# انتاج وتنقية و توصيف حامض الكوجيك من الفطر *Aspergillus parasiticus* المعزول محليا

**علي عبد الكاظم جاسم الغانمي**

*كلية العلوم –جامعة كربلاء*

omranaljelawi@gmail.com

## الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لتنقية وتوصيف حامض الكوجيك المنتج من العزلة الفطرية المحلية *Aspergillus parasiticus* المشخصة بالطرائق التقليدية و الجزيئية . تم انتاج حامض الكوجيك من العزلة الفطرية قيد الدراسة باستخدام وسط عصير التمر المدعم ببعض المغذيات و تبين أن تركيز عصير التمر 10% (سكريات مختزلة) بمدة حضن 10 أيام هما أفضل الظروف لإنتاج الحامض. كما تم تنقية الحامض من راشح المزرعة و قد شملت خطوات التنقية: الترويق و كروماتوغرافي الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G–75 و أخيرا بلورة الحامض. تم توصيف الحامض المنقى في هذه الدراسة و ظهر بشكل بلورات طويلة عديمة اللون و له نقطة انصهار (151 – 153)°م و له زمن احتجاز مقداره 3.960 دقيقة عند فصله بكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC).

**الكلمات المفتاحية :** حامض الكوجيك , *Aspergillus parasiticus* , تفاعل البلمرة المتسلسل, التنقية , كروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة

## Abstract

This study was conducted to purify and characterize kojic acid (KA) produced from the local fungal isolate *Aspergillus parasiticus* which was identified by classical and molecular methods .

Kojic acid was produced from the mentioned isolate using date juice supplemented with some nutrients as a production medium. Results showed that date juice (10% reducing sugars) with an incubation period of 10 days were the optimal conditions for KA production. The acid was purified from the fungal culture filtrate, the purification steps included clarification, gel filtration chromatography using sephadex G-75 and finally crystallization.

The purified acid in this study was characterized. It seemed as colorless long needles crystals, its melting point was (151-153)℃ and it has a retention time of 3.960 minutes when it separated by high performance liquid chromatography.

**Key words:** Kojic acid, *Aspergillus parasiticus*, PCR, Purification, HPLC

## المقدمة

إستقطب حامض الكوجيك إهتمام الباحثين في العقود الاخيرة بالنظر لأتساع تطبيقاته في مجالات مختلفة ولعل اهمها إستعمال الحامض في صناعة مواد التجميل وذلك لدوره في حماية الجلد , وقابليته على منع الاشعة فوق البنفسجية وتثبيطه لفعاليات أنزيم التايروسينيز وإستعماله مهدئاً للألم وعلاجاً ضد الالتهابات فضلاً عن أستعماله في المجال الغذائي كعامل مانع للأسوداد غير المرغوب في المنتجات الزراعية (Kobayashi *et al*.,1996 ;Rodriues *et al*.,2011) . ينتج حامض الكوجيك من عدد محدود من الاحياء المجهرية التي تشمل مجموعة من الفطريات مثل انواع *Aspergillus spp.* والـ *Rhizopus spp.* والـ *Penicillium spp.* وانواع معينة من البكتريا في طور الثبات من النمو . (Bently,2006; Terabayshi *et al*.,2010)

اتجهت الدراسات في الوقت الحاضر الى استخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) في تشخيص الاحياء المجهرية نظراً لدقة وسرعة هذه التقنية مقارنة بالطرائق التقليدية المستخدمة في التشخيص والتي تتصف بكونها بطيئة ( Amghalia *et al* .,2009 ; Hogan *et al*., 1999) .

وعادة ماتكون السلالات البرية ( Wild Strains) غير مناسبة للانتاج الصناعي نظراً لانخفاض حصيلة نواتجها الايضية لذا يلجأ عادة الى التحسين الوراثي (Genetic improvement) أو تحسين الانتاج وصولاً الى الانتاج المفرط من الحامض المطلوب (Bhalla *et al* .,2006) . ونظراً لما يمتلكه حامض الكوجيك من أهمية تطبيقية كبيرة لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى انتاج الحامض بكفاءة من عزلة فطرية محلية فضلاً عن تنقية الحامض وتوصيفه .

## المواد وطرق العمل

**العزلة الفطرية المستخدمة في الدراسة :**

تم الحصول على عزلة فطرية محلية من قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة كربلاء تعود لجنس *Aspergillus spp.* منتجة لحامض الكوجيك .

**تشخيص العزلة الفطرية على مستوى النوع :**

**أ- تشخيص العزلة الفطرية بالطرائق التقليدية :**

تم تنمية العزلة الفطرية قيد الدراسة على وسط Potato dextrose agar وحضنها بدرجة حرارة 28 مْ وبعد ظهور النمو شخصت العزلة الفطرية بالاعتماد على الخصائص الشكلية والمجهرية (Morphological and Microscopic Characteristic) وفق المفاتيح التصنيفية الاتية (Emons,1976 ; Gantam and Bhadauria, 2012 ; Eillis *et al*., 2007 ) .

**ب- تشخيص العزلة الفطرية باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR)**

شخصت العزلة الفطرية باستخدام تقنية PCR لتأكيد نتيجة التشخيص بالطرائق التقليدية .

- **تنمية الفطر *Aspergillus spp* واستخلاص الـ DNA :**

تم تنمية الفطر *Aspergillus spp* قيد الدراسة في 20 مل من وسط السابروید السائل (Sabouraud broth) في حاضنة هزازة بسرعة رج 120 دورة /دقيقة بدرجة حرارة 28 مْ لمدة 3 أيام . رشح بعد ذلك الوسط للحصول على المايسيليا (Mycelia) لغرض استخدامها في استخلاص الـ DNA .

تم استخلاص الـ DNA من الفطر *Aspergillus spp* باستخدام العدة (Kit) المجهزة من شركة (Promega,USA) وحسب تعليمات الشركة المجهزة . وأجريت عملية ترحيل كهربائي للـ DNA المستخلص للتأكد من نجاح عملية الاستخلاص .

- **بادئات الـ PCR ( PCR Primers) :**

تم اسخدام البادئات الاتية (Sardinas *et al .,2010*) وفق ماهو موضح في الجدول الاتي :

**الجدول (1): اسم وتسلسل وناتج بادئات منطقة ITS region :**

| Name of primer | Sequence of primer | Size of product |
|---|---|---|
| PAR- F | 5'- GTCATGGCCGCCGGG GGCGTC- 3' | 500 bp |
| PAR- R | 5'- CCTGGAAAAAATGG TTGTTTTGCG- 3' | |

- **مزيج Master mix:**

استخدم مزيج Master mix والموضحة مكوناته في الجدول الاتي :

**الجدول (2): مكونات Master mix لتفاعل الـ PCR للمنطقة ITS region :**

| Component | Conc. (µM) | Amount (µl ) |
|---|---|---|
| GoTaq Green Master Mix 2X | 2X | 12.5 |
| PAR- F primer | 40 µM | 2.5 |
| PAR- R primer | 40 µM | 2.5 |
| Nuclease free water | - | 2.5 |
| DNA sample | - | 5 |
| Total volume | - | 25 |

- **ظروف تشغيل جهاز PCR :**

تم برمجة جهاز PCR وفق الاتي :

| No. | Step | Temp.(°C) | Time | No. of Cycles |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Initial denaturation | 95 | 10 min. | 1 |
| 2 | Denaturation | 94 | 30 sec. | 35 |
| 3 | Annealing | 63 | 90 sec. | |
| 4 | Extension | 72 | 2 min. | |
| 5 | Final extension | 72 | 10 min. | 1 |
| 6 | Storage | 4 | ∞ | - |

**الكشف عن نواتج التضاعف :**

تم الكُشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1 % . تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائيا بفرق جهد 7 فولت/ سم لمدة ساعة ، وفُحِص الهلام بعد الانتهاء من عملية الترحيل وذلك بتعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي المستخدم والمُرحل مع نواتج التضاعف .

**انتاج حامض الكوجيك من الفطر *Aspergillus spp***

أستخدم وسط عصير التمر المدعم ببعض المغذيات في انتاج حامض الكوجيك من الفطر *Aspergillus spp* قيد الدراسة . حضر عصير التمر الزهدي على وفق الطريقة الموصوفة من قبل Al-Obaidi *et al.*(1987) وذلك بإضافة لتر من الماء المغلي الى 500 غم من تمر الزهدي ( بعد ازالة النوى والاقماع ) وتركه لمدة ليلة كاملة للحصول على العصير الذي اجريت له عملية ترشيح باستخدام قماش الململ أعقبها عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق للحصول عليه بشكل رائق . قدرت السكريات المختزلة في العصير وفق الطريقة الموصوفة من قبل Miller(1959) .

**تأثير تركيز عصير التمر في انتاج الحامض**

خفف عصير التمر بالماء المقطر ليعطي تراكيز مختلفة من السكريات (2.5 و5 و 7.5و 10 و 12.5) % وتم تدعيمه ببعض المغذيات شملت 0.5% مستخلص خميرة و 0.1% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ($KH_2PO_4$) و 0.05% كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSo_4.7H_2O$ ) برقم هيدروجيني 5 . نقل

قرص واحد من العزلة الفطرية *Aspergillus spp* النامية على وسط Potato dextrose agar (حاوية على $1\times10^7$ بوغ / مليليتر) الى الوسط الانتاجي الموصوف اعلاه وتم الحضن في الحاضنة الساكنة بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 10 أيام وبعد انتهاء مدة الحضن تم طرد النماذج مركزياً بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي استخدم في تقدير حامض الكوجيك .

- **تأثير مدة الحضن في انتاج الحامض :**

تم متابعة انتاج حامض الكوجيك من العزلة الفطرية قيد الدراسة لمدة 16 يوم لتحديد مدة الحضن المثلى لانتاج الحامض .

**تقدير حامض الكوجيك :**

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bentley(1957) في تقدير حامض الكوجيك واعتماداً على المنحني القياسي لحامض الكوجيك وذلك بمزج 1 مل من راشح المزرعة الفطرية مع 2.5 مل محلول حامض الهيدروكلوريك (0.1 مولر ) و 0.2 مل من كلوريد الحديديك (0.2 مولر) في أنابيب إختبار وثم رج المزيج جيداً ثم تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 500 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

**تنقية حامض الكوجيك :**

تم تنقية حامض الكوجيك المنتج من الفطر *Aspergillus spp* بحسب الخطوات الاتية :

- الترويق (Clarification) : عدل الرقم الهيدروجيني للراشح الفطري الخام الى 10 باستعمال هيدروكسيد الكالسيوم (1 ع) ثم سخن المزيج الى درجة حرارة 80 مْ لمدة 15 دقيقة أعقبه طرد مركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وبعد أن أهمل الراسب عدل الرقم الهيدروجيني للراشح الى (6.5-7.5) للحصول على الراشح المروق الذي تم تقدير كمية حامض الكوجيك فيه . جفف الراشح المتحصل عليه في فرن بدرجة حرارة 45مْ لتهيئته لخطوة التنقية اللاحقة .
- كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-75 : حضر هلام Sephadex G-75 بمحلول منظم Tris –HCL (0.02 مولر , PH 7.0) وتم تعبئته في عمود بابعاد (1.4×64) سم وثم موازنته بالمحلول المنظم نفسه . وبعد إضافة نموذج حامض الكوجيك الى سطح هلام السيفادكس أجريت عملية الفصل وجمعت الاجزاء المفصولة بواقع 3.5 مل/جزء وبسرعة جريان 0.5 مل / دقيقة . وتمت قراءة الامتصاص للاجزاء المفصولة ورسمت العلاقة بين تركيز حامض الكوجيك وعدد الاجزاء .
- بلورة حامض الكوجيك : اعتمدت طريقة Saleh *et al.*,(2011) للحصول على بلورات حامض الكوجيك النقية .
- **توصيف حامض الكوجيك :**
  - ❖ الوصف المظهري للحامض (Appearance)

تم وصف الحامض مظهرياً من ناحية اللون والقوام .

  - ❖ تحديد نقطة انصهار الحامض :تم تسجيل نقطة بداية ونهاية انصهار الحامض .
  - ❖ فصل حامض الكوجيك بكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC):

تم استعمال جهاز HPLC من نوع Shimadzn LC-2010 A لفصل حامض الكوجيك المنقى من الفطر *Aspergillus spp* قيد الدراسة وكان العمود المستعمل من نوع $C_{18}$ ذي الابعاد (2.4×250) ملم أما الطور المتحرك المستعمل فهو (ماء – Acetonitrile) بنسبة (92% -8% )

بمعدل جريان 1 مل / دقيقة وتم قياس الامتصاص عند طول موجي 269 نانوميتر ورسمت العلاقة بين قوة الاشارة وزمن الاحتجاز .

**دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء للحامض :**

تم تحديد طيف الاشعة تحت الحمراء للحامض المنقى في هذه الدراسة باستخدام جهاز FT-IR بمدى من الاعداد الموجية(400 – 3800 ) سم$^{-1}$ .

## النتائج والمناقشة

**تشخيص العزلة الفطرية:**

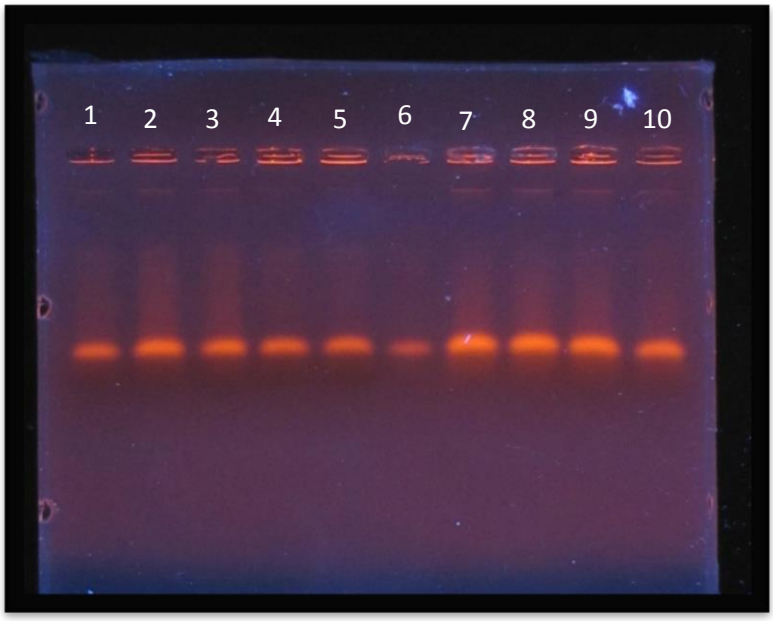
بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية للفطريات و المشار اليها سابقا فقد اتضح أن التشخيص المقترح للعزلة قيد الدراسة هو *Aspergillus parasiticus* .

و لغرض تأكيد تشخيص هذه العزلة فقد استخدمت تقنية PCR كونها من الطرائق المفيدة و الناجحة في حقل الفطريات سوآءا من ناحية تصنيفها أو تشخيص الاصابات الفطرية (Al Shahni *et al.*,2009).

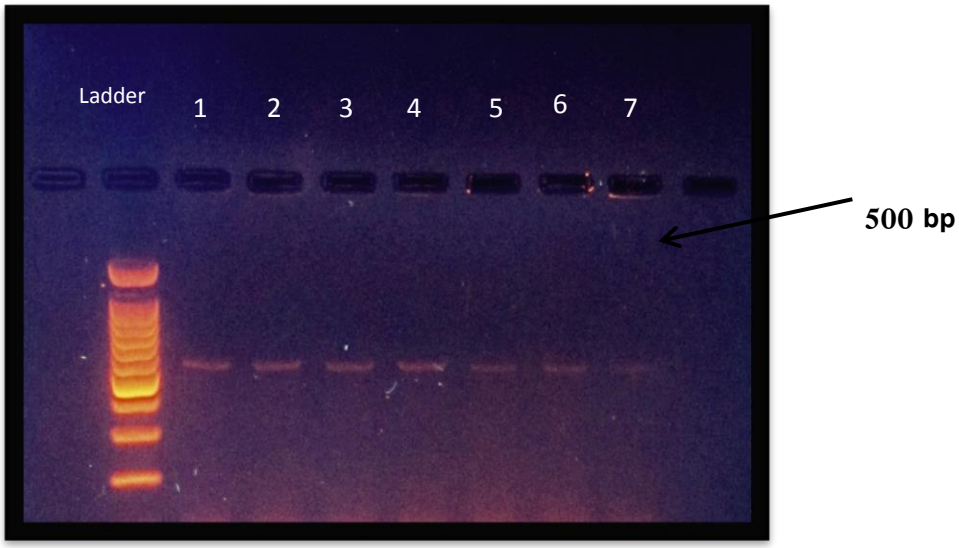
ان طريقة استخلاص ال DNA المستخدمة في هذه الدراسة كانت ملائمة اذ يلاحظ من الشكل (1) ظهور حزم DNA واضحة بعد ساعة من الترحيل الكهربائي.

و يوضح الشكل (2) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR و التي يتبين من خلالها أن البادئ المستخدم في هذه الدراسة كان ناجحا في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 500 bp لذا فأن نتائج التشخيص المستخدمة في هذه الدراسة تشير الى أن العزلة قيد الدراسة هي *Aspergillus parasiticus* .

تعد تقنية PCR من الطرائق السريعة و المتخصصة ذات الحساسية العالية في تشخيص الاحياء المجهرية (Sardinas *et al.*,2010) .




**الشكل (1): الترحيل الكهربائي لل DNA المستخلص من الفطر *A. parasiticus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 7 فولت / سم لمدة ساعة واحدة .**

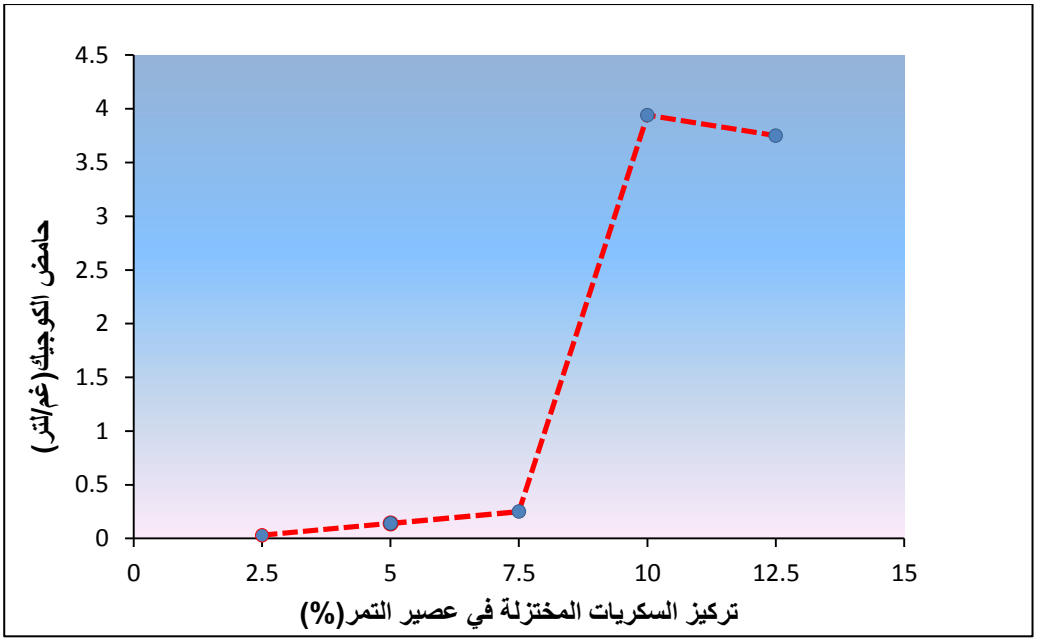



**الشكل (2): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR للمنطقة ITS للفطر *A. parasiticus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 1% وفرق جهد 7 فولت / سم لمدة ساعة واحدة .**

**تحديد التركيز الامثل من عصير التمر في انتاج حامض الكوجيك :**

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3 ) زيادة انتاج حامض الكوجيك بزيادة تركيز السكريات المختزلة في عصير التمر الى ان بلغ اقصى انتاج للحامض عند التركيز 10% إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 39.4 غم/لتر ثم ينخفض بعد ذلك .

يتضح من النتائج أعلاه ملائمة عصير التمر لأنتاج حامض الكوجيك من الفطر *A. parasiticus* ويمكن ان يعزى ذلك الى إحتوائه على مكونات تدعم نمو الفطر وانتاج الحامض إذ أشارت احدى الدراسات الى ان عصير التمر الزهدي يحتوي على سكريات كلية بنسبة 86.8% وسكريات مختزلة بنسبة 73.4% منها 32.77% سكر كلوكوز و 39.15 % سكر فركتوز فضلاً عن أحتوائه على نسب قليلة من الاملاح المعدنية وبعض الفيتامينات (Yousif *et al.*,1982) . كما ان نسبة الكلوكوز المشار اليها في تركيب عصير التمر تعد مناسبة لانتاج الحامض نظراً لان الكلوكوز يعد أفضل مصدر كربوني للانتاج من خلال عمله كمولد (Precursor) للحامض إذ ان التشابه التركيبي كبير بين الكلوكوز وحامض الكوجيك من خلال احتوائهما على حلقة سداسية . أما انخفاض تزكيز حامض الكوجيك المنتج من الفطر *A. parasiticus* عند استعمال تركيز عال من السكريات المختزلة (12.5)% فيمكن ان يعزى الى التأثير الازموزي (Osmotic effect) الذي تحدثه التراكيز العالية من السكريات لخلايا الفطريات (El-Aasar, 2006) .



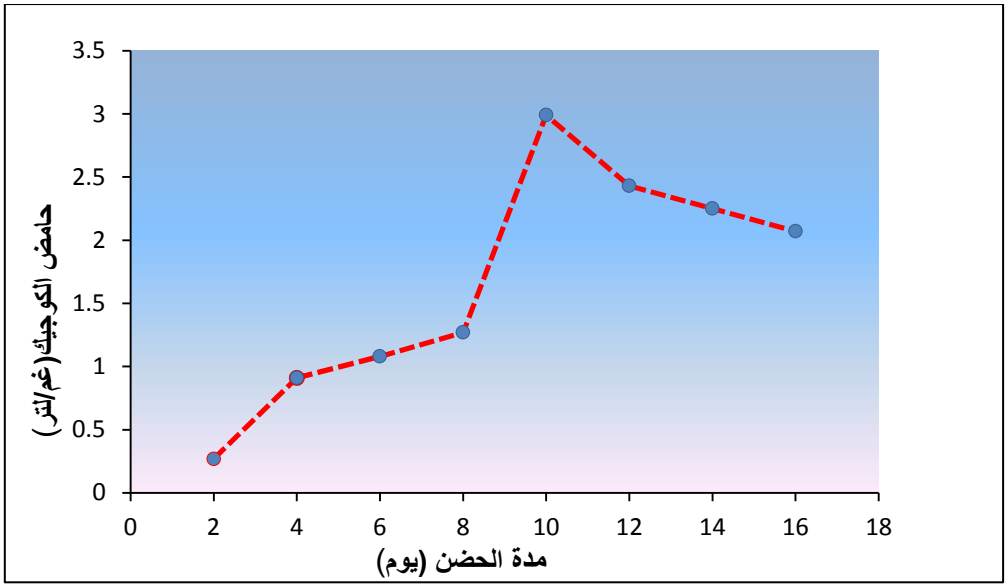

**الشكل( 3): تأثير تركيز عصير التمر في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A. parasiticus***

**تأثير مدة الحضن في انتاج حامض الكوجيك:**

تمت متابعة إنتاج حامض الكوجيك من الفطر *A. parasiticus* لمدة ستة عشر يوماً وقد بينت النتائج الموضحة بالشكل (4) أن أقصى انتاج للحامض من العزلة الفطرية قيد الدراسة قد تحقق بعد عشرة أيام من الحضن إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 29.9 غم / لتر .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه Lin (2011) فقد كانت مدة 11 يوماً هي المثلى للوصول الى أقصى إنتاج من الفطرين *A. flavus* 30010 CCRC و *A. oryzae* CCRC 30102 .

تباينت مدة الحضن اللازمة للحصول على أقصى انتاج من حامض الكوجيك فقد تكون أحياناً طويلة إذ كانت مدة الحضن (18- 24) يوماً هي المثلى لانتاج الحامض من الفطر *A. candidus* في حين إقتصرت مدة الحضن على 4 أيام للحصول على أعلى انتاج للحامض من الفطر *A. flavus* (Kamaroddin ,2007).




**الشكل(4 ): تأثير مدة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A. parasiticus***

**تنقية حامض الكوجيك :**

- **خطوة الترويق** : إن تعديل الرقم الهيدروجيني للراشح الحاوي على حامض الكوجيك بهيدروكسيد الكالسيوم الى (PH 10) ومعاملته حرارياً وطرده مركزياً ساعد في ترسيب خلايا الفطر والمواد غير الذائبة الاخرى , وقد أطلق على المستخلص المتحصل عليه في هذه الخطوة بالمستخلص المروق ( Clarified extract) . لقد وردت خطوة الترويق كخطوة اولى في تنقية أحماض عضوية أخرى مثل حامض اللاكتيك المنتج من البكتريا إذ تساعد هذه الخطوة في تحويل حامض اللاكتيك الى لاكتات الكالسيوم فضلاً عن قتل البكتريا وتخثير بروتينات الوسط والتخلص من كربونات الكالسيوم الزائدة . وتكسير السكريات المتبقية في الوسط (Vijayakumar *et al.*,2008) فضلاً عن ان تجفيف هذا المستخلص يعد خطوة ضرورية لتهيئته لخطوة التنقية اللاحقة .

- **كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-75 :**

أجريت عملية الترشيح الهلامي للمستخلص المجفف الخارج من خطوة الترويق باستعمال الهلام Sephadex G-75 بوجود محلول منظم Tris –HCl (0.02 مولر , PH 7.0) . وبعد ان تم جمع الاجزاء وتقدير كمية حامض الكوجيك يلاحظ من الشكل (5) ظهور الحامض في الاجزاء المحصورة بين ( 15- 35 ) غم / لتر وبلغ أعلى تركيز للحامض في الجزء 24 إذ بلغ 3.8 غم/ لتر .

استخدم الترشيح الهلامي في تنقية حامض الكوجيك المنتج من الفطريات فقد تمكن Saleh *et al* .(2011) من تنقية حامض الكوجيك المنتج من الفطرين *T. viride* و *T .reesei* باستعمال عمود من الهلام Sephacryl S-200 ( 1.6 ×90) سم إذ انحصرت كمية الحامض المنقاة من الفطر *T. viride* في الاجزاء (56-64) بينما انحصرت كمية الحامض المنقاة من الفطر *T.reesei* في الاجزاء (57-66 ).

استعملت طرائق مختلفة لفصل وتنقية حامض الكوجيك من الاوساط التخمرية اذ تمكن Rodrigues *et al.*(2011) من فصل الحامض من الفطر *Aspergillus spp.* بتجفيد الراشح الفطري أعقبه استخلاص متعاقب باستعمال الايثانول :الماء بنسبة 20:80 وأخيراً بتبخير النموذج ومن ثم بلورته للحصول على الناتج النهائي .

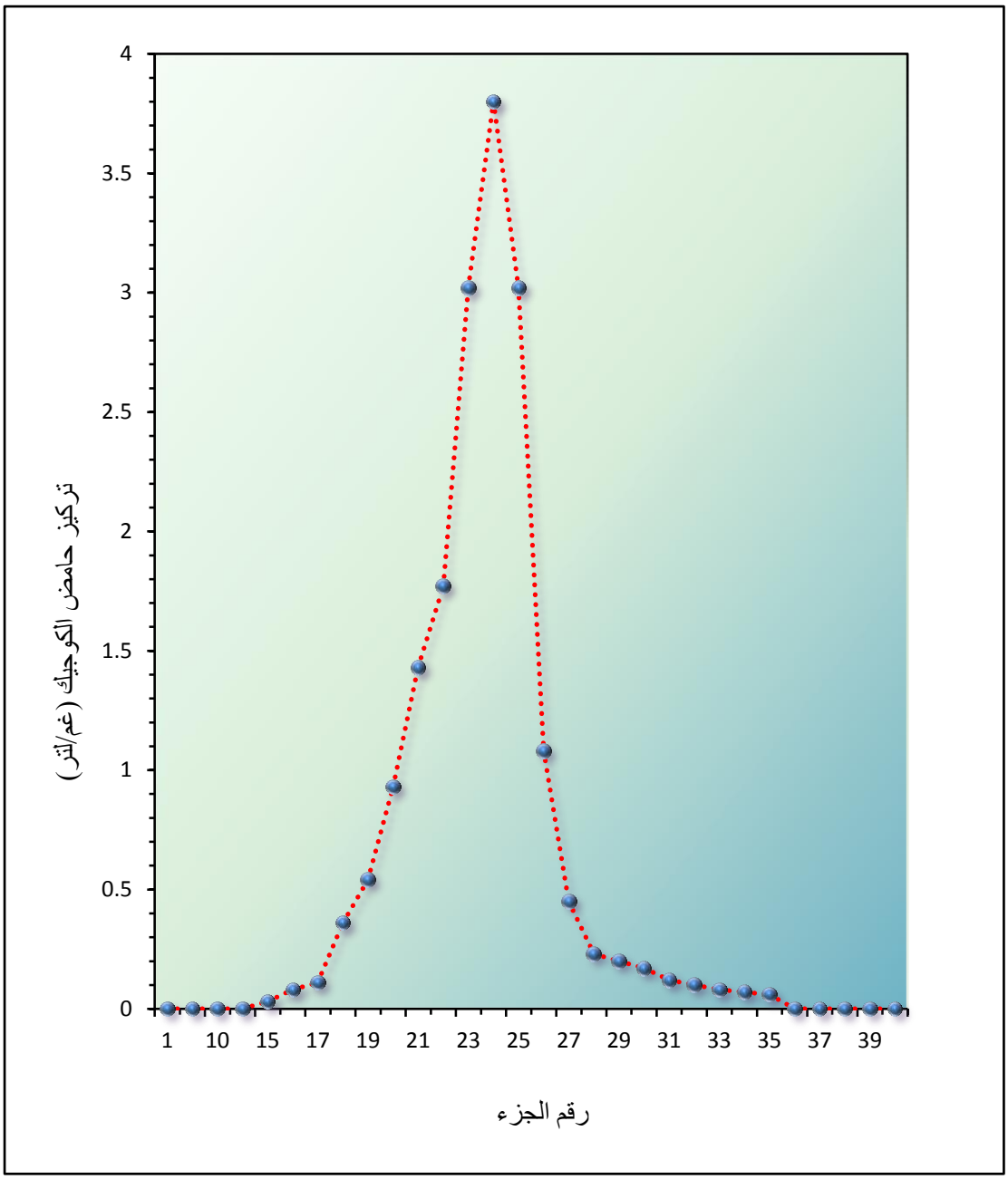
**بلورة حامض الكوجيك :**

أسفرت عملية بلورة حامض الكوجيك قيد الدراسة عن الحصول على بلورات طويلة عديمة اللون من الحامض . ومما تجدر الاشارة اليه أن هناك طرائق مختلفة لبلورة الحامض فقد أشار Lin *et al* .,(1976) الى ان بلورية الحامض المنتج من الفطر *A. parasiticus* تمت بحفظ الراشح الفطري تحت ظروف مبردة (5– 8 ) مْ مما أدى الى ظهور بلورات بلون أصفر بني تبعها أعادة بلورة باستعمال مزيج الماء والاسيتون التي امكن من خلالها الحصول على بلورات ابرية طويلة من الحامض .

**توصيف حامض الكوجيك :**

**المظهر (Appearance)**

ظهر الحامض المنقى في هذه الدراسة بشكل بلورات طويلة عديمة اللون . أشارت العديد من الدراسات الى ظهور حامض الكوجيك بمظاهر مختلفة فقد كان مظهر الحامض المنقى من الفطر *A . oryzae var effuses NRC14* بشكل ابر طويلة عديمة اللون (Hazzaa *et al., 2013* ) , في حين كان مظهر الحامض المنقى من العزلة الطافرة للفطر *A. flavus* بشكل بلورات مصفرة الى بنية (Abd E1–Aziz , 2013) .




**الشكل( 5 ): تنقية حامض الكوجيك من الفطر *A. parasiticus* بالترشيح الهلامي باستعمال الهلام Sephadex G–75 [ أبعاد العمود (64 x 1.4) سم ، حجم الجزء 4 مل ، سرعة الجريان 0.5 مل/دقيقة] .**

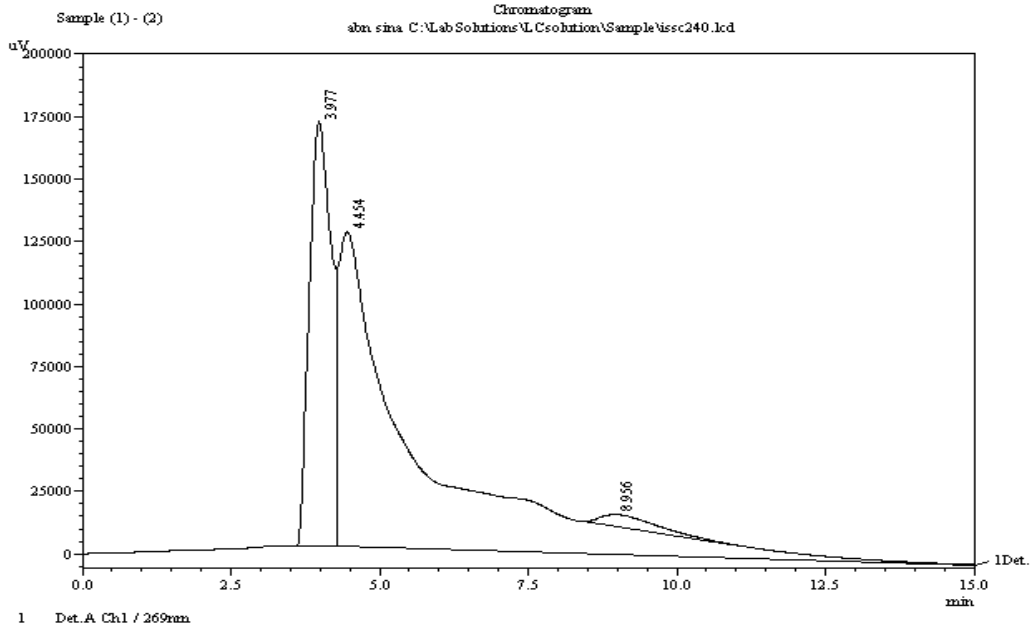
**فصل حامض الكوجيك بكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة :**

أستعمل هذا النوع من الكروموتوغرافيا لمعرفة نقاوة حامض الكوجيك فضلاً عن حساب زمن الاحتجاز للحامض إذ يتضح من الشكل (6) ظهور قمتي إمتصاص لكل من حامض الكوجيك القياسي وحامض الكوجيك قيد الدراسة بزمن احتجاز مقداره (3.977 و 3.960 ) دقيقة , على التوالي وبذلك تكون هذه النتيجة دليلاً على نقاوة الحامض .

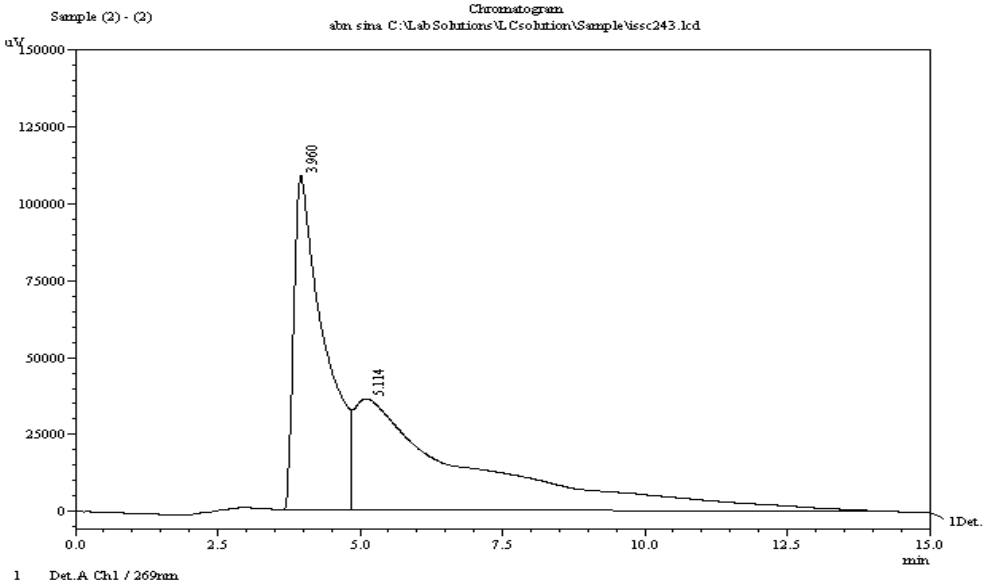
يعد زمن الاحتجاز المستحصل في هذه الدراسة أقل بكثير مما وجده Huany *et al.,* (2004) إذ بلغ زمن احتجاز الحامض 13.937 باستعمال طور متحرك مكون من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين والميثانول بنسبة 1:19

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

استعمل هذا النوع من الكروماتوغرافيا في تحديد نقاوة حامض الكوجيك المنقى من الفطر *Aspergillus spp.* إذ بلغت نسبة النقاوة للحامض المذكور 95% ( Rodrigues *et al.*,2011) وأشارت الكثير من الدراسات الى دور HPLC في فصل حامض الكوجيك من مصادر مختلفة فقد تمكن Zhao *et al.,*(2003) من فصل الحامض من الفطر *A. oryzae* باستعمال تقنية HPLC باستعمال طور متحرك مكون من ميثانول فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم Tetrabutyl ammonium و bromide بنسبة 96:4 .




**الشكل (6) : A- فصل حامض الكوجيك بكروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة للحامض القياسي**




**الشكل (6) : B - فصل حامض الكوجيك بكروموتوغرافيا السائل عالي الكفاءة للحامض المنقى الفطر *A. parasiticus***

## تحديد نقطة الانصهار

إن تحديد نقطة الانصهار تعد خطوة مهمة في تحديد نقاوة المركب . تم قياس نقطة الانصهار للحامض قيد الدراسة وتبين انها محصورة بين (151 – 153) وهذه القيمة تقع ضمن مدى نقاط انصهار حامض الكوجيك التي تتراوح مابين (151 – 154) مْ (Ohyama and Mishima,1990) .

جاءت هذه النتيجة مطابقة لما تم التوصل اليه في الكثير من الدراسات السابقة فقد تراوحت نقطة انصهار حامض الكوجيك المنقى من الفطر *A. oryzae* var *effuses* NRC 14 بين (152 –153) مْ ( Hazzaa *et al.,*2013) وأشار Lide and Milne (1996) الى أن نقطة انصهار هذا الحامض 153.5 مْ .

## طيف الاشعة تحت الحمراء

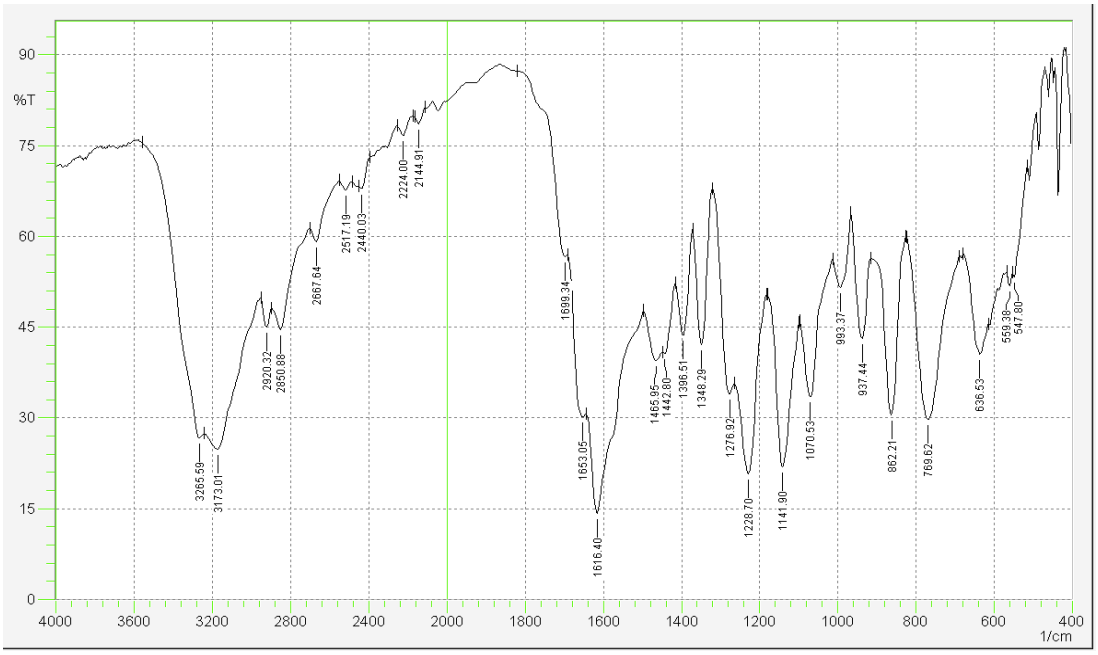
أستعمل مطياف الاشعة تحت الحمراء في تشخيص بعض المجاميع الرئيسة والداخلة في تركيب حامض الكوجيك المنقى حيث تم تسجيل الاطياف في مدى من الاعداد الموجية (400–4000 )سم$^{-1}$ .

يلاحظ من الشكل (7) ظهور حزم امتصاص عند الترددات الاتية :

3265 و 3173 و 2920 و 2850 و 1658 و 1612 و 1467 و 1226 و 1141 و 1070 و 939 و 862 و 767 و 636 ) سم$^{-1}$ :

ان ظهور حزمتي امتصاص عند الترددين (3265 و 3173 ) سم$^{-1}$ يشير الى وجود مجموعتي الهيدروكسيل (OH) الاليفاتية (المرتبطة بمجموعة $CH_2$ ) والأينولية , على التوالي . أما ظهور حزمتي امتصاص عند الترددين (2920 و 2850 ) سم$^{-1}$ فيعود لاهتزاز مط اواصر CH الاليفاتية . بينما يعزى ظهور الحزمة عند التردد 1658 سم$^{-1}$ الى اهتزاز مط مجموعة الكربونيل ( C=O الكيتونية ) في حين ان ظهور حزمة الامتصاص عند التردد 1612 سم$^{-1}$ يعزى لاهتزاز مط الاصرة المزدوجة C=C المسؤولة عن الهيكل البايروني لحامض الكوجيك . أما ظهور الحزمة عند التردد 1467 سم$^{-1}$ فيعزى لانحناء مجموعة $CH_2$ , فضلا عن وجود التركيب الحلقي من C–O–C بسبب ظهور حزمتي امتصاص عند الترددين

(1226 و 1141 ) سم$^{-1}$ . بينما يلاحظ ظهور حزم امتصاص عند الاعداد الموجية (939 و 862 و 767 ) سم$^{-1}$ والتي تعود الى التعويض الثنائي لحلقة البنزين في الموقع 1,4 disubtituted of 1,4-α ring (Saleh *et al.*,2011) .




**الشكل (7): طيف الاشعة تحت الحمراء لحامض الكوجيك المنقى من الفطر *A. parasiticus***

## المصادر


**سلفرشتاين (1981)**. التشخيص الطيفي للمركبات العضوية . ترجمة عوض، هادي كاظم ، و حسين ، فهد علي ، و العزاوي ، صبحي صالح . مراجعة باسل هاشم /جامعة بغداد.

**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.

**Al-Obaidi**, Z.S.; Gh. M. Aziz; Th.S. Al-Hakkak and M.A. Al-Hilli (1987). Optimization of propagation medium for baker's yeast using date extract and molasses. Date Palm J. 5(1): 164-178.

**Al-Shahni,** M.M. ; Makimura, K. ; Yamada, T. ; Satoh, K. ; Ishihara, Y. ; Takatori, K. and Sawada, T.(2009). Direct colony PCR of several medically important Fungi using ampdirect plus. JPh. J. Infect. Dis., 62: 164-167.

**Amghalia,** E. ; Naji, A.A. ; Shamsudin, M. N. ; Radu, S. ; Rosli, R. ; Neela, V. and Rahim, R.A. (2009). Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus ayreus* isolated from Malaysian hospitals. Research Journal of Biological Sciences, 4: 444-448.

**Bentley** R. (1957). Preparation and analysis of kojic acid. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(eds), Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 34: 238- 241.

**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.

**Bhalla,** T.C. ; Sharma, N.N. and Sharma, M.(2006). Food and industrial microbiology: production of metabolites, Industrial enzymes, Amino acid, Vitamins and Single cell proteins. Himachal Pradesh university.

**Eillis,** D. ; Davis, S. ; Alexion, H. ; Handke, R. and Bartley, R.(2007). Descriptions of Medical fungi. School of Molecular and Biomedical Science, University of Adelaide, Australia.

**El-Aasar,** S.A.(2006). Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus* . International J. of Agriculture and Biology. 8(4): 468-473.

**Emons,** H. (1976). Medical Mycology. Williams and Wilkins.

**Gantam,** A.K. and Bhadauria, R.(2012). Characterization of *Aspergillus* species associated with commercially stored triphala powder. African Journal of Biotechnology, 11(104):16814-16823.

**Hazzaa,** M.M. ; Saad, A.A. ; Hassan, H.M. and Ibrahim, E.I.(2013). High production of kojic acid crystals by isolated *Aspergillus oryzae* var. *effusus* NRC14. J. of Applied Sciences Research . 9(3): 171401723.

**Hogan,** J. S. ; Gonzales, R.N. ; Harmon, R.J. ; Nickerson, S.C. ; Oliver, S.P. ; Pankey, J.W. and Smith, K.L.(1999). Laboratory Handbook. On Bovine Mstitis Counicil, Inc. , Madison, Wisconson, USA.

**Huang**, S. ; Lin, C. ; Huang, M. and 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.

**Kamaroddin,** M.F.B.A.(2007). Direct utilization of tapioca starch by *Aspergillus flavus* for production of kojic acid in batch and fed-batch culture. Desertation B.Sc. Industrial Biology, University Technology Malaysia.

**Kobayashi,** Y. ; Kayahara, H. ; Tadasa, K. and Tanaka, H. (1996). Synthesis of N-Kojic-amino acid and N-Kojic-amino acid-Kojiate and their tyrosinase inhibitory activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters J. 6(12): 1303-1308.

**Lide,** D.R. and Milne, G.W.A.(1996). Properties of organic compounds, version 5.0 , Boca Raton , F.L., CRC press[CD-ROM].

**Lin,** C.( 2001). The effect of equipping a non-Waven fabrics in the fermenter on the production of kojic acid by *Aspergillus flavus* .M.SC. Thesis, Chemical Engineering, China.

**Lin,** M.T. ; Mahajan, J.R. ; Dianese, J.C. and Takatsu, A.(1976). High production of kojic acid crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 in liquid medium. Applied and Environmental Microbiology J. 32(1): 298-299.

**Miller,** G.L.(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry J. 31(3): 426-429.

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

**Rodrigues,** A.P.D. ; Carvalho, A.S.C. ; Santos, A.S. ; Alves, C.N. ; do Nascimento, J.L.M. and 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.

**Rossomando,** E.F.( 1987). High performance liquid chromatography in enzymatic analysis. Applications to the assay of enzymatic activity . A Wiley-Interscience publication, John Wiley & Sons.

**Saleh,** R.M. ; Kabli, S.A. ; Al-Garni, S.M. and 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.

**Sardinas,** N. ; Vazquez, C. ; Serna, J.G. ; Gonzales, T. and Patino, B.(2010). Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive. PCR assay. Food additives and contaminants. 27(6): 853-858.

**Terabayashi**, Y. ; Sano, M. ; Yamane, N. ; Marui, J. ; Tamano, K. ; Sagara, J. ; Dohmoto, M. ; Oda, K. ; Ohshima, E. ; Tachibana, K. ; Higa, Y. Ohashi, S. ; Koike, H. and Machida, M. (2010). Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *A. oryzae*. ELSEVIER J. 27: 953-961.

**Vijayakumar,** J. ;Aravindan, R. and Viruthagriri, T.(2008). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. Chem. Biochem. Eng. Q. 22 (2):245-264.

**Yousif,** A.K. ; Benyamin, N.D. ; Kada, A. ; Mehi-Alddin and Ali, S.M.(1982). Chemical composition of four Iraqi date cultivars. Date Palm Journal. 1(2): 285-294.

**Zhao,** S. ; Li, Y. ; Zhao, H. ; Ji, R. and Li, Y.(2003). Analysis of kojic acid in *Aspergillus oryzae* ferment by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. Wei Sheng Yan Jiu J. 32(4): 384-385.