Archive of SID

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر، سال نوزدهم،
شماره ۳، صفحه ۲۰۸-۲۰۳، ۱۳۸۵
ISSN : 1016-3255

استخراج کیتوسان ازمنبع قارچی در تخمیر حالت جامد

Chitosan Extraction by Fungi in Solid State Fermentation

سعید محمدبیگی[1*]، ویدا مقصودی[2]، سهیلا یغمایی[1]، زهرا قبادی نژاد[2]
تهران، دانشگاه صنعتی شریف، ۱ ـ دانشکده مهندسی شیمی، صندوق پستی ۹۴۶۵/۱۱۳۸۵، ۲ ـ مرکز تحقیقات بیوشیمی و محیط زیست، صندوق پستی ۱۱۳۶۵/۶۸۹۱

دریافت: ۸۴/۵/۲۵، پذیرش: ۸۴/۱۱/۱۱

چکیده

کیتوسان قارچی زیست‌پلیمری ارزشمند و دارای خواص ویژه‌ای است که تولید آن در تخمیر حالت جامد از قارچها به عنوان روشی جدید مطرح است. در این پژوهش، با رشد گونه‌های قارچ آسپرژیلوس نایجر روی کنجاله سویا، پنبه دانه، ذرت و کلزا به عنوان سوبسترای جامد دارای نیتروژن، توانایی تولید کیتوسان و اثر درصد نیتروژن، گونه قارچی و رطوبت سوبسترای جامد در مقدار تولید بررسی شد. در تمام گونه‌های آسپرژیلوس نایجر (PTCC) با کدهای ۵۰۱۰،۵۰۱۲ و ۵۱۰۳، مقدار کیتوسان در روز چهارم به طور میانگین (برای رطوبت تقریبی ۳۶ درصد و pH = ۶/۴ در مورد دو سوبسترای پنبه دانه و سویا) تقریباً ۱۲/۶۹۱ (g/kg ماده خشک) بدست آمد. از گونه ۵۰۱۲ در محیط کنجاله سویا با رطوبت تقریبی ۳۷درصد در روز دوازدهم، مقدار (g/kg ماده خشک) ۱۷/۰۵۳ و در گونه ۵۰۱۰ در محیط کنجاله پنبه دانه در روز هشتم، (g/kg ماده خشک) ۱۷/۹۷ کیتوسان استخراج شد.

واژه‌های کلیدی

کیتوسان، آسپرژیلوس نایجر، کنجاله، تخمیر حالت جامد، زیست‌پلیمر

Key Words

chitosan, *Aspergillus niger*, residue, solid state fermentation, biopolymer

مقدمه

کیتین فراوانترین پلی‌ساکارید طبیعی است. اهمیت این زیست‌پلیمر طبیعی به دلیل امکان کاربرد آن در زمینه‌های مختلف است. کیتین با نام علمی پلی[β -(۴،۱)-۲- استامید و۲ ـ داکسی ـ D ـ گلوکوپیرانوز] شناخته می‌شود که از نظر ساختار مولکولی، حلالیت محدود و میل کم به ترکیب شیمیایی، شبیه به سلولوز است با این تفاوت که در کربن دوم به جای گروه استامید گروه هیدروکسیل قرار گرفته است. کیتوسان مشتق با ارزش کیتین، با نام علمی پلی[β -(۴،۱)-۲- آمینو ۲ ـ داکسی ـ D ـ گلوکو پیرانوز] کوپلیمری از[(۴،۱)-۲- آمینو-۲ داکسی- β -D-

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار: beigisaeed@yahoo.com

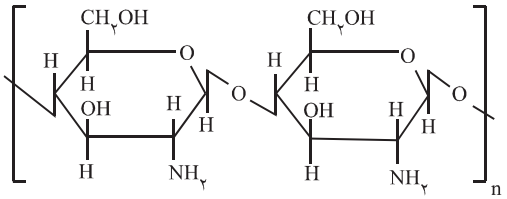
www.SID.ir

Archive of SID

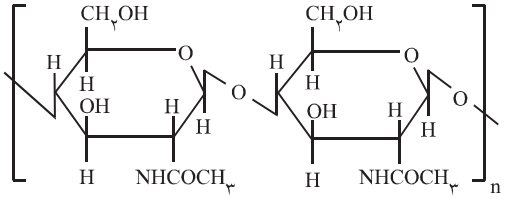
گلوکان] و [(۱،۴)-۲-استامید و ۲ - داکسی - β -D-گلوکان] است [۱] که از فرایند استیل زدایی قلیایی کیتین بدست می آید (ساختار ۱).

قارچها یکی از منابع تولید کیتوسان هستند. دراین نوع قارچها کیتوسان نقش فیزیولوژیکی را بازی می کند. به همین دلیل آنزیم کیتین داستیلاز موجود در دیواره سلولی قارچ، کیتین را به کیتوسان تبدیل می کند. در نتیجه، کیتوسان را به طور طبیعی در دیواره سلولی گروهی از قارچها می توان یافت که در این حالت به کمک فرایند تخمیر همراه با فرایند آبکافت قلیایی، کمپلکس گلوکان - کیتوسان تولید می شود. پیوندهای گلوکان را در بعضی موارد به کمک فرایند قلیایی و در مواردی دیگر به کمک آنزیم بتا - گلوکاناز یا آلفا - آمیلولیتیک می توان از بین برد [۲-۴].

قارچها بدون کلروفیل هستند در نتیجه نمی توانند به تنهایی مواد آلی مورد نیاز خود را بسازند و نیاز به منبع کربن و ازت آلی، برای تهیه انرژی دارند. مولکولهای کوچک مثل قندهای ساده و آمینواسیدها در لایه ای آبی در اطراف مخمر تجمع یافته، به آسانی از خلال دیواره سلولی نفوذ می کنند ولی در مورد مولکولهای بزرگ و پلیمرهای غیر محلول مثل پروتئینها، گلیکوژن، نشاسته و سلولوز، باید هضم اولیه قبل از جذب به وسیله سلول قارچ انجام شود. این فرایند شامل آزاد سازی آنزیمهای ویژه است که سبب متلاشی شدن ساختار سوبسترا و نفوذ محصولات هضم از میان دیواره سلولی می شود. آزمایشهایی که روی ۳۳ گونه مختلف قارچ، از رده های مختلف انجام گرفته است نشان می دهد که کیتوسان از همه این گونه ها قابل استخراج است. با وجود این که تولید کیتوسان در دیواره سلولی گونه های موکورال از رده زیگومیستها گزارش شده است، ولی استخراج کیتوسان از گونه های آسکومیستها



کیتوسان



کیتین

ساختار ۱ ساختار کیتین و کیتوسان [۱].

مثل آشبیا گوسیپی، گیبرلا فوجی کوروی و دوترومیستها مثل آسپرژیلوس SPP و بازیدومیستها مثل آگاریکاس بیسپورس نیز بررسی شده است. گونه آبسیدیا گلوکا از رده موکورالها به عنوان منبعی بسیار خوب برای کیتوسان است که در طبقه بندی قارچهایی شامل کیتین - کیتوسان قرار می گیرد. گونه های رایزوپوس اوریزای و موکورراکسی که به عنوان دو قارچ مهم در تولید کیتوسان هستند در رده زیگومیستها وگونه های آسپرژیلوس و پنی سیلیوم در رده آسکومیستها قراردارند [۵].

کرستنی و همکارانش [۴] با بررسیهای خود به این نتیجه رسیدند که کیتوسان تولیدی از رشد لینتینوس ادودس روی سبوس گندم بعد از گذشت ۱۲ روز به بیشترین مقدار (kg ماده خشک/g) ۶/۲ و در محیط تخمیر حالت غوطه ور به حداکثر مقدار mg/L ۱۲۰ می رسد. آنها دریافتند که تولید با روش تخمیر در حالت جامد ۵۰ برابر بیشتر از حالت غوطه ور است. این روش مناسب، کم هزینه و قابل افزایش در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی است همچنین، محصول دارای کیفیت مطلوب یعنی درجه استیل زدایی زیاد و وزن مولکولی کم است. کیتوسان تولیدی به روش قارچی دارای وزن مولکولی کمتر و درجه استیل زدایی بیشتری است و هرچه درجه استیل زدایی بیشتر باشد خاصیت ضد میکروبی کیتوسان زیادتر است [۶]. کیتوسانهای با وزن مولکولی کم و درجه استیل زدایی زیاد، دارای چگالی بار و حلالیت بیشتری هستند. نتایج پژوهشها نشان می دهد که تولید کیتوسان در تخمیر کنجاله سویا به کمک گونه آسپرژیلوس نایجر با بیشترین مقدار (kg ماده خشک/g) ۲ در روز دوازدهم و در مورد کنجاله مانگ (kg ماده خشک/g) ۱/۴ بدست آمده است. مقدار درصد نیتروژن در کنجاله سویا ۰/۶ درصد و در کنجاله مانگ ۰۰۲ /۰ درصد بوده است [۷]. همان طور که مشاهده می شود تغییر در درصد نیتروژن موجب تغییر در مقدار کیتوسان تولیدی شده است و رشد بهتر قارچ روی کنجاله سویا انجام گرفته که البته گونه قارچی هم در تولید کیتوسان مؤثر است. در سامانه تخمیر در حالت غوطه ور که میکروارگانیسمها در فاز مایع به شکل غوطه ور کشت می شوند کنترل شرایط عملیاتی رشد راحت تر است، از این رو راکتورهای زیستی تخمیر در حالت غوطه ور گسترش بیشتری یافته اند. ولی، در این پژوهش با توجه به ویژگیهای تخمیر در حالت جامد کنجاله های مختلف دارای مقادیر متفاوت نیتروژن به عنوان سوبسترای جامد در سامانه تخمیر بررسی شده است.

کاربردها

با توجه به خواص زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بسیار مناسب کیتوسان استفاده از آن در پزشکی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. برای نمونه کاربرد کیتوسان در ژن درمانی و استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

هیدروژلهای حساس به دمای زیست تخریب پذیر با پایه کیتوسان در سامانه های آزادسازی تدریجی دارو یکی از کاربردهای مهم آن است. داروهای کاهش وزن و کلسترول بر پایه کیتوسان نیز ساخته شده است. این زیست‌پلیمر دارای گروه آمین آزاد است که به آن خواص ضدمیکروبی و لخته سازی می دهد که در صنایع از این خاصیت به عنوان جاذب استفاده می کنند. حذف فلزات سنگین در غلظتهای کم تا متوسط که از صنایع مختلف وارد محیط زیست می‌شوند، به ویژه زمانی که فلزات در غلظتهای کم (قسمت در بیلیون) وجود داشته باشند، به کمک کیتوسان امکان پذیر است. یکی از فلزات بسیار سمّی جیوه است که مقدار بسیار کم آن در حد قسمت در میلیون نیز برای موجودات زنده مضر است. از این رو حذف این ماده از منابع آلاینده، بسیار ضروری است. مشاهدات نشان داده که مقدار کمی از کیتوسان قارچی (در مقایسه با موارد دیگر) مقدار مس بیشتری را جذب کرده است و زیست توده قارچی کمترین مقدار جذب را دارد[۵] به طوری که:

زیست توده قارچی < کیتوسان از پوست سخت پوستان < ماده نامحلول در قلیا (AIM) < کیتوسان قارچی

استفاده از کیتوسان در تثبیت آنزیمها، حذف رنگ از پساب کارخانجات نساجی و پوششهایی با لایه کیتوسان در صنعت بسته بندی بسیار مورد توجه است[۸]. کیتوسان با بار مثبت جزئی که دارد به عنوان لخته کننده‌ای پلی کاتیونی عمل می کند و به طور مؤثر ترکیبات پروتئینی را از پسابها حذف می کند (شکل ۱).

پژوهشها نشان داده است که قابلیت حذف ذرات معلق به وسیله کیتوسان نسبت به اثر بنتونیت و ژلاتین در شفاف‌سازی آب میوه‌ها بسیار زیاد است و در ضمن حذف این ذرات در زمان کمتری انجام می‌گیرد [۹]. به علت خاصیت ضد قارچی و ضد باکتری در صنایع غذایی از کیتوسان به عنوان عامل ضد میکروبی استفاده می‌شود.

تجربی

مواد

در این پژوهش، از استیک اسید، استون، اتانول، سدیم هیدروکسید جامد (سود) همگی محصول شرکت Merck آلمان همچنین، محیط کشت (potato dextrose agar, PDA) استفاده شد.

دستگاهها

شناسایی کیفی کیتوسان استخراجی به وسیله طیف نورسنج FTIR ۱۰۰۰ Unicam Mattson انجام گرفت. درصد نیتروژن کل با استفاده از دستگاه Macro Kjeldahl بدست آمد. همچنین از گرمخانه برای اندازه‌گیری مقدار رطوبت، از کوره الکتریکی برای اندازه‌گیری مقدار خاکستر و انکوباتور برای رشد میکروارگانیسمها و دستگاه سانتریفوژ برای گریز از مرکز محلولها و جداسازی کیتوسان با سرعت ۶۰۰۰ rpm استفاده شد.

روشها

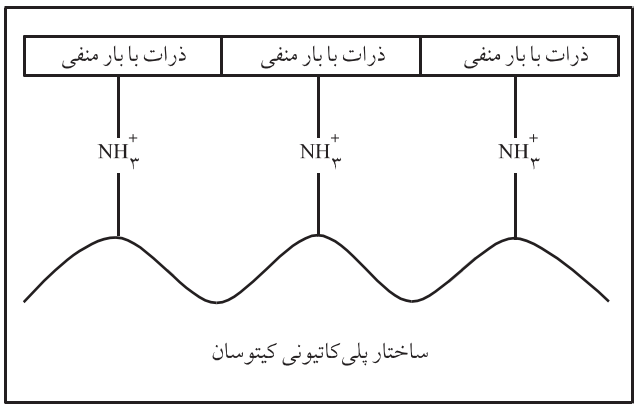
در این پژوهش، به ترتیب انتخاب سوبسترای جامد و میکروارگانیسم مناسب، آماده سازی محیط کشت و تلقیح میکروارگانیسم، استخراج کیتوسان وشناسایی آن انجام گرفته است. پس از تهیه کنجاله‌های سویا، پنبه دانه، ذرت و کلزا از کارخانه روغن کشی، آنها در یخچال در دمای ۴°C برای استفاده بعدی نگهداری شدند تا به عنوان محیط کشت در تخمیر جامد استفاده شوند. میکروارگانیسمهای مورد استفاده در این آزمایش گونه‌های قارچی آسپرژیلوس نایجر (Persian type culture collection, PTCC) با کدهای ۵۰۱۲،۵۰۱۰ و ۵۱۰۳ انتخاب شدند.

مقدار ۳۰ g از هر کنجاله را در ارلن ۵۰۰ mL توزین کرده، بعد از تنظیم رطوبت به طور دستی، با استفاده از لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت دکستروز آگار تازه و به شکل مایل، تعلیق آسپرژیلوس نایجر با غلظت Spores/mL ۳×۱۰۶ تهیه و به مقدار mL ۱ از آن در محیطهای کشت جامد آماده شده، در شرایط استریل (زیر هود استریل و در کنار شعله) تلقیح شد. محیطهای کشت در انکوباتور در دمای ۳۰°C قرار داده شدند. بعد از رشد میکرو ارگانیسمها در محیطهای کشت در روزهای تعیین شده، تعلیقی از محیط کشت به کمک سود N ۱ تهیه شده (w/v ۱:۳۰) و به مدت min ۲۰-۱۵ در اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C قرار داده شد. سپس، مواد نامحلول در سود به وسیله سانتریفوژ به مدت min ۱۵ با سرعت rpm ۶۰۰۰ جدا شد پس از آن به کمک آب مقطر تا خنثی شدن کامل (pH = ۷) شسته و هر بار سانتریفوژ شد. باقیمانده‌های جامد برای استخراج بیشتر با استیک اسید ۲ درصد (w/v ۱:۴۰) در دمای ۹۵°C به مدت h ۶ استخراج شدند. محلول در مدت min ۱۵ با سرعت rpm ۶۰۰۰ سانتریفوژ شد تا مواد غیر قابل حل در اسید جدا شود. سپس، محلول بالایی را جدا کرده، به کمک سود N ۲، pH محلول در حدود ۱۰ تنظیم شد. در نهایت، محلول سانتریفوژ و کیتوسان رسوبی با آب مقطر و به ترتیب با اتانول ۹۵ درصد (w/v ۱:۲۰) و استون (w/v ۱:۲۰) شسته، در دمای ۶۰°C در گرمخانه خلأ خشک شد [۵،۷،۱۰،۱۱،۱۲].

از تبدیل نیتروژن آلی به آمونیوم سولفات در مجاورت سولفوریک اسید غلیظ، پتاسیم سولفات، جیوه سولفات و ترکیب جسم بدست آمده با سود و تقطیر آمونیاک آزاد شده و جذب آن در محلول کلریدریک اسید

www.SID.ir

Archive of SID

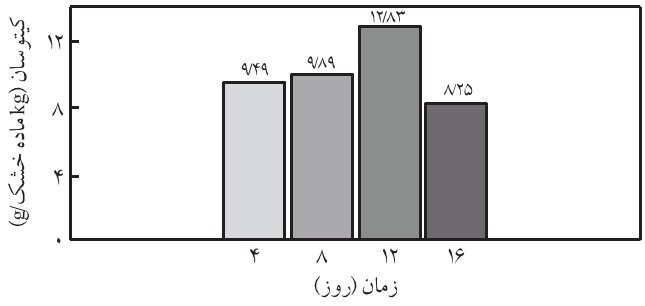


شکل ۱ نمای جاذبه متقابل بین کیتوسان و ذرات با بار منفی [۱۲].

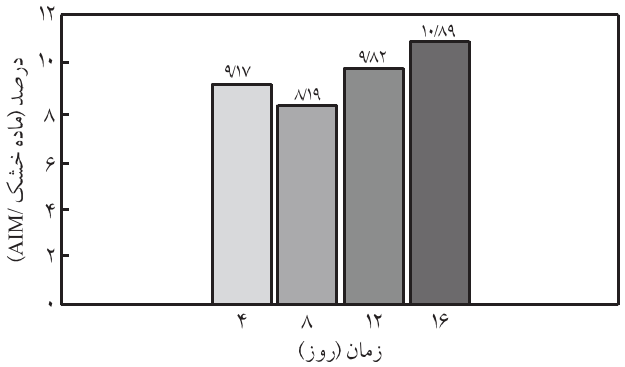
و تیتر کردن آمونیوم کلرید حاصل با سود استاندارد درصد نیتروژن بدست آمد. با استفاده از گرمخانه مقدار رطوبت و به کمک روش آنترون درصد قند و با استفاده از کوره الکتریکی در دمای $550^{\circ}C$ مقدار خاکستر اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج و بحث

انواع مختلف آسپرژیلوس نایجر در محیط کشت کنجاله های ذرت، پنبه دانه، سویا و کلزا رشد کردند، یعنی بدون اضافه کردن ماده دیگری برای رشد اولیه، فقط با مرطوب کردن محیط کشت جامد به مقدار مطلوب، رشد اولیه انجام گرفت. محیطهای مختلف کشت جامد با مقادیر متفاوت نیتروژن برای بررسی تولید میکروبی کیتوسان استفاده شدند. استخراج کیتوسان از آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۲، در محیط کنجاله سویا در رطوبت تقریبی ۵۰ درصد و pH = ۶/۴ نشان می دهد که توانایی تولید در این گونه قارچی برای کیتوسان وجود دارد و مقدار آن در روز دوازدهم



شکل ۲ تولید کیتوسان بر حسب زمان کشت در مورد کنجاله سویا، رطوبت تقریبی ۵۰ درصد و pH = ۶/۴.



شکل ۳ بررسی مقدار ماده نامحلول در قلیا بر حسب زمان کشت، رطوبت تقریبی ۵۰ درصد و pH = ۶/۴.

کشت به بیشترین مقدار یعنی (kg ماده خشک/g) ۱۲/۸۳ می رسد (شکل ۲). بعد از گذشت زمان از مقدار کیتوسان کاسته می شود. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، عامل رشد یعنی مقدار مواد نامحلول در قلیا برای بررسی مقدار رشد میکروارگانیسم مورد توجه قرار گرفت. مقدار مواد نامحلول در قلیا که تا حدودی معیاری از رشد میکروارگانیسم است رفتاری صعودی از خود نشان می دهد (به جز در روز هشتم که ممکن است ناشی از خطا در آزمایش باشد) ولی مقدار کیتوسان با توجه به شکل ۲ کاهش یافته است که احتمالا زیست‌پلیمر سنتز شده به عنوان ماده‌ای مغذی دارای نیتروژن به وسیله میکروارگانیسم مصرف و تولید کیتوسان کم شده است.

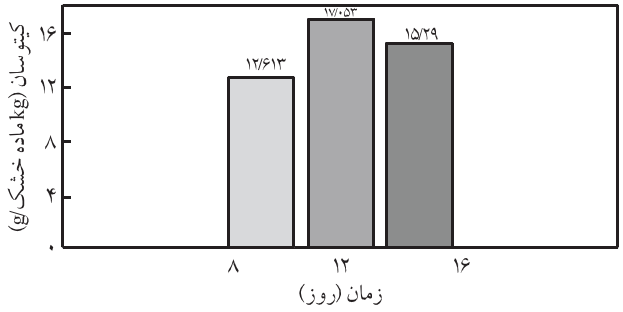
استخراج کیتوسان از آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۲، در محیط کنجاله سویا در رطوبت ۳۷ درصدو pH = ۶/۵ نیز مورد مطالعه قرار گرفت که مقایسه نمودار تولید در شرایط یکسان به غیر از رطوبت (مقایسه رطوبت ۵۰ درصد و ۳۷ درصد) نشان می دهد تولید کیتوسان در این شرایط نیز در روز دوازدهم بیشتر است و مقدار آن دررطوبت ۳۷ درصد بیش از رطوبت ۵۰ در صد است (شکل ۴).

جدول ۱ مشخصات بدست آمده از کنجاله های مورد استفاده در محیطهای کشت.

کنجاله	مقدار رطوبت (٪)	مقدار خاکستر (٪)	مقدار قند محلول (٪)	مقدار نیتروژن (٪)
سویا	۸/۲	۶	۸/۹	۸/۴
پنبه دانه	۸/۵	۵/۵	۷/۱	۵/۳
کلزا	۸	۶	۶/۸	۶/۲
ذرت	۸	۵/۸	۸/۶	۷/۹

www.SID.ir

Archive of SID

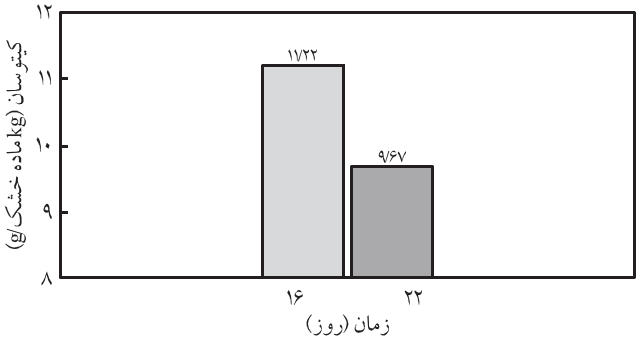


شکل ۴ تولید کیتوسان بر حسب زمان کشت در کنجاله سویا، رطوبت تقریبی ۳۷ درصد و pH = ۶/۵.

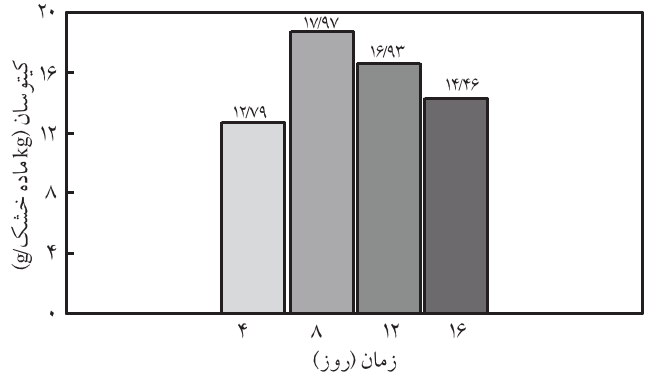
بیشترین مقدار تولید در روز دوازدهم برای کنجاله سویا در رطوبت ۵۰ درصد (kg ماده خشک/g) ۱۲/۸۳ ودر رطوبت ۳۷ درصد (kg ماده خشک/g) ۱۷/۰۵۳ (شکلهای ۲ و ۴) بدست آمد.

نتایج استخراج کیتوسان از آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۲، در محیط کنجاله کلزا در رطوبت ۳۷ درصد و pH = ۶/۴ در شکل ۵ نشان داده شده است. همان طور که در شکلهای ۴ و ۵ مشاهده می شود مقدار کیتوسان برای محیط کشت کنجاله سویا در روز شانزدهم (kg ماده خشک/g) ۱۵/۲۹ و در مورد کنجاله کلزا (kg ماده خشک/g) ۱۱/۲۲ بدست آمد(در شرایط یکسان رطوبت ۳۷ درصد و pH = ۶/۴). اختلاف مقدار درصد نیتروژن کل در دو سوبسترا علت تفاوت در تولید کیتوسان است و همان طور که مشاهده می شود بعد از گذشت زمان، تولید کاهش می یابد.

برای بررسی توانایی تولید کیتوسان در نوع قارچی آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۰ استخراج کیتوسان در محیط کشت کنجاله پنبه دانه در رطوبت تقریبی ۳۶ درصد و pH = ۶/۵ بررسی شد که نتایج در شکل ۶ آورده شده است. گونه ۵۰۱۰ از میکروارگانیسم آسپرژیلوس نایجر در مقدار استخراج کیتوسان مؤثر است و در این مورد مقدار تولید کیتوسان در



شکل ۵ تولید کیتوسان بر حسب زمان کشت در کنجاله کلزا، رطوبت تقریبی ۳۷ درصد و pH = ۶/۴.

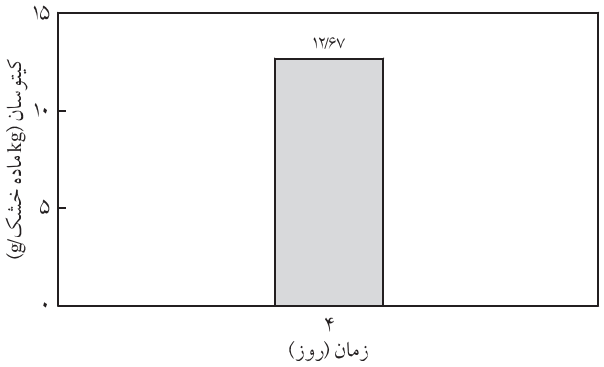


شکل ۶ تولید کیتوسان بر حسب زمان کشت در کنجاله پنبه دانه، رطوبت تقریبی ۳۶ درصد و pH = ۶/۵.

روز هشتم به بیشترین مقدار (kg ماده خشک/g) ۱۷/۹۷ می رسد که از نظر اقتصادی دارای اهمیت است (شکل ۶).

توانایی تولید کیتوسان در گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر ۵۱۰۳ تقریباً نزدیک به گونه های دیگر آسپرژیلوس است.

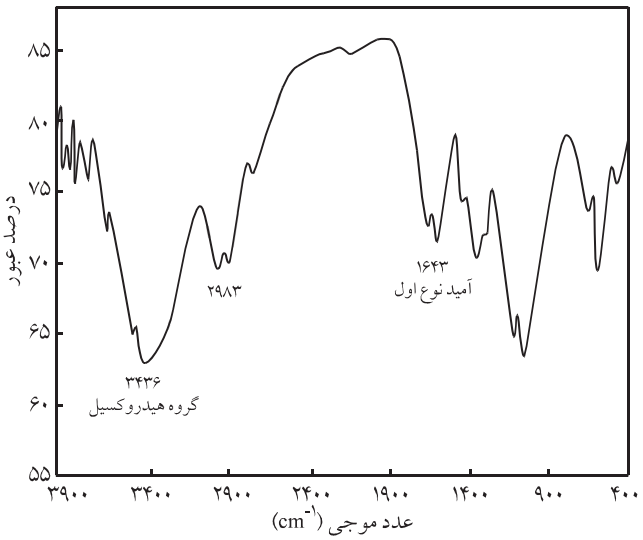
تولید برای گونه های آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۰، ۵۰۱۲ و ۵۱۰۳ در روز چهارم (برای رطوبت تقریبی ۳۶ درصد و pH = ۶/۴ در مورد دو سوبسترای پنبه دانه و سویا) تقریبا به طور میانگین مقدار ۱۲/۶۹۱ است (شکلهای ۶،۴ و ۷). استخراج کیتوسان از آسپرژیلوس نایجر ۵۰۱۲، در محیط کشت کنجاله ذرت در رطوبت ۳۷ درصد نیز بررسی شد اما، در محیطهای کشت تهیه شده نتایج خوبی بدست نیامد. بعد از کشت میکروارگانیسم آسپرژیلوس نایجر و آبکافت قلیایی محیط به کمک سود ۱ N در روزهای چهارم، هشتم و دوازدهم کشت و استخراج با استیک اسید، عمل سانتریفوژ به خوبی انجام نمی گرفت، یعنی حتی در سرعتهای زیاد محلول شفافی بدست نمی آمد که احتمالا به دلیل وجود ذرات بتا - گلوکان در آن است که باعث ایجاد کدورت در محلول



شکل ۷ توانایی تولید کیتوسان در نوع آسپرژیلوس نایجر ۵۱۰۳ در محیط کشت کنجاله سویا، رطوبت تقریبی ۳۶ درصد و pH = ۶/۵.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۸ طیف FTIR مربوط به کیتوسان استخراج شده.

استخراج شده به وسیله استیک اسید شده است. بنابراین، در مورد کنجاله ذرت، مقدار کیتوسان بسیار کم وغیر قابل اندازه‌گیری بود.

نمونه‌ای از طیف FTIR مربوط به کیتوسان استخراجی در شکل ۸ نشان داده شده است و درجه استیل زدایی کیتوسان بدست آمده در محدوده ۸۵-۸۰ قرار داشت.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، اثر درصد نیتروژن، مقدار رطوبت محیط کشت جامد، زمان کشت و نوع گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر در مقدار تولید کیتوسان بررسی شد. تولید مطلوب محصول در شرایط مناسب، توانایی استخراج کیتوسان در قارچ آسپرژیلوس نایجر را نشان می‌دهد. بنابراین، به علت قابل تغییر بودن منابع دریایی در تولید کیتوسان، درصورت انتخاب سوبسترای مناسب در محیط کشت تخمیر حالت جامد که شامل درصد مناسبی از نیتروژن است، روش استخراج قارچی کیتوسان بهتر و مناسبتر خواهد بود اگر محیط کشت جامد از ضایعات جامد غیر قابل استفاده در صنایع و مناسب برای رشد میکروارگانیسم مربوط انتخاب شود.

مراجع

1. Taghizadeh S.M., Takrousta M., Davari G. and Yousefi M., Preparation of Chitosan with Different Degree of Deacetylation and Comparison of Its Different Characterization Methods, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (in Persian)*, **17**, 291-297, 2004.
2. Nwe N., Chandrkrachang S.F., Stevens W., Maw T. and Teck Koon T., Production of Fungal Chitosan by Solid State and Submerged Fermentation, *Carbohyd. Polym.,* **49**, 235-237, 2002.
3. Rane K. and Hoover D., An Evaluation of Alkali and Acid Treatments for Chitosan Extraction from Fungi, *Process Biochem.*, **28**, 115-118, 1993.
4. Crestini C., Kovac B. and Giovannozzi-Sermanni G., Production and Isolation of Chitosan by Submerged and Solid-state Fermentation from Lentinus Edodes, *Biotechnol. Bioengin.*, **50**, 207-210, 1996.
5. Ke-Jin H., Jin-Lian H., Kwok-Ping H. and Kwok-Wing Y., Screening of Fungi for Chitosan Producers, and Copper Adsorption Capacity of Fungal Chitosan and Chitosanaceous Materials, *Carbohyd. Polym.*, **58**, 45-52, 2004.
6. Niederhofer A. and Muller B., A Method For Direct Preparation of Chitosan with Low Molecular Weight from Fungi, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 101-105, 2004.
7. Suntornsuk W., Pochanavanich P. and Suntornsuk L., Fungal Chitosan Production on Food Processing by Products, *Process Biochem.*, **37**, 727-729, 2002.
8. Majeti N.V. and Kumar R., A Review of Chitin and Chitosan Applications, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1-27, 2000.
9. Chatterjee S. and Guha A.K., Clarification of Fruit Juice with Chitosan, *Process Biochem.*, **39**, 2229-2232, 2004.
10. Chatterjee S., Adhya M., Guha A.K. and Chatterjee B.P., Chitosan from Mucor Rouxii: Production and Physico-chemical Characterization, *Process Biochem.*, **40**, 395-400, 2005.
11. Nwe N. and Stevens W., Effect of Urea on Fungal Chitosan Production in Solid Substrate Fermentation, *Process Biochem.*, **39**, 1639-1642, 2004.
12. Shahidi F., Arachchi J.K.V. and You-Jin J., Food Applications of Chitin and Chitosans, *Trends Food Sci. Technol.*, **10**, 37-51, 1999.

www.SID.ir