

تحديد الظروف المثلى لإنتاج 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 النهريين مركز بحوث التقانات الاحيائية

Aya Ahmed Abdulatooof

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 الذي كلوكوز امين. هو بوليمر حيوي متعدد الاستعمالات واطهر خصائص بايولوجية مختلفة فريدة من نوعها ولذلك له تطبيقات واسعة في الغذاء والطب الحيوي والصناعات الكيماوية. هدفت هذه الدراسة الى تحديد الظروف المثلى لإنتاج الكايتوسان من الفطر *Aspergillus oryzae* SU-B2 اظهرت النتائج أن أفضل تلك الظروف تتمثل باستخدام سكر الكلوكوز بتركيز 2% كمصدر للكربون وكلا من كبريتات الامونيوم بتركيز 0.5% ومستخلص الخميرة بتركيز 0.1% والبيبتون بتركيز 1% كمصدر للنيتروجين والرقم الهيدروجيني 5.5 ودرجة الحرارة 30م و لمدة 120 ساعة وحجم اللقاح 15 مل محتويا على 710x1 بوغ/ مل وبسرعة تهوية 150 دورة/ 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 % (NH₄)₂SO₄ 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 ازالة مجاميع الاستيل [3,4] التي ترتبط بمجموعة الامين في موقع كاربون رقم 2 في الكايتين. وتستعمل لهذا الغرض بعض المعاملات الكيماوية باستخدام محاليل قاعدية مركزة، وعندما تكون مجاميع الاستيل المزالة تتراوح من (35-40%) فإن الناتج هو كايتوسان [21]. يتواجد الكايتين في الهيكل الخارجي للحشرات والقشريات كالروبيان وسرطان البحر وغيرها [8]. واتجهت الدراسات الحديثة للبحث عن مصادر بديلة لإنتاج الكايتوسان وقد ركزت تلك الدراسات على أنتاجه من الفطريات وخاصة من صنف Zycomycetes، كما أن الفطريات الخيطية filamentous fungi تعتبر أيضا مصادر جيدة لإنتاج 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 1,4-β [6]. أزداد الاهتمام في الفترة الاخيرة في أنتاج الكايتوسان ومشتقاته وذلك لأستخداماته في عدة مجالات حيث يستخدم في الصناعات الغذائية كمادة حافظة او مادة متخنة 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 الكيماوي لجدار *A. oryzae* على سكريات متعددة بنسبة 90% وكمية قليلة من البروتين، ويعد الكايتين هو النسبة الأكبر 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 69.8 ملغم / 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 الحضان 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 عن *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 والطماطة 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 ، البيبتون 3غم ، كبريتات الامونيوم 1.5غم ، كلوريد الصوديوم 0.3غم ، كلوريد الكالسيوم 0.03غم ، 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 ، عمق الوسط بالمؤصدة، علما بان الكلوكوز تم اضافة الى مكونات الوسط بعد اذابته في 50 مل من الماء المقطر وعمق على أنفراد تحت نفس الظروف المذكورة أنفا وأضيف الى مكونات الوسط بعد التعقيم. استخدم هذا الوسط في إنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية للفطر [13].

انتاج وأستخلاص الكايتوسان

أُتبع طريقة تخمرات الحالة السائلة بنقل 10 مل من العالق السبوري الذي يحتوي X 1 10⁷ بوغاً / مل الى 300 مل من وسط معقم YPG في دورق الينماير سعة 500 مل لمعرفة كفاءة العزلات المنتخبة في إنتاج الكايتوسان [13]. حضنت النماذج في حاضنة هزازة على درجة 30م مدة 4 أيام في دوارق وبسرعة 150 دورة /دقيقة، أجري حصد الغزل الفطري بعد انتهاء فترة الحضانة بترشيح وسط الإنتاج بقمع بختر باستخدام ورق ترشيح Whatman No.1، جففت الكتلة الحيوية من الغزل الفطري في فرن على درجة 65م ولحين ثبات الوزن [12]، تم احتساب وزن الكتلة الحيوية الجافة من الغزل الفطري نسبة الى حجم الوسط ، وعمل الغزل الفطري الجاف بإضافة محلول قاعدي من هيدروكسيد الصوديوم تركيزه 1N الى وبكمية (1 : 40) (وزن : حجم) من وزن الغزل الفطري الجاف، مزج العالق وعمق في مؤصدة على درجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة، نبذت المواد القاعدية غير الذائبة (Alkaline 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، عملت المواد الجافة القاعدية غير الذائبة بحامض الخليك تركيزه 2% وينسبة (1 : 40) (وزن:حجم) ووضع الامونج في جهاز المكثف العكسي reflux condenser لمدة 6 ساعات وعلى حرارة 95 م لغرض أستخلاص الكايتوسان. أجريت عملية النذب 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 6000 Xg مدة 15 دقيقة، أهمل العالق وتم غسل الراسب لخمس او ست مرات بالماء المقطر والذي عد الكايتوسان المنتج . كررت العملية بالغسل باستخدام الايثانول 95% مرة والاسيتون مرة أخرى بنسبة 1:20 (وزن:حجم) وجففت الناتج بفرن على درجة حرارة 60 م لحين ثبات الوزن. قدرت كفاءة الإنتاج على اساس كمية الكايتوسان المنتجة [16].

تحديد الظروف المثلى لإنتاج الكايتوسان**1- تحديد المصدر الكربوني الأمثل**

درس تأثير عدد من مصادر الكربون على إنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لعفن *A. oryzae SU-B2* وأشتملت تلك المصادر على الكلوكوز والكالكتوز والفركتوز والسكرورز. إذ اضيفت هذه المصادر الى الوسط بتركيز 1%. حضنت النماذج في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 30 م مدة 4 أيام. وفي نهاية مدة الحضانة قدرت الكتلة الحيوية الجافة وأستخلص الكايتوسان و قدرت كميته في جميع التجارب اللاحقة لتحديد الظروف المثلى للإنتاج [2].

2- تحديد التركيز الأمثل للمصدر الكربوني

تم اختيار نسب مختلفة من الكلوكوز كفضل مصدر كربوني لإنتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae SU-B2* وعلى ضوء النتائج المتحققة في التجربة السابقة ، لذلك فقد استخدمت نسبة 1% ، 2% ، 3% ، 4% ، 5% من الكلوكوز مع ثبات مكونات الوسط الأخرى وظروف الإنتاج والأستخلاص [2].

3- تحديد المصدر النتروجيني الأمثل

درس تأثير عدد من مصادر النتروجين العضوية واللاعضوية على إنتاج الكايتوسان وأشتملت هذه المصادر على مستخلص الخميره والبيبتون وفول الصويا وكبريتات الامونيوم وشراب الذره و نترات الصوديوم كل على انفراد وبتركيز 1.6 % بدلا من المصادر النتروجينية المستخدمة في الوسط الأساس وبنفس النسبة. وتم إنتاج وأستخلاص الكايتوسان وتقدير كميته تحت نفس الظروف الألفة الذكر [2].

4- تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل

درس تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط التنمية على إنتاج الكايتوسان، وقد تم تحضير وسط التنمية بارقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 3- 6 وبفارق 0.5 من وسط لآخر، مع الاخذ بنظر الاعتبار الظروف المثالية للإنتاج المتحققة في التجارب السابقة. تم إنتاج وأستخلاص الكايتوسان وتقدير كميته تحت نفس الظروف الألفة الذكر [2].

5- تحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج

درس تأثير درجة حرارة الحضانة في الحاضنة الهزازة على إنتاج الكايتوسان، وأستعملت درجات حرارية مختلفة تراوحت بين 25- 40 م وبفارق 5 درجات بين وسط وآخر مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في إنتاج الكايتوسان في التجارب السابقة وتم أستخلاص وإنتاج الكايتوسان تحت نفس الظروف الألفة [2].

6- تحديد فترة الحضانة المثلى للإنتاج

درس تأثير فترة الحضانة وباستعمال الظروف المثلى المتحققة لإنتاج الكايتوسان في التجارب الألفة الذكر، حيث تم تنمية العزلة بالمزارع المغمورة ولفترات مختلفة تراوحت من 24 - 144 ساعة، وتم أستخلاص وتقدير الكايتوسان المنتج كل 24 ساعة تحت نفس الظروف السابقة [2].

7- تحديد حجم اللقاح الأمثل

لغرض معرفة حجم اللقاح الأمثل من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae SU-B2* ، اضيفت حجوم مختلفة من لقاح العفن شملت على 5مل، 10 مل، 15مل، 20مل و 25 مل وبتركيز 10x10⁷ بوغ / مل وتم أستخلاص وإنتاج الكايتوسان تحت الظروف المثلى للإنتاج المتحققة في الخطوات السابقة [2].

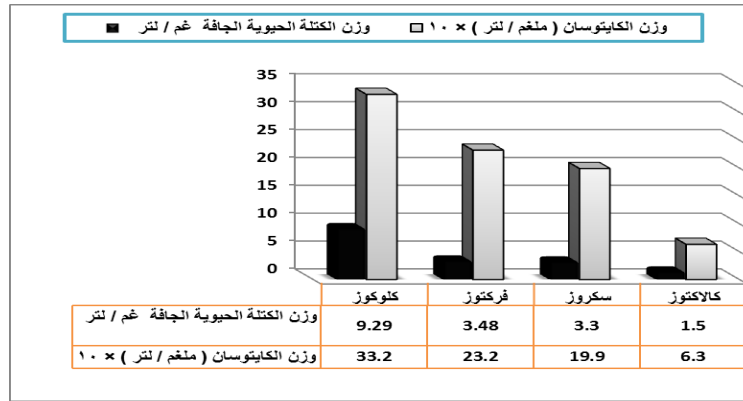
8- تحديد عدد الدورات المثلى للانتاج

درس تأثير سرعة التهوية خلال فترة الحضانة على إنتاج 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 وإنتاج الكايتوسان تحت الظروف المثلى للانتاج المتحققة في الخطوات السابقة [2].

النتائج و المناقشة

تحديد المصدر الكربوني الأمثل

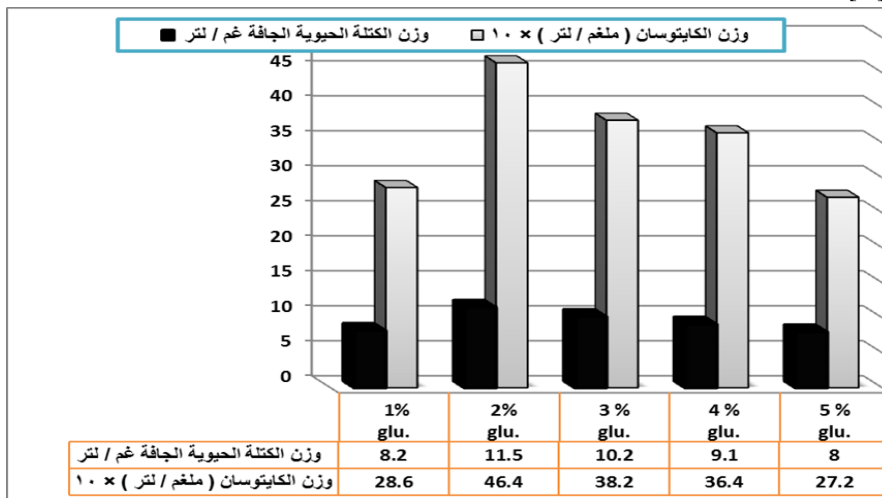
يوضح شكل (1) تأثير عدد من مصادر الكربون التي أستعملت لتدعيم الوسط في إنتاج الكايتوسان وأستملت المصادر على الكلوكوز والفركتوز والكالانوز والسكروز وبتركيز 1% ، وأظهرت النتائج أن الكلوكوز كان له التأثير الأكبر في إنتاج الكتلة الحيوية والكايتوسان، حيث بلغ وزن الكتلة الحيوية الجافة 9.29غم / لتر في حين بلغ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



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

تأثير تركيز الكلوكوز الأمثل في الانتاج

يوضح شكل (2) أن أفضل تلك التراكيز لإنتاج الكايتوسان كان بأستخدام الكلوكوز بتركيز 2%، إذ زاد إنتاج 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 إنتاج 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 أعتد على أستخدام الكلوكوز بتركيز 2 % كأفضل تركيز لإنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية قيد الدراسة. وتتفق هذه النتائج مع مذكره [13] أن زيادة تركيز الكلوكوز من 1 - 3 % أدى الى زيادة إنتاج الكايتوسان، بينما يكون للتراكيز العالية 4 % و 5 % تأثيرا ضارا أعلى نمو الفطريات وربما يؤدي الى موتها بالرغم من أن الكلوكوز يعد من الطلائع (precursor) اللازمة لتخليق الكايتين والكايتوسان، ويدخل أيضا في بناء بعض المكونات الداخل خلوية المهمة الأخرى في الخلية [5].

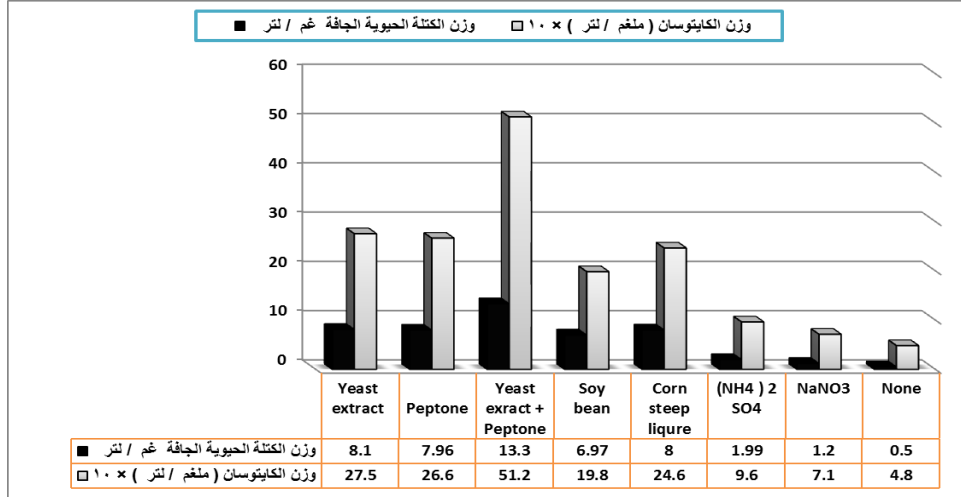


شكل (2): تأثير تركيز الكلوكوز في إنتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2

تأثير المصدر النتروجيني على إنتاج الكايتوسان

أختبر عدد من مصادر النتروجين العضوية وأخرى غير العضوية لدراسة تأثيرها في إنتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 . وشملت تلك المصادر التي أستعملت لتدعيم وسط الإنتاج على مستخلص الخميرة (Yeast extract) والبيتون (Peptone) وفول

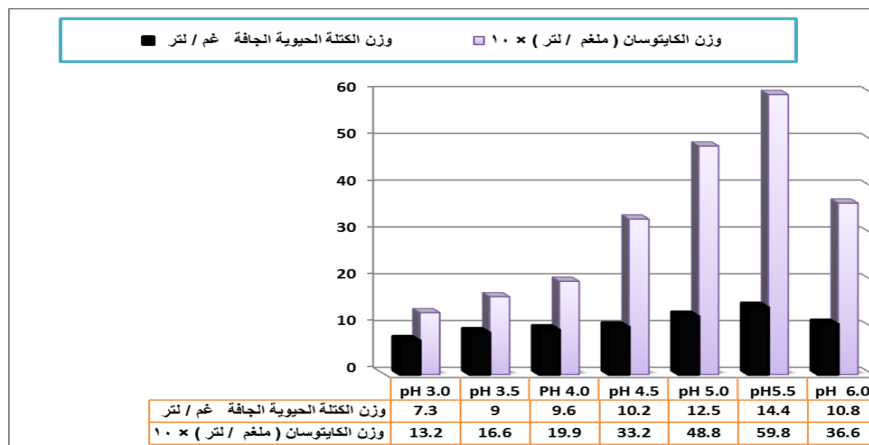
الصويا (Soy bean) وكبريتات الامونيوم (NH₄)₂SO₄) وعصير شراب الذرة (Corn steep liquor) و نترات الصوديوم (NaNO₃) ومستخلص الخميرة+ البيبتون (Yeast extract+ Peptone) شكل (3). وجد أن أفضل تلك المصادر هو مستخلص الخميرة مع البيبتون، إذ بلغت الكتلة الحيوية الجافة 13.3 غم / لتر، في حين بلغت كمية الكايتوسان المنتج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



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

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل

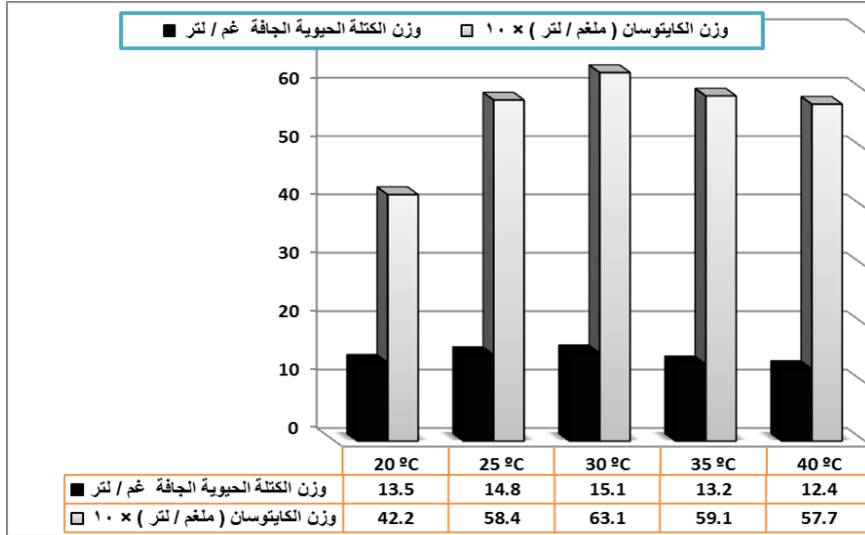
وجد أن قابلية العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 على النمو وإنتاج الكايتوسان تتغير مع تغير الرقم الهيدروجيني لوسط النمو، فقد لوحظ زيادة الكتلة الحيوية يرافقتها زيادة في كمية الكايتوسان المنتج بزيادة الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج في المزارع المغمورة ولغاية 5.5، ثم عاد إنتاج الكايتوسان والكتلة الحيوية فشهد انخفاضاً بزيادة الرقم الهيدروجيني إلى 6، إذ بلغت الكتلة الحيوية والكايتوسان 14.4 غم/لتر و 598 ملغم / لتر على التوالي عند الرقم الهيدروجيني 5.5، فيما بلغت 10.8 غم / لتر و 366 ملغم / لتر على التوالي أيضاً عند الرقم الهيدروجيني 6، شكل (4)، وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتد أن يكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط النمو هو 5.5، لذلك ينبغي التحكم بالرقم الهيدروجيني لوسط النمو كونه يعدّ احد العوامل البيئية المهمة التي لها دور في تشجيع الكائن المجهرى على النمو وإنتاج الكايتين ومن ثم الكايتوسان. وتتفق هذه النتائج مع ما وجدته [18] إذ أشار إلى أن أقصى كمية من الكتلة الحيوية والكايتوسان يمكن الحصول عليها من عزلة من فطر *Absidia butleri* NCIM 977 عندما كان الرقم الهيدروجيني لوسط النمو 5.5 أيضاً، إذ بلغت 8.6 غم / لتر و 640 ملغم / لتر على التوالي. ووجد [17] أن الرقم الهيدروجيني للأوساط التخمرية الصلبة يؤثر بشكل كبير على معدل نمو الفطريات ويتراوح الرقم الهيدروجيني المثالي لنمو معظم الفطريات بين 5.5-6.5.



شكل(4): تأثير الرقم الهيدروجيني لوسط النمو في إنتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمال الكلوكوز بتركيز 2% مصدرا للكربون ومستخلص الخميرة والبيبتون مصدرا للنتروجين.

تحديد الحرارة المثلى لانتاج الكايتوسان

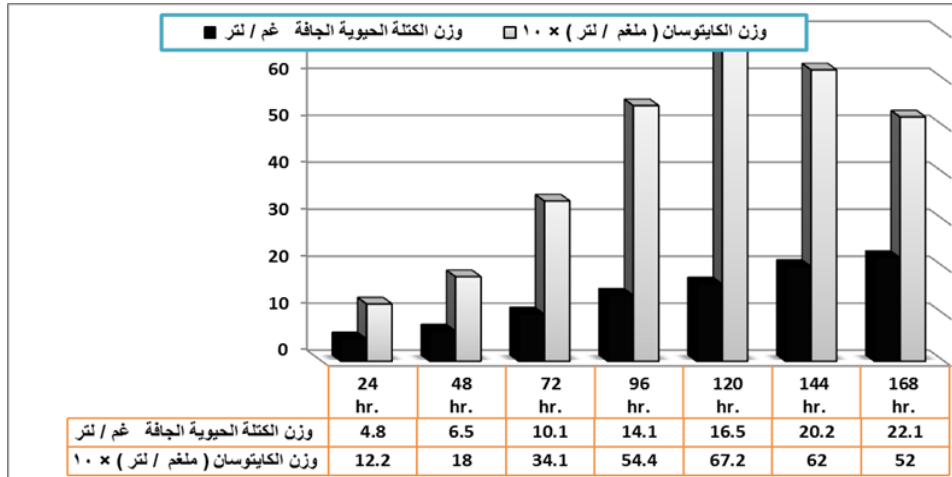
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) أن درجة الحرارة المثلى لانتاج الكايتوسان من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 هي 30م، إذ بلغت الكتلة الحيوية 15.1 غم / لتر في حين بلغت كمية الكايتوسان المنتج 631 ملغم / لتر. وعلى ضوء هذه النتائج فقد أعتمد على استخدام حرارة 30 م لتكون درجة الحرارة المثلى لتنمية الكائن المجهرى قيد الدراسة ونتاج الكايتوسان في التجارب اللاحقة، ومن الجدير بالذكر أن انخفاض درجة الحرارة أو ارتفاعها عن الحد الأمثل له أثر سلبي على تكوين الكتلة الحيوية ونتاج الكايتوسان لأن الأمر مرتبط بقدر 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 *Aspidia butleri* NCIM 977 بطريقة المزارع المغمورة كانت 30 م حيث بلغت الكتلة الحيوية 8.4 غم / لتر في حين بلغت الحصيلة من الكايتوسان 667.16 ملغم / لتر، كما استخدم [14] درجة حرارة 30م لانتاج الكايتوسان من عزلة من فطر (872 , 2208 and 1785) *Aspergillus niger* MTCC strains إذ بلغت كمية الكتلة الحيوية لهذه العزلات 19.8، 20.8 و 17.3 غم /لتر على التوالي.



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

تأثير فترة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان

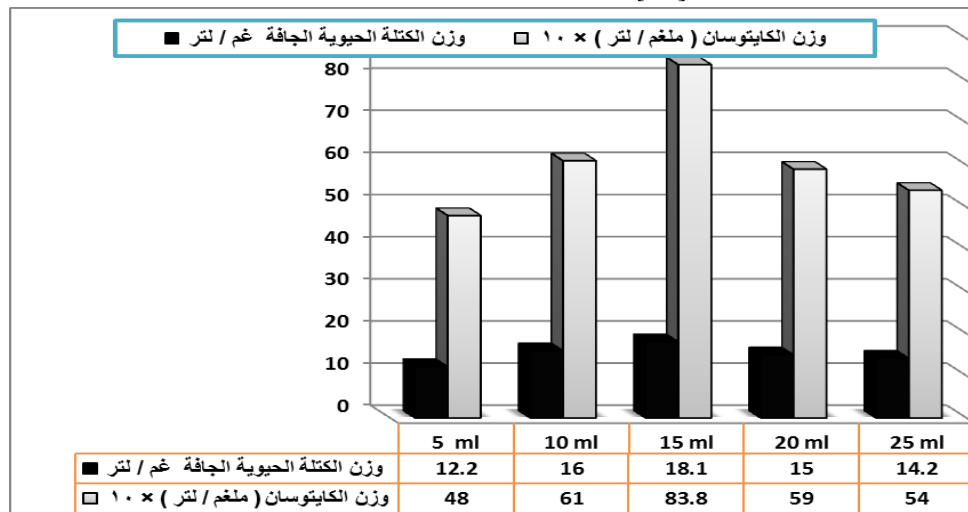
لتقدير الوقت الأمثل لانتاج الكايتوسان فقد جرت العملية التخمرية في وسط أنتاج معقم بحجم 300 مل وحضن على درجة الحرارة المثلى للنتاج 30 م في حاضنة هزازة وعلى سرعة 150 دورة / دقيقة ولفترات مختلفة تراوحت من 24 – 168 ساعة. لوحظ أن الزيادة في الكتلة الحيوية كانت متوافقة مع الزيادة في كمية الكايتوسان ولغاية 120 ساعة من الحضانة، إلا أن كمية الكايتوسان الناتجة من العزلة المحلية لفطر *A. oryzae* SU-B2 شهدت انخفاضاً بعد ذلك وبلغت 520 ملغم / لتر بعد مرور 148 ساعة من الحضانة في الوقت الذي كانت عند أقصاها 672 ملغم / لتر بعد مرور 120 ساعة من الحضانة. وعلى النقيض من ذلك فقد استمرت الحصيلة للكتلة الحيوية بالارتفاع، حيث بلغت أقصاها 22.1 غم / لتر بعد مرور 148 ساعة من الحضانة شكل (6)، لذلك فقد عُدت مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان من الكائن المجهرى قيد الدراسة هو 120 ساعة لاستخدامها في الدراسات اللاحقة. وقد يعود سبب تدهور أو انخفاض كمية الكايتوسان المنتجة وارتفاع كمية الكتلة الحيوية من الكائن المجهرى 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 المجهرى 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 أُعتبرت مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان في التجارب اللاحقة هي 120 ساعة. وقد تباينت الدراسات في تحديد مدة الحضانة المثلى لانتاج الكايتوسان حسب نوع الكائن المجهرى المستخدم في العملية التخمرية.



شكل (6): تأثير فترة الحضانة على إنتاج الكايتوسان من عزلة محلية من عفن *A. oryzae* SU-B2 وباستعمال الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكربون ومستخلص الخميرة والبيتون مصدرا للنيتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5 وبدرجة حرارة 30 م.

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 استخدام حجم لقاح 5 مل يحتوي على 1×10^7 بوغ / مل، وازدادت الكتلة الحيوية 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 انخفضت 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 ولا يتناسب مع حجم الوسط لذلك فعند زيادة حجم اللقاح أدى بدوره الى زيادة في الكمية المنتجة من الكتلة الحيوية والكايتوسان [22].

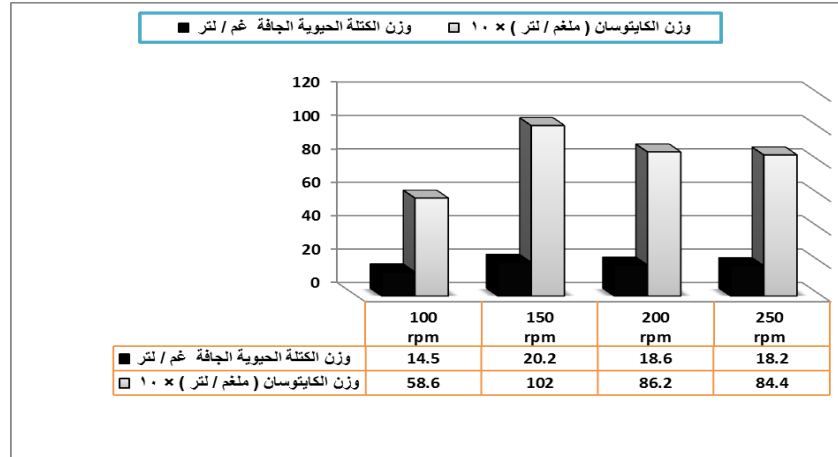


شكل (7): تأثير حجم اللقاح المضاف الانتاج على إنتاج الكايتوسان من عزلة محلية من فطر *A. oryzae* SU-B2 وباستعمال الكلوكوز بتركيز 2 % مصدرا للكربون ومستخلص الخميرة والبيتون مصدرا للنيتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5 وخلال 120 ساعة من الحضانة على درجة 30 م.

تأثير درجة التهوية في إنتاج الكايتوسان

يبين شكل (8) تأثير سرعة التهوية في الحاضنة الهزازة في إنتاج الكايتوسان من فطر *A. oryzae*، إذ يلاحظ من هذا الشكل أن زيادة سرعة التهوية من 100 الى 150 دورة / دقيقة تؤدي الى زيادة الحصيلية من الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج إلا أن هذه الزيادة تراجعت عندما زادت سرعة الدوران للحاضنة الهزازة الى 200 و 250 دورة / دقيقة حيث بلغت الحصيلية من الكتلة الحيوية والكايتوسان أذناها 18.2 غم / لتر و 844 ملغم / لتر على التوالي عند السرعة 250 دورة / دقيقة بعد أن كانت عند أقصاها 20.2 غم / 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 المجهرى، فضلا عن أن الفطريات تعد كائنات هوائية إجبارا فهي تحتاج الى وفرة من الاوكسجين في التنمية والانتاج. وكل هذه الاسباب تتعكس على زيادة سرعة نمو الكائن وزيادة قابليته على تكوين ما يحتاجه من مواد الايض الاولى والثانوي التي تتطلبها عملية البناء ولاسيما إنتاج 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 انخفاض الحصيصة من الكتلة الحيوية والكايتوسان المنتج، كما أن انخفاض سرعة التهوية ينتج عنه قلة كمية الاوكسجين المتوفرة للخلايا وبالتالي هبوط معدل النمو وانخفاض المنتج من الكايتين والكايتوسان. وعلى ضوء هذه النتائج فقد عد 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 *Aspergillus 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 أو التهوية، حيث بلغت الحصيصة 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 للكربون ومستخلص الخميرة والبيتون مصدرا للنيتروجين والرقم الهيدروجيني للوسط 5.5 وخلال 120 ساعة من الحضانة على درجة 30 م° وبحجم لقاح 15 مل 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 لانتاج لكايتوسان من الفطر *A. oryzae* SU-B2

العامل المؤثر	العامل المؤثر الأمثل	الكتلة الحيوية الجافة (غم / لتر)	الكايتوسان (ملغم/لتر)	نسبة الزيادة (%)
المصدر الكربوني	الكلوكوز	9.29	3320	-
تركيز المصدر الكربوني	2 %	11.5	4640	39.7
المصدر النيتروجيني	مستخلص الخميرة + البيتون	13.3	5120	54.2
الرقم الهيدروجيني	5.5	14.4	5980	80.1
درجة الحرارة	30 م°	15.1	6310	90.0
فترة الحضانة	120 ساعة	16.5	6720	102.4
حجم اللقاح	15 مل 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. Ghoady, 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 Physico- Chemical Characterization. Process Biochemistry. 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 chitosan analysis 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 chitosan from *Penicillium* 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 Pharmaceutics and BioPharmaceutics*. 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.