عزل وتشخيص العفن الاكثر انتاجا لحامض الكوجيك بالطريقة الجزيئية وتحوير وسط الانتاج للحصول على حاصل اكبر واكثر نقاوة لبلوراته

طارق زيد ابراهيم[1] ويونس علي يونس وصلاح عمر احمد

* قسم علوم الاغذية \ كلية الزراعة والغابات \ جامعة الموصل

الخلاصة

اختبرت 17 عزلة برية للاعفان لبحث انتاجها لحامض الكوجيك ، تسعة منها انتجه (53 %) وكانت العزلة 4a الاعلى انتاجية التي شخصت مجهريا وبطريقة التشخيص الجزيئي لفواصل النسخ الداخلية ITS 1,4 على انها تابعة للنوع *Aspergillus oryzae* . كان عدد تواليات المنطقة المشخصة 548 توالي ، وباستخدام طريقة تخمرات المزارع السطحية السائلة حددت الظروف المثلى لإنتاجه فكانت متمثلة بمدة تخمر لمدة 8 ايام واس هيدروجيني 6 ودرجة حرارة 30 °م و 100 غم / لتر سكر الكلوكوز كمصدر كربوني ومصدر نتروجيني مكون من 2.5 غم / لتر خلاصة الخميرة و 0.1 غم / لتر نترات الامونيوم و 1 غم / لتر فوسفات ثنائية الصوديوم او فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ، ورج متقطع لأربع ساعات يوميا عند سرعة دوران 150 دورة / دقيقة ، وقد انتجت العزلة 60 غم / لتر من حامض كوجيك اي بكفاءة انتاج 0.78 غم حامض كوجيك من 1 غم كلوكوز ، وعند تقليل كمية خلاصة الخميرة الى اقل ما يمكن والاستعاضة عنها بمصدر نتروجيني لا عضوي زادت نسبة حاصل بلورات الحامض المستخلصة الناتجة الى 58.28 % ، واعطت بلورات الحامض المنقاة المنتجة نسبة تطابق 95 % مع حامض الكوجيك القياسي عند تحليلها بجهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء .

الكلمات المفتاحية:
حامض الكوجيك ، *Aspergillus oryzae* ، ITS ، الظروف المثلى ، البلورة ، FT-IR .

للمراسلة :
طارق زيد ابراهيم
البريد الالكتروني:
azzawwy@yahoo.com

Isolation and Identification of the most Producible Mold for Kojic Acid by the Molecular Method and Modify the Production Medium for Pure and High Yield of Crystals

Tariq Z. Ibrahim , Yonus Ali Yonus and Salah O. Ahmed
Food Sciences Dept.- College of Agric. & Forestry- Mosul University

ABSTRACT

Seventeen wild fungal isolates were tested for kojic acid production, nine of them were found kojic acid producer (53%), and the 4a isolate was the highest producer of kojic acid. Which diagnosed using microscopic procedure and at molecular level (using the internal transitional spacer ITS 1,4) and found to be *A. oryzae* and sequences of ITS were 548 sequences. Surface liquid cultures fermentation was used for determination of the optimal conditions for kojic acid production which were found to be, 8 days of fermentation period, pH 6 at 30 ˚C and at 100 g/L glucose as a carbon source, 2.5 g/L yeast extract and 0.1 g/L ammonium nitrate as nitrogen sources and 1 g/L disodium phosphate or potassium dihydrogene phosphate and with occasional shaking for four hours a day at 150 round/min. The isolate produced 60 g/L of kojic acid at yield of 0.78 g of kojic acid from 1 g glucose. Decreasing the added yeast extract to the production media to the lowest amount and commutating it by adding an inorganic nitrogen source caused an increase in the yield of kojic acid crystals to 58.28 %, the purified kojic acid isolated crystals gave 95% of correspondence ratio to the standard kojic acid crystals when they analyzed by using infrared spectroscopy.

Key words:
Kojic acid, *Aspergillus oryzae*, ITS, optimal conditions, crystallization, FT-IR.

Correspondence:
Tariq Z. Ibrahim
E-mail:
azzawwy@yahoo.com

[1] البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الاول

المقدمة:

حامض الكوجيك هو احد منتجات الايض الثانوية Secondary metabolites والتي تنتج من قبل العديد من الاعفان وبخاصة الانواع التابعة للجنس *Aspergillus* منذ بدء نموها في اوساط الانتاج (Rosfarizan واخرون ، 1998؛ Rodrigues واخرون ، 2011). ازداد استخدام الحامض في مجال التصنيع الغذائي نظرا لوظائفه الكيميائية المتعددة والمفيدة للعمليات التصنيعية وللحفاظ على بعض الصفات المهمة للمنتجات ، فقد استخدم كمضاد للاسمرار Antibrowning اذ له القدرة على منع الاسمرار الانزيمي Enzymatic browning في مجموعة من الاغذية الحاوية على انزيم الاسمرار Polyphenol oxidase مثل العرهون والبطاطا والتفاح والروبيان الابيض وسلطان البحر وقد اثبت فاعليته كمضاد للاسمرار وذلك بتداخله مع استهلاك الاوكسجين الضروري في عمل انزيم الاسمرار وايضا قدرة الحامض على اختزال مركب Oxyquinones الى Diphenoles ليعمل على منع تكون الصبغة السمراء في هذه الاغذية (Chen واخرون ، 1991 ؛ Kahn واخرون ، 1997) . واثبت Hasebe واخرون (1995) ان لحامض الكوجيك فعاليتين مهمتين ضد الاسمرار الانزيمي فمن ناحية يعطي فائدة مشابهة لاضافة حامض الاسكوربيك كمادة اساس لعمل انزيم الاسمرار ومن جهة اخرى اعطى نتائج مشابهة لمثبطات انزيمات الاسمرار، وقد اظهر الحامض فعالية عالية اثناء انتاج الشاي الاخضر اذ كان له دور فعال في تثبيط انزيمات الاسمرار التي تسبب مشاكل كبيرة عند الانتاج (Wang واخرون ، 2003) . واستخدم الحامض ايضا في منع تلون Discolouration القشريات البحرية واللحوم الحمراء وبعض الخضراوات الطازجة (Saleh واخرون ، 2011) . ولذا فقد هدفت الدراسة الى ايجاد سلالة ذات انتاجية عالية لحامض الكوجيك وتشخيصها جزيئيا وانتاج وعزل بلوراته وتنقيتها بعد تحوير وسط الانتاج للحصول على اعلى انتاج من البلورات .

مواد وطرائق البحث:

استخدمت 16 عينة رز مختلفة المنشأ (محلية ومستوردة) لغرض عزل الاحياء المجهرية المنتجة لحامض الكوجيك واستخدم لهذا الغرض طريقة التخافيف العشرية Serial dilution methods والفرش على الاطباق الحاوية على وسط اكار البطاطا والدكستروز وحضنت الاطباق في درجة حرارة 30 °م لمدة 5 –7 ايام وانتخبت مستعمرات الاعفان المختلفة ونقيت على اطباق مستقلة لاكار البطاطا والدكستروز ووسط اكار زابك لغرض تشخيصها . ولاختبار انتاج حامض الكوجيك لقحت دوارق مخروطية سعة 250 مللتر حاوية على 100 مللتر من وسط انتاج حامض الكوجيك بلمسة ابرة التلقيح من سبورات عزلات الاعفان المختلفة وحضنت الدوارق في حضانة رجاجة موديل 211 DS المجهز من شركة Labnet International Inc. الانكليزية في درجة حرارة 30 °م لمدة 10 ايام مع استخدام الرج بسرعة 200 دورة / دقيقة وبمعدل اربع ساعات يوميا . واستخدمت الطريقة اللونية في الكشف عن انتاج حامض الكوجيك وتقدير كميته وبحسب طريقة Kamaroddin (2007) وجرى قياس الامتصاصية Absorption على طول موجي 500 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer موديل PD-303 UV المجهز من شركة APEL الانكليزية لمعرفة تركيز الحامض المنتج بالاسقاط على المنحنى القياسي للحامض المجهز من شركة Rita Corporation الامريكية . اعتمدت الصفات المزرعية لمستعمرات الاعفان النامية على وسطي اكار البطاطا والدكستروز واكار زابك اضافة الى الصفات المجهرية اذ حضرت شرائح زجاجية للاعفان بالطريقة الرطبة Wet mount method وصبغها بصبغة المثلين الازرق Methylen blue وشخصت الاجناس في قسم وقاية النبات–كلية الزراعة والغابات جامعة الموصل وفق طريقة Maza واخرون (1997) وشخصت انواع الجنس *Aspergillus* sp. وفق المفتاح التشخيصي الوارد في Raper واخرون (1977) . جرى التشخيص الجزيئي بالاعتماد على طريقة بادئات مناطق فواصل النسخ الداخلية Internal Transcribed Spacer (ITS) region primers وبحسب طريقة Mirhendi واخرون (2007) للعزلة 4a التابعة للنوع *A. oryzae* ذات الانتاجية الاعلى ، وبمكررين لخيوط العفن اتبعت طريقة العمل الخاصة بعدة عزل DNA الخاص بالخلايا النباتية (PowerPlant Pro DNA Isolation Kit Catalog No. 13400-50) المجهز من شركة MOBIO Laboratories, Inc. الامريكية واثناء مراحل الطريقة استخدم الطرد المركزي المبرد موديل Accuspin Micro 17R المجهز من شركة Fisher Scientific الامريكية على السرع 10000 و 16000 دورة / دقيقة في درجة حرارة 4 °م وحسب المدة المحددة في طريقة عمل العدة وجهاز الرجاج من نوع Vortex Genie 2 موديل 12-812 المجهز من شركة ALLIED Fisher Scientific الامريكية ، وتم التاكد من عزل الـ DNA في العينة باستخدام جهاز المطياف الضوئي ذو القطرة النانوية Nano Drop Spectrophotometer موديل ND-1000 المجهز من شركة Fisher Scientific الامريكية عند برنامج يعتمد الطول موجي 280 / 260 نانومتر . نقلت عينة DNA الى جهاز Polymerase Chain Reaction PCR لغرض تضخيم منطقة ITS1 و ITS4 اذ استخدم لهذا الغرض جهاز PCR نوع UNO-Thermoblock المجهز من شركة Biometra الامريكية واضيف خليط

مكونات التفاعل الخاص بعمل الجهاز PCR Reaction Mixer وبحسب طريقة Mirhendi واخرون (2007) . اختبرت عينة DNA المضـــخمة (ITS 1,4) بالترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis لمعرفة الحجم التقريبي لعينة DNA المضاعفة بالمقارنة مع خليط الاحجام القياسية المختلفة المعلمة Ladder molecular size marker المجهز من شركة Sigma-Aldrich مقاسه بوحدة زوج قاعدة Base pair المزودة مع عدة جهاز الترحيل الكهربائي موديل 200/2.0 electrostage المجهز من شركة Biorad الامريكية وباستخدام الاكاروز Agarose بتركيز 1 % وزن / حجم مذاب في محلول دارئ TAE وهو ايضا نفس محلول التطوير ، مزجت العينة مع صبغة Ethidium bromide بتركيز 0.5 مايكروغرام / مللتر وبحث عن الحزمة الناتجة في منطقة 500 – 600 زوج قاعدة بالمقارنة مع حزم السيطرة القياسية باستخدام جهاز اظهار البقع باشعة UV من نوع ENDURO GDS aplegen المجهز من شركة Labnet International, Inc. واستخدمت العدة الخاصة بتنقية عينة DNA من خليط PCR من نوع QIAquick والمجهزة من شركة QIAGEN الامريكية وارسلت عينة DNA المحضرة الى شركة Gene wiz Company, Inc. الامريكية لتحديد التعاقب الجيني DNA sequencing للعينة وتمت المكاملة والتجميع والمطابقة لها باستخدام البرنامج seqtrace المحمل من على موقع http://code.google.com/p/seqtrace/ وبحث عن رقم السلالة التي تطابق التوالي الذي تم الحصول عليه من قاعدة GenBank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST وبتطبيق برنامج BLASTn (Altschul واخرون ،1997) واستخدم برنامج MEGA6 لتحليل التطابق الجيني مع انواع السلالات الفطرية المختلفة وبحسب طريقة Tamura واخرون (2013) . حور وسط الانتاج ذو الظروف المثلى لانتاج حامض الكوجيك بتغيير كمية ونوع مصدر النتروجين اذ اضيفت خلاصة الخميرة بتركيز 2.5 غم / لتر له مع اضافة نترات الامونيوم بتراكيز 0.1 و 0.25 و 0.5 غم / لتر كمصدر لاعضوي للنتروجين والكلوكوز بتركيز 100 غم / لتر وضبط الاس الهيدروجيني عند 6 وعقمت الاوساط ولقحت وحضنت في درجة حرارة 30 ◦م لمدة 8 ايام مع الرج المتقطع بمعدل 4 ساعات يوميا بسرعة 150 دورة / دقيقة . ولتقدير كمية الكلوكوز المتبقي اتبعت الطريقة المذكورة في Kamaroddin (2007) وقرء الامتصاص على طول موجي 540 نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي . ولتقدير وزن المايسليوم الجاف للعفن اتبعت الطريقة المذكورة في El-Aasar (2006) ولاستخلاص بلورات الحامض حورت طريقة Hazzaa واخرون (2013) اذ تم جمع رواشح المزارع في دورق مخروطي حجم 2 لتر وركزت الى خمس حجمها الاصلي باستخدام المبخر الدوار نوع RE300/MS المجهز من شركة BARLOWORLD SCIENTIFIC LIMITED الانكليزية بدرجة حرارة 50 ◦م بعدئذ وضع المحلول المركز الناتج في الثلاجة لمدة 24 ساعة رشح بعدها من خلال ورق الترشيح نوع واتمان NO:1 لجمع بلوراته المتكونة ولبلورة الحامض الذائب ركز المحلول الراشح مرة اخرى الى نصف حجمه الاخير واضيف اليه محلول خلات الاثيل المركز بواقع ضعف حجمه ثم بخر خلات الاثيل للحصول على بلورات الحامض ، ونقيت البلورات اذ اذيبت في محلول اسيتون وماء بنسبة 1 : 3 وكررت عملية التنقية هذه عدة مرات للحصول على بلورات عالية النقاوة وجففت البلورات بعدها في الفرن الكهربائي في درجة حرارة 80 ◦م لمدة 24 ساعة . وللتحليل الكيميائي لبلورات حامض الكوجيك القياسي والمنتج استخدم لهذا الغرض جهاز Fourier Transform Infrared (FTIR) من نوع (Opus ATR-Crystal Diamond موديل ALPHA المجهز من شركة BRUKER الالمانية اذ وضعت بلورات الحامض على مكبس الجهاز وحللت بمدى ترددات بين 400 – 4000 / سم وبحسب طريقة Liu واخرون (2014) .

النتائج والمناقشة:

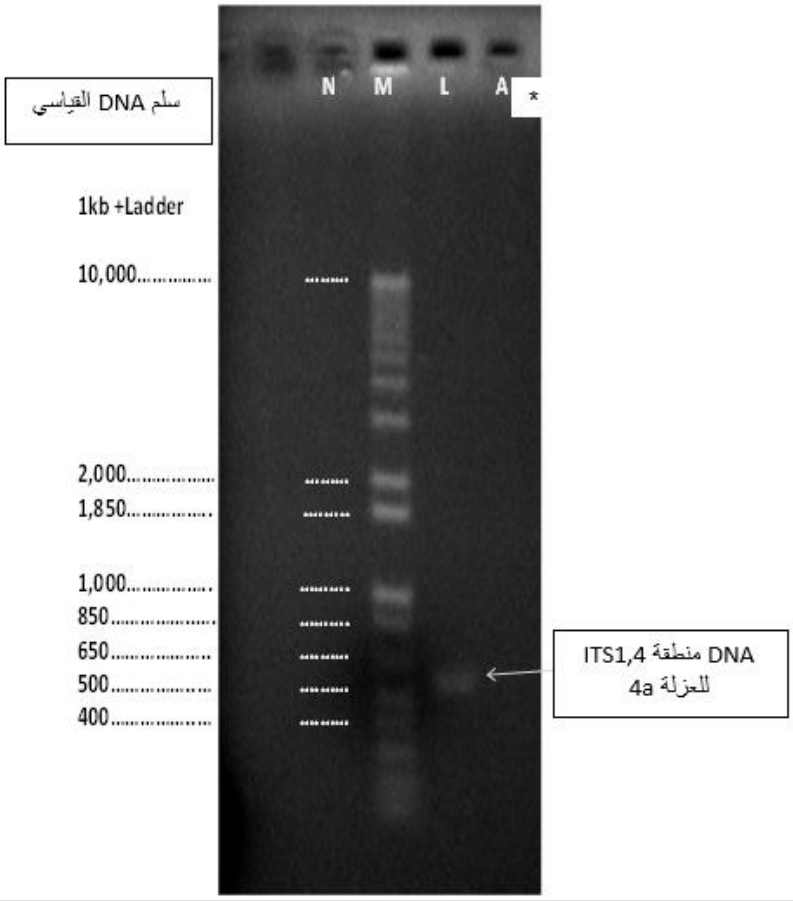
تم الحصول على 17 عزلة من الاعفان من عينات الرز المستوردة والمحلية واختبرت قابليتها على انتاج حامض الكوجيك باستخدام الوسط الاساس للانتاج (تسعة منها انتجت حامض الكوجيك بما يعادل 53 % كنسبة للعزلات المنتجة للحامض من العزلات الكلية) ، اذ يبين الجدول (1) ان الانواع التابعة للجنس *Fusarium* sp. كانت جميعها غير منتجة لحامض الكوجيك في حين ان الانواع التابعة للنوع *Penicillium* sp. وجد منها اربع عزلات غير منتجة له وواحدة منتجة ، وانتاج ضعيف للعزلة التابعة للجنس *Bipolaris* sp. ولم يسجل اي انتاج للحامض من عزلتا العفن *Aspergillus niger* في حين انتجته عزلتان تابعتان لكل من *A. parasiticus* و *A. flavus* وثلاث عزلات للنوع *A. oryzae* .

جدول (1) الاعفان المنتجة للحامض

التسلسل	نوع الكائن المجهري	الانتاج	KA غم / لتر	الرمز
1	*Bipolaris* sp.	+	1.83	Bio
2	*Aspergillus parasiticus*	+	1	T1
3	*A. parasiticus*	+	3.7	6a
4	*A. flavus*	+	3.9	6d
5	*A. flavus*	+	2.85	2a
6	*A. oryzae*	+	4.6	X1
7	*A. oryzae*	+	13.2	4a
8	*A. oryzae*	+	4.2	3a
9	*A. niger*	–	–	4b
10	*A. niger*	–	–	5a
11	*Penicillium* sp.	–	–	4d
12	*Penicillium* sp.	–	–	6b
13	*Penicillium* sp.	–	–	4c
14	*Penicillium* sp.	+	2.4	6c
15	*Penicillium* sp.	–	–	p.ps2
16	*Fusarium* sp.	–	–	Fus
17	*Fusarium* sp.	–	–	Fus1

وجدت العزلة 4a التابعة للنوع *A. oryzae* انها الاكثر انتاجا من بين العزلات الاخرى اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 13.2 غم / لتر في حين تفاوتت كمية الحامض المنتجة من الانواع والاجناس المعزولة الاخرى باقل من 5 غم / لتر ، انتخبت العزلة 4a من بين الانواع الاخرى لسببين رئيسيين الاول كونها ذات انتاجية عالية لحامض الكوجيك والسبب الثاني لكونها تعود للنوع *A. oryzae* الشائع استخدامه في انتاج الاغذية المتخمرة اليابانية وتأكيد العديد من البحوث العلمية على خلو هذا النوع من المسارات الايضية المتكاملة لإنتاج السموم الفطرية والتي تنتج من اغلب انواع الجنس *Aspergillus* sp. وعلى وجه الخصوص سموم الافلا (Bentley ، 2006) . تم التأكد من نسبة امتصاص DNA العينة باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Nano Drop Spectrophotometer) اذ اعطى نسبة امتصاص 1.24 باستخدام طولي الموجة 280 / 260 نانومتر وهو ما يقارب تركيز DNA في العينة يصل الى 44.2 نانوغرام / مللتر وهو تركيز ملائم لإتمـام التشخيص (النسبة والتركيز اخذت من الجهاز). وقورن حجم جزيئات DNA المضخمة الناتجة من جهاز PCR مع سلم DNA القياسي ذو الاحجام المختلفة لمعرفة الحجم التقريبي لمنطقة ITS1,4 المضاعفة الخاصة بالعفن واختبار صحة عملية التضخيم التخصصية باستخدام الترحيل الكهربائي على الهلام اذ يظهر الشكل (1) وجود حزمة واحدة لعينة PCR وهو ما يؤكد خصوصية التضاعف ودقة العمل ويلاحظ ايضا عند مقارنة موقع الحزمة هذه مع سلم DNA القياسي انها تظهر في منطقة الاحجام المحصورة بين 500 – 650 زوج قاعدة وهذا ما يتفق مع Mirhendi واخرون (2007) والذي اشار الى ان اغلب احجام منطقة ITS التابعة لانواع الجنس *Aspergillus* sp. تتراوح ما بين 500 – 650 زوج قاعدة .

استكملت التنقية لناتج DNA من خليط PCR باستخدام العدة الخاصة بالتنقية وحددت التواليات DNA sequencing للقواعد النتروجينية على طول منطقتي ITS1 و ITS4 من قبل شركة Gene wiz الامريكية وحللت وكوملت التواليات بمطابقة السلسلتين بمساعدة برنامج Sequitrace على طول شريطي DNA لمنطقة ITS1,4 الشكل (2) وتبين ان التوالي يتطابق مع العديد من السلالات التابعة للنوع *A. oryzae* وحدد رقم تسجيل Accession Number للتوالي في قاعدة GenBank بالرمز KC466529.1 وعند تحليل التوالي ببرنامج MEGA6 ظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3) اذ كانت النسبة المئوية للقاعدة النتروجينية الثايمين Thymine 22.8 % والسايتوسين Cytosine 29.7 % والادنين Adenine 18.8 % والكوانين Guanine 28.6 % وعدد التواليات للعزلة 4a 548 زوج قاعدة وقد اثبتت دقة هذه الطريقة في تشخيص عزلات الاعفان اذ الانواع والسلالات المختلفة تبدي تباينا في عدد ونسب القواعد النتروجينية في منطقة ITS وهذا يتفق مع Saber واخرون (2015).

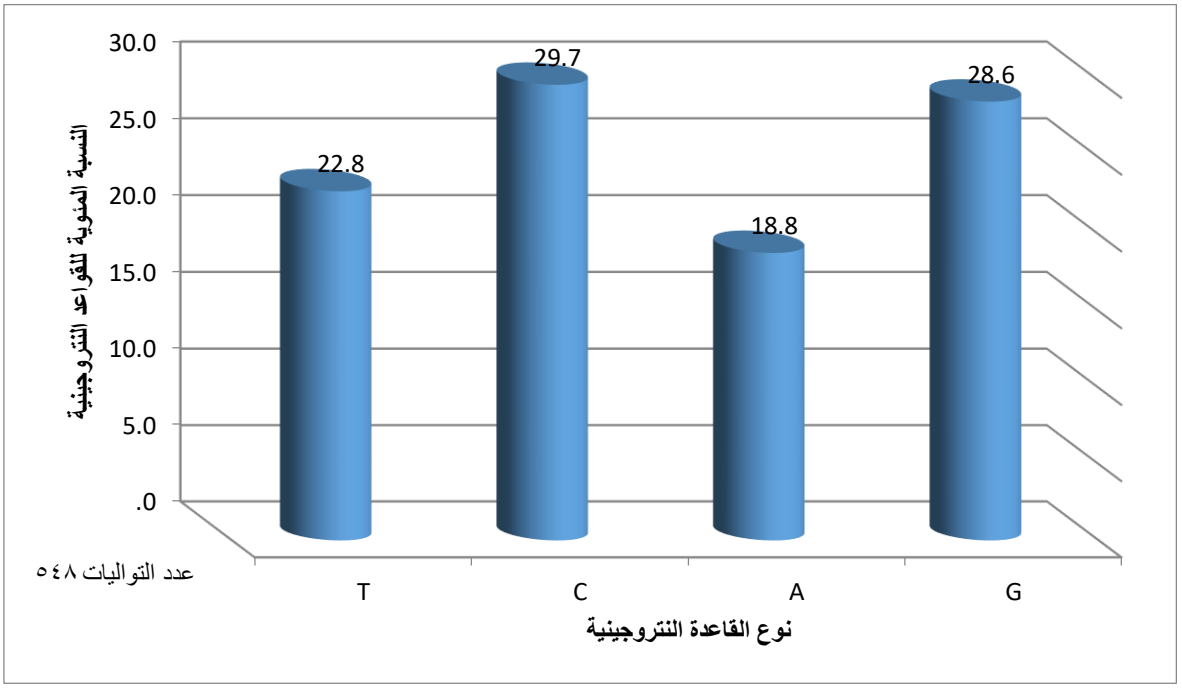


* اذ L هي عينة DNA المضخمة لمنطقة ITS 1,4 للعزلة 4a ، M تمثل عينة سلم DNA القياسية

شكل (1) حجم قطعة DNA المضاعفة لمنطقة ITS 1,4 للعزلة 4a بالمقارنة مع سلم DNA القياسي

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGT
ACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGA
CACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCT
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGA
GTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCA
CGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGAT
CCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTTCCA
GGTTGACCTCGGATCA

شكل (2) توالي القواعد النتروجينية لـDNA منطقة ITS للعزلة 4a



* T = الثايمين ، C = السايتوسين ، A = الادنين ، G = الكوانين

شكل (3) النسبة المئوية للقواعد النتروجينية في منطقة ITS 1,4 للعزلة 4a

وتجنبا للمشاكل الاقتصادية لبلورة حامض الكوجيك وتنقيته وللحصول على حاصل Yield اكبر للبلورات المنتجة جرى تحوير لوسط الانتاج الامثل لتقليل كمية المواد المسببة للتلون والتي تعيق عملية تنقية بلورات الحامض المستخلصة مثل خلاصة الخميرة فقد تم تقليص كمية خلاصة الخميرة المضافة الى وسط الانتاج الى 2.5 غم / لتر والتعويض عنها باضافة الحد الادنى من نترات الامونيوم وبتراكيز مختلفة للحصول على اقل كتلة حيوية مقابل اعلى انتاج للحامض ومن دون الاستغناء عن خلاصة الخميرة لدورها المهم في انتاج حامض الكوجيك اذ يتضح من الجدول (2) ان استخدام تركيز ثابت لخلاصة الخميرة (2.5 غم / لتر) مع تقليل التركيز الامثل لانتاج حامض الكوجيك من نترات الامونيوم الى التركيز الادنى المستخدم في الدراسة (0.1 غم / لتر) ادى هذا التحوير الى الحصول على اقل كتلة حيوية اذ بلغت 3.829 غم / لتر وزن جاف فيما انتجت اعلى كمية لحامض الكوجيك وصلت الى 60.75 غم / لتر وبكفاءة انتاج للحامض (كفاءة تحويل السكر الى حامض الكوجيك) التي وصلت الى 0.78 غم حامض كوجيك لكل 1 غم كلوكوز مستهلك من الوسط عند حساب كمية الحامض المنتجة من كمية السكر المستهلكة ، فضلا عن تقليص التكاليف اللازمة لاعادة البلورة وازالة الصبغات من بلورات الحامض المستخلصة وفيما يخص حاصل بلورات الحامض المنتجة فقد كانت اول اشارة الى كمية البلورات المستخلصة من اوساط التخمر المختلفة من قبل Devi واخرون (2015) والذين اوضحوا ان مقدار الحاصل لبلورات الحامض تختلف باختلاف وسط التخمر لانتاج حامض الكوجيك وهي تعتمد على

التركيب الكيميائي ومكونات الوسط فكلما قلت المواد الكيميائية ذات الارتباط العالي بحامض الكوجيك كلما زادت كمية بلورات الحامض المعزولة ، اذ استخدموا اوساط مختلفة معقدة ومجهولة التركيب مثل نخالة الرز Rice bran ونخالة الحنطة Wheat bran ومخلفات نباتية اخرى .

جدول (2) تأثير وسط الانتاج في انتاج الكتلة الحيوية وحامض الكوجيك وكفاءة الانتاج من العزلة 4a

تركيز نترات الامونيوم	تركيز حامض الكوجيك	وزن المايسليوم الجاف	الكلوكوز المتبقي	الكلوكوز المستهلك	كفاءة انتاج حامض الكوجيك
0.1	60.75±0.91أ *	3.829±0.04ج	23.00	77.00	0.78±0.62أ
0.25	52.6±0.28 ب	5.445±0.01ب	29.79	70.21	0.74±0.43 ب
0.5	50.45±0.35ج	5.58±0.04أ	29.64	70.36	0.72±2.02ج

*** الاحرف المتشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 0.01**

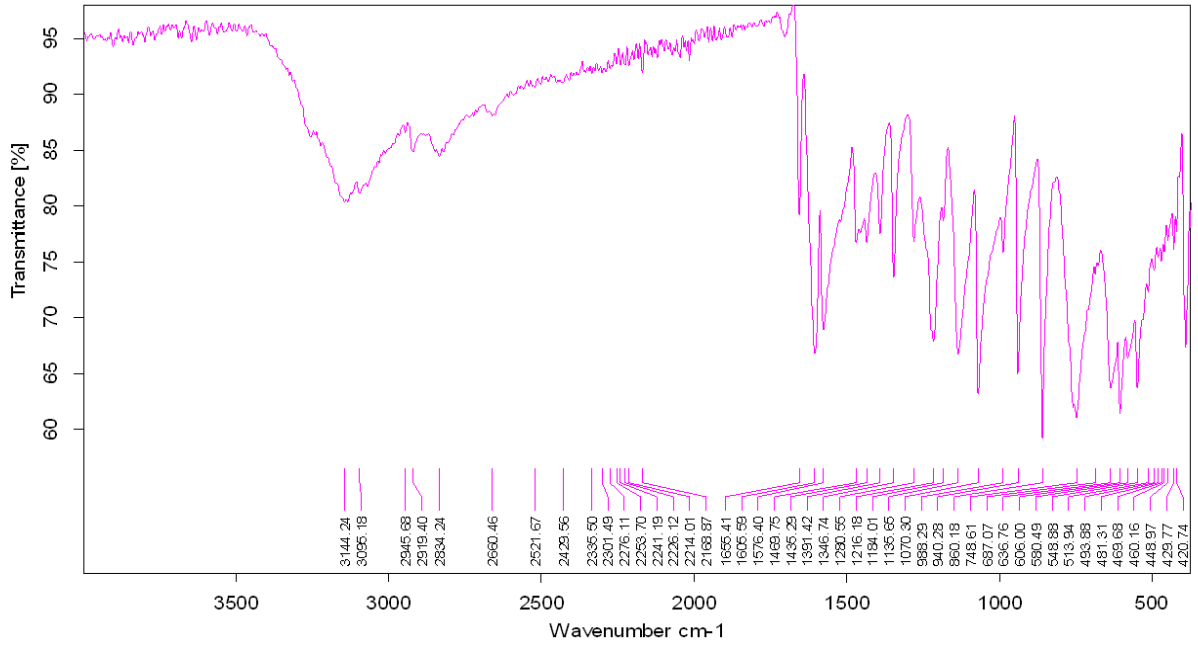
فبخفض كمية خلاصة الخميرة في وسط الانتاج الى اقل ما يمكن قد زاد الحاصل بدرجة اكبر من بلورات الحامض مقارنة مع وسط الانتاج السابق اذ يبين الجدول (3) ان النسبة المئوية للبلورات الناتجة المستخلصة كانت 58.28 % من الوسط المحور مقارنة بـ 36.77 % في الوسط غير المحور عند ايجاد النسبة المئوية لبلورات الحامض المستخلصة من كمية الحامض المنتجة في الوسط في كل حالة واصبح عدد مرات التنقية والقصر 3 مرات بدلا من 6 مرات للحصول على بلورات حامض نقية وهذه النتائج تتفق مع Ogawa واخرون (1995) والذي استنتج ان استخدام خلاصة الخميرة بتركيز 2.5 غم / لتر في وسط الانتاج لوحدها كمصدر نتروجيني اعطى اعلى انتاج لحامض الكوجيك مع اطالة في الوقت اللازم للتخمر الى 13 يوما في المزارع السطحية مقارنة مع كمية اقل من حامض الكوجيك ووقت اقل بلغ 8 ايام عند استخدام خلاصة الخميرة بتركيز 5 غم / لتر في وسط التخمر ، وهذه النتائج تتقارب مع نتائج هذه الدراسة مع وجود فارق الوقت فلم يتطرق الباحث الى كمية الكتلة الحيوية المنتجة في كلا الحالتين من تركيب وسطي التخمر والتي تعد ذات اهمية كبيرة في الانتاج فمن المتوقع ان استخدام التركيز الادنى لخلاصة الخميرة ادى الى انتاج كتلة حيوية اقل و احتاجت الى مدة حضن اطول لإعطاء اعلى انتاج للحامض ، ومن نتائج تجربة التحوير فقد كان لنترات الامونيوم الدور الكبير في تقليص الوقت اللازم للتخمر واعطاء اعلى انتاجية للحامض من اقل كتلة حيوية منتجة وهو ما يتفق مع El-Aasar (2006) والذي اشار الى اهمية اضافة نترات الامونيوم مع خلاصة الخميرة في وسط الانتاج للحصول على انتاجية عالية لحامض الكوجيك مقارنة مع استخدام كل مصدر نتروجيني لوحده .

جدول (3) النسبة المئوية لبلورات حامض الكوجيك المستخلصة من نوعين من الاوساط

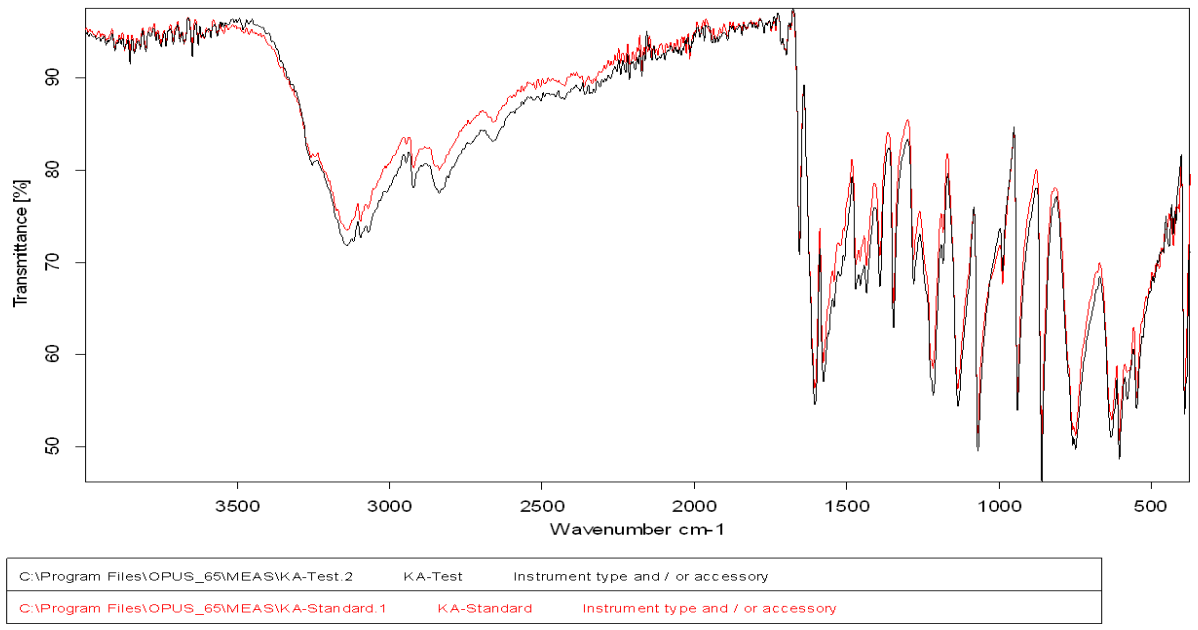
نوع الوسط	كمية الحامض المنتجة غم / لتر	عدد مرات مرحلة التنقية والقصر	وزن بلورات الحامض المستخلصة (غم)	النسبة المئوية للبلورات الناتجة (الحاصل)
وسط الظروف المثلى	57.65	6 مرات	21.2	36.77
الوسط المحور	60.75	3 مرات	35.41	58.28

يوضح الشكل (4 أ) كروماتوكرام التركيب الكيميائي لحامض الكوجيك القياسي باستخدام جهاز FT-IR والذي يظهر المخطط التفصيلي وقمم نفاذ حزم الاطوال الموجية لمجموعة من المواقع على جزيئة حامض الكوجيك فظهور القمة عند الحزمة 3144.24 / سم دلالة على وجود المجموعة الوظيفية الطرفية الهيدروكسيلية وقمتا الحزمتين 2919.40 و 2834.24 / سم تبين وجود مركب حلقي اليفاتي Aliphatic ring وهو ما يتفق مع Devi واخرون (2015) والحزمة 1655.41 / سم تدل على وجود مركب حلقي مع مجموعة كاربونيل ويتضح من الشكل ايضا وجود ترددين لاصرتين مزدوجتين عند الحزمتين 1605.59 و

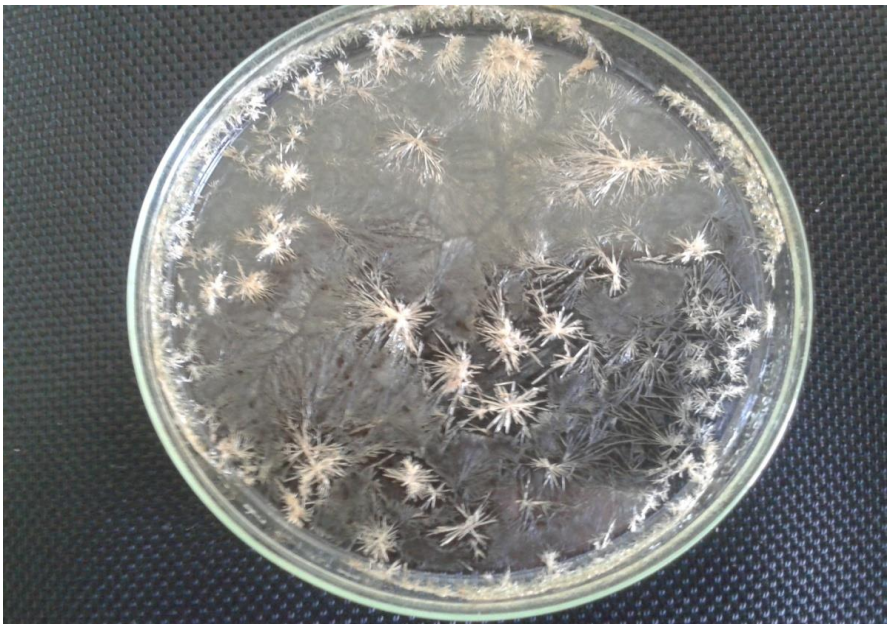
1576.4 / سم وتشير الحزمة 1469.75 / سم الى وجود مجموعة طرفية مثيلية والحزمة 1070.30 / سم تبين وجود مركب حلقي يحتوي في تركيبه ذرة اوكسجين داخلة ضمن تركيب الحامض الحلقي وهذا ما يتفق مع Hazzaa واخرون (2013) و Liu واخرون (2014) ، ويصف الشكل (4 ب) مقارنة بين قمم واطياف الانتقال لحامض الكوجيك القياسي والمنتج الذي اعطى نسبة تطابق 95 % وتظهر الصورة (1) صورة لبلورات حامض الكوجيك المنتجة .



شكل (4 أ) كروماتوكرام تحليل التركيب الكيميائي لحامض الكوجيك القياسي بجهاز FT-IR



شكل (4 ب) تطابق ومقارنة التحليل الكيميائي بجهاز FT-IR بين حامض الكوجيك القياسي والمنتج



صورة (1) صورة بلورات حامض الكوجيك الابرية التي تم الحصول عليها في الدراسة

المصادر:

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Bentley, R. (2006). From *miso, sake* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for Kojic acid. Natural Product Reports 23: 1046-1062.

Chen, J.S., C. Wei and M.R. Marshall (1991). Inhibition mechanism of Kojic acid on Polyphenol oxidase. Journal of Agriculture and Food Chemistry 39: 1897-1901.

Devi, K. B., P. Vijayalakshmi, V. Shilpa and B. V. Kumar (2015). Optimization of cultural parameters for cost effective production of Kojic acid by fungal species isolated from soil. British Microbiology Research Journal 7:255-268.

El-Aasar, S.A. (2006). Cultural conditions studies on Kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Agriculture and Biology 8: 468-473.

Hasebe, T., K. Oshima, O. Takise and S. Uchiyama (1995). Chemically amplified Kojic acid responses tyrosinase-based biosensor, based on inhibitory effect to substrate recycling driven by tyrosinase and L-ascorbic acid. Talanta 42: 2079-2085.

Hazzaa, M.M., A.M. Saad, H.M. Hassan and E.I. Ibrahim (2013). High production of Kojic acid crystals by isolated *Aspergillus oryzae* var. *effusus* NRC14. Journal of Applied Sciences Research 9: 1714-1723.

Kahn, V., N. Ben-Shalom and V. Zakin (1997). Effect of Kojic acid on the oxidation of *N*-Acetyldopamine by mushroom Tyrosinase. Journal of Agriculture and Food Chemistry 45: 4460-4465.

Kamaroddin, M.F.B. (2007). Direct utilization of tapioca starch by *Aspergillus flavus* for production of Kojic acid in batch and fed-batch culture. PSM thesis, Industrial Biology Department, Faculty of Science, University of Technology Malaysia.

Liu, X., W. Xia, Q. Jiang, Y. Xu and P. Yu (2014). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Kojic acid grafted chitosan oligosaccharide. Journal of Agricultural and Food Chemistry 62: 297-303.

Maza, L.M., M.T. Pezzlo and E.J. Baron (1997). Color atlas of diagnostic microbiology. Mosby-year Book, Inc., p.: 119-124.

Mirhendi, H., K. Diba, P. Kordbacheh, N. Jalalizand and K. Makimura (2007). Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. Journal of Medical Microbiology 56: 1568-1570.

Ogawa, A., Y. Wakisaka, T. Tanaka, T. Sakiyama and K. Nakanishi (1995). Production of Kojic acid by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL484. Journal of Fermentation and Bioengineering 80:41-45.

Raper, K.B., D.I. Fennell and P.K.C. Austwick (1977). The genus *Aspergillus* . Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York, P.: 357-372.

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

Rosfarizan, M., A.B. Ariff, M.A. Hassan and M.I.A. Karim (1998). Kojic acid production by *Aspergillus flavus* using gelatinized sago starch as carbon sources. Folia Microbiology 43: 459-464.

Saber, W.I., N.E. El-Naggar, M.S. El-Hersh and A.Y. El-Khateeb (2015). An innovative synergism between *Aspergillus oryzae* and *Azotobacter chroococcum* for bioconversion of cellulosic biomass in to organic acids under restricted nutritional conditions using multi-response surface optimization. Biotechnology 14: 47-57.

Saleh, R.M., S.A. Kabli, S.M. Al-Garni and S.A. Mohamed (2011). Screening and production of antimicrobial compound from *Trichoderma spp.* against human-pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research 5: 1619-1628.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Genetics Evolution 30: 2725-2729.

Wang, L., D. Kim, J. Park and G. Y. Lee (2003). Various antibrowning agents and green tea extract during processing and storage. Journal of Food Processing Preservation 27: 213-225.