المجلد (10) العدد (1) لسنة 2018

المجلة العراقية لبحوث السوق وحماية المستهلك

# دراسة الصفات الفيزيائية والكيميائية وتحديد السمية الخلوية لحامض الكوجيك المنتج من عزلة محلية *Aspergillus flavus WJF81* وتأثيراتها على صحة المستهلك.

زينب علي مزهر[1*]، نضال محمد صالح [2]

[1] قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق، zainab.mizher@yahoo.com

[2] استاذ دكتور، قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق، nidhalspring@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2017/9/6 تاريخ قبول النشر: 2017/12/21

## الخلاصة

اجريت خطوات الحصول على بلورات حامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* **WJF81** ، بفصل نواتج التخمر عن المايسيليوم الفطري من مزارع الانتاج بطريقة النبذ المركزي على سرعة 5000 دورة مدة 10 دقائق، ثم تم استخلاصه بخلات الاثيل وتركيز الراشح بالمبخر الدوار، وجفف بفرن درجة حرارته (37م)، وتم الحصول على بلورات الحامض ابرية طويلة موشورية مائلة للصفرة بالفحص بالمجهر الضوئي بقوة تكبير 10x ثم 40x، وتم تحديد نقطة الانصهار التي انحصرت ما بين درجة حرارة (153.5-152.9)م، وتم تشخيص حامض الكوجيك بتطبيق تقنية كروموتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC وبينت النتائج امتلاك الحامض قيد الدراسة على قمة واحدة تقارب فيها زمن الاحتجاز مع زمن احتجاز القمة للحامض القياسي، اذ بلغ زمن احتجاز الحامض قيد الدراسة (7.054) دقيقة وزمن احتجاز حامض الكوجيك القياسي (7.534) دقيقة، كما اثبتت نتائج التحري عن السمية الخلوية لحامض الكوجيك على محلول دم الانسان المستهلك بأستخدام التراكيز (100، 200، 300، 400 و 500 ppm) من الحامض، من خلال عدم وجود ترسبات وعدم ظهور اي تحلل لكريات الدم للتراكيز المختبرة.

**الكلمات المفتاحية:** حامض الكوجيك، الاستخلاص، بلورات، كروموتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC، السمية.

# STUDY THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND DETERMINATION THE CYTOTOXICITY OF KOJIC ACID PRODUCED FROM THE LOCAL ISOLATE *ASPERGILLUS FLAVUS* WJF81 AND THEIR EFFECTS ON CONSUMER HEALTH.

*Zainab A. Mezher* [*1], *Nidhal M. Salih* [2]

[1] Food Science Department, College of Agriculture, Baghdad University, Baghdad, Iraq zainab.mizher@yahoo.com.

[2] Prof. Dr. Food Science Department, College of Agriculture, Baghdad University, Baghdad, Iraq nidhalspring@yahoo.com.

## ABSTRACT

**Steps were taken to obtain the Kojic acid crystals from local fungal isolation *A. flavus* WJF81 by separating the fermentation products from the fungus mycelium from the production plant at the centrifuge at a speed of 5000 cycles for 10 minutes. The extraction was followed by ethyl acetate then supernatant concentrate by using rotary evaporator, and dried with heat oven 37°C. Long, yellowish, pristine acid crystals were obtained that examined the optical microscope with a magnification force of 10x and 40x. The melting point of kojic acid was determined between 152.9-153.5 °C Results of the diagnosis of Kojic acid by applying High pressure liquid chromatography HPLC technique showed that the acid was at one peak, which was close to the time of detention with the peak retention time of the standard acid, which Kojic acid under study retention time was (7.054) minutes and retention time of the standard kojic acid (7.534) minutes. Results of the study of the cytotoxicity of Kojic acid on the human blood consumer solution by using concentrations (100, 300, 200, 400, 500 ppm) of acid showed absence of deposits and no appearance for any analysis of blood corpuscles of the tested concentrations.**

**Keywords:** kojic acid, Extraction, Crystals, High pressure liquid chromatography HPLC, Toxicity.

[*] البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

**المقدمة INTRODUCTION:**

يعد حامض الكوجيك حامضاً عضوياً، حيث تنتجه بعض الاحياء المجهرية كأيض ثانوي (**Chaudhary *et al*.,2014**)، وتعود صفاته الحامضية الضعيفة الى احتوائه على مجموعة الهيدروكسيل في موقع ذرة الكاربون الخامسة C5 التي تمكنه من تكوين ملح بتفاعله مع بعض المعادن مثل الصوديوم والزنك والنحاس والكالسيوم والنيكل والكادميوم (**Mohamad *et al*., 2010**)، والحامض مركب سالب الشحنة له القابلية على ربط Chelate الايونات الموجبة كالحديد ثلاثي التكافؤ، وتكوين مركب مستقر كما يمكن ان تشترك اكثر من وحدة حامض الكوجيك في ربط ايون الحديد الثلاثي التكافؤ وتكوين معقدات حديد مع واحدة او اكثر من وحدات الحامض (**Aytemir and Calis, 2006**).

استعملت طرائق مختلفة لفصل وتنقية حامض الكوجيك فقد استخلص الحامض المنتج من الفطر *A. oryzae* NRRL 35191 بأستعمال خلات الاثيل (**Chaves *et al*., 2012**)، اما **Hazzaa *et al*. (2013)** فقد استخدموا مذيب خلات الاثيل والكلوروفورم لأستخلاص الحامض من *A. oryzae var. effusus* NRC14، بينما قام **Rodrigues *et al*. (2011)** بأستخلاص لحامض الكوجيك من *Aspergillus* spp. بإضافة الايثانول والماء بنسبة 20:80 ثم اجريت عملية التبخير للحصول على منتوج متبلور، وكذلك طُبق الكلوروفورم لأستخلاص حامض الكوجيك المنتج من *Aspergillus* و *Penicillium* (**Chaudhary *et al*., 2014**)، وتم فصل وتنقية حامض الكوجيك من الاوساط التخمرية من قبل **Rodrigues *et al*. (2011)** بتجفيد الراشح الفطري بفصل الحامض من الفطر *Aspergillus* spp. مع استخلاص متعاقب بأستعمال الايثانول: الماء بنسبة 20:80 وبعدها بخر النموذج وبلورته للحصول على الناتج النهائي، وقام **Lajis *et al*. (2012)** بعمل طرد مركزي للمزرعة السائلة لعفن *Rhizomucor miehei* بعد الانتاج والتي تحتوي على حامض الكوجيك، ثم استعمل المبخر الدوار بدرجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة للحصول على البلورات التي تم فصلها بخلطها مع الميثانول واجري الطرد المركزي بعد ذلك.

واستخلص الحامض المنتج من الفطر *A. flavus* بمزيج من الايثانول والماء بنسبة 20:80 وبرد المستخلص في الثلاجة لمدة ليلة كاملة للحصول على البلورات، التي جففت على درجة حرارة 80م لمدة 24 ساعة واكملت عملية التنقية بأستعمال مزيج الماء والاسيتون (**Abd El-Aziz., 2013**). اوضح **Saleh *et al*. (2011)** انه تم الحصول على بلورات حامض الكوجيك بأخذ راشح المزرعة وتركيزه بالمبخر الدوار، وحفظه بدرجة حرارة 4م في الثلاجة لحين تشكيل بلورات حامض الكوجيك التي حُملت على ورق ترشيح Whatman No.1 وغُسلت عدة مرات بالبنزين، واذيبت مع خلات الاثيل للتخلص من الشوائب لحين ظهور بلورات حامض الكوجيك النقية.

ومن اهم الطرائق التشخيصية دقة لتحديد نوعية وكمية الحامض هي طريقة كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC (High Performance Liquid Chromatography)، وهذه الطريقة مستخدمة منذ ثمانينيات القرن الماضي واطوالها الموجية بين (220-267) نانومتر (**Burdock *et al*., 2001**)، التي طورها **Ariff *et al*. (1996)** واستخدمها في التقدير النوعي والكمي لحامض الكوجيك المنتج من فطر *A. flavus* في الاوساط التخمرية.

كان الاعتقاد السائد سابقاً ان حامض الكوجيك احد السموم الفطرية Aflatoxin ولكن البحوث الحديثة لم تدرج الحامض ضمن السموم الفطرية حيث عومل كحامض عضوي وأحد منتجات الايض الثانوية التي تنتجها الفطريات (**Bentley, 2006**)، واوضح **Basappa *et al*. (1970)** ان حامض الكوجيك ليس وسيط في تركيب السموم الفطرية حيث انه والسموم الفطرية تتبع مسارات مختلفة، اما استخدام حامض الكوجيك كمادة مضافة للغذاء لا يشكل اي خطر على صحة المستهلك (**Nohynek *et al*., 2004**).

ذكرت دراسات عدة ان استهلاك الحامض بالنسب المشابهة لتراكيزه في الاغذية المتخمرة لا يؤثر على صحة المستهلك لأن معظمها شاع استهلاكها على مر العصور واشتهرت بأنها اغذية صحية (**El-Kady *et al*., 2014**).

**المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHODS:**

**استخلاص وبلورة حامض الكوجيك:**

تم انتاج كمية من حامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية *Aspergillus flavus* WJF81 تحت الظروف المثلى للإنتاج بتنمية العزلة في وسط غذائي مكون من 10% سكر السكروز مصدراً كاربونياً و 0.25% مستخلص الخميرة مصدراً نتروجينياً، وعُدل الوسط الى الرقم الهيدروجيني 4 ودرجة حرارة الحضن 30م وبظروف حضن ساكنة لمدة 15 يوم، وجرى استخلاص وبلورة الحامض حسب طريقة **Hazzaa *et al*. (2013)** المحورة من قبل باحث الدراسة الحالية، اذ تم فصل نواتج التخمر عن الخيوط الفطرية (Mycelium) بأستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة (5000) دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق، تم اختبار وجود حامض الكوجيك بالراشح بواسطة الطريقة اللونية ثم تم استخلاصه بخلات الأثيل بأستعمال قمع الفصل ثم ركز الراشح بالمبخر الدوار بدرجة حرارة 36م للحصول على اقل حجم، بعدها جفف الراشح المركز في فرن درجة حرارته 37م لمدة 48ساعة وذلك للحصول على بلورات حامض الكوجيك بشكل نقي.

**توصيف بلورات حامض الكوجيك:**

**الوصف المظهري:**

يتم وصف البلورات مظهرياً من ناحية اللون والقوام والشكل وتحديد شكل البلورات بواسطة المجهر الضوئي حيث يأخذ جزء من البلورات وتوضع على شريحة زجاجية ثم تغطيتها بقطعة من غطاء الشريحة الصغير(Cover slide)، بعدها تفحص بالمجهر الضوئي بالعدسة الصغرى 10x اولاً ثم بالعدسة الجافة الكبرى بقوة تكبير 40x.

**تحديد نقطة انصهار حامض الكوجيك:**

تم تحديد نقطة انصهار الحامض في مصنع ابن سينا/ وزارة الصناعة والمعادن، وذلك بوضع كمية من الحامض في انبوبة شعرية مسدودة من أحد طرفيها ثم وضعت في جهاز قياس نقطة الانصهار Melting PointSMP301 وسجلت نقطة بداية الانصهار ونهايتها.

**تشخيص كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (High Performance Liquid Chromatography (HPLC:**

تم استعمال تقنية HPLC في تشخيص حامض الكوجيك المنقى من العزلة المنتخبة قيد الدراسة، اذ تم حقن (20) مايكروليتر من النموذج في العمود بوساطة الحاقن، و كان العمود المستعمل من نوع C18 ذي الأبعاد (4.6 x 250) ملم وحجم الدقائق (5) مايكرون، أمّا الطور المتحرك المستعمل فهو (ماء/ Acetonitrile) بنسبة (92 / 8)%، علما بأن معدل الجريان المستعمل (1.5) مل/دقيقة، وتم قياس الامتصاص عند طول موجي (269) نانوميتر ورسمت العلاقة بين قوة الإشارة وزمن الاحتجاز وتم مقارنة زمن احتجاز Retention time المركب النموذج مع زمن ظهور المركب القياسي.

**تحديد السمية الخلوية لحامض الكوجيك على محلول الدم البشري:**

تم الكشف عن سمية حامض الكوجيك المستخلص حسب الطريقة المتبعة من قبل **Nair *et al.* (1989)** وذلك بأخذ (1) مل من دم الانسان الطازج مع (20) مل من محلول ملحي Normal saline 0.85%، ثم حُضرت تراكيز من حامض الكوجيك (100, 200, 300, 400 و 500 ppm) كما في (الجدول، 1) بأستخدام حامض الكوجيك الخزين ذو تركيز 1000ppm المحضر بأذابة (0.1) غم حامض الكوجيك في (100) مل من الماء المقطر، بعدها تم خلط (100) مايكروليتر من كل تركيز مع (2) مل من عالق الدم، اما العينة الضابطة كانت بأضافة (100) مايكروليتر من الماء المقطر الى (2) مل من عالق الدم، حُضنت النماذج على درجة حرارة (37م) وتمت متابعة عكارة العالق في المدد الزمنية 10 و 30 و 60 دقيقة.

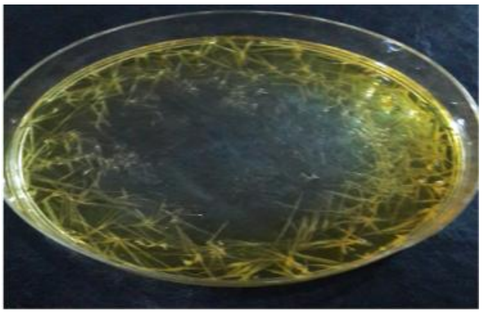
**جدول (1):** حجوم وتراكيز حامض الكوجيك الخزين للكشف عن تحديد السمية.

| رقم الانبوبة | حجم حامض الكوجيك الخزين (مل) | حجم الماء المقطر (مل) | تركيز حامض الكوجيك ppm |
|---|---|---|---|
| **1** | 0.5 | 4.5 | 100 |
| **2** | 1 | 4 | 200 |
| **3** | 1.5 | 3.5 | 300 |
| **4** | 2 | 3 | 400 |
| **5** | 2.5 | 2.5 | 500 |

**النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION:**

**الاستخلاص والبلورة لحامض الكوجيك:**

تم الحصول على بلورات حامض الكوجيك والتي تظهر في (الشكل، 1) حيث تم استخلاصه بخلات الاثيل من راشح المزرعة الفطرية *A. flavus* WJF81 وعومل بالنبذ المركزي والحرارة وساعدت هذه الخطوة في ترويق المستخلص كخطوة اولى في التنقية وحسب طريقة **Vijayakumar *et al.* (2008)** والتي وصفها بأنها الخطوة الاولى في تنقية الاحماض العضوية الاخرى.



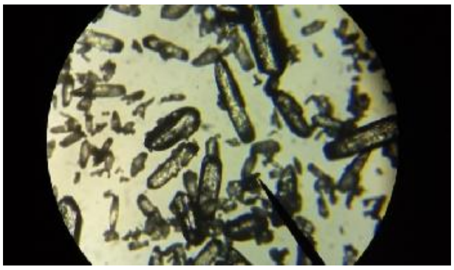
**شكل (1):** بلورات حامض الكوجيك المجففة المنتج من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* WJF81 .

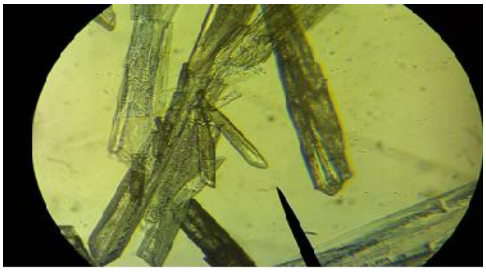
بينما قام **Basappa *et al.* (1970)** بتنقية حامض الكوجيك من الفطر *A. flavus* بواسطة أستخلاصه بالكلوروفورم وفصله بكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بمرحلتين الاولى بأستعمال مذيبين ايثانول:كلوروفورم (90:10) وبعدها فصلت البقع واعادة تحميلها ثانياً بأستخدام مزيج المذيبات بيوتانول- حامض الخليك- ماء بنسبة (1:1:4).

**توصيف حامض الكوجيك فيزيائياً وكيميائياً:**

بينت الدراسة شكل بلورات حامض الكوجيك بأنها بلورات ابرية طويلة موشورية، مائلة للصفرة وحسب ما موضح بـ(الشكل، 2)، وهذا يطابق ما ذكره **Abd EL-Aziz (2013)** من ان مظهر الحامض المنقى من العزلة الطافرة للفطر *A. flavus* كان بشكل بلورات صفراء الى بنية، فيما ظهرت بلورات الحامض بشكل ابري طويلة عديمة اللون من الفطر *A. oryzae var. effusus* NRC14 **(Hazzaa *et al*., 2013)**.

وذكر **Chaudhary *et al.* (2014)** ان بلورات الحامض النقية لها شكل ابري موشوري ذات لون اصفر باهت الى عديمة اللون.





**(ب)** **(أ)**

**شكل (2): (أ)** بلورات حامض الكوجيك المنتج من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* WJF81 تحت المجهر الضوئي **(ب)** بلورات حامض الكوجيك القياسي تحت المجهر الضوئي

**نقطة الانصهار:**

تم قياس نقطة الانصهار لحامض الكوجيك المنتج من العزلة *A. flavus* WJF81 حيث تراوحت بين (153.5-152.9)م وهذه الدرجة تقع ضمن مدى نقاط انصهار حامض الكوجيك التي تتراوح ما بين (151-154)م **(Ohyama and Mishima, 1990)**، والتي توافقت مع ما جاء به **Saleh *et al.* (2011)** الذي حدد نقطة الانصهار (150-153.5)م لحامض الكوجيك وهذا يعتمد على نسبة نقاوة بلورات الحامض.

**تشخيص وتقدير حامض الكوجيك بتقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة**

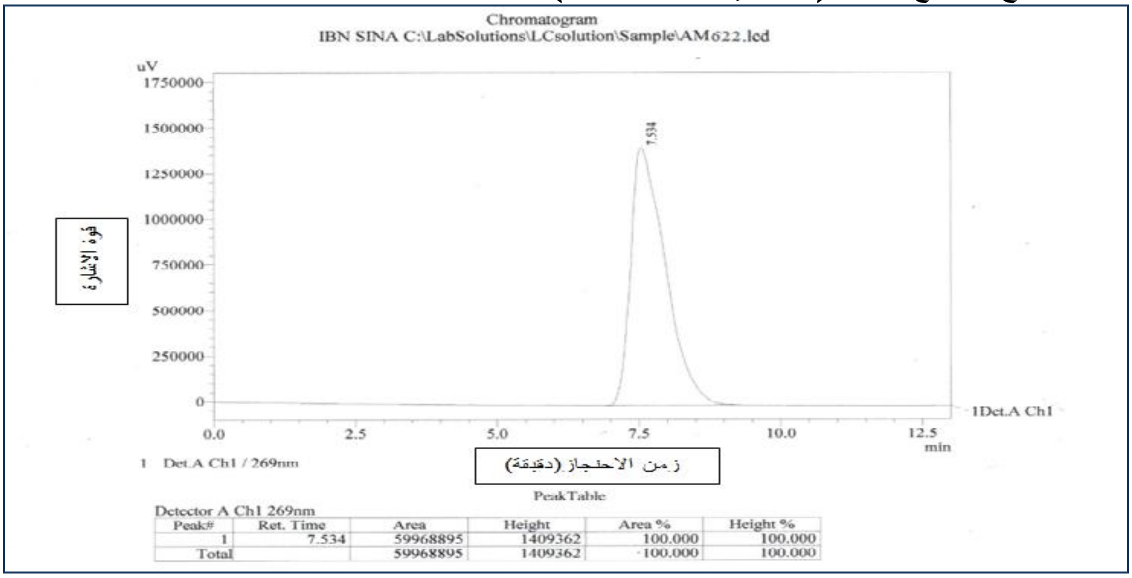
**High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

اجري هذا الفحص لتشخيص نموذج حامض الكوجيك قيد الدراسة، حيث تم دراسة تطابق زمن الاحتجاز لها مع زمن احتجاز المركب القياسي البالغ (7.534) دقيقة, اذ اظهرت النتائج المبينة في (الشكلين، 3 و 4) امتلاك حامض الكوجيك على قمتين ولن قمة واحدة منها تقارب فيها زمن الاحتجاز مع زمن احتجاز القمة للحامض القياسي، الذي بلغ (7.054) دقيقة وكان تركيز حامض الكوجيك قيد الدراسة (23.3) غم/لتر.

ان هذه المعطيات التي تم الحصول عليها بتطبيق تقنية HPLC توافقت مع ما وجده **Higashi and Fujii (2012)** فقد توصلا الى ان زمن الاحتجاز لحامض الكوجيك بلغ (7) دقائق وذلك بأستعمل طور متحرك مكون من Acettonitrile و Milli-Q-Water الحاوي على Trifluoroacetic acid بنسبة (9:11).

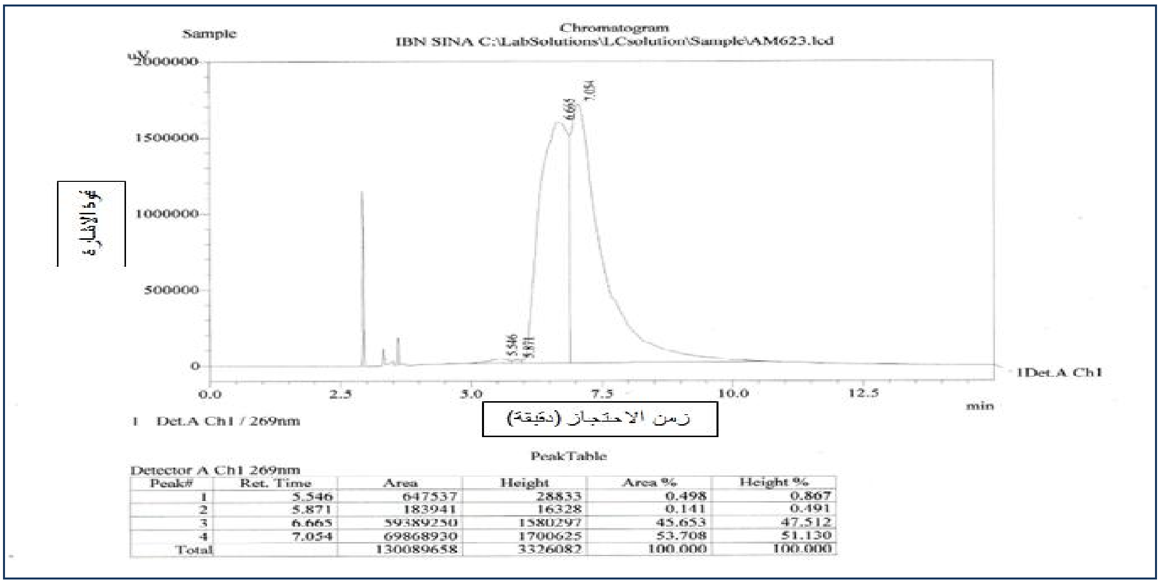
بينما وجد **Huang *et al.* (2004)** ان زمن احتجاز حامض الكوجيك (13.637) دقيقة وذلك بأستعماله طور متحرك مكون من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ($KH_2PO_4$) والميثانول بنسبة (1:99).

ويتأثر زمن الاحتجاز بعاملين الاول هو المسافة التي يقطعها النموذج خلال مادة العمود والثاني هو السرعة التي يتمكن بها النموذج من قطع المسافة **(Rossomando, 1987)**.




| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 7.534 | 59968895 | 1409362 | 100.000 | 100.000 |
| Total | | 59968895 | 1409362 | 100.000 | 100.000 |

**شكل (3):** كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC لحامض الكوجيك القياسي.



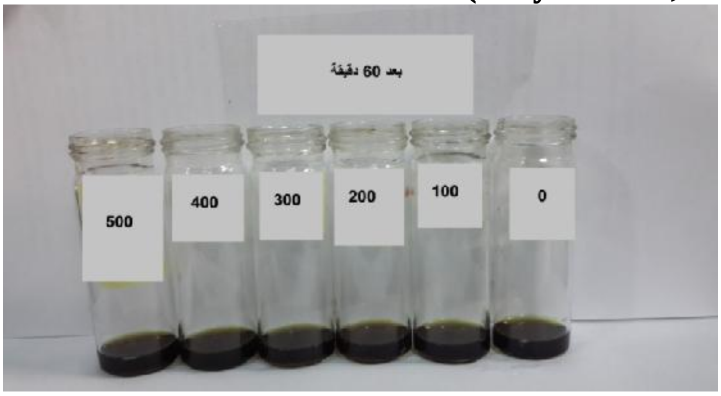

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5.546 | 647537 | 28833 | 0.498 | 0.867 |
| 2 | 5.871 | 183941 | 16328 | 0.141 | 0.491 |
| 3 | 6.665 | 59389250 | 1580297 | 45.653 | 47.512 |
| 4 | 7.054 | 69868930 | 1700625 | 53.708 | 51.130 |
| Total | | 130089658 | 3326082 | 100.000 | 100.000 |

**شكل (4):** كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC لحامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* WJF81

**تحديد السمية الخلوية لحامض الكوجيك المنتج من العزلة المحلية *A. flavus* WJF81 وتأثيرها على صحة المستهلك:**

يبين (الشكل، 5) نتائج اختبار فحص السمية الخلوية لحامض الكوجيك المنتج من العزلة المحلية *A. flavus* WJF81 بأستخدام تراكيز مختلفة من حامض الكوجيك قيد الدراسة مقارنة مع العينة الضابطة التي لا تحتوي على حامض الكوجيك، اذ وجد من خلال عدم وجود ترسبات في المحلول الملحي وعدم ظهور اي تحلل لكريات الدم الانسان ولكافة التراكيز المختبرة، خلال مدد الاختبار البالغة (10، 30، 60) دقيقة مما يدل على انها لا تمتلك خواص سمية تعمل على تحلل

وترسب كريات الدم وبذلك فأنه لا وجود لأي اثار جانبية عند استهلاكها والذي يتفق مع العديد من الدراسات والتي تبين بأن حامض الكوجيك ليس احد السموم الفطرية، وانه ليس وسيط في تركيب السموم الفطرية حيث ان حامض الكوجيك والسموم الفطرية تتبع مسارات مختلفة **(Basappa *et al*., 1970)**، وممكن استخدامه كمادة مضافة للغذاء حيث لا يشكل اي خطر على صحة المستهلك **(Nohynek *et al*., 2004)**.




**شكل (5):** اختبار فحص السمية الخلوية لحامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* WJF81 **على دم الانسان**.

**الاستنتاجات CONCLUSIONS:**

**تم** الحصول على حامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية *A. flavus* WJF81 **بشكل بلورات** ابرية طويلة موشورية، مائلة للصفرة، وله نقطة انصهار تنحصر بين (153.5-152.9**م**، **وشُخص** بتقنية HPLC وبلغ تركيب الحامض **في الوسط الانتاجي** (24.73) **غم**/لتر وبلغ زمن احتجاز حامض الكوجيك من العزلة الفطرية المحلية المختبرة (7.054) دقيقة وهو مقارب لزمن احتجاز المركب القياسي لحامض الكوجيك (7.534) دقيقة، وبعد الفحص عن سمية الحامض تبين انه لا يعد من السموم الفطرية عند استخدامه ضمن التراكيز (100-500)ppm.

**REFERENCES :**

I. Abd El-Aziz, A. B. (2013). Improvement of kojic acid production by a Mutant of *Aspergillus flavus. J. of Natural Sciences Research, 3*(4), 31-41.

II. Ariff, A. B., Salleh, M. S., Ghani, B., Hassan, M. A., Rusul, G. & Karim, M. I. A. (1996). Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link. *Enzyme and Microbiology Technology J., 19*(7), 545-550.

III. Aytemir, M. D., & Calis, U. (2006). Synthesis of some new hydroxypyranone derivatives and evaluation of their anticonvulsant activities. *FABAD Journal of Pharmacological Science, 31*, 23-29.

IV. Basappa, S. C., Sreenivasamurthy, V., & Parpia, H. A. B. (1970). Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus flavus* Link. *Journal of General Microbiology, 61*(1), 81-86.

V. Bentley, R. (2006). From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *National Production Republic J., 23*(6), 1046-1062.

VI. Burdock, G. A., Soni, M. G., & Carabin, I. G. (2001). Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Toxicol. Pharmacol. J., 33*(1), 80-101.

VII. Chaudhary, J., Pathak, A. N., & Lakhawat, S. (2014). Production tchnology and applications of kojic acid. *Annual Research and Review in Biology, 4*(21), 3165-3196.

VIII. Chaves, F. C., Gianfagna, T. J., Aneja, M., Posada, F., Peterson, F. W., & Vega, F. E. (2012). *Aspergillus oryzae* NRRL 35191 from coffee, a non toxic endophyte with the ability to synthesize kojic acid. *German Mycological Society*, *11*, 263-267.

IX. El-Kady, I. A., Zohri, A. N. A., & Hamed, S.R. (2014). Kojic acid production from agro industrial by products using fungi. *Biotechnology Research International*, Volume 2014, Article ID 642385, 10 pages.

X. Hazzaa, M. M., Saad, A. A., Hassan, H. M., & Ibrahim, E. I. (2013). High production of kojic acid crystals by isolated *Aspergillus oryzae var. effusus* NRC14. *J. of Applied Sciences Research*, *9*(3), 1714-1723.

XI. Higashi, Y., & Fujii, Y. (2012). Determination of kojic acid in a skin whitening cosmetic by high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet detection after pre column derivatization with 4-flouro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *J. Cosmetic Sciences*, *63*(3), 205-212.

XII. Huang, S., Lin, C., Huang, M., & Wen, K. (2004). Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid. Arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. *J. of Food and Drug Analysis*, *12*(1), 13-18.

XIII. Lajis, A. F. B., Hamid, M., & Ariff, A. B. (2012). Depigmenting effect of kojic acid estersin hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012, Article ID 952452, 9 pages.

XIV. Mohamad, R., Mohamad, M. S., Suhaili N., Saleh M. M., & Ariff A. B. (2010). Kojic acid: applications and development of fermentation process for production. *Biotech. & and Mol. Bio. J.*, *5*(2), 24-37.

XV. Nair, M. G., Putnam, A. R., Mishra, S. K., Mulks, M. H., Taft, W. H., Keller, J. E., Miller, J. R., Zhu, P. P., Meinhart, J. D., & Lynn, D. G. (1989). Faeriefungin: a new broad spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. autotrophicus. *J Nat Prod*, *52*, 797-809.

XVI. Nohynek, G. J., Kirkland, D., Marzin, D., Toutain, H., Leclerc-Ribaud, C., & Jinnai, H. (2004). An assessment of the genotoxicity and human health risk oftopical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. *Food and Chemical Toxicology*, *42*, 93-105.

XVII. Ohyama, Y., & Mishima, Y. (1990). Melanosis inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance J.*, *6*, 53-58.

XVIII. Rodrigues, A. P. D., Carvalho, A. S. C., Santos, A. S., Alves, C. N., do Nascimento, J. L. M., & Silva, E. O. (2011). Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biology International J*, *35*(4), 335-343.

XIX. Rossomando, E. F. (1987). High Performance Liquid Chromatography in Enzymatic Analysis. *Applications to the Assay of Enzymatic Activity*. A Wiley-Interscience Publication, John W. and Sons, United States.

XX. Saleh, R. M., Kabli, S. A., Al-Garni, S. M., & Mohamed, S. A. (2011). Screening and production of antibacterial compound from *Trichderma* spp. against human pathogenic bacteria. *African J. of Microbiology Research, 5*(13), 1619-1628.

XXI. Vijayakumar, J., Aravindan, R., & Viruthagriri, T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q, 22*(2), 245-264.