تحديد الظروف المثلى لأنتاج الكايتوسان من الفطر *Aspergillus oryzae* SU-B2 بطريقة تخمرات الحالة السائلة

Optimization Condition of Chitosan Produced by Submerged Fermentation from *Aspergillus oryzae* SU-B2

آيه أحمد عبد اللطيف حميد عبود جبر زيد اكرم ثابت*
جامعة بغداد/ كلية الزراعة
*جامعة النهرين مركز بحوث التقانات الاحيائية
Aya Ahmed Abdulatoof Hameed Abood Jaber Zaid A. Thabit*
College of Agriculture/ Baghdad University
*Biotechnology Research Center/ AL-Nahrain University

E-mail:zaidakrm@yahoo.com

المستخلص

الكايتوسان الذي يمكن الحصول عليه بعد ازالة مجاميع الاستيل من الكايتين، هو سكر متعدد يتشكل اساسا من وحدات متعددة من الدي كلوكوز امين. هو بوليمر حيوي متعدد الاستعمالات واظهر خصائص بايولوجية مختلفة فريدة من نوعها ولذلك له تطبيقات واسعة في الغذاء والطب الحيوي والصناعات الكيميائية. هدفت هذه الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لأنتاج الكايتوسان من الفطر *Aspergillus oryzae SU-B2* اظهرت النتائج أن أفضل تلك الظروف تتمثل بأستخدام سكر الكلوكوز بتركيز 2% كمصدر للكربون وكلا من كبريتات الامونيوم بتركيز 5 .0% ومستخلص الخميرة بتركز1 .0 % والببتون بتركيز1% كمصدر للنتروجين والرقم الهيدروجيني 5.5 ودرجة الحرارة 30م ومدة 120ساعة وحجم اللقاح 15 مل محتويا على 10x1^7 بوغ/ مل وبسرعة تهوية 150دورة/ دقيقة حيث بلغت انتاجية الكايتوسان 10200 ملغم/ لتر وبمعدل زيادة بلغت 207.2%.

Abstract

Chitosan, the deacetylated form of chitin, is a polysaccharide formed primarily of repeating units of D-glucosamine. It is a versatile biopolymer exhibiting various unique biological properties hence finds wide applications in food, biomedical and chemical industries. This study was conducted to evaluate optimum condition for chitosan production from *Aspergillus oryzae* SU-B2. The result have showed the best concentration 2% glucose as carbon sources, while 0.5 %$(NH_4)_2SO_4$ and 0.1% yeast extract were optimum concentration as nitrogen sources. The optimum pH was 5.5 whereas the optimum temperature is 30˚C with incubation time 120h and agitation rate 150 rpm. The high yield of chitosan 10200 mg/ml was obtained with average increase 207.2%.

المقدمة

يعد الكايتوسان المنتج الرئيسي من الكايتين الذي يمكن الحصول عليه بعد أزالة مجاميع الاستيل [3،4] التي ترتبط بمجموعة الامين في موقع كاربون رقم 2 في الكايتين. و تستعمل لهذا الغرض بعض المعاملات الكيميائية باستخدام محاليل قاعدية مركزة، وعندما تكون مجاميع الاستيل المزالة تتراوح من (35-40%) فأن الناتج هو كايتوسان [21]. يتواجد الكايتين في الهيكل الخارجي للحشرات والقشريات كالروبيان وسرطان البحر وغيرها [8]. واتجهت الدراسات الحديثة للبحث عن مصادر بديلة لانتاج الكايتوسان وقد ركزت تلك الدراسات على أنتاجه من الفطريات وخاصة من صنف Zycomycetes ، كما أن الفطريات الخيطية filamentous fungi تعتبر أيضا مصادر جيدة لأنتاج الكايتين والكايتوسان في التطبيقات الصناعية، حيث يمكن تصنيعه في ظروف قياسية [15]. يعد الكايتوسان سكر أميني ذو شحنة موجبة يتكون من ارتباط وحدات الكلوكوز أمين بأصرة كلايكوسيدية من نوع β -1,4 [6]. أزداد الاهتمام في الفترة الاخيرة في أنتاج الكايتوسان ومشتقاته وذلك لأستخداماته في عدة مجالات حيث يستخدم في الصناعات الغذائية كمادة حافظة او مادة مثخنة او مثبتة. وفي الزراعة والمجالات الطبية والصيدلانية ومواد التجميل ومعالجة مياه الصرف الصحي[2], وكذلك يمكن استخدامه كمضاد مايكروبي جيد ضد مجموعة من الاحياء المجهرية المرضية [9], يمكن أنتاج الكايتوسان من فطر *Aspergillus oryzae* حيث يحتوي التركيب الكيميائي لجدار *A. oryzae* على سكريات متعددة بنسبة 90% وكمية قليلة من البروتين، ويعّد الكايتين هو النسبة الاكبر من السكريات الموجودة في الجدار الخلوي للفطريات الخيطية حيث تتراوح نسبته من 10- 20% ، وهو بذلك يساهم الى حد كبير في سلامة جدار الخلية [20]. وأشار [7] الى ان انتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae* بلغ 69.8ملغم / غم من وزن المايسليوم ، فيما وجد [1] في دراسة أخرى ان انتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae* بلغ أقصاه بين 5.87 – 5.9 % خلال 12 يوم من الحضن في مزارع مغمورة لذلك هدفت الدراسة الى تحديد الظروف المثلى للحصول على اعلى انتاج للكايتوسان من الفطر *A. oryzae*.

المواد وطرائق العمل

الاحياء المستخدمة

عزلة محلية من عفن *Aspergillus oryzae SU-B2* تم الحصول عليها من قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة بغداد والمعزولة من عينات الفواكه والخضروات التالفة تم الحصول عليها من الاسواق المحلية وتضمنت البطيخ والخوخ والطماطه والشجر وعينات من الخبز التالف واللبن وعينة من تربه مزيجية من حقول كلية الزراعة /جامعة بغداد في الجادرية.

وسط الانتاج (YPG) Yeast extract -Peptone Glucose

حضر هذا الوسط باذابة المكونات (كلوكوز 3غم , خلاصة الخميرة 0.3غم , الببتون 3غم , كبريتات الامونيوم 1.5 غم , كلوريد الصوديوم 0.3 غم, كلوريد الكالسيوم 0.03 غم , كبريتات المغنيسيوم المائية 1.5غم) في 240 مل من الماء المقطر وتم ضبط pH الوسط الى 5 باستخدام قطرات من حامض الهيدروكلوريك تركيزه 0.1N ، عقم الوسط بالمؤصدة، علما بان الكلوكوزتم أضافتة الى مكونات الوسط بعد اذابته في 50 مل من الماء المقطر وعقم على أنفراد تحت نفس الظروف المذكورة آنفا وأضيف الى مكونات الوسط بعد التعقيم. أستخدم هذا الوسط في أنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية للفطر [13].

انتاج وأستخلاص الكايتوسان

أتبعت طريقة تخمرات الحالة السائلة بنقل 10 مل من العالق السبوري الذي يحتوي 1 X 10^7 بوغاً / مل الى 300 مل من وسط معقم YPG في دورق الينماير سعة 500 مل لمعرفة كفاءة العزلات المنتخبة في أنتاج الكايتوسان [13]. حضنت النماذج في حاضنة هزازة على درجة 30م مدة 4 أيام في دوارق و بسرعة 150 دورة /دقيقة, أجري حصد الغزل الفطري بعد أنتهاء فترة الحضن بترشيح وسط الانتاج بقمع بخنّر بأستخدام ورق ترشيح Whatman No.1, جففت الكتلة الحيوية من الغزل الفطري في فرن على درجة 65م ولحين ثبات الوزن [12]، تم أحتساب وزن الكتلة الحيوية الجافة من الغزل الفطري نسبة الى حجم الوسط ، عومل الغزل الفطري الجاف باضافة محلول قاعدي من هيدروكسيد الصوديوم تركيزه 1N الى وبكمية (1 : 40) (وزن : حجم) من وزن الغزل الفطري الجاف, مزج العالق وعقم في مؤصدة على درجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة, نبذت المواد القاعدية غير الذائبة (Alkalin Insoluble Materials (AIM بالطرد المركزي بسرعة 6000Xg مدة 5 دقائق, وغسلت عدة مرات بالماء المقطر لحين وصول الرقم الهيدروجيني الى التعادل (pH=7)، جففت المواد القاعدية غير الذائبة (AIM) في فرن على درجة حرارة 40 م ولحين ثبات الوزن, عوملت المواد الجافة القاعدية غير الذائبة بحامض الخليك تركيزه 2% وبنسبة (1 : 40) (وزن:حجم) ووضع الانموذج في جهاز المكثف العكسي reflux condenser لمدة 6 ساعات وعلى حرارة 95 م لغرض أستخلاص الكايتوسان. أجريت عملية النبذ المركزي بسرعة 6000 Xg مدة 15 دقيقة وسحب العالق الحاوي على الكايتوسان. تم ترسيب الكايتوسان من العالق بتعديل الرقم الهيدروجيني للوسط بأضافة هيدروكسيد الصوديوم تركيزه 2N وتم نبذ العالق بالطرد المركزي على Xg 6000 مدة 15 دقيقة, أهمل العالق وتم غسل الراسب لخمس او ست مرات بالماء المقطر والذي عـدَّ الكايتوسان المنتج . كررت العملية بالغسل باستخدام الايثانول 95% مرة والاسيتون مرة أخرى بنسبة 20:1 (وزن:حجم) وجفف الناتج بفرن على درجة حرارة 60 م لحين ثبات الوزن. قدرت كفاءة الانتاج على اساس كمية الكايتوسان المنتجة [16].

تحديد الظروف المثلى لأنتاج الكايتوسان

1- تحديد المصدر الكاربوني الامثل

درس تأثير عدد من مصادر الكاربون على أنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لعفن *A. oryzae SU-B2* وأشتملت تلك المصادر على الكلوكوز والكالاكتوز والفركتوز والسكروز. إذ اضيفت هذه المصادر الى الوسط بتركيز 1%. حضنت النماذج في حاضنة هزازه بدرجة حرارة 30 مُ مدة 4 أيام. وفي نهاية مدة الحضن قدرت الكتلة الحيوية الجافة وأستخلص الكايتوسان وقدرت كميته في جميع التجارب اللاحقة لتحديد الظروف المثلى للانتاج [2].

2- تحديد التركيز الامثل للمصدر الكاربوني

تم أختيار نسب مختلفة من الكلوكوزكافضل مصدر كربوني لانتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae SU-B2* وعلى ضوء النتائج المتحققة في التجربة السابقة ، لذلك فقد استخدمت نسبة 1% , 2% , 3%, 4 % و 5% من الكلوكوز مع ثبات مكونات الوسط الاخرى وظروف الانتاج والاستخلاص [2].

3- تحديد المصدر النتروجيني الامثل

درس تأثير عدد من مصادر النتروجين العضوية واللاعضوية على أنتاج الكايتوسان وأشتملت هذه المصادر على مستخلص الخميره والبيبتون وفول الصويا وكبريتات الامونيوم وشراب الذره ونترات الصوديوم كل على انفراد وبتركيز 1.6 % بدلا من المصادر النتروجينة المستخدمة في الوسط الاساس وبنفس النسبة. وتم انتاج وأستخلاص الكايتوسان وتقدير كميته تحت نفس الظروف الانفة الذكر [2].

4- تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل

درس تاثير الرقم الهيدروجيني لوسط التنمية على أنتاج الكايتوسان، وقد تم تحضير وسط التنمية بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 3- 6 وبفارق 0.5 من وسط لاخر، مع الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثالية للانتاج المتحققة في التجارب السابقة. تم أنتاج وأستخلاص الكايتوسان وتقدير كميتة تحت نفس الظروف الانفة الذكر [2].

5- تحديد درجة الحرارة المثلى للأنتاج

درس تاثير درجة حرارة الحضن في الحاضنة الهزازة على أنتاج الكايتوسان، وأستعملت درجات حرارية مختلفة تراوحت بين 25- 40 م وبفارق 5 درجات بين وسط وآخر مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في أنتاج الكايتوسان في التجارب السابقة وتم استخلاص وانتاج الكايتوسان تحت نفس الظروف الانفة [2].

6- تحديد فترة الحضن المثلى للأنتاج

درس تاثير فترة الحضن وباستعمال الظروف المثلى المتحققة لانتاج الكايتوسان في التجارب الآنفة الذكر، حيث تم تنمية العزلة بالمزارع المغمورة ولفترات مختلفة تراوحت من 24 - 144 ساعة, وتم أستخلاص وتقديرالكايتوسان المنتج كل 24 ساعه تحت نفس الظروف السابقة [2].

7- تحديد حجم اللقاح الامثل

لغرض معرفة حجم اللقاح الامثل من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae SU-B2* ، اضيفت حجوم مختلفة من لقاح العفن شملت على 5مل, 10 مل, 15مل, 20مل و25 مل وبتركيز 1x10 ^{7} بوغ / مل وتم أستخلاص وأنتاج الكايتوسان تحت الظروف المثلى للانتاج المتحققة في الخطوات السابقة [2].

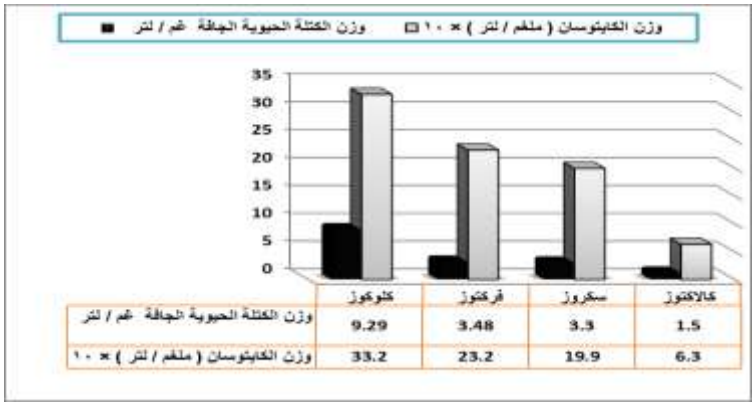
8- تحديد عدد الدورات المثلى للانتاج

درس تاثير سرعة التهوية خلال فترة الحضن على أنتاج الكايتوسان، حيث حضنت مزارع الفطر في حاضنة هزازة تحت الظروف المثالية المتحققة في التجارب السابقة مع تغيير سرعة الحاضنة الهزازة من 150 – 250 دورة / دقيقة وبفارق 50 دورة / دقيقة بين معاملة واخرى. وتم أستخلاص وأنتاج الكايتوسان تحت الظروف المثلى للانتاج المتحققة في الخطوات السابقة [2].

النتائج و المناقشة

تحديد المصدر الكاربوني الامثل

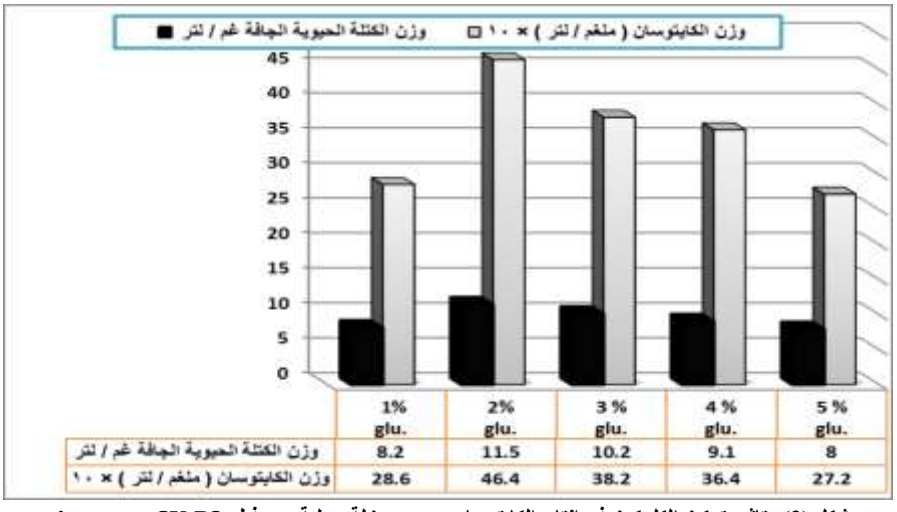
يوضح شكل (1) تأثير عدد من مصادر الكاربون التي أستعملت لتدعيم الوسط في أنتاج الكايتوسان وأشتملت المصادر على الكلوكوز والفركتوز والكالاكتوز والسكروز وبتركيز 1% ، وأظهرت النتائج أن الكلوكوز كان له التأثير الاكبر في أنتاج الكتلة الحيوية والكايتوسان، حيث بلغ وزن الكتلة الحيوية الجافة 9.29غم / لتر في حين بلغ وزن الكايتوسان 332 ملغم /لتر. وقد وجد أن الكلوكوز هو أفضل مصدركربوني لهذا الغرض، وقد يعود السبب في ذلك الى سهولة أستهلاكه في المسارات الايضية للانتاج الحيوي فضلا عن كونه يساهم في تكوين مكونات الجدار الخلوي بما ذلك الكايتين والكايتوسان [13]، كما أشار [12] الى استخدام الكلوكوز كمصدر للكاربون بتركيز 3 % في الوسط المستعمل لانتاج الكايتين والكايتوسان من عزلات مختلفة من عفن *Penicillium* spp .



شكل(1): تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على أنتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2.

تأثير تركيز الكلوكوز الامثل في الانتاج

يوضح شكل (2) أن أفضل تلك التراكيز لأنتاج الكايتوسان كان بأستخدام الكلوكوز بتركيز 2%, إذ زاد أنتاج الكتلة الحيوية والكايتوسان بزيادة تركيز الكلوكوز, حيث بلغت الكتلة الحيوية 11.5غم / لتر فيما بلغ وزن الكايتوسان 464 ملغم / لتر عند التركيز 2% كلوكوز, وشهد أنتاج الكايتوسان والكتلة الحيوية أنخفاضا ملحوظا بزيادة تركيز المصدر الكربوني عن 2 %، حيث بلغ وزن الكتلة الحيوية ووزن الكايتوسان 8غم/ لتر و272 ملغم / لتر على التوالي عند استخدام الكلوكوز بتركيز 5 %. وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتمد على أستخدام الكلوكوز بتركيز 2 % كافضل تركيز لانتاج الكايتوسان من العزلة المحلية قيد الدراسة. وتتفق هذه النتائج مع ماذكره [13] أن زيادة تركيز الكلوكوز من 1 - 3 % أدى الى زيادة انتاج الكايتوسان، بينما يكون للتراكيز العالية 4 % و 5 % تاثيرا ضاراًعلى نمو الفطريات وربما يؤدي الى موتها بالرغم من أن الكلوكوز يعّد من الطلائع (precursor) اللازمة لتخليق الكايتين والكايتوسان، ويدخل أيضا في بناء بعض المكونات الداخل خلوية المهمة الاخرى في الخلية [5].

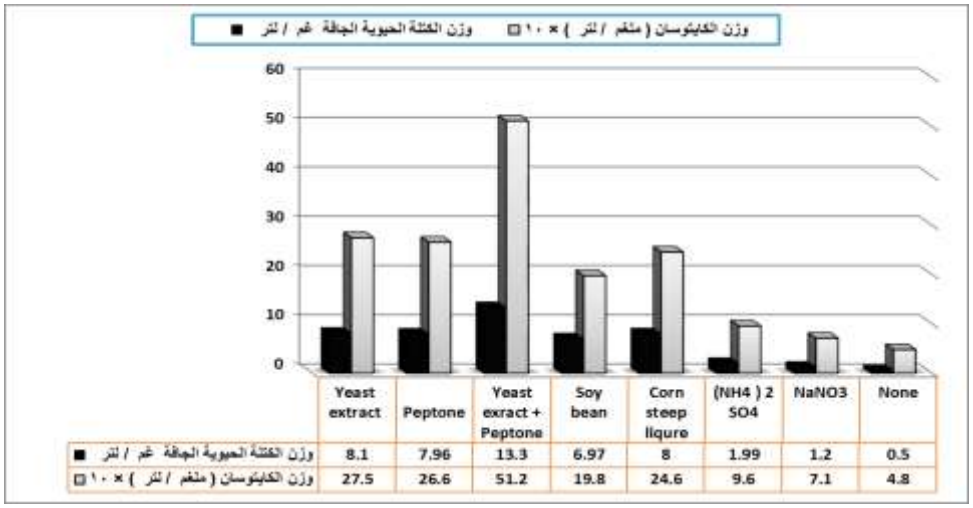


شكل (2): تاثير تركيز الكلوكوز في انتاج الكايتوسان من من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2.

تأثير المصدر النتروجيني على انتاج الكايتوسان

أختبرعدد من مصادر النتروجين العضوية وأخرى غير العضوية لدراسة تاثيرها في أنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 . وشملت تلك المصادر التي استعملت لتدعيم وسط الانتاج على مستخلص الخميرة (Yeast extract) والببتون (Peptone) وفول

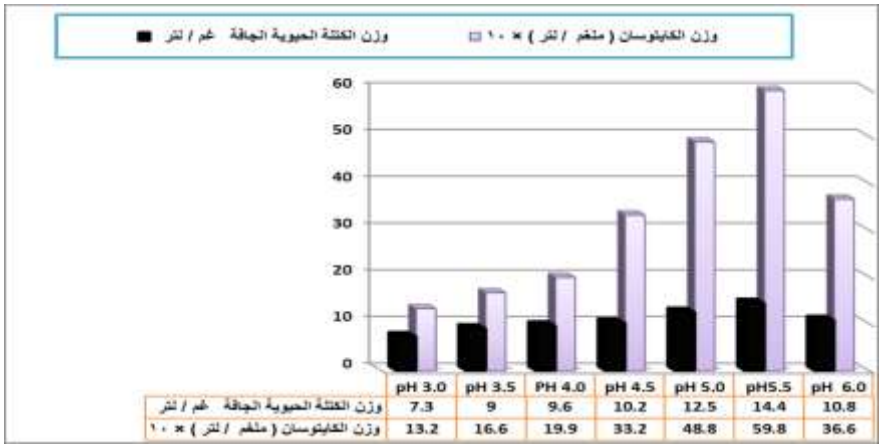
الصويا (Soy bean) وكبريتات الامونيوم ((NH4)2SO4) وعصير شراب الذرة (Corn steep liquor) ونترات الصوديوم (NaNO3) ومستخلص الخميرة+ البيتون (Yeast extract+ Peptone) شكل (3). وجد أن أفضل تلك المصادرهومستخلص الخميرة مع البيتون، إذ بلغت الكتلة الحيوية الجافة 13.3 غم / لتر، في حين بلغت كمية الكايتوسان المنتج 512 ملغم / لتر، يلي ذلك مستخلص الخميرة لوحده ثم البيتون لوحده وأخيراً شراب نقيع الذرة، بينما أنخفضت بشكل كبيرمعدل وزن الكتلة الحيوية وكمية الكايتوسان المنتجة في الاوساط الحاوية على المصادر النتروجينية اللاعضوية، أما في حالة غياب المصدر النتروجيني فقد أنخفضت الحصيلة من الكايتوسان والكتلة الحيوية الى 90% ، 96 % على التوالي مقارنة بالمعاملة التي أستخدم فيها خلاصة الخميرة والبيتون كمصادر النتروجينية شكل (3). هذه النتائج تشير الى أن الفطريات تفضل المصادرالنتروجينية العضوية لاغراض النمو وانتاج الكايتوسان لانها تحصل عليها بشكل جاهز ومباشر، وهذا يتفق مع ما ذكره [11] من ان افضل انتاج للكايتوسان من الفطر *Aspergillus niger* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة كان باستخدام اليوريا كمصدر للنتروجين.



شكل(3): تأثير مصدر النتروجين في انتاج الكايتوسان من من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل

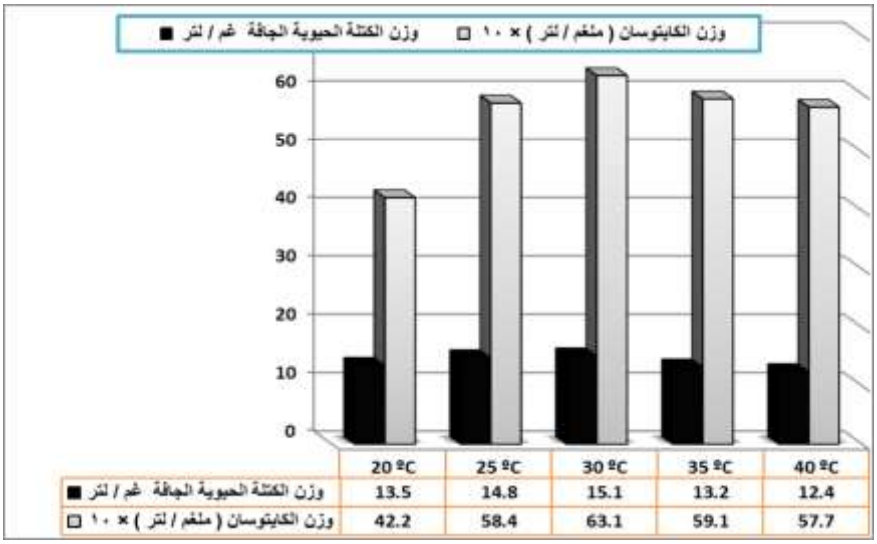
وجد أن قابلية العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 على النمو وانتاج الكايتوسان تتغيير مع تغير الرقم الهيدروجيني لوسط النمو، فقد لوحظ زيادة الكتلة الحيوية يرافقها زيادة في كمية الكايتوسان المنتج بزيادة الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج في المزارع المغمورة ولغاية 5.5، ثم عاد أنتاج الكايتوسان والكتلة الحيوية فشهد أنخفاضا بزيادة الرقم الهيدروجيني الى 6، إذ بلغت الكتلة الحيوية والكايتوسان 14.4غم/ لتر و 598 ملغم / لتر على التوالي عندالرقم الهيدروجيني 5.5، فيما بلغت 10.8غم / لتر و 366 ملغم / لتر على التوالي أيضا عند الرقم الهيدروجيني 6، شكل (4), وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتمد أن يكون الرقم الهيدروجيني الامثل لوسط النمو هو 5.5، لذلك ينبغي التحكم بالرقم الهيدروجيني لوسط النمو كونه يعّد احد العوامل البيئية المهمة التي لها دور في تشجيع الكائن المجهري على النمو وأنتاج الكايتين ومن ثم الكايتوسان. وتتفق هذه النتائج مع ماوجده [18] إذ اشار الى أن اقصى كمية من الكتلة الحيوية والكايتوسان يمكن الحصول عليها من عزلة من فطر *Absidia butleri* NCIM 977 عندما كان الرقم الهيدروجيني لوسط النمو 5.5 ايضا، أذ بلغت 8.6 غم / لتر و 640 ملغم / لتر على التوالي . ووجد [17] أن الرقم الهيدروجيني للاوساط التخمرية الصلبة يؤثر بشكل كبير على معدل نمو الفطريات ويتراوح الرقم الهيدروجيني المثالي لنمو معظم الفطريات بين 5.9-6.5.



شكل(4): تاثير الرقم الهيدروجيني لوسط النمو في انتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون ومستخلص الخميرة والبيتون مصدرا للنتروجين.

تحديد الحرارة المثلى لانتاج الكايتوسان

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) أن درجة الحرارة المثلى لانتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 هي 30م، إذ بلغت الكتلة الحيوية 15.1 غم / لتر في حين بلغت كمية الكايتوسان المنتج 631 ملغم / لتر. وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتمد على أستخدام حرارة 30 م لتكون درجة الحرارة المثلى لتنمية الكائن المجهري قيد الدراسة وانتاج الكايتوسان في التجارب اللاحقة، ومن الجدير بالذكرفان أنخفاض درجة الحرارة او أرتفاعها عن الحد الامثل له أثراً سلبيا على تكوين الكتلة الحيوية وأنتاج الكايتوسان لان الامر مرتبط بقدرة الكائن على النمو، لذلك فقد هبط معدل وزن الكتلة الحيوية والحصيلة من الكايتوسان المنتج في كلا الحالتين . وتتفق هذه النتائج مع حصل عليه [18] إذ اشار الى أن أفضل درجة حرارة لانتاج الكايتوسان من فطر *Absidia butleri* NCIM 977 بطريقة المزارع المغمورة كانت 30 مْ حيث بلغت الكتلة الحيوية 8.4 غم / لترفي حين بلغت الحصيلة من الكايتوسان 667.16 ملغم / لتر، كما أستخدم [14] درجة حرارة 30م لانتاج الكايتوسان من عزلة من فطر (*Aspergillus niger* MTCC strains (872 , 2208 and 1785 إذ بلغت كمية الكتلة الحيوية لهذه العزلات 19.8، 20.8 و17.3 غم /لتر على التوالي.

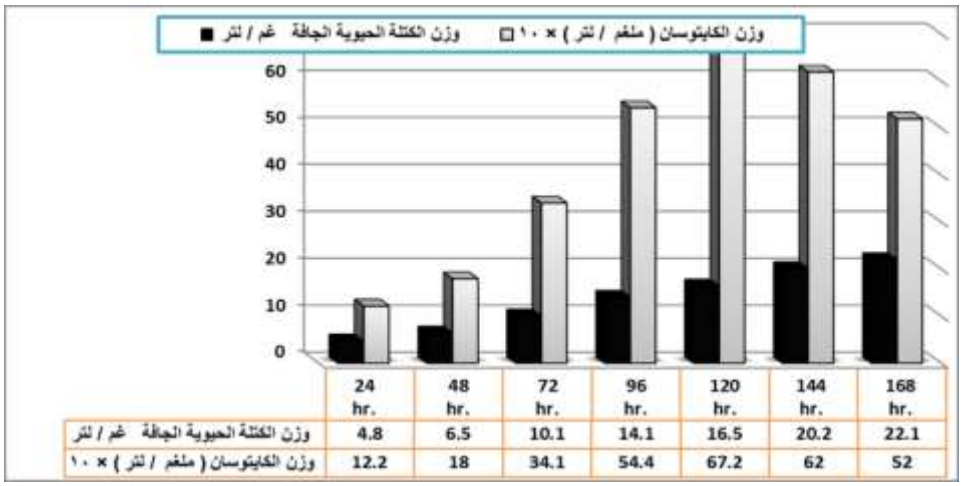


	20 ºC	25 ºC	30 ºC	35 ºC	40 ºC
وزن الكتلة الحيوية الجافة غم / لتر	13.5	14.8	15.1	13.2	12.4
وزن الكايتوسان (ملغم / لتر) × ١٠	42.2	58.4	63.1	59.1	57.7

شكل (5): تأثير درجة الحرارة على انتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون ومستخلص الخميرة والبيتون مصدرا للنتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5.

تأثير فترة الحضن المثلى لأنتاج الكايتوسان

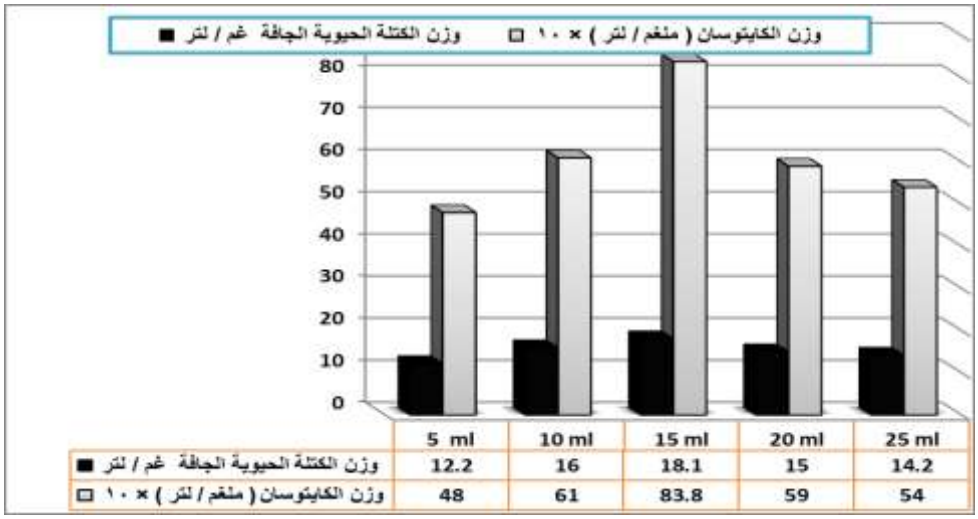
لتقدير الوقت الامثل لانتاج الكايتوسان فقد جرت العملية التخمرية في وسط أنتاج معقم بحجم300 مل وحضن على درجة الحرارة المثلى للانتاج 30 مْ في حاضنة هزازة وعلى سرعة 150 دورة / دقيقة ولفترات مختلفة تراوحت من 24 – 168 ساعة. لوحظ أن الزيادة في الكتلة الحيوية كانت متوافقة مع الزيادة في كمية الكايتوسان ولغاية 120 ساعة من الحضن، الا ان كمية الكايتوسان الناتجة من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 شهدت أنخفاضاً بعد ذلك وبلغت 520 ملغم / لتر بعد مرور 148 ساعة من الحضن في الوقت الذي كانت عند أقصاها 672 ملغم / لتر بعد مرور 120 ساعة من الحضن. وعلى النقيض من ذلك فقد استمرت الحصيلة للكتلة الحيوية بالارتفاع، حيث بلغت أقصاها 22.1 غم / لتر بعد مرور 148 ساعة من الحضن شكل (6)، لذلك فقد عُدت مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان من الكائن المجهري قيد الدراسة هو 120 ساعة لاستخدامها في الدراسات اللاحقة. وقد يعود سبب تدهورأو أنخفاض كمية الكايتوسان المنتجة وأرتفاع كمية الكتلة الحيوية من الكائن المجهري بعد مدة الحضانة المثلى الى دخول الكائن الى مرحلة الثبوت العددي أو مرحلة الهلاك ولاسيما في المزارع المغلقة بعد نفاذ مكونات الوسط واستهلاك الكايتين والكايتوسان كمغذيات من قبل الكائن المجهري وزيادة تحلل المواد البوليمرية من قبل الانزيمات المحللة المتحررة مثل Chitonase وانتشار نواتج تحلل الخلايا [11, 22]. لذلك ينصح بوقف عمليات التخمر قبل الوصول الى مرحلة تحلل الخلايا. وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتبرت مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان في التجارب اللاحقة هي 120 ساعة. وقد تباينت الدراسات في تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان حسب نوع الكائن المجهري المستخدم في العملية التخمرية.



شكل (6): تأثير فترة الحضن على انتاج الكايتوسان من عزلة محلية من عفن *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون ومستخلص الخميرة والببتون مصدرا للنتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5 وبدرجة حرارة 30 مْ.

تحديد حجم اللقاح الامثل لانتاج الكايتوسان

يلاحظ من شكل (7) وجود زيادة تدريجية في كمية الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتجة من العزلة المحلية من فطر *A. oryzae* SU-B2، إذ بلغت الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج 12.2 غم / لتر و 480 ملغم / لتر على التوالي عند أستخدام حجم لقاح 5 مل يحتوي على 1×10^7 بوغ / مل، وازدادت الكتلة الجيوية والكايتوسان المنتج حتى بلغ أقصاه الى 18.1 غم / لتر و 838 ملغم / لتر على التوالي عند استخدام 15 مل من لقاح الفطر الحاوي على 1×10^7 بوغ / مل . ومن الجدير بالذكر فان كمية الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج أنخفضت مع زيادة حجم اللقاح عن الحد الامثل إذ بلغت الكتلة الحيوية 14.2 غم / لتر فيما بلغت كمية الكايتوسان 540 ملغم / لتر عند الوصول الى حجم لقاح 25 مل حاويا على 1×10^7 بوغ / مل من لقاح العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 . أن الزيادة الحاصلة في كمية الكتلة الحيوية والكايتوسان بزيادة حجم اللقاح في بداية العملية التخمرية قد تعود الى أن تركيز اللقاح قليل ولايتناسب مع حجم الوسط لذلك فعند زيادة حجم اللقاح أدى بدوره الى زيادة في الكمية المنتجة من الكتلة الحيوية والكايتوسان [22].

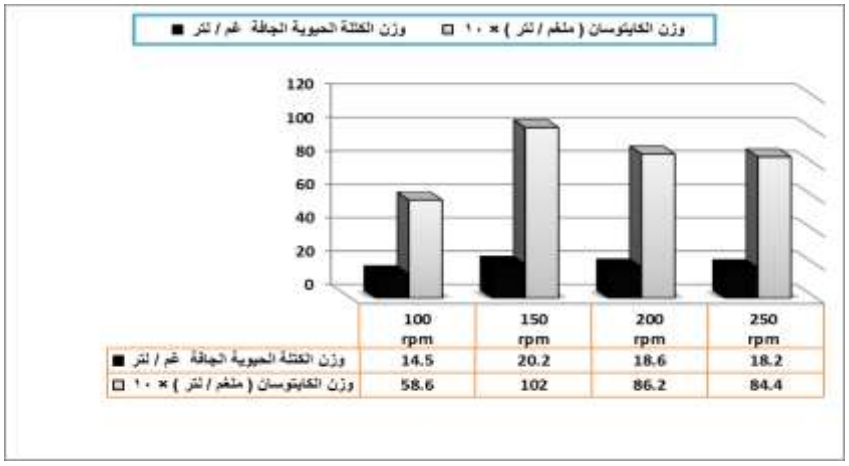


شكل (7): تأثير حجم اللقاح المضاف الانتاج على انتاج الكايتوسان من من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون ومستخلص الخميرة والببتون مصدراللنتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5وخلال 120 ساعة من الحضن على درجة 30 مْ.

تأثير درجة التهوية في انتاج الكايتوسان

يبين شكل (8) تاثير سرعة التهوية في الحاضنة الهزازة في أنتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae*، إذ يلاحظ من هذا الشكل أن زيادة سرعة التهوية من 100 الى 150 دورة / دقيقة تؤدي الى زيادة الحصيلة من الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج إلا أن هذه الزيادة تراجعت عندما زادت سرعة الدوران للحاضنة الهزازة الى 200 و 250 دورة / دقيقة حيث بلغت الحصيلة من الكتلة الحيوية والكايتوسان أدناها 18.2 غم / لتر و 844 ملغم / لتر على التوالي عند السرعة 250 دورة / دقيقة بعد أن كانت عند أقصاها 20.2غم / لتر و 1020 ملغم /لتر عند السرعة 150 دورة / دقيقة. هذه النتائج تشير أن التحريك يساهم في مزج الاوكسجين مع مكونات الوسط فيزيد من ذائبيتها وتجانسها، الامر الذي يجعل من المكونات الغذائية متاحة للكائن المجهري ، فضلا عن أن الفطريات تعّد كائنات هوائية أجبارا فهي تحتاج الى وفرة من الاوكسجين في التمنية والانتاج. وكل هذه الاسباب تنعكس على زيادة سرعة نمو الكائن وزيادة قابليتة على تكوين مايحتاجة من مواد الايض الاولي والثانوي التي تتطلبها عملية البناء ولاسيما أنتاج الكايتين والكايتوسان اللذان يدخلان في بناء الجدار الخلوي للكائن. بيد أن التحريك العالي أو زيادة سرعة الحاضنة الهزازة

قد تسبب في تثبيط نمو الكائن في التخمرات الحيوية مما يؤدي الى أنخفاض الحصيلة من الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج، كما أن أنخفاض سرعة التهوية ينتج عنه قلة كمية الاوكسجين المتوفرة للخلايا وبالتالي هبوط معدل النمو وانخفاض المنتج من الكايتين والكايتوسان. وعلى ضوء هذه النتائج فقد عُد سرعة الحاضنة بمعدل 150 دورة / دقيقة هي الافضل لانتاج الكايتوسان من العزلة المحلية فطر *Aspergillus oryzae* قيد الدراسة. وقد تباينت الدراسات في تحديد السرعة المثلى لانتاج الكايتوسان من الاعفان في مزارع مغمورة، فقد استخدم [14] سرعة حاضنة هزارة تعادل 180 دورة / دقيقة لانتاج الكايتوسان من فطر *Aspergillu niger*، وعلى خلاف ذلك فقد وجد [19] أن أفضل انتاج للكتلة الحيوية والكايتوسان من فطر *Mucor rouxii* في مزارع مغمورة كان في حالة عدم استخدام التحريك أوالتهوية، حيث بلغت الحصيلة من الكتلة الحيوية 1.455 غم / لتر وكمية الكايتوسان 386 ملغم / لتر في حالة عدم استخدام التهوية بالمقارنة مع استخدامها حيث بلغت الكتلة الحيوية 1.355 غم / لتر وكمية الكايتوسان 353 ملغم / لتر.



شكل (8): تأثير سرعة التهوية على انتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمل الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكاربون ومستخلص الخميرة والببتون مصدرا للنتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5 وخلال 120 ساعة من الحضن على درجة 30 مْ وبحجم لقاح 15مل محتويا على 1× 10^7 بوغ/مل.

اجمالي الظروف المثلى وكفاءة الانتاج

تم في هذه الدراسة انتاج الكايتوسان من عزلة محلية من عفن *Aspergillus oryzae* SU-B2 ، كما امكن تحديد الظروف المثلى للانتاج ورفع كفاءة الانتاج الى 207.2 % جدول (1) .

جدول (1): يوضح الظروف المثلى لأنتاج لكايتوسان من الفطر *A. oryzae SU-B2*

العامل المؤثر	العامل المؤثر الامثل	الكتلة الحيوية الجاف (غم /لتر)	الكايتوسان (ملغم/لتر)	نسبة الزيادة (%)
المصدر الكاربوني	الكلوكوز	9.29	3320	-
تركيزالمصدر الكاربوني	2 %	11.5	4640	39.7
المصدر النتروجيني	مستخلص الخميرة + الببتون	13.3	5120	54.2
الرقم الهيدروجيني	5.5	14.4	5980	80.1
درجة الحرارة	30مْ	15.1	6310	90.0
فترة الحضن	120 ساعة	16.5	6720	102.4
حجم اللقاح	15مل وبمعدل 1 × 710 بوغ / مل	18.1	8380	152.4
سرعة التهوية	150 دورة / دقيقة	20.2	10200	207.2

References

1. Abd El-Naby, M.S., Helmy, M.H., Mahmoud, M.H. and Eman, I.I. (2014). Production of Some Polysaccharides from Kojic Acid Producing *Aspergillus oryzae* var. effusus NRC14 Biomass. British Biotechnology Journal. 4(11): 1212-1222.
2. Akila, R.M. (2014). Fermentative production of fungal chitosan, a versatile biopolymer (perspectives and its applications). Advances in Applied Science Research. 5(4): 157-170.
3. Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. and Heras, A. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. Current Chemical Biology. 3: 203-230.
4. Dutta, P.K., Ravikumar, M.N.V. and Dutta, J. (2002). Chitin and Chitosan for versatile applications. JMS Polymer Review. C42: 307.
5. Ghoody, G.W. (1994). Cell walls. In the Growing Fungus p43-51 London, Chapman and Hall.
6. Guha , A.K ., Chatterjee , B.P., Chatterjee , S. and Adhya, M. (2005). Production and Phisico- Chemical Characterization. Process Biochemisty. 40:395-400.
7. Ke-Jin, H., Jin-Lian, H., Kwok-Ping, H. and Kwok-Wing, Y. (2004). Screening of fungal chitosan and chitosanaceous materials. Carbohydrate Polymers. 58: 45-52.

8. Kumar, A. B. V., Varadaraj, M. C., Gowda, L.R. and Tharanathan, R.N. (2005). Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosanolysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli.* Biochemical journal. 391(2):167-175.

9. Logesh, A.R., Thillaimaharani, K.A, Sharmila, K., Kalaiselvam, M. and Raffi, S.M. (2012). Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(2): 140-143.

10. Maghsoodi, V., Razavi, J. and Yaghmaei, S. (2009). Solid State fermentation for production of chitosan by *Aspergillus niger* . International Journal of Engineering- TransactionsA: Basics. 22 (1):1-6.

11. Maghsoodi, V. and Yaghmaei, S. (2010). Comparison of solid substrate and submerged fermentation for chitosan production by *Aspergillus niger*. Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering. 17(2): 153-157.

12. Mohammad, A. E., Aroona, C., Eshrat, G., Fathabad and Fereshteh, P. (2013). Preparation of chitossan from *Pencillium* SPP. and determination of their degree of deacetylation. Indian Journal of Biotechnology. 12:231-235.

13. Nadarajah, K., Kader J., Mazmirea, M. and Paul, D.C. (2001). Production of chitosan by fungi. Pakistan Journal of Biological sciences. 4(3): 263-265.

14. Natarajan, K., Riyaz, A. B. and Rengarajan, S. (2011). Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC Strains, Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10(3):553-558.

15. Nemtsev, S.V., Zueva, O.Y., Khismatullin, M.R., Albulov, A.I., and Varlamov, V.P. (2004). Isolation of chitin and chitosan from honey bees. Applied Biochemistry and Microbiology. 40:39–43.

16. Niederhofer, A. and Muller. B.W. (2004). A Method for Direct Preparation of Chitosan with Low Molecular weight from fungi. European Journal of Pharmaceuties and BioPharmaceuties. 57:101-105.

17. Nwe, N. and Stevens, W.F. (2004). Effect of urea on Fungal Chitosan Production in Solid Substrate Fermentation., Process Biochemistry. 39:1639-1642.

18. Pradnya, N.V. and Archana, R.J. (2014). Fermentative production of mycelial chitosan from Zycomycetes: Media Optimization and physico-chemical characterization. Advance in bioscience and biotechnology. (5): 940-956.

19. Sakthivel, L. and Gopal, S. (2013). Studies on Chitosan production from different fungal mycelium. International Journal of Current Biotechnology. 1(1):9-11.

20. Sato, H., Toyoshima, Y., Shintani, T. and Gomi, K. (2011). Identification of potential cell wall component that allow Taka-amylase A adsorption in submerged cultures of *Aspergillus oryzae.* Applied Microbiology and Biotechnology. 92(5):961-969.

21. Shepherd, R., Reader, S. and Falshaw, A. (1997). Chitosan functional properties. Glycoconjugate Journal. 14:535-542.

22. Viccini, G., Mitchell, D.A., Boit, S.D., Gern, J.C., da Rosa, A.S., Costa, R.M., Dalsenter, F.D.H., van Meien, O.F. and Krieger, N. (2001). Analysis of Growth Kinetic Profiles in SSF. Food Technology and biotechnology. 39(4):271-294.