مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد ٤٠ العدد ٤ (٢٠٢٥): ١-١٤

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo ٤٠ No.4 (2025): 1-14

إنتاج الكيتوزان من بعض أنواع الفطور الدقيقة بالتخمير المغمور في وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة

آلاء مجر[١*]، ومحمد فواز العظمة [٢] ونزار عيسى[٣]

١طالبة ماجستير تقانات حيوية–كلية الزراعة – جامعة دمشق.

٢ أستاذ في قسم وقاية النبات – كلية الزراعة– جامعة دمشق.

٣ أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم– جامعة دمشق.

ملخص:

يُعتبَر الجدار الخلوي للفطور مصدراً بديلاً للكيتوزان، حيث وُجِد بأنَّ الكيتين والكيتوزان المستخلص من الفطور أنقى وأكثر تماسكاً، ويحوي ملوثات مُحسِّسة أقل من الكيتين المستخلص من مخلفات المحار shellfish وبالتالي يكون أكثر ملائمة لاستخدامه في التطبيقات الصيدلانية والغذائية، كما يمكن الحصول على المشيجة الفطرية بطرائق سهلة وسريعة ومنخفضة التكلفة بغض النظر عن الموقع الجغرافي والفصل. في هذه الدراسة تمَّ استخلاص الكيتوزان من الجدار الخلوي لثلاثة أنواع من الفطور *Rhizopus stolonifer*، *Aspergillus niger*، and *Penicillium italicum* بعد تنميتها في وسط سائل من عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعةJuice Sweet Sorghum (SSJ) بطريقة التخمير المغمور Submerged Fermentation (SmF). حيث أعطى فطر *Rhizopus stolonifer* أكبر كمية من الكيتوزان بنسبة ٤.٩٪ من الوزن الجاف لمشيجة الفطر، بناءً عليه تمت أمثلة وسط الزرع السائل للحصول على أكبر كتلة جافة من هذا الفطر. أظهرت النتائج أنَّ تمديد الوسط بنسبة 70/30 حجماً بالماء المقطر وبالتخمير المغمور لمدة ٦ أيام على درجة حرارة ٢٥° س مع إضافة بيبتون بتركيز ٢٪ الوسط وبسرعة دوران rpm=150 أنتج أكبر كتلة جافة من مشيجة الفطر، و قد تمَّ تنفيذ هذا العمل في مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخبر البيولوجيا الجزيئية في الجامعة العربية الدولية.

الكلمات المفتاحية: الكيتوزان، عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة، Rhizopus stolonifera.

تاريخ الايداع:٢٠٢١/١٢/٧
تاريخ القبول: ٢٠٢٢/٣/٣٠

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

production of chitosan from some micro fungi by submerged fermentation in Sweet Sorghum Juice

Alaa Majar[1*], Mohammad Fawaz Azmeh[2], and Nizar Issa[3]

[*1]Master's student in Folk Technologies, Faculty of Agriculture, Damascus University.

[2] Professor in the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University.

[3]Assistant Professor in the Department of Biology, Faculty of Science, Damascus University.

Received: 7/12/2021
Accepted: 30/3/2022

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

Fungal cell wall is an alternative source of chitosan. Fungal chitin and chitosan is purer, more coherent, and contains less allergens than chitin extracted from shellfish, so it is more suitable for pharmaceutical and food applications, considering that fungal mycelium can be obtained by simple, rapid, and low cost ways regardless of geographical location or season. In this study chitosan was extracted from Rhizopus stolonifer, Aspergillus niger and Penicillium italicum by submerged fermentation in Sweet Sorghum Juice (SSJ). It was observed after growing fungi on diluted Sweet Sorghum Juice (SSJ) by submerged fermentation that Rhizopus stolonifer gave the biggest amount of chitosan (4.9% of mycelium dry weight). The liquid medium was optimized to get the biggest dry weight of this fungus. The results showed that diluting the medium SSJ to 30/70 v/v in distilled water under submerged fermentation for 6 days at 25º C degree by adding 2% of peptone into medium and 150 rpm rotation speed had given the biggest dry weight of Rhizopus stolonifer.

Key Words: Chitosan, Rhizopus Stolonifer, Sweet Sorghum Juice.

١. المقدمة:

١-١ التخمير:

التخمير هو تقنية للتحويل الحيوي للركائز المعقدة إلى مركبات بسيطة عن طريق أحياء دقيقة متنوعة كالجراثيم والفطور. أدَّى تطوير هذه التقنيات كالتخمير المغمور والتخمير بالحالة الصلبة إلى الإنتاج الصناعي للمركبات الفعالة حيوياً. حيث استُعمِل التخمير بشكل واسع لإنتاج مواد متنوعة تملك أهمية عالية للأفراد والصناعة. وقد اكتسَبَت تقنيات التخمير أهمية عبر السنين نتيجة لميزاتها البيئية والاقتصادية. تم تعديل التقنيات القديمة لزيادة الإنتاجية وتَضَمَّن هذا التطوير عمليات وآلات جديدة، وقد برزت تقنيتي تخمير واسعتين كنتيجة لهذا التطور السريع: التخمير المغمور (SmF) Submerged Fermentation والتخمير بالحالة الصلبة Solid State Fermentation (SSF). حيث تتمتع تقنية التخمير المغمور بالعديد من الميزات كالوقت القصير والكلفة المنخفضة والإنتاجية العالية وبسهولة تنقية المنتج والتحكُّم السهل(Aryal,2019) .

وسط عُصارة ساق الذرة البيضاء السكرية وهو وسط التخمير المستخدم في هذا البحث يُعتبَر البديل الأمثل لإنتاج السكر والوقود الحيوي Biofuel في العديد من الدول وذلك لقلة تكاليف زرعه ومتطلباته المائية المحدودة وتأقلُمه البيئي الواسع مع مختلف الظروف الجوية وقلة حساسيته تجاه الإضاءة والحرارة مما يسهل زراعته في أوقات ومواعيد متباينة دون التأثير على إنتاجيته (Turki *et al,*2010).

١-٢ الكيتوزان:

الكيتوزان أو poly(β−(1→ 4)D-glucosamine) ناتج عن نزع زمرة الأستيل deactylation من الكيتينN-acetyl glucosamine ، وهو بوليمير طبيعي غير سام قابل للتحلل الحيوي Biodegradable، وله استخدامات هامة وواسعة في مختلف المجالات ويتم إنتاجه بصورة أساسية من القشريات البحرية (سرطان crabs، قريدسshrimp، سلطعون النهرcrayfishes) والتي تعد محدودة في سورية، يمكن كذلك استخلاص الكيتوزان من الحشرات مثل الذباب بمختلف مراحل حياتها(يرقة، شرنقة)(L.soetemans *et al,*2020) اعتبار جدران الفطور مصدراً بديلاً للكيتوزان حيث تَبَيّن أنَّ استخلاص الكيتوزان من الفطور، مقارنةً مع القشريات، يملك العديد من المزايا مثل معدل النمو العالي للفطور، المحتوى المنخفض من المعادن، واحتمالية استخدام مخلفاتها في الصناعات المختلفة (V.P.Ivshin *et al,*2007). كما أنَّ الكيتين المستخلص من الفطور أنقى وأكثر تماسكاً، ويحوي ملوثات مُحسِّسة أقل من الكيتين المستخلص من مخلفات المحار shellfish وبالتالي يكون أكثر ملائمة لاستخدامه في التطبيقات الصيدلانية والغذائية والأنسجة (T.Okada and I.Kubo,1999). بالإضافة إلى أنَّ مخلفات القشريات البحرية محدودة بالفصول وأماكن الصناعة السمكية بينما المشيجة الفطرية يمكن الحصول عليها بالتخمير بغض النظر عن الموقع الجغرافي والفصل (Yoshihara *et al,*2003;Chatterjee *et al,*2005). تمَّ في هذه الدراسة تنمية الفطور بعملية التخمير المغمور ضمن وسط بديل من عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice (SSJ) والذي يعد منخفض التكلفة مقارنة بأوساط الزرع السائلة التقليدية.

١-٣ مصادر استخلاص الكيتوزان في هذا البحث:

١. *Rhizopus stolonifer* هو جنس شائع من الفطور الزيجية الرُمية يُعرف بعفن الخبز الأسود black bread mold وأبواغ هذا الفطر منتشرة في الهواء في جميع أنحاء العالم خاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ، وهو عامل شائع في فساد الأغذية المخزنة ، وينمو هذا الفطر على البقايا النباتية أو على روث الحيوانات، ويستفاد منه صناعياً في إنتاج العديد من المركبات الكيميائية مثل حمض الفيوماريك (فضول و نفاع،٢٠٠٦)، وقد تمَّ أخذ العزلة الفطرية من ثمرة شمام (قرية جسرين غوطة دمشق ٢٠٢٠/٩/٦).

٢. *Aspergillus niger* من الفطريات الزقية وهي واسعة الانتشار في الطبيعة تعيش على أي وسط غير حي وعلى جميع أنواع الخضروات والثمار والفواكه واللحوم، وتُسبِّب لها أعفان وروائح كريهة ، ويُستفاد منها في إنتاج بعض أنواع المضادات الحيوية مثل أسبرجيللين Aspergillin وإنتاج حمض الليمون وحمض الغليكوني وحمض الحماض وغيرها من الحموض العضوية(فضول و نفاع،٢٠٠٦)، وقد تم أخذ العزلة الفطرية من البصل المتواجد في السوق المحلية.

٣. *Penicillium italicum:* من الفطريات الزقية وهي المسببة لعفن الحمضيات الأزرق (فضول ونفاع،٢٠٠٦).

١-٤ استخلاص الكيتوزان

تشمل عملية استخلاص الكيتين والكيتوزان بشكل عام ثلاث خطوات رئيسية(Benhablies *et al,* 2019) هي:

١- إزالة المعادن demineralization

٢-إزالة البروتينات deproteinization

٣- نزع الأستلة deactylation

بينما في حالة الكيتوزان الفطري والذي يملك محتوى منخفض من المعادن تشمل عملية الاستخلاص الخطوات التالية:

١. المعالجة القلوية لإزالة البروتينات والسكريات المتعددة المنحلة في الوسط القلوي

٢. إرجاع حمضي لفصل الكيتين والكيتوزان

٣. ترسيب الكيتوزان ضمن شروط قلوية(S.Muslim *et al,*2019).

- تمَّ إنتاج الكيتوزان بالتخمير المغمور لأول مرة من خلال فطر *Lentinus edodes* (Crestini *et al* ,1996).
- وفي دراسة أخرى تمَّت المقارنة بين طريقتي إنتاج الكيتوزان بالحالة الصلبة والتخمير المغمور لفطر *butleri* Gongronella وتَبَيّن أنَّ الإنتاج والكتلة الحيوية كانتا أكبر بـ 2.5-1.5 مرة بالتخمير المغمور منه بالتخمير بالحالة الصلبة SSF (Nwe *et al,*2002).
- وتمَّ إنتاج الكيتوزان من فطر *Mucor rouxii* (Chatterjee *et al,*2005).
- في عام 2009 تمَّ إنتاج الكيتوزان من فطر *Aspergillus niger* بالتخمير المغمور (Maghsoodi *et al,*2009).
- وتمت في دراسة أخرى المقارنة بين عدة طرائق استخلاص للكيتين من فطر *Ganoderma lucidium* الذي جرت تنميته الحصول بالتخمير المغمور (Alvarez et al ,2014).

١-٥ أهمية الكيتوزان وتطبيقاته المختلفة:

أظهرت الأبحاث المختلفة أهمية كبيرة واستخدامات واسعة للكيتوزان، فهو بلمر طبيعي غير سام، وقابل للتحلُّل الحيوي، لذلك يعتبر من البوليميرات الهامة في المجالات الزراعية والصيدلانية والغذائية(Morin *et al,*2019) ، إضافة للمجالات الصناعية والنسيجية (Lim and Hudson,2004)، واستُخدِم الكيتوزان في العديد من المجالات الطبية والتجميلية (Aranaz *et al,* 2018)، ومعالجة المياه،(Yong *et al,*2015) ، ووقاية النبات(Kurita،2006). كما يتم إجراء بعض التعديلات الكيميائية على الكيتوزان لتناسب استخداماته المختلفة(V.K.Mourya and Nazma N.Inamdar,2008).

ونظراً للاستخدامات الواسعة والمهمة للكيتوزان وقلة مصادره التقليدية عالمياً (الجدار الخارجي للقشريات) في سورية، ظهرت الحاجة للحصول على الكيتوزان من مصادر أخرى غير تقليدية كالجُدُر الخلوية للفطور بالنظر إلى أنَّه يمكن الحصول على المشيجة الفطرية بطرائق سهلة، سريعة ومنخفضة التكلفة، وبغض النظر عن الموقع الجغرافي والموسم . لذلك هدف هذا البحث إلى:

- دراسة إمكانية استخلاص الكيتين والكيتوزان من ثلاثة أنواع من الفطور الدقيقة (*Penicillium italicum/Rhizopus stolonifer /Aspergillus niger*)

بعد تنميتها للحصول على أكبر كتلة حيوية بطريقة التخمير المغمور ومن ثمَّ انتخاب العزلة الفطرية الأكثر مردوداً وأمثلة شروط تنميتها على وسط الزرع السائل.

٢. المواد والطرائق:

تم تنفيذ العمل في مخبر التنوع الحيوي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخبر البيولوجيا الجزيئية في الجامعة العربية الدولية.

٢-١ عزلات الفطور المستخدمة في هذه الدراسة

- تم الحصول على فطر *Rhizopus stolonifer* من ثمرة شمام ناضجة مصدرها (قرية جسرين الغوطة الشرقية ،ريف دمشق).
- تم الحصول على فطر *Aspegillus niger* من البصل من السوق المحلية.
- تم الحصول على فطر *Penicillum italicum* من ثمرة برتقال من السوق المحلية.

وتم زرع العزلات الفطرية الثلاث على وسط Sabouraud dextrose agar SDA لمدة ٣ أيام بدرجة حرارة ٣٠ْ س بعد تعقيم الوسط بالصاد الموصد autoclave بدرجة حرارة ١٢١ْس لمدة ١٥ دقيقة.

٢-٢ الوسط السائل المستخدم في عملية التخمير المغمور للفطور

عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ sweet sorghum juice درجة بريكس Brix للعُصارة ١٤.٣ (أي كل ١٠٠ مل من العُصارة تحوي ١٤.٣ غ سكريات) حيث استُخدِمَت هذه العُصارة كوسط سائل لتنمية الفطور بطريقة التخمير المغمور وتمَّ الحصول على العُصارة الخام من الهيئة العامة للتقانة الحيوية.

٢-٣ زرع الفطور الدقيقة ضمن وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ واستخلاص الكيتوزان منها

تمَّ زرع ٣ أنواع من الفطور الدقيقة (*Aspergillus niger/Rhizopus stolonifer/Penicillum italicum*) على وسط *SDA* بعد *تعقيمه* على درجة حرارة ١٢١° س ولمدة ١٥ دقيقة ضمن الصاد الموصد autoclave ثم حُضِنَت لمدة ٣ أيام على درجة حرارة ٣٠ ْس.

ثمَّ تمَّ التلقيح بخزعة من المشيجة الفطرية الناتجة ضمن دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل تحوي ٥٠ مل من وسط SSJ بتمديد ٣٠٪ -والذي تَبَيّن بأنَّه التركيز الأفضل في تجربة أولية أُجريت على فطر *Rhizopus stolonifer*- بعد تعقيمه على درجة حرارة ١٢١° س ولمدة ١٥ دقيقة ضمن الصاد الموصد autoclave وحُضِنَت الدوارق بعدها في الحاضنة الهزازة incubator shaker (INNOVA40) على درجة حرارة ٣٠° س وسرعة دوران 150 rpm لمدة ٦ أيام .وتم بعد ذلك ترشيح المشيجة الفطرية الناتجة وتجفيفها في الفرن على درجة حرارة ٦٠ ْس لمدة ٢٤ ساعة ثم وُزِنَت الكتلة الجافة بميزان حساس(sartorius d=0.001g).

٢-٤ أمثلة شروط زرع فطر *Rhizopus stolonifer* في وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ Sweet Sorghum Juice

- في تجربة أولية لتحديد التركيز الأمثل إلى وسط SSJ تمّ تمديد وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة بنسب مختلفة بالماء المقطر حيث وُضع ٥٠ مل من الوسط في كل دورق زجاجي مخروطي سعة ٢٥٠ مل وبثلاثة مكررات لكل تركيز ومن ثم تمّ تعقيم الوسط على درجة حرارة ١٢١° س ولمدة ١٥ دقيقة ضمن الصاد الموصد autoclave ثم تمّ تلقيح كل دورق بخزعة من المشيجة الفطرية لفطر *Rhizopus stolonifer* المزروع على وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) لمدة ٣ أيام على درجة حرارة ٣٠ ْس. حُضِنَت الدوارق بعدها في الحاضنة الهزازة incubator shaker (INNOVA40)على درجة حرارة ٣٠° س وسرعة دوران 150= rpm لمدة ٦ أيام .تمّ بعد ذلك ترشيح المشيجة الفطرية الناتجة وتجفيفها في الفرن على درجة حرارة ٦٠ ْس لمدة ٢٤ ساعة ثمَّ وُزنت الكتلة الجافة بميزان حساس(sartorius d=0.001g).
- تمَّت أمثلة شروط الزرع لفطر *Rhizopus stolonifer* في ثلاثة تمديدات مختلفة إلى وسط SSJ(٣٠٪-٣٥٪-٤٠٪) بإضافة الماء المقطر حيث وُضِع ٥٠ مل من وسط عُصارة ساق الذرة السكرية الرفيعةSweet Sorghum Juice SSJ ضمن كل

دورق من الدوارق مخروطية سعة ٢٥٠ مل والتي تمَّ تعقيمها بالصاد الموصد autoclave على درجة حرارة ١٢١° س لمدة ١٥ دقيقة. بعدها تمَّ تلقيح الوسط السائل بخزعة من الفطور وتمَّ حضن الدوارق على ثلاث درجات حرارة مختلفة (٢٥-٣٠-٣٥ ° س) وبثلاثة مكررات لكل تمديد ولمدة ٦ أيام ضمن جهاز incubator shaker وبسرعة دوران (rpm=150) دورة بالدقيقة وتمَّ بعدها ترشيح المشيجة الفطرية وتجفيفها بالفرن على درجة حرارة ٦٠°س لمدة يوم واحد وحساب الوزن الجاف للمشيجة الفطرية بميزان حساس .(sartorius d=0.001g)

- تم كذلك زرع عزلة فطر *Rhizopus stolonifer* المأخوذة من ثمرة الشمام على درجة حرارة ٢٥° س و٣٠°س داخل دورق ٢٥٠مل يحوي ٥٠ مل من وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ الممدد بنسبة ٣٠٪ لمدة ٦ أيام وسرعة دوران rpm=150 وبإضافة بيبتون peptone بنسبة ١٪ و٢٪ حيث تمت إضافة البيبتون peptone إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ بعد تعقيمه على درجة حرارة ١٢١°س لمدة ١٥ دقيقة ثم تركه يبرد بحرارة الغرفة إلى أن تصبح حرارته حوالي ٦٠°س ثم أضيفت كمية البيبتون المطلوبة (١٪ أو٢٪) وبثلاثة مكررات لكل تركيز وتم بعدها ترشيح المشيجة الفطرية وتجفيفها بالفرن على درجة حرارة ٦٠°س لمدة يوم واحد وحساب الوزن الجاف للمشيجة الفطرية بميزان حساس (sartorius d=0.001g).

٢-٥ استخلاص الكيتوزان

تمَّ جمع المشيجة الفطرية الناتجة بعد تجفيفها بالفرن على درجة حرارة ٦٠° س، وتمَّت بعدها المعالجة القلوية بإضافة ٥٠ مل من هيدروكسيد الصوديوم بتركيزين مختلفين NaOH(1N)(2N) لكل ١غرام (وزن جاف) من المشيجة حيث أُجريَت المعالجة بشروط مختلفة (درجة حرارة ١٢١°س لمدة ٢٠ دقيقة / درجة حرارة ٩٥°س لمدة ساعتين). بعدها جُمعَت المواد القلوية غير المنحلة بالترسيب ضمن المثفلة centrifuge (Hettich EBA 8)على سرعة دوران٦٠٠٠rpm لمدة ٢٠ دقيقة ثم غُسِلَت عدة مرات بالماء المقطر لتعديل درجة الحموضة pH=7 وجُفِفَت المواد القلوية غير المنحلة بالفرن على درجة حرارة ٤٠°س.تمَّت المعاملة بعدها بحمض الخل ٢٪ (v/v) كمحل للكيتوزان تحت ظروف إرجاع لمدة ٦ ساعات على درجة حرارة ٩٥°س حيث تمت إضافة ٣٠ مل من حمض الخل بتركيز ٢٪ لكل ١ غ من المواد القلوية غير المنحلة المتبقية بعد المعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم. وفُصلَت المواد غير المنحلة بالحمض بالترسيب ضمن المثفلة على سرعة دوران ٦٠٠٠ rpm لمدة ١٥-٢٠ دقيقة. بعد ذلك ومن أجل ترسيب الكيتوزان الفطري تمَّ عزل الطافي الحاوي على الكيتوزان وضبط درجة الحموضة pH=١٠ بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز NaOH (2N). ثم تمَّ تثفيل الكيتوزان المترسب بواسطة المثفلة على سرعة دوران٦٠٠٠ rpm لمدة ١٥ دقيقة. تمَّ بعدها غسل الكيتوزان المعزول ٤ إلى ٥ مرات بالماء المقطر لتعديل ال pH. استُخدِم بعدها الإيتانول ٩٦٪ لغسل الكيتوزان ثم جُفِف بالفرن على درجة حرارة ٦٠°س (Chatterjee *et al,*2005؛Nwe *et al,*2001).

٣. النتائج والمناقشة:

٣-١ استخلاص الكيتوزان من الفطور الدقيقة في وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ

يُبَيّن الجدول ١ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية مقدراً بالغرام (متوسط لثلاثة مكررات) بعد زرعها لمدة ٦ أيام على درجة حرارة ٣٠° س و وزن الكيتين والكيتوزان الناتج عن ٥ غ من هذه الفطور (متوسط لمكررين) حيث وُجِد أنَّ فطر *Aspergillus niger* أعطى أكبر كمية من الكيتين٣.٠٣ غ أي بنسبة ٦٠.٦٪ من الوزن الجاف للفطر مقارنة مع فطر *Rhizopus stolonifer* والذي نتج عنه ٢.٢٤ غ من الكيتين أي بنسبة٤٤.٨٪ من الوزن الجاف للفطر وفطر*Penicillium italicum* الذي أعطى ١.٥ غ من الكيتين أي بنسبة ٣٠٪ من الوزن الجاف للفطر. أما أكبر كمية من الكيتوزان نتجت عن فطر ال *Rhizopus stolonifer* ٠.٢٢٢ غ بنسبة ٤.٤٤٪ من الوزن الجاف للفطر مقارنة

مع ٠.٧٦٪ و٠.٤٢٪ على التوالي من *فطور Aspergillus niger* و*Penicillium italicum* لذلك تمَّت أمثلة شروط وسط SSJ للحصول على أكبر كتلة جافة من فطر *Rhizopus stolonifer* واستخلاص الكيتوزان منه.

الجدول ١الوزن الجاف للمشيجة الفطرية (غ) بعد زرعها لمدة ٦ أيام على درجة حرارة ٣٠° س ووزن الكيتين والكيتوزان الناتج عن ٥ غرام من كل نوع من الفطور (غ)

نوع الفطر المستخدم	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة± الانحراف المعياري (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)	وزن الكيتين(غ)	وزن الكيتوزان(غ)
Rhizopus stolonifer	0.265±0.033	5.3	2.24±0.37	0.222±0.028
Aspergillus niger	0.365±0.115	7.3	3.03±0.11	0.038±0.022
Penicillium italicum	0.501±0.056	10.02	1.5±0.50	0.021±0.011

٣-٢ أمثلة نمو فطر *Rhizopus stolonifer* على وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ:

٣-٢-١ أمثلة تركيز وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ

يُبَيّن الجدول ٢ الوزن الجاف لمشيجة فطر *Rhizopus stolonifer* مقدراً بالغرام (متوسط ثلاثة مكررات) بعد الزرع في تمديدات مختلفة من وسط SSJ لمدة٦ أيام على درجة حرارة ٣٠ °س حيث أظهرت النتائج أنَّ تمديد الوسط بنسبة ٣٠٪ أعطى أكبر كتلة جافة من مشيجة الفطر (٧.٨٤غ).

الجدول٢ الوزن الجاف لمشيجة فطر*Rhizopus stolonifer* (غ) بعد الزرع في تمديدات مختلفة من وسط SSJ لمدة٦ أيام على درجة حرارة ٣٠ °س

تمديد الوسط السائل	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة± الانحراف المعياري (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)
%25	0.012±0.007	0.246
%30	0.392±0.073	7.84
%35	0.294±0.061	5.88
%40	0.287±0.130	5.74

٣-٢-١ أمثلة درجات الحرارة وتراكيز وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ

يُبَيّن الجدول ٣ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية مقدراً بالغرام (متوسط لثلاث مكررات) بعد الزرع على درجات حرارة (٢٥-٣٠-٣٥ °س)، حيث وُجِد أنَّ زرع فطر *Rhizopus stolonifer* في وسط SSJ المُمَدد بنسبة ٣٠٪ (درجة بريكس Brix ٤.٣) وضمن درجة حرارة ٢٥° س ولمدة ٦ أيام وبسرعة دوران ١٥٠ rpm قد أعطى أكبر كتلة جافة من هذا الفطر.

أي أنَّ الكتلة الحيوية الأكبر للمشيجة الفطرية المأخوذة من عزلة *Rhizopus stolonifer* تم الحصول عليها بعد زرع العزلة في وسط SSJ بتمديد ٣٠٪ وعلى درجة حرارة ٢٥° س.

الجدول ٣ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية (غ) (متوسط لثلاث مكررات) بعد الزرع على درجات حرارة (٢٥-٣٠-٣٥ °س)

درجة الحرارة(س)	٢٥°	٢٥°	٣٠°	٣٠°	٣٥°	٣٥°
تمديد الوسط السائل	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)
%30	0.593±0.105	11.86	0.463±0.110	9.26	0.0756±0.046	1.512
%35	0.464±0.050	9.28	0.436±0.066	8.72	0.107±0.067	2.140
%40	0.548±0.122	10.96	0.544±0.075	10.88	0.062±0.042	1.240

٣-٢-٢ تأثير إضافة بيبتون إلى عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ:

يُبَيّن الجدول ٤ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية مقدراً بالغرام (متوسط لثلاثة مكررات) بعد إضافة بيبتون والتخمير على درجة حرارة ٢٥° و٣٠°س ، حيث وُجِد أنَّ إضافة بيبتون بنسبة ٢٪ إلى وسط SSJ وبالتخمير ضمن درجة حرارة ٢٥°س لمدة ٦ أيام وعلى سرعة دوران ١٥٠rpm أعطى أكبر كتلة حيوية جافة من مشيجة فطر *Rhizopus stolonifer* (11.51 غ/ل) ، وأن إضافة بيبتون بنسبة١٪ و٢٪ إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ وذلك بالتخمير ضمن درجة حرارة ٣٠°س لمدة ٦ أيام وعلى سرعة دوران ١٥٠ rpm أعطى الكتلة الجافة ذاتها من فطر *Rhizopus stolonifer* (8.6 غ/ل) وبانحراف معياري أقل عند إضافة ٢٪ بيبتون لذلك النسبة الأفضل المضافة من البيبتون إلى وسط بالتخمير ضمن درجة حرارة ٣٠° س هي ٢٪.

الجدول ٤ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية (غ) بعد إضافة بيبتون والتخمير على درجة حرارة ٢٥° و٣٠°س

درجة الحرارة(س)	٢٥°	٢٥°	٣٠°	٣٠°
نسبة البيبتون	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة± الانحراف المعياري (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)	المتوسط الحسابي للوزن الجاف للمشيجة± الانحراف المعياري (غ/٥٠مل)	الوزن الجاف للمشيجة (غ/ل)
0%	0.278±0.009	5.56	0.342±0.010	6.84
1%	0.412±0.040	8.24	0.430±0.200	8.60
2%	0.576±0.050	11.51	0.430±0.087	8.60

وبإجراء اختبار تحليل التباين للبيانات باستخدام برنامج Minitab ظهرت النتائج الموضَّحة بالجدول ٥ حيث تُبَيّن النتائج عدم وجود فرق معنوي بين درجة الحرارة والوزن الجاف للمشيجة الفطرية ووجود فرق معنوي بين تركيز إلى وسط السائل وهو عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة وبين الوزن الجاف للمشيجة الفطرية ووجود فرق معنوي بين نسبة البيبتون المضافة إلى وسط السائل والوزن الجاف للمشيجة الفطرية.

الجدول ٥ تحليل التباين للوزن الجاف للمشيجة الفطرية بالمقارنة مع متغيرات التجربة (درجة الحرارة وتركيز الوسط ونسبة البيبتون)

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
حرارة	2	1.13533	1.05786	0.52893	48.13	0.000
تركيز وسط	2	0.01468	0.01084	0.00542	0.49	0.615
نسبة بيبتون	2	0.02575	0.02575	0.01288	1.17	0.323
Error	32	0.35169	0.35169	0.01099		
Total	38	1.52746				

DF درجة الحرية،Seq SS مجموع متتالي من المربعات، Adj SS مجموع المربعات المعدل، Fاختبار تحليل التباين

من النتائج السابقة وُجِد أنَّ الكتلة الحيوية الأكبر للمشيجة الفطرية المأخوذة من عزلة *Rhizopus stolonifer* تم الحصول عليها بعد زرع العزلة في وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ بتمديد ٣٠٪ وبإضافة بيبتون بتركيز ٢٪ وعلى درجة حرارة ٢٥° س.

يحوي وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة البيضاء نسبة سكريات جيدة وكافية لنمو الفطريات تتراوح بشكل عام نسبة السكريات في عُصارة ساق الذرة البيضاء السكرية SSJ بين ١٠٪إلى ٢٥٪ وتضم سكروز وغلوكوز وفركتوز(Liang *et al,*2010) ويمكن تمديده بسهولة بالنسب الملائمة عن طريق إضافة الماء المقطر وقد تَبَيّن من خلال هذا البحث أنَّ النسبة الأمثل للتمديد عند درجة الحرارة ٢٥° س هي ٣٠٪ أي تم إضافة ٣٠ مل من وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة البيضاء و٧٠ مل ماء مقطر لتحضير ١٠٠ مل من الوسط وبقياس درجة بريكس لهذا التمديد تَبَيّن أنَّها تساوي ٤.٣ أي كل ١٠٠ مل من عُصارة ساق

الذرة البيضاء السكرية الممددة بنسبة ٣٠٪ تحوي ٤.٣ غ من السكريات حيث تستخدم الفطور السكريات كمصدر للكربون وبعد الزرع في الوسط لمدة ٦ أيام أصبحت درجة بريكس ٠.٥ أي أنَّ الفطر استهلك تقريبا ٨٨.٤٪ من السكريات في الوسط وباستخدام التمديدات الأكبر ٣٥٪ و٤٠٪ ،والتي تصبح نسبة السكريات فيها ٥.٠١ و٥.٧غ /١٠٠مل على الترتيب لم يؤدي ذلك إلى زيادة في كتلة المشيجة الفطرية الناتجة عن فطر *Rhizopus stolonifer* عند التخمير المغمور على درجة حرارة ٢٥ ºس والتي تعتبر ضمن مجال درجات الحرارة الأمثل لنمو الفطور والذي يتراوح بين ٢٥-٣٠ º س ، حيث أعطى الفطر عند تمديد الوسط بنسبة ٣٠٪ ١١.٨٦ غ/ل من الوزن الجاف للمشيجة الفطرية بينما أعطى عند تمديد الوسط بنسبة ٣٥٪ ٩.٢٨ غ/ل وعند تمديد الوسط بنسبة ٤٠٪ أعطى ١٠.٩٦ غ/ل ، وبالتخمير على درجة الحرارة ٣٠ºس أعطى الفطر أكبر كتلة حيوية عند التركيز ٤٠٪ حيث بلغ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية الناتجة عند هذا التمديد ١٠.٨٨ غ/ل ، وبالتخمير على درجة حرارة ٣٥ºس انخفضت الكتلة الحيوية للفطر بشكل واضح حيث أعطى الفطر أكبر كتلة حيوية عند التمديد ٣٥٪ حيث بلغ الوزن الجاف للمشيجة الفطرية ٢.٤ غ/ل وتوافقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات السابقة ، حيث وجد Inparuban وآخرون (٢٠٠٩) أنَّ زيادة السكر في الوسط إلى ٥٪ أعطى أكبر كتلة حيوية ، وكذلك وجد Jiru(٢٠٠٩) في دراسة لأمثلة إنتاج خميرة S.cerevisiae من مولاس قصب السكر أنَّ معظم السلالات المدروسة أعطت أعلى كتلة حيوية عند تركيز السكر ٥٪ في حين تناقص المردود مع ارتفاع تركيز السكر ليكون أقل ما يمكن عند تركز ٧.٥٪، ويمكن أن يُفسَّر ذلك وفق تأثير crabtree effect، حيث أنَّ التراكيز المرتفعة من السكريات في الوسط تُثَبِّط أنزيمات التنفس(مسار الأكسدة) وبالتالي تتجه الفطور في مسار إنتاج الإيتانول للحصول على الطاقة اللازمة لها بالرغم من توفر الأوكسجين في الوسط وعليه تنخفض الكتلة الحيوية وتزداد نسبة الإيتانول والذي يكون له تأثير سام على الخلايا ،إضافة إلى أن التراكيز العالية من السكريات تسبب زيادة الضغط الأسموزي على الخلايا (Ringborn *et al,*1996;Bekatorou *et al* ,2006) بالرغم من أن التمديدات الأعلى الوسط في هذه التجربة أي ٣٥٪ و٤٠٪ لا تحوي نسبة عالية من السكريات والتي تبلغ ٥.٠١ و٥.٧ غ / ١٠٠ مل لكن من المحتمل أنَّ هذه الزيادة المحدودة في نسبة السكريات قد أدت إلى إنقاص الكتلة الحيوية للفطر عند درجة الحرارة ٢٥ºس وفقاً للتفسيرات المذكورة، وبإضافة البيبتون إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة بنسبة ٢٪ ضمن تمديد ٣٠٪ من الوسط وعلى درجة حرارة ٢٥ ºس تم الحصول على كتلة أكبر من المشيجة الفطرية ١١.٥١ غ/ل حيث أنَّ البيبتون يُعتبر مصدر للبروتينات الذي تحتاجه الفطور للنمو الدقيقة وهذا يتوافق مع دراسة سابقة تُبَيّن أنَّ النسبة الأمثل لنمو المشيجة الفطرية لفطر *Rhizopus oryzae* على الآغار عندما تكون نسبة البروتينات إلى الكربوهيدرات بين ٠.٤ و٠.٥ (D.A.seaby *et al,*1988) وكذلك فطر *Rhizopus stolonifer* المستخدم في هذه الدراسة وهو فطر من نفس الجنس قد أعطى أفضل نمو عندما كانت نسبة البيبتون المضاف الوسط ٢٪ ونسبة تمديد الوسط ٣٠٪ أي المحتوى من السكريات ٤.٣ في كل ١٠٠ مل وسط وبالتالي تكون نسبة البروتينات إلى السكريات ٢/٤.٣ = ٠.٠٤٦٥.

٣-٣ استخلاص الكيتوزان

٣-٣-١ أمثلة شروط المعالجة القلوية أثناء استخلاص الكيتوزان من فطر *Rhizopus stolonifer*:

يوضح الجدول ٦ كمية الكيتين والكيتوزان الناتجة عن ٥ غرام من فطر *Rhizopus stolonifer* مقدرة بالغرام بعد المعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيزين 2N،1N ولفترات زمنية مختلفة (متوسط لمكررين) حيث وُجِد أنَّ استخلاص أكبر كمية الكيتوزان من فطر *Rhizopus stolonifer* يتم الحصول عليها بالمعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2N وبدرجة حرارة ١٢١º س لمدة ٢٠ دقيقة.

جدول٦ كمية الكيتين والكيتوزان الناتجة عن ٥ غرام من فطر *Rhizopus stolonifer* مقدرة بالغرام بعد المعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيزين 1N،2Nولفترات زمنية مختلفة

تركيز هيدروكسيد الصوديوم (N)	المدة الزمنية للمعالجة القلوية (دقيقة)	الحرارة المستخدمة في المعالجة القلوية (س)	وزن الكيتين الناتج(غ)	وزن الكيتوزان الناتج (غ)
1N	120دقيقة	95° س	2.35 غ	0.072 غ
1N	20 دقيقة	121° س	1.85غ	0.097 غ
2N	120 دقيقة	95° س	1.86غ	0.194 غ
2N	20 دقيقة	121° س	1.48غ	0.210غ

٣-٣-٢ مقارنة كمية الكيتين والكيتوزان المستخلص من فطر *Rhizopus stolonifer* المزروع في وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ بإضافة وبدون إضافة بيبتون peptone :

يوضح الجدول ٧ مقارنة كمية الكيتين والكيتوزان الناتجة عن ٥ غرام من فطر *Rhizopus stolonifer* المزروع بإضافة بيبتون peptoneوبدون إضافة بيبتون peptone (متوسط لمكررين) إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة SSJ مقدرة بالغرام بعد المعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2N بدرجة حرارة ٩٥° س ولمدة ١٢٠ دقيقة، حيث وُجِد أنَّ إضافة البيبتون إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ قد ساهم في زيادة كمية الكيتين والكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* .

جدول٧ مقارنة كمية الكيتين والكيتوزان الناتجة عن ٥ غرام من فطر *Rhizopus stolonifer* المزروع بإضافة بيبتون peptone وبدون إضافة بيبتون peptoneإلى وسط SSJ

الإضافات إلى وسط الزرع	وزن الكيتين الناتج(غ)	وزن الكيتوزان الناتج(غ)
بدون بيبتون	1.863غ	0.194غ
مع بيبتون	2.247غ	0.246 غ

أفضل نسبة من الكيتوزان تم استخلاصها في هذه الدراسة من *Rhizopus stolonifer*هي ٠.٢٤٥ غ كيتوزان من ٥ غرام وزن جاف للمشيجة الفطرية أي بنسبة ٤.٩٪ من وزن الجاف للمشيجة الفطرية أي 49g/kg وهي نسبة جيدة مقارنة مع نتائج لدراسة سابقة والتي بيَّنت أنَّ نسبة الكيتوزان المستخلص من فطر *Rhizopus oryzae* بالطريقة التقليدية تساوي٦.٦٧٪(Sebastian *et al* ,2019) .

ومن النتائج الموضحة بالجدول ٦ وجد أنه تم استخلاص أكبر كمية الكيتوزان من فطر *Rhizopus stolonifer* بالمعالجة القلوية بهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2N وبدرجة حرارة ١٢١° س لمدة ٢٠ دقيقة وهذه النتيجة تتوافق مع نتائج دراسات سابقة تُبَيّن أنَّ زيادة تركيز هيدروكسيد الصوديوم المستخدم بالمعالجة القلوية يزيد كمية الكيتوزان المستخلصة بكمية قليلة وكذلك زيادة درجة الحرارة أثناء المعالجة القلوية تعطي كمية أكبر من الكيتوزان(Marikani *et al,*2010).

ومن النتائج الموضحة بالجدول ٧ وُجِد أنَّ إضافة البيبتون إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ قد ساهم في زيادة كمية الكيتين والكيتوزان الناتج عن فطر *Rhizopus stolonifer* بنسبة ١.٥ مرة وممكن تفسير ذلك بأن وجود البيبتون كمصدر للآزوت ساهم بزيادة نسبة الكيتوزان الناتجة وهذا يتوافق مع دراسة سابقة تُبَيّن زيادة نسبة الكيتوزان الناتج عن فطر *Aspergillus niger* بعد استخدام وسط تخمير صلب يحوي نسبة ٨.٤±٠.٢٦ من الآزوت مقارنة مع وسط آخر يحوي نسبة أقل من الآزوت(Maghsoodi *et al,*2008) .

٤. الاستنتاجات:

- يمكن استخدام وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة Sweet Sorghum Juice SSJ بعد تمديده بنسبة ٣٠٪ بالماء المقطر لتنمية الفطور الدقيقة بالتخمير المغمور ويعد أوفر من أوساط الزرع التقليدية المستوردة.
- يمكن اعتماد الفطور كمصدر بديل لإنتاج الكيتوزان وبنسبة جيدة (٥٪ من وزن المشيجة الفطرية الجافة) وخاصة في البلدان التي لا تتوفر فيها المصادر التقليدية للكيتوزان (قشريات بحرية) مثل سورية.

٥. المقترحات والتوصيات:

- اختبار تأثير زيادة مدة المعالجة القلوية عند استخلاص الكيتوزان من الفطور على حرارة ١٢١° س للحصول على كمية أكبر من الكيتوزان.
- اختبار تأثير زيادة نسبة البيبتون المضافة إلى وسط عصارة ساق الذرة السكرية الرفيعة (SSJ) عن ٢٪ في الحصول على إنتاج أكبر من المشيجة.
- التوسع في استخلاص الكيتوزان من أنواع أخرى من الفطور الدقيقة والكبرى.

التمويل: هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. Álvarez، David Alexander Ramírez Cadavid، Diana Marcela Escobar Sierra، Claudia Patricia Ossa Orozco، Diego Fernando Rojas Vahos، Paola Zapata Ocampo، Lucía Atehortúa، "**Comparison of Extraction Methods of Chitin from *Ganoderma lucidum* Mushroom Obtained in Submerged Culture**"، *BioMed Research International*، vol. 2014، Article ID 169071، 7 pages، (2014).
2. Aranaz، Inmaculada، Niuris Acosta، Concepción Civera، Begoña Elorza، Javier Mingo، Carolina Castro، María D.l.L. Gandía، and Angeles Heras Caballero.. **Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin، Chitosan and Their Derivatives** *Polymers* 10، no. 2: 213 (2018).
3. Aryal Sagar February 28، 2019 **Submerged Fermentation https://microbenotes.com/submerged-fermentation/**
4. Balakrishnan، K. and Pandey، A. (1996**) Production of Biologically Active Secondary Metabolites in Solid State Fermentation**. Journal of Scientific and Industrial Research،55: 365-372.
5. Benhabiles M. S، Salah R، Lounici H، Drouiche N، Goosen M. F. A، Mameri N**. Antibacterial activity of chitin، chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste**. *Food hydr.* 2012;29(1):48/56.
6. Chatterjee ،S،M.Adhya،A.K.Guha and B.P. (2005).**Chitosan from mucor rouxii: Production and pHysico-chemical characterization.Process** Biochem،40:395-400.
7. Crestini C، Kovac B، Giovannozzi-Sermanni G. **Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from Lentinus edodes**. Biotechnol Bioeng. 1996 Apr 20;50(2):207-10.
8. D A Seaby; A R McCracken; J P Blakeman (1988). **Experimental determination of requirements for the growth of edible Rhizopus species for use in solid substrate fermentation systems.** ، 44(4)، 289–299. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740440402
9. Daverey، Achlesh & Pakshirajan، Kannan. (2009). **Production of sopHorolipids by the yeast Candida bombicola using simple and low cost fermentative media**. Food Research International. 158. 499-504. 10.1016/j.foodres.2009.01.014.
10. Dharmaraj، S. (2010) Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. World Journal of Microbiology and Biotechnology، 26: 2123-2139.
11. K. Kurita، **Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans**، Marine Biotechnology، Vol. 8، No. 3، 2006، pp. 203-226.
12. Lim،S.H.and Hudson،S.M.(2004) **Application of a fiber-reactive chitosan derivative to cotton fabric as an antimicrobial textile finish** .*Carbohydr.polym*،56:227-234.
13. Lise Soetemans, Maarten Uyttebroek, Leen Bastiaens,**Characteristics of chitin extracted from black soldier fly in different life stages**,International Journal of Biological Macromolecules,Volume 165, Part B,2020,Pages 3206-3214.
14. Machado، C.M.، Oishi، B.O، Pandey، A. and Soccol، C.R.(2004) Kinetics of Gibberella fujikori Growth and Gibberellic Acid Production by Solid State Fermentation in a Packed-Bed Column Bioreactor. Biotechnology Progress، 20: 1449-1453.
15. Maghsoodi، Vida & Razavi، Javad & Yaghmaei، Soheila. January (2010). **Production of Chitosan by submerged fermentation from Aspergillus niger.** Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering. 16.
16. Maghsoodi، Vida & Yaghmaei، Soheila & Beigi، Sayed. March and April (2008**). Influence of Different Nitrogen Sources on Amount of Chitosan Production by Aspergillus niger in Solid State Fermentation.** Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 27. 47-52.
17. MARIKANI، Dr.KANNAN & Nesakumari، Maliga & Rajarathinam، Kaniappan & Aja، Ranjitsingh. August (2010). **Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions**. Advance biological Research. 4. 10.
18. Mi-Kyeong Jang; Byeong-Gi Kong; Young-Il Jeong; Chang Hyung Lee; Jae-Woon Nah. 7June (2004). **PHysicochemical characterization of α-chitin، β-chitin، and γ-chitin separated from natural resources**. ، 42(14)، 3423–3432. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pola.20176

19. Morin-Crini N.، Lichtfouse E.، Torri G.، Crini G. (2019) **Fundamentals and Applications of Chitosan.** In: Crini G.، Lichtfouse E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews 35. Sustainable Agriculture Reviews، vol 35. Springer، Cham.
20. Muslim.S ، Sahira & Israa، & Al-Kadmy، M & Mohammed Ali، Alaa & Ali، Mohammed & Ahmed، & Dwaish، Ahmed & Saba، & Khazaal، Saba & Sraa، & Muslim، Sraa & Sarah، & Aziz، Sarah. October (2018**). Extraction of Fungal Chitosan and its Advanced Application Advances in Biotechnology.**
21. Nwe، Nitar & Chandrkrachang، Suwalee & Stevens، Willem & Maw، Theingi & Tan، Teck & Khor، Eugene & Wong، Sek-Man. 1August (2002). **Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation.** Carbohydrate Polymers. 49. 235-237.
22. Robinson، T.، Singh، D. and Nigam، P. (2001) Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Applied Microbiology and Biotechnology، 55: 284-289.
23. Rossi، S. C.، Vandenberghe، L. P. S.، Pereira، B. M. P.، Gago، F. D.، Rizzolo، J. A.، Pandey، A.، … Medeiros، A. B. P. (2009). **Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp.** Food Research International، 42(4)، 484-486.
24. Sebastian، JosepH; Rouissi، Tarek; Brar، Satinder Kaur; Hegde، Krishnamoorthy; Verma، Mausam 1 September (2019). **Microwave-assisted extraction of chitosan from Rhizopus oryzae NRRL 1526 biomass**. Carbohydrate Polymers.
25. T.Okada and I.Kubo، **Fungus useful for chitin production** ،US Patent 5905035،1999.
26. V.K. Mourya; Nazma N. Inamdar (2008). **Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore**. ، 68(6)، 1013–1051.
27. V.P.Ivishin،S.D.Artamonova،T.N.Ivshina،andF.F.Sharnina،**Methods for isolation of chitin –glucan complexes from higher fungi native biomass** Polymer Science B،vol،49،no،11-12،pp.305-310،December 2007.
28. Wang، Yanbo. (2009). **Prebiotics: Present and future in food science and technology**. Food Research International. 42. 8-12.
29. Yong S.K.، Shrivastava M.، Srivastava P.، Kunhikrishnan A.، Bolan N. (2015) **Environmental Applications of Chitosan and Its Derivatives**. In: Whitacre D. (eds) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 233. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews)، vol 233. Springer، Cham.
30. Yoshihara،K،Y.Shinohara،T.Hirostu and K.Izumori،2003. **Chitosan productivity enhancement in Rhizopus oryaze YPF-61A by psicose.**J.Biosci.Bioeng،95:293-297.

٣١.ديما الحاج تركي وعدنان قنبر ومجد الجمالي وفواز العظمة ٢٠١٠. الذرة **البيضاء السكرية محصول بديل واعد لإنتاج السكر والوقود الحيوي**، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وقسم المحاصيل الحقلية كلية الزراعة جامعة دمشق، مؤتمر تحديات تحسين الإنتاجية وسبل تطويرها في القطاع الزراعي.

٣٢.د. جودة توفيق فضول، ود. وليد غازي نفاع كتاب (٢٠٠٥-٢٠٠٦) **المرجع في علم الفطريات** منشورات جامعة دمشق كلية الهندسة الزراعية. مطبعة الروضة. ص:١٠٠٩