر)	٠/٣٩١±٠/٠٠٧
ذرات جامد معلق فرار (میلی گرم در لیتر)	٠/٠٩٥±٠ /٠٠٣

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

گونه	*Lactobacillus acidophilus*		*Aspergillus niger*	
تیمار (درصد استیک‌واتر)	COD حداکثر کاهش (میلی‌گرم در لیتر)	حداکثر توده‌زنده تولیدی (گرم در لیتر)	COD حداکثر کاهش (میلی‌گرم در لیتر)	حداکثر توده زنده تولیدی (گرم در لیتر)
صفر	^{b}٣٣٢٧٠	^{b}٣/١٦	^{b}٤٧٨٠٠	^{b}٦/٣١
١٠٠	^{a}٥٣٣٣٠	^{a}٥/١٢	^{a}٥٥٢٠٠	^{a}٧/٢٨

*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<٠/٠٥).

جدول ٥: نتایج مربوط به درصد رطوبت، ماده خشک، خاکستر، پروتئین و RNA در باکتری و قارچ در تیمارهای مختلف*

گونه	*Lactobacillus acidophilus*					*Aspergillus niger*				
تیمار (درصد استیک واتر)	درصد رطوبت	درصد ماده خشک	درصد خاکستر	درصد پروتئین	درصد RNA	درصد رطوبت	درصد ماده خشک	درصد خاکستر	درصد پروتئین	درصد RNA
صفر	^{a}٣/٢١±٠/٠٢٨	^{b}٩٦/٧٩±٠/٠٢٨	^{b}٤/٢٠±٠/١٤١	^{a}٧١/١٣±٠/١٤١	^{a}١٥/٢٧٥±٠/٠٤	^{a}٣/٥٠±٠/٠٢٨	^{b}٩٦/٥٠±٠/٠٢٨	^{b}٣/٣٠±٠/٠٢٨	^{a}٥١/٣٦±٠/٣١٨	^{a}٩/٣٦±٠/٠٥٧
١٠٠	–	^{a}٩٧/٠٦±٠/٠٦٣	^{a}٥/١٠±٠/١٤١	^{b}٦٨/٣٧±٠/١٤٨	١٥/٠٤٥±٠/٠٦	^{b}٢/٩٧±٠/٠٨٤	^{a}٩٧/٠٣±٠/٠٨٤	^{a}٣/٤٩±٠/٠٥٦	^{b}٤٨/٦٦±٠/١٩٠	^{b}٩±٠/٠٩٥

*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<٠/٠٥).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

جدول ٦ : میزان اسیدهای آمینه در باکتری *L. acidophilus* و در قارچ *A. niger* در تیمارهای مختلف و مقایسه با برخی از منابع پروتئینی دیگر*

اسید آمینه	باکتری (شاهد)	باکتری (٪۱۰۰)	قارچ (شاهد)	قارچ (٪۱۰۰)	میگوی سفیدهندی*	آرد ماهی**	FAO***
اسیدآسپارتیک	٦/٥٥±٠/٠٤٩^{a}	٦/٣٨±٠/٠٢١ ^{b}	٥/٩٨±٠/٠٣٥^{a}	٥/٨٣±٠/٠٣٥^{b}	٦/٣٤ ± ٠/٥٣	٨/٦٠	–
اسیدگلوتامیک	٩/٤٣±٠/٠٣٥^{a}	٩/٣٣±٠/٠٤٢^{a}	٨/٠٧±٠/٠٦٣^{a}	٧/٩٢±٠/٠٥٦^{a}	١١/٦٨±٠/٦٣	١٣/٤٠	–
سرین	٣/٦٥±٠/٠٢١^{a}	٣/٥٦±٠/٠٢٨^{b}	٣/٢٢±٠/٠٢١^{a}	٣/١٣±٠/٠٢٨^{a}	٤/٨٨ ±٠/١٤	٤/١٠	–
گلایسین	٥/٤٥±٠/٠٣٥^{a}	٥/٣٦±٠/٠٣٥^{a}	٢/٢٤±٠/٠١٤^{a}	٢/١٢±٠/٠٤٩^{a}	٦/٧٣± ٠/١٩	٩/٣٠	–
هیستیدین	٢/٣٣±٠/٠٤٢^{a}	٢/٢٧±٠/٠٢١^{a}	١/٧٨±٠/٠٠٧^{a}	١/٧١±٠/٠١٤^{b}	١/١٣±٠/٠٥	٢/٠٠	–
آرژنین	٥/٨٥±٠/٠٣٥^{a}	٥/٧٤±٠/٠٢٨^{a}	٢/٥٠±٠/٠٤٢^{a}	٢/٤٤±٠/٠٤٩^{a}	٧/٣٤±٠/١٨	٦/١٠	–
تره اونین	٣/٤٤±٠/٠٢٨^{a}	٣/٣٧±٠/٠٢٨ ^{a}	٤/٤٠±٠/٠٢٨^{a}	٤/٣٠±٠/٠٢١^{a}	٣/٢٦± ٠/٠٩	٣/٨٠	٢/٨
آلانین	٦/٣٥±٠/٠٥٦^{a}	٦/٢٥±٠/٠٤٢^{a}	٣/٥٦±٠/٠٤٢^{a}	٣/٣٩±٠/٠٣٥^{a}	٤/٤٤± ٠/١٨	٦/٣٠	–
پرولین	٣/٦٦±٠/٠١٤^{a}	٣/٥٥±٠/٠٤٩^{a}	٣/٥٨±٠/٠٢٨^{a}	٣/٤٦±٠/٠٤٩^{a}	٦/٢٧± ٠/٣٣	٥/٥٠	–
تیروزین	٢/٧٣±٠/٠٣٥^{a}	٢/٦٧±٠/٠٢٨^{a}	٣/٥٤±٠/٠٤٢^{a}	٣/٤٤±٠/٠٢٨^{a}	٢/٩٩± ٠/١	٢/٨٠	–
والین	٤/٥٣±٠/٠٣٥^{a}	٤/٤٥±٠/٠٤٢^{a}	٣/٦١±٠/٠٢٨^{a}	٣/٤٥±٠/٠٤٢^{a}	٢/٨٩± ٠/١٤	٤/٥٠	٤/٢
متیونین	٢/١٦±٠/٠٣٥^{a}	٢/٠٣±٠/٠٤٢^{a}	١/٤٣±٠/٠٢١^{a}	١/٣١±٠/٠٠٧^{b}	١/٢٩ ± ٠/١	٢/٤٠	٢/٢
سیستئین	–	–	–	–	٠/٤٣±٠/٠٤	٠/٩٠	٢/٠
ایزولویسین	٣/٥٧±٠/٠٢٨^{a}	٣/٤٥±٠/٠٢٨^{a}	٣/٤٤±٠/٠٢٨^{a}	٣/٣١±٠/٠١٤^{b}	٢/٥١±٠/١١	٣/٨٠	٤/٢
لوسین	٥/٨٣±٠/٠٢٨^{a}	٥/٧٥±٠/٠٢١^{a}	٥/٢٧±٠/٠٢١^{a}	٥/١٤±٠/٠٣٥^{b}	٤/٧٢± ٠/٢٤	٦/٤٠	٤/٨
فنیل آلانین	٣/٧٧±٠/٠٢٨^{a}	٣/٦٤±٠/٠٢٣^{b}	٣/٠٢±٠/٠٢٨^{a}	٢/٩٢±٠/٠٢٨^{a}	٤/٧٢± ٠/٢٤	٣/٤٠	٢/٨
لایزین	٤/٨٣±٠/٠٢٨^{a}	٤/٦٧±٠/٠٣٥^{b}	٤/٥٠±٠/٠٢٨^{a}	٤/٣٠±٠/٠٣٥^{b}	٦/١٧±٠/٣٨	٦/٧٠	٤/٢
مجموع اسیدهای آمینه ضروری	٣٦/٣١	٣٥/٣٧	٢٩/٩٥	٢٨/٨٨	٣٤/٢	٣٧/٩٩	٢٥/٢
مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری	٣٧/٨٢	٣٧/١٥	٣٠/١٩	٢٩/٢٩	٤٣/٣٣	٥٠	–
نسبت اسیدهای آمینه ضروری به غیرضروری	٠/٩٦	٠/٩٥	٠/٩٩	٠/٩٨	٠/٧٨	٠/٧٥	–

*عابدیان، ۱۳۸۰ **Yazdian *et al.*, 2005** ***Kurbanoglu and Algure, 2002

*ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<٠/٠٥).

*ستون با حروف مشابه بدون اختلاف معنی‌دار هستند (P>٠/٠٥).

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

بحث

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 احتمالاً 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 Algur (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 میلی‌گرم در لیتر بود. Schultz و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش نمودند که با استفاده از منبع آب پنیر بدون پروتئین در کشت باکتری *Kluyveromyces marxianus* CBS65560، میزان COD ۱۳۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۸۰ درصد) کاهش داشت. Nigam (۲۰۰۰) از ضایعات کارخانه کنسروسازی آناناس برای تولید قارچ *Candida utilis* استفاده نمود. میزان 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 Kim (۲۰۰۱) میزان توده زنده *Candida utilis* را با استفاده از ملاس ۵/۱ گرم در لیتر اعلام نمودند. Zhang و همکاران (۲۰۰۸) با کشت گونه *Trichoderma viride* WEBL0702، از ضایعات 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 ۷۳-۳۹ و ۱۱-۱درصد مطابقت دارد (Patil *et al*., 2000; Gao *et al*., 2007). در واقع باکتری‌ها میزان اسیدهای نوکلئیک 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 غیرسمی تبدیل کنند (Anupama & Ravindra, 2000; Gao *et al*., 2007). اما قابلیت استفاده در انسان‌ها را ندارد در صورتی‌که 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 *Methylomonas* 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 متیونین کمترین و لیزین بیشترین مقدار را شامل شدند. میزان پروتئین گونه *Trichoderma viride* حاصل از تفاله لیموترش ۳۱/۹ درصد (Gregorio *et al*., 2002) و گونه *Trichoderma viride* WEBL0702، ۱۹/۸ درصد حاصل از ضایعات آب پنیر بدون پروتئین (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 ۴۷-۴۴ درصد (Ivarson *et al*., 1982) و گونه *Rhizopus oligosporus* حاصل از ضایعات مایع ابریشم طبیعی ۵۰/۲ درصد (Mahat, 1992) بدست آمد. گونه *Schwanniomyces castellii* B5285، با استفاده از ضایعات نشاسته‌ای، پروتئین ۴۵/۶ درصد گزارش شد که در برخی از آنها اسید آمینه متیونین بعنوان عامل محدود کننده بود (Hongpattaraker & Kittikun., 1995). Nigam (۲۰۰۰) توانست با استفاده از تفاله هیدرولیز شده به میزان مناسب گونه *Candida langeronii* تولید نماید. میزان پروتئین ۴۸/۲ درصد و میزان RNA ۵/۸ درصد گزارش شد.

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

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

(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 ناپایدار می‌باشد (Menden & Cremer, 1970; Fabregas & 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 (Gao *et al*.,;Stottrup & Mcevoy, 2003 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 Lee (۲۰۰۰) 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 محیط کشت استفاده نمود. توده زنده حاصل شامل۶۰ 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 آمینه والین، ایزولوسین، تره‌اونین، فنیل‌آلانین و تیروزین نسبت به اسیدهای آمینه معرفی شده توسط FAO بالاتر است. گزارش Nigam (۲۰۰۰) نشان داد که ترکیب اسیدهای آمینه قارچ *Candida utilis* حاصل از ضایعات کارخانه کنسروسازی 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 (۴۸/۶۶ 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 RNA 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* و قارچ *A. niger* مناسب می‌باشد.

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. 20th ed American Public Health Association, American Water Works Association Water., Environment Federation, Washington, DC, USA.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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 slurry-state 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. Single-cell 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

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]
Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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 bioprotein-a 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. Single-cell 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, 11th meeting, Kopenhagen. pp.63-72.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]

Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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.

[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109957]

Downloaded from isfj.ir at 22:09 +0330 on Sunday November 26th 2017

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*.

*corresponding author