

Optimization of cultural conditions for kojic acid production from *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج حامض الكوجيك من الفطرين

A.flavus و *A.fumigatus*

علاء عبد الحسين كريم الدعيمي, علي عبد الكاظم جاسم الغانمي

جامعة كربلاء-كلية العلوم

Aakm7789@gmail.com

ماجد كاظم عبود الشبلي

جامعة القادسية-كلية التربية

Ardkdhm79@gmail.com

الخلاصة

درست الظروف المزرعية لإنتاج حامض الكوجيك من العزلتين الفطريتين المحليتين (*Aspergillus fumigatus*(24) و *A. flavus*(29) وأوضحت النتائج أن أفضل هذه الظروف تمثلت باستخدام وسط مكون من المولاس المروق بتركيز ٤,٢% سكريات مختزلة المدعم بـ (٠,٢٥ و ٠,١)% كبريتات الأمونيوم و ٠,١% فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و ٠,٠٥% كبريتات المغنيسيوم سباعية جزيء الماء و برقم هيدروجيني (٦ و ٤,٥) و حجم لقاح (١٠×٤^٧ و ١٠×٤^٨) بوغ/مل للعزلتين المذكورتين، على التوالي.

الكلمات المفتاحية: حامض الكوجيك، المولاس المروق

Abstract

The cultural conditions for kojic acid production from two local fungal isolates *Aspergillus fumigatus*(24) and *A.flavus*(29) were studied. The results showed that the optimum conditions were using a medium containing clarified molasses 4.2% reducing sugars supplemented with ammonium sulfate (0.25 and 0.1)% , KH₂PO₄ 0.1% , MgSO₄.7H₂O 0.05% , adjusted to pH (6 and 4.5) , and inoculated with (4×10⁷ and 4×10⁸)spore/ml , respectively.

Key words: kojic acid , clarified molasses

(Introduction) المقدمة

يعد حامض الكوجيك حامضاً عضوياً ، و هو أحد مركبات الأيض الثانوي التي تنتجها بعض الاحياء المجهرية (Saleh *et al.*,2011) . و قد حظي هذا الحامض بتطبيقات واسعة اذ يستعمل في المجال الطبي كمضاد للالتهابات و مهدئ للألم (Kayahara *et al.*, 1990) ، بينما يستعمل في مجال التصنيع الغذائي لزيادة نكهة و منع اسمرار الأغذية و كعامل مضاد للأكسدة (Son *et al.*, 2001) فضلا عن استعماله في صناعة مواد التجميل كعامل تبييض Whiting agent و عامل واقى ضد الاشعة فوق البنفسجية (Jimbow & Minamitsuji,2001).

على الرغم من امكانية انتاج الاحماض العضوية من المصادر النباتية و الحيوانية أو عن طريق التصنيع الكيميائي إلا أن الانتاج التجاري لهذه الاحماض يتم من خلال التخمرات الميكروبية نظرا لما تتميز به الطريقة الأخيرة من امكانية زيادة الانتاج بوساطة تحسين الظروف البيئية أو التطويع الوراثي (Genetic manipulation) للكائن المجهرى (Demain & Dana, 2007) .

اتجهت عمليات انتاج الأحماض العضوية الى استخدام مواد أولية رخيصة الثمن في تنمية الاحياء المجهرية لتحقيق أعلى انتاج من الحامض المطلوب بأقل كلفة . و من المعروف أن عمليات التصنيع الغذائي تتسبب بسلسلة من مشاكل رمي المخلفات و النواتج العرضية ، و غالبا ما تكون هذه المخلفات أو النواتج غنية بالسكريات بسبب طبيعتها العضوية مما يتيح امكانية استغلالها بكفاءة في انتاج الأحماض العضوية (Alil & Zulkali, 2011).

و يعد المولاس الناتج العرضي لصناعة السكر ، و تشير إحدى الاحصائيات الى أن اجمالي الانتاج العالمي من المولاس بلغ ٤٥ مليون طن متري في عام ٢٠٠٠ (Abubaker et al ., 2012) و أن نظرة عابرة على تلك الاحصائية تعطي مؤشرا واضحا على حجم الدور الاقتصادي الذي يلعبه هذا الناتج العرضي .

و عادة ما تكون السلالات البرية (Wild strains) غير مناسبة للإنتاج الصناعي نظرا لانخفاض حصيله نواتجها الايضية لذا يلجأ عادة أمّا الى التحسين الوراثي (Genetic improvement) أو تحسين الظروف البيئية للإنتاج وصولا الى الانتاج المفرط (Overproduction) من الحامض المطلوب، كما أن السلوك الفسيولوجي للكائن المجهري يتغير خلال النمو و يعتمد بشكل كبير على مكونات الوسط فضلا عن أن الانتاج المفرط من المنتج الايضي يتأثر بمجموعة من العوامل تشمل على التهوية و الرقم الهيدروجيني للوسط و درجة الحرارة و نوع و تركيز المغذيات و أيونات المعادن و المحتات و المثبطات (Inducers/Inhibitors) للسلالات المنتجة (Bhalla et al ., 2006) .

و نظرا لما يمتلكه حامض الكوجيك من أهمية تطبيقية كبيرة لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى انتاج الحامض بكفاءة من عزلة فطرية محلية عبر تحديد الظروف المزرعية لإنتاج الحامض من العزلتين *A.flavus*(29) و *A.fumigatus*(24) .

المواد و طرائق العمل

الكائن المجهري و ظروف انتاج الحامض

استعملت عزلتان فطريتان محليتان هما *A.fumigatus*(24) و *A.flavus*(29) تم انتخابهما أثر عملية غربلة في دراسة سابقة (الدعيمي ، ٢٠١٣). نشطت هاتان العزلتان على طبق بتري يحتوي على أكار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة ٢٨ م لمدة (٧-١٠) أيام.

استعمل المولاس بعد ترويجه كوسط لإذابة المغذيات الأخرى الموصوفة من قبل (Ariff et al .(1996). عدا الكلوكوز في انتاج الحامض من العزلتين المشار اليهما. جرت عملية الترويق بتخفيف المولاس المستعمل بالماء المقطر بنسبة ٤:١ ثم أضيف ٤ مل من حامض الكبريتيك (1 N) لكل ١٠٠ مل من المولاس المخفف و تم غليانه لمدة ٥ دقائق و ترك لليوم التالي اذ تكون راسب بني الذي أجريت له عملية طرد مركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة، أهمل الراسب في حين احتفظ بالراشح الذي تم تقدير محتواه من السكريات المختزلة. شملت المغذيات المضافة الموصوفة من قبل (Ariff et al .(1996) و التي تم تدعيم الوسط بها: مستخلص الخميرة (٠,٥%) و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH₂PO₄) (٠,١%) و كبريتات المغنيسيوم سباعية جزيء الماء (MgSO₄. 7H₂O) (٠,٥%). يتم تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط و يوزع في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل بواقع ٥٠ مل.

تجري عملية تلقيح الوسط بنقل قرص واحد (بقطر ٧ ملم) يحتوي (١×١٠^٧ و ١×١٠^٨ بوغ/مل تقريبا) من العزلتين الفطريتين، على التوالي، الناميتين على وسط PDA الى وسط المولاس الانتاجي الموصوف أعلاه و تم الحضانة في الحاضنة الساكنة بدرجة حرارة ٣٠ م لمدة عشرة أيام. و بعد انتهاء مدة الحضان يتم طرد النماذج مركزيا لفصل الكتلة الحيوية عن راسح المزرعة الفطرية الذي استعمل في تقدير كمية حامض الكوجيك و السكريات المختزلة المتبقية.

تقدير حامض الكوجيك

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bentley(1957) في تقدير كمية حامض الكوجيك و اعتمادا على المنحنى القياسي لحامض الكوجيك، و ذلك بمزج ١مل من راشح المزرعة الفطرية مع ٢,٥مل من محلول حامض الهيدروكلوريك ٠,١ M و ٠,٢ مل من كلوريد الحديدك ٠,٢ M في انابيب اختبار و رجت جيدا ثم تمت قراءة الامتصاص بطول موجي ٥٠٠ نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

تقدير السكريات المختزلة

قدرت السكريات المختزلة في وسط الانتاج بالطريقة الموصوفة من قبل Miller(1959) و اعتمادا على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل.

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج حامض الكوجيك من الفطرين (24) *A.fumigatus* و (29) *A.flavus*

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في انتاج حامض الكوجيك من العزلتين المنتخبتين و اشتملت هذه العوامل على :

١- تأثير المصدر الكربوني و تركيزه

خفف المولاس المروق بالماء المقطر لعمل تراكيز مختلفة منه (١,٤ و ٢,٨ و ٤,٢ و ٥,٦ و ٧) % سكريات مختزلة ، ثم دعم بالمغذيات المشار اليها سابقا لتحديد التركيز الأمثل من المولاس لأفضل انتاج من حامض الكوجيك و قورنت النتائج مع وسط الانتاج الحاوي على مكونات الوسط نفسها باستثناء استعمال الكلوكوز بتركيز ٥% بدلا من المولاس و الموصوف من قبل Ariff et al(1996) .

٢- تأثير المصدر النيتروجيني

أ- نوع المصدر النيتروجيني

تم اختبار ٧ مصادر نيتروجينية لتحديد المصدر الأكفأ منها في انتاج حامض الكوجيك من العزلتين المنتخبتين اشتملت هذه المصادر على مستخلص الخميرة و اليوريا و نترات الصوديوم و كلوريد الأمونيوم و كبريتات الأمونيوم و نترات البوتاسيوم و فوسفات الأمونيوم . و قد استخدمت المصادر النيتروجينية جميعها بتركيز ٠,٢٥ % عدا مستخلص الخميرة الذي استخدم بتركيزين أحدهما ٠,٢٥ % و الثاني ٠,٥ % .

ب- تحديد تركيز المصدر النيتروجيني الأمثل للإنتاج

أضيفت تراكيز متدرجة من كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ الى وسط المولاس المروق . اشتملت هذه التراكيز على (٠ و ٠,١ و ٠,٢٥ و ٠,٥ و ٠,٧٥ و ١,٠) % لتحديد التركيز الأمثل من المصدر النيتروجيني لإنتاج الحامض .

٣- تأثير الاملاح

استخدمت فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و كبريتات المغنيسيوم سباعية جزيء الماء بتوليفات مختلفة تراوحت من (٠,٠ - ٠,١) % لدراسة تأثير هذين الملحين في انتاج حامض الكوجيك.

٤- تأثير الرقم الهيدروجيني

وزع وسط الانتاج في دوارق سعة ٢٥٠ مل بواقع ٥٠ مل لكل دورق و عدل الرقم الهيدروجيني في هذه الدوارق الى (٣,٥ ، ٤ ، ٤,٥ ، ٥ ، ٥,٥ ، ٦ ، ٦,٥) باستخدام ١ ع من كل من هيدروكسيد الصوديوم و حامض الهيدروكلوريك ، حضنت الاوساط المعقمة و الملقحة بدرجة حرارة ٣٠ م و لمدة ١٠ أيام لدراسة تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج الحامض.

٥- تأثير حجم اللقاح

لقت الاوساط المعقمة بأعداد مختلفة من السبورات اشتملت على (5×10^6 و 1×10^7 و 2×10^8 و 3×10^9 و 4×10^{10} و 5×10^{11}) بوغ /مـلل للعلزلة (24) *A. fumigatus* و (5×10^6 و 1×10^7 و 2×10^8 و 3×10^9 و 4×10^{10} و 5×10^{11}) بوغ /مـلل للعلزلة *A. flavus* (29) و حضنت الاوساط بدرجة حرارة ٣٠ م . لبيان تأثير حجم اللقاح في إنتاج الحامض .

النتائج و المناقشة

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج حامض الكوجيك من العزلتين (24) *A. fumigatus* و

A. flavus (29)

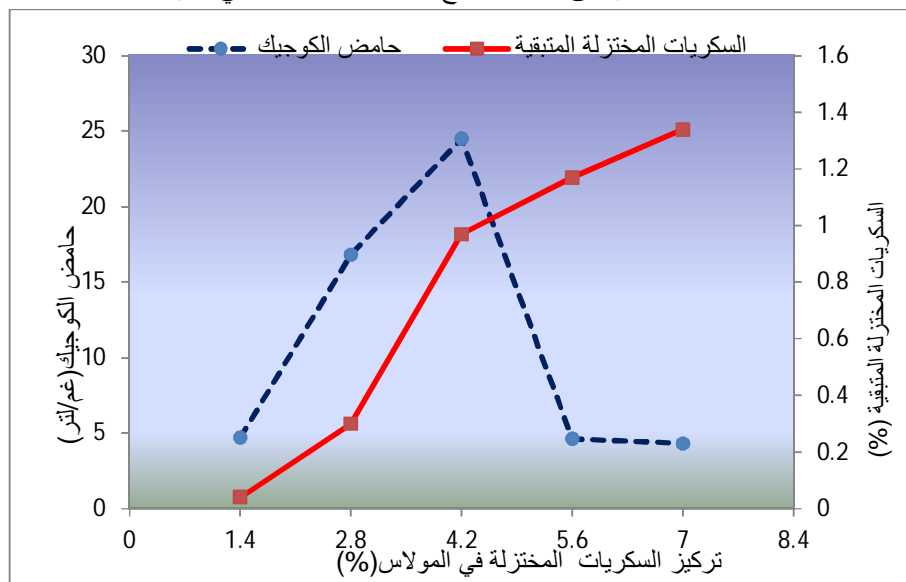
١- تأثير المصدر الكربوني

قورن إنتاج حامض الكوجيك من العزلتين (24) *A. fumigatus* و (29) *A. flavus* باستخدام نوعين من الاوساط ، الأول صناعي يحتوي على الكلوكوز ٥% و مستخلص الخميرة و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و كبريتات المغنيسيوم سباعية جزيء الماء ، أما الوسط الثاني فهو المولاس المروق المدعم بمستخلص الخميرة و الاملاح و بنفس تراكيزها في الوسط الأول . تم اختبار عدة تراكيز من المولاس انحصرت بين (١,٤ - ٧) % سكريات مختزلة لتحديد التركيز الأمثل منها لإنتاج الحامض و أظهرت النتائج المبينة في الشكلين ١ و ٢ أنّ أعلى قيم إنتاج للحامض كانت باستخدام وسط المولاس ذي التركيز ٤,٢% سكريات مختزلة اذ بلغ تركيز الحامض المنتج (٢٤,٥١ و ٢٦,٨٠) غم/لتر للعزلتين (24) *A. fumigatus* و (29) *A. flavus* على التوالي ، مقارنة بقيم الإنتاج المستحصل عليها في بقية تراكيز المولاس من جهة و وسط التخمر الصناعي الحاوي على الكلوكوز ٥% كمصدر للكربون من جهة أخرى و اعتمادا على هذه النتيجة تم اختيار وسط المولاس بتركيز سكريات مختزلة ٤,٢% كأفضل مصدر كربوني و تم استخدامه في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

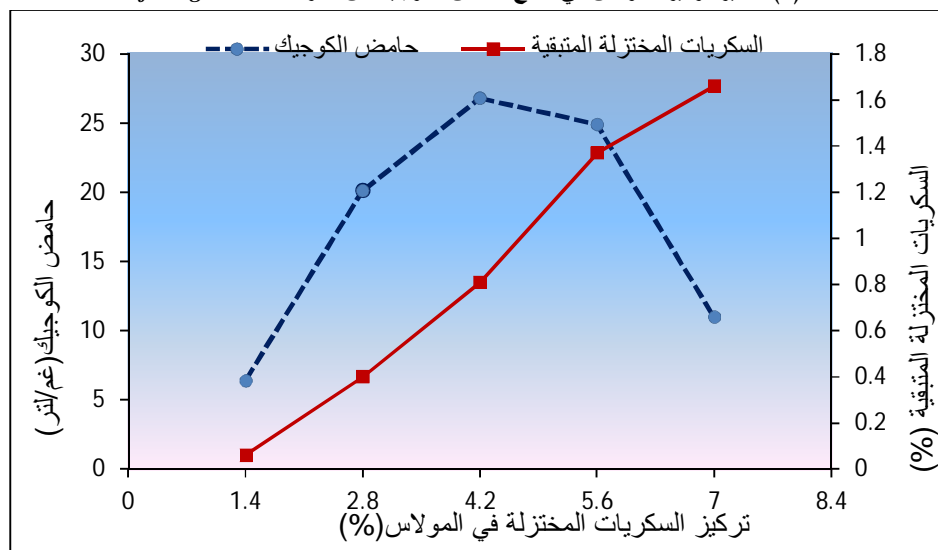
يتضح من النتائج أعلاه ملائمة وسط المولاس لإنتاج حامض الكوجيك و يمكن أن يعزى ذلك الى احتوائه على مكونات تدعم نمو الفطرين و إنتاج الحامض، اذ يحتوي المولاس على ٢٠% ماء و ٨% محتويات غير عضوية و أملاح و ١٠% مكونات غير سكرية و مواد نيتروجينية و أحماض مرتبطة و حرة و مواد صمغية ذائبة و ما يقارب من ٦٢% سكريات ، اذ تشكل سكريات السكروز و الكلوكوز و الفركتوز (٣٢ و ١٤ و ١٦) % على التوالي (Olbrich, 1963) ، فضلا عن ذلك فأن نسبة الكلوكوز المشار اليها في تركيب المولاس تعد مناسبة لإنتاج حامض الكوجيك نظرا لأن الكلوكوز يعد أفضل مصدر كربوني لإنتاج هذا الحامض من خلال عمله كمولد (Precursor) للحامض اذ أنّ التشابه التركيبي كبير بين الكلوكوز و حامض الكوجيك من خلال احتوائهما على حلقة سداسية الكربون (El-Aasar, 2006) .

كما يلاحظ من النتائج انخفاض تركيز حامض الكوجيك المنتج من الفطرين عند استخدام التراكيز العالية من السكريات المختزلة (٦,٥ و ٧) % و قد يعود السبب في ذلك الى التأثير الأزموزي (Osmosis effect) (الذي تحدده التراكيز العالية من السكريات لخلايا الفطريات (El-Aasar, 2006)) . ويتضح من الشكلين ١ و ٢ أنّ زيادة تركيز السكريات المختزلة ينجم عن زيادة واضحة في السكريات المختزلة المتبقية و الذي ربما يعزى الى عدم قابلية الأحياء المجهرية لتمثيل المستويات العالية من السكريات (El-Aasar, 2006) .

اختلفت نتائج الدراسة الحالية عما جاء به (El-Aasar, 2006) الذي توصل الى أن أفضل مصادر الكربون المستعملة لإنتاج حامض الكوجيك من العزلة *A.parasiticus* هي الكلوكوز ٦% يليه السكروز ٣% و من ثم مولاس البنجر السكري ٦%. كما لا تتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما وجد في دراسة أخرى أوضحت أن أفضل تركيز من مولاس البنجر للحصول على أقصى إنتاج للحامض من الفطر *A.parasiticus* بلغ ٢٠% (وزن/حجم) (Gad, 2003)، و يمكن أن يعزى الاختلاف في النتائج بين دراستنا الحالية و ما توصل اليه الأخير الى اختلاف نوع المولاس المستعمل في الدراستين .



الشكل (١): تأثير تركيز المولاس في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٤ *A. fumigatus*



الشكل (٢): تأثير تركيز المولاس في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٩ *A. flavus*

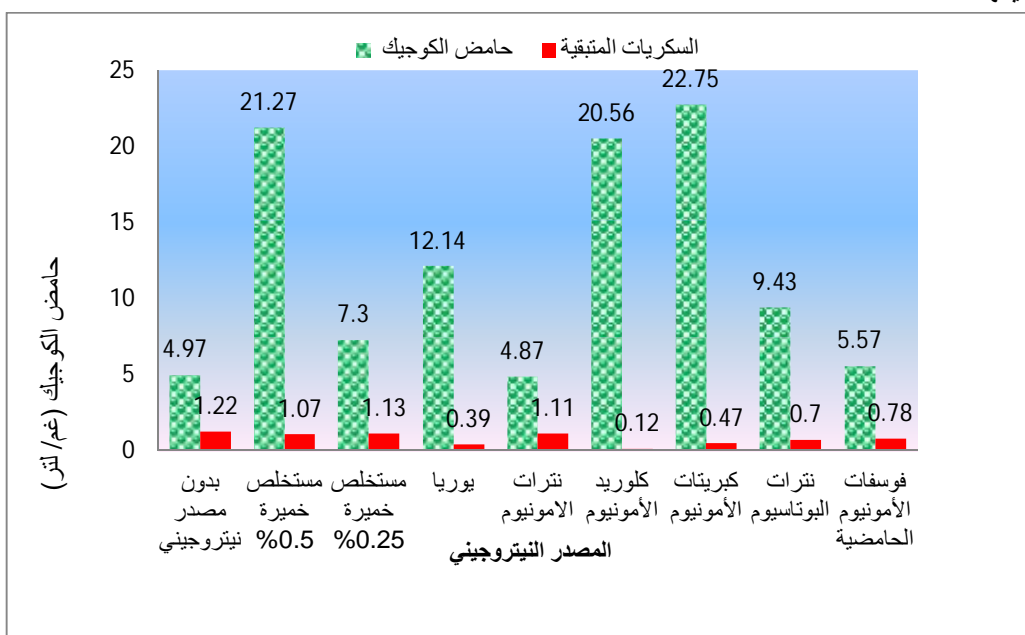
٢- تأثير المصدر النيتروجيني و تركيزه

درس تأثير المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض الكوجيك من العزلتين (*A.fumigatus* (24) و *A.flavus* (29) فقد استخدمت سبعة مصادر نيتروجينية شملت مستخلص الخميرة و اليوريا و نترات الصوديوم و كلوريد الامونيوم و كبريتات الامونيوم و نترات البوتاسيوم و فوسفات الامونيوم ، اذا استعملت هذه المصادر بتركيز ٠,٢٥% بينما استعمل مستخلص الخميرة بتركيزين (٠,٢٥ و ٠,٥) %.

و أوضحت النتائج في الشكل ٣ أنّ أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض من الفطر *A.fumigatus*(24) هو كبريتات الأمونيوم إذ بلغ إنتاج الحامض ٢٢,٧٥ غم/لتر ، بينما يتضح من الشكل ٤ أنّ مستخلص الخميرة بتركيز ٠,٥ % هو المصدر الأفضل للإنتاج من الفطر *A. flavus*(29) بتركيز حامض مقداره ٢١,٤٢ غم/لتر ، بيد أنه يلاحظ أنّ استخدام كبريتات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض من الفطر الأخير أدى الى إنتاج كمية حامض عالية بلغت ٢٠,٧٩ غم/لتر و هي قيمة مقارنة جدا لما تم الحصول عليه عند استعمال مستخلص الخميرة.

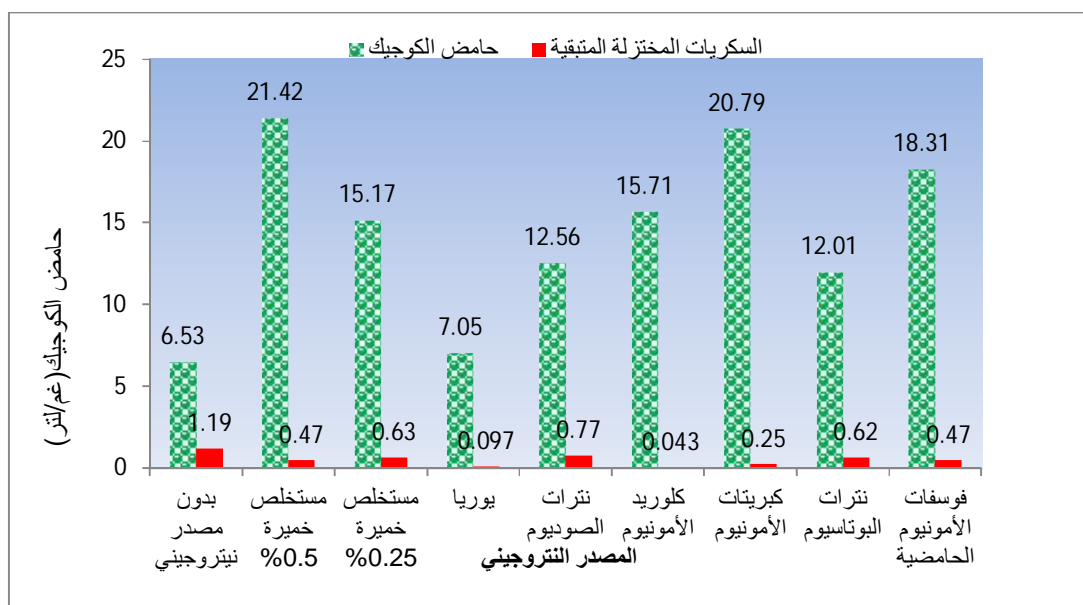
بينما سجل أوطأ إنتاج من العزلة *A. fumigatus* (24) باستخدام نترات الصوديوم إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ٤,٨٧ غم/لتر ، في حين بلغ أوطأ إنتاج من العزلة *A. flavus* (29) باستخدام اليوريا بكمية حامض منتجة مقدارها ٧,٠٥ غم/لتر .

و نظرا لأنّ كبريتات الأمونيوم تعد رخيصة الثمن مقارنة بمستخلص الخميرة فضلا عن أنّ التركيز المستخدم من الكبريتات لإنتاج الحامض كان نصف التركيز المستخدم من مستخلص الخميرة لذا فقد وقع الاختيار على كبريتات الأمونيوم كأفضل مصدر نيتروجيني و تم استخدامها في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.



الشكل (٣): تحديد نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة *A. fumigatus* (24).

إنّ النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة تشير الى تفوق المصدر النيتروجيني غير العضوي (كبريتات الأمونيوم) على المصادر العضوية المستخدمة في الدراسة ، و مستخلص الخميرة 0.5% تختلف هذه النتيجة عمّا تم الحصول عليه في بعض الدراسات السابقة إذ أكد El-Aasar(2006) انخفاض إنتاج الحامض باستخدام المصادر النيتروجينية كبريتات الأمونيوم و نترات الأمونيوم مقارنة بالمصدر العضوي مستخلص الخميرة في إنتاج الحامض من الفطر *A.parasiticus* إذ أعطى الأخير كمية من الحامض مقدارها ٢٨,٤١ غم/لتر مقارنة بالمصدرين غير العضويين الذين أعطيا كمية حامض بلغت ٤ غم/لتر . كما توصل Wan(2005) الى تفوق مستخلص الخميرة و بروتين حب الصويا و التريتون و ماء نقيع الذرة و نخالة الرز على المصدر غير العضوي كبريتات الأمونيوم في إنتاج حامض الكوجيك من الفطر *A.oryzae* M3B9 .

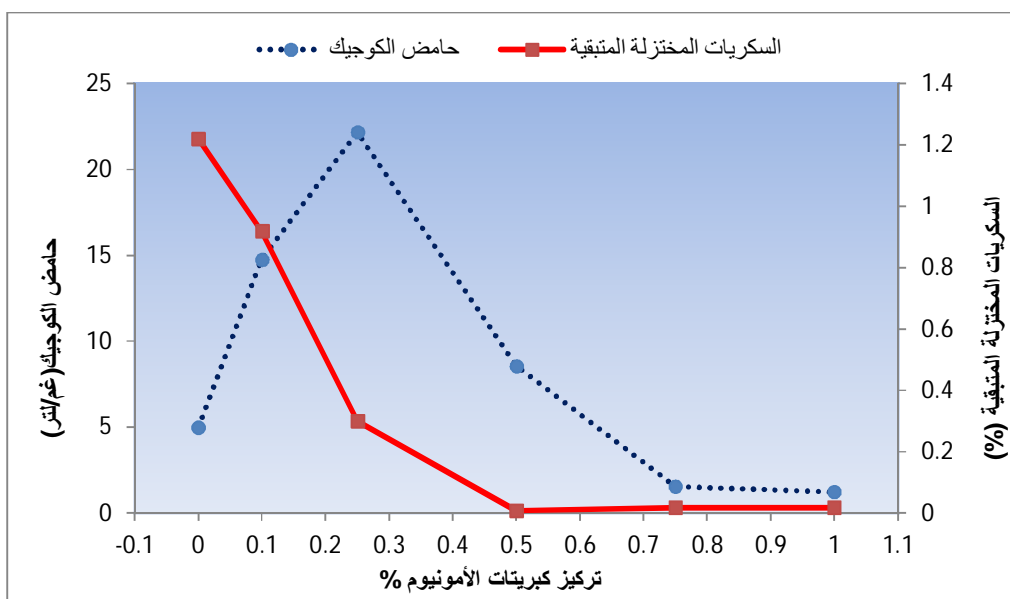


الشكل (٤): تحديد نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة (29) *A. flavus*.

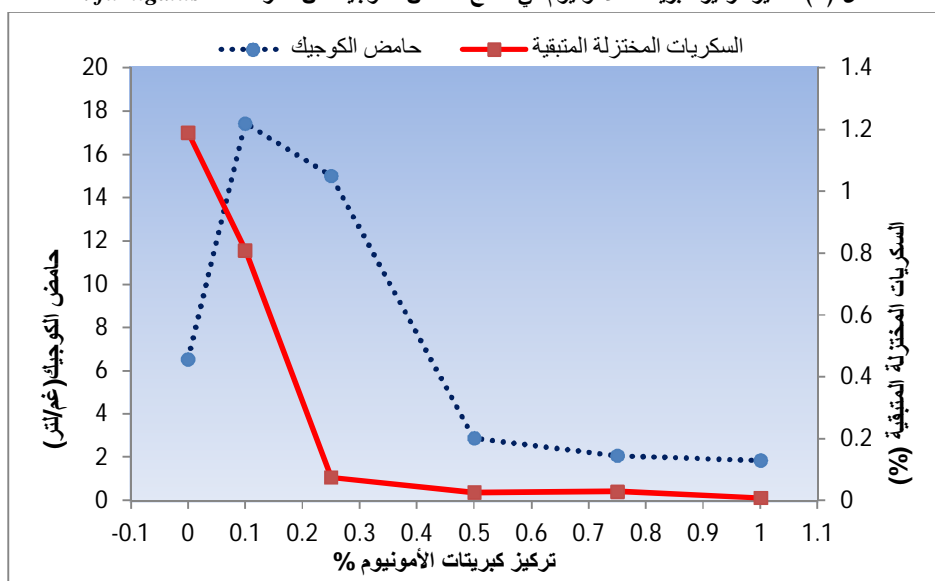
و من جهة أخرى ، أشارت العديد من الدراسات الى أن إنتاج الحامض يزداد باستعمال مزيج من المصادر النيتروجينية العضوية و غير العضوية اذ أدى التوليف بين مستخلص الخميرة و كبريتات الأمونيوم الى الحصول على أقصى إنتاج من الحامض من الفطرين *A. oryzae* و *A. flavus* بكمية حامض منتجة مقدارها (٨٣ و ٢٥)غم/لتر ، على التوالي (Kwak&Rhee,1992) و (Megalla et al ., 2010) ، على التوالي ايضا .

بعد أن تم تحديد كبريتات الامونيوم كأفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض تم تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني لإنتاجه ، و تشير النتائج في الشكل ٥ الى أن أعلى إنتاج للحامض من العزلة (24) *A. fumigatus* كان باستخدام التركيز ٠,٢٥ % من كبريتات الامونيوم اذ بلغ تركيز الحامض المنتج ٢٢,١٧ غم/لتر للعزلة (24) *A. fumigatus* ، بينما كان التركيز ٠,١ % هو الأمثل من الكبريتات للإنتاج من الفطر (29) *A. flavus* اذ بلغ تركيز الحامض ١٧,٤٣ غم/لتر (الشكل ٦).

فضلا عما تقدم فإن التركيز الأمثل من كبريتات الامونيوم المتحصل عليه من هذه الدراسة بوجود التركيز الأمثل من المصدر الكربوني (المولاس) المتحصل عليه من هذه الدراسة ايضا ربما ساعد في اعداد وسط متوازن من حيث النسبة بين الكربون و النيتروجين (C/N Ratio) بما يحقق زيادة في إنتاج حامض الكوجيك ، فقد وجد Rosfarizan et al.(2010) أن إنتاج حامض الكوجيك ينخفض كثيرا عند نسبة الكربون الى النيتروجين أقل من ١٠٠ ، و استنتجوا أن كمية النيتروجين الضرورية لإنتاج حامض الكوجيك يجب أن تكون محدودة ، و يجب أن تتوفر كميات كبيرة من المصدر الكربوني اثناء طور الإنتاج لتحويلها الى الحامض بواسطة انزيمات غشاء الخلية و النشاطات الاخرى للخلايا غير النامية.



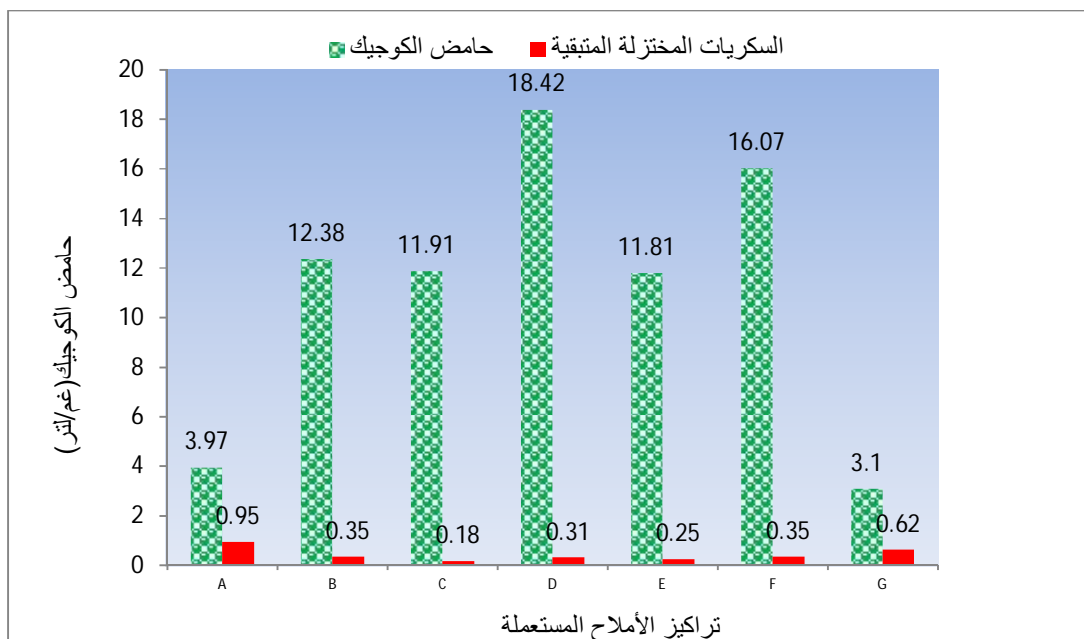
الشكل (٥): تأثير تركيز كبريتات الأمونيوم في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٤ *A. fumigatus*



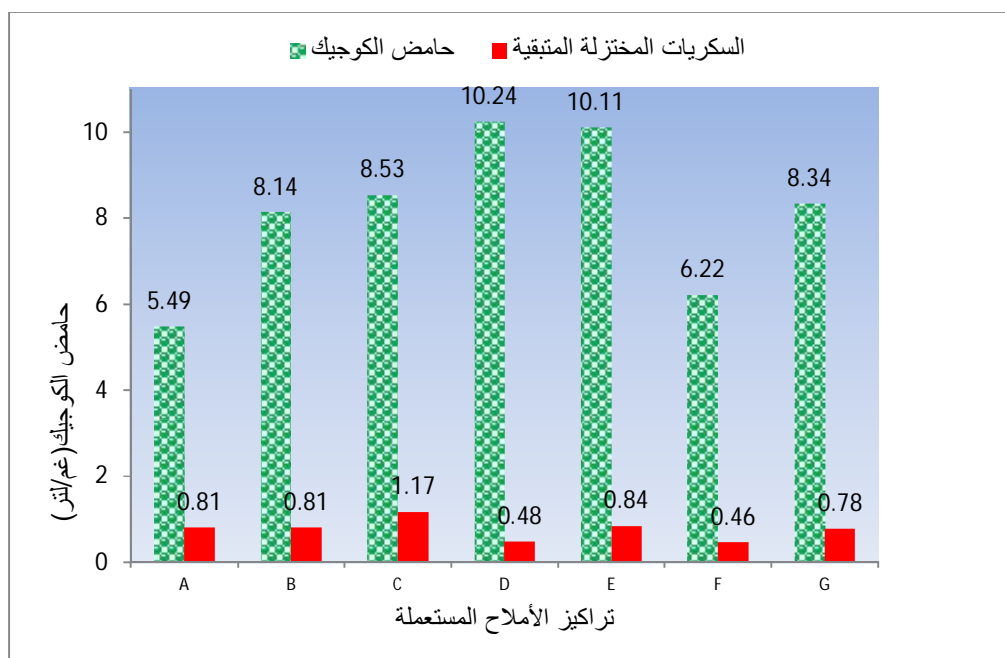
الشكل (٦): تأثير تركيز كبريتات الأمونيوم في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة (٢٩) *A. flavus*

٣- تأثير الاملاح

درس تأثير الاملاح في إنتاج حامض الكوجيك و قد تبين من خلال النتائج الموضحة في الشكلين ٧ و ٨ أن أقصى إنتاج للحامض بلغ (١٨,٤٢ و ١٠,٢٤)غم/لتر من العزلتين (*A.fumigatus*(24) و *A.flavus*(29) على التوالي باستعمال KH_2PO_4 و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ بتركيز (٠,١ و ٠,٠٥) % ، على التوالي . اذ تم تثبيت هذين التركيزين من الاملاح لاستخدامها في التجارب اللاحقة جميعها .



الشكل (٧): تأثير تركيز الاملاح في انتاج حمض الكوجيك من العزلة ٢٤ *A. fumigatus*



الشكل (٨): تأثير تركيز الاملاح في انتاج حمض الكوجيك من العزلة (29) *A. flavus*

- A: بدون أملاح.
 B: ٠,١ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ مع ٠,١ KH_2PO_4
 C: ٠,١ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ مع ٠,٠٥ KH_2PO_4
 D: ٠,٠٥ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ مع ٠,١ KH_2PO_4
 E: ٠,٠٥ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ مع ٠,٠٥ KH_2PO_4
 F: ٠,١ KH_2PO_4
 G: ٠,٠٥ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه العديد من الباحثين ، اذ استعمل معظم الباحثين التركيزين المذكورين اعلاه من الاملاح للحصول على أقصى انتاج من حمض الكوجيك من الفطريات *A. parasiticus* و *A. flavus* (Kamaroddin,2007) و (El-Aasar, 2006)، على التوالي .

أما Rosfarizan & Ariff (2006) فقد استعملوا KH_2PO_4 بتركيز ٠,١ % و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ بتركيز ٠,٢٥ % في إنتاج الحامض من الفطر *A. flavus* Strain S44-1 اذ بلغت كمية الحامض المنتجة ٤٠,٢ غم/لتر.

بالرغم من تباين الأحياء المجهرية في احتياجاتها الغذائية لكونها تختلف في مقدرتها على استهلاك و تخليق المواد المختلفة ، إلا أن هناك متطلبات عامة تعد أساسية للنمو و تكوين الناتج . و تعد الاملاح المعدنية احدى هذه المغذيات الأساسية و التي تحتاجها الأحياء المجهرية بمقادير ضئيلة للنمو و تكوين الناتج ، لذلك ينبغي اضافتها الى البيئة لتدعيمها (Stunbury & Whitaker, 1984) .

و قد وجد أن للفوسفات دورا تنظيميا لعمليات التأيض الثانوي كما هو الحال في إنتاج بعض الحوامض العضوية و المضادات الحيوية ، اذ تؤدي فوسفات البوتاسيوم الموجودة في الوسط الزراعي مهمتين اساسيتين : الأولى هي المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي كونها محلولا منظما ، و الثانية مصدرا مغذيا للفطر بتزويده بالفسفور (الخفاجي ، ١٩٩٠) .

٤- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي

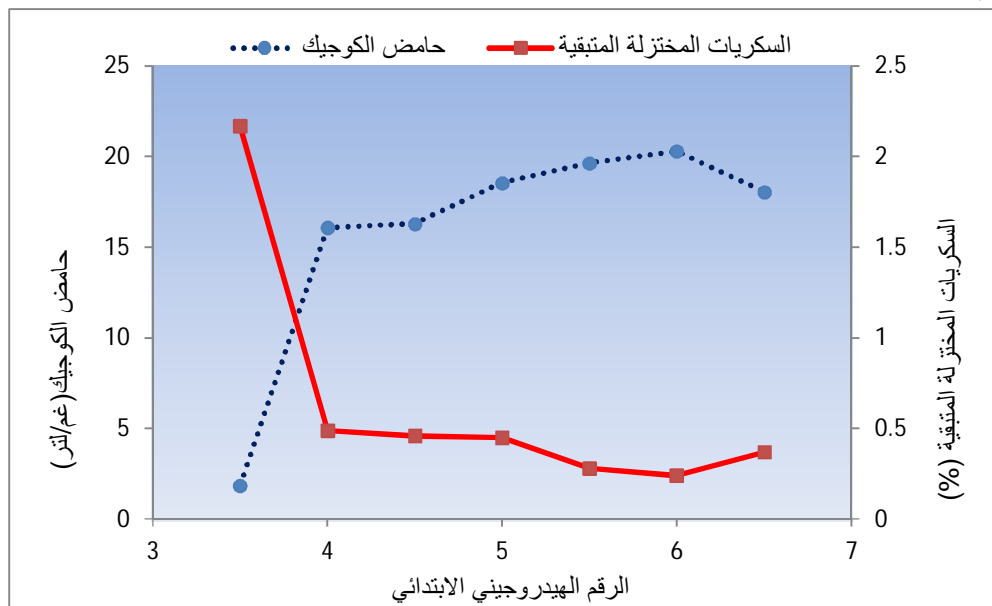
درس تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج حامض الكوجيك ، و كما يلاحظ من الشكل ٩ أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج الحامض من العزلة (*A.fumigatus*(24) بلغ ٦ اذ كانت كمية الحامض المنتجة ٢٠,٢٩ غم/لتر، أما ما يلاحظ في الشكل ١٠ فإن الرقم الهيدروجيني ٤,٥ هو الأمثل لإنتاج الحامض من العزلة (*A.flavus*(29) اذ بلغت كمية الحامض المنتجة ١١,٢٩ غم/لتر.

إن النتيجة المستحصلة من الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج حامض الكوجيك من الفطر *A.flavus* (29) قيد الدراسة تتفق مع ما وجدته Lin et al.(1976) اذ كان الرقم الهيدروجيني ٤,٥ هو الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر *A. parasiticus* . كما تعد تلك النتيجة مقارنة لما حصل عليه El-Aasar(2006) و Hazzaa et al.(2013) ، اذ كان الرقمان الهيدروجينيان ٥ و ٤ هما الأمثلان لإنتاج الحامض من الفطرين *A. parasiticus* و *A. oryzae* var. *effusus* NRC14 ، على التوالي . أما النتيجة المستحصلة من الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر (*A. fumigatus* (24) فتتفق مع ما وجدته Gad(2003) اذ كان الرقم الهيدروجيني ٦ هو الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر *A. parasiticus* .

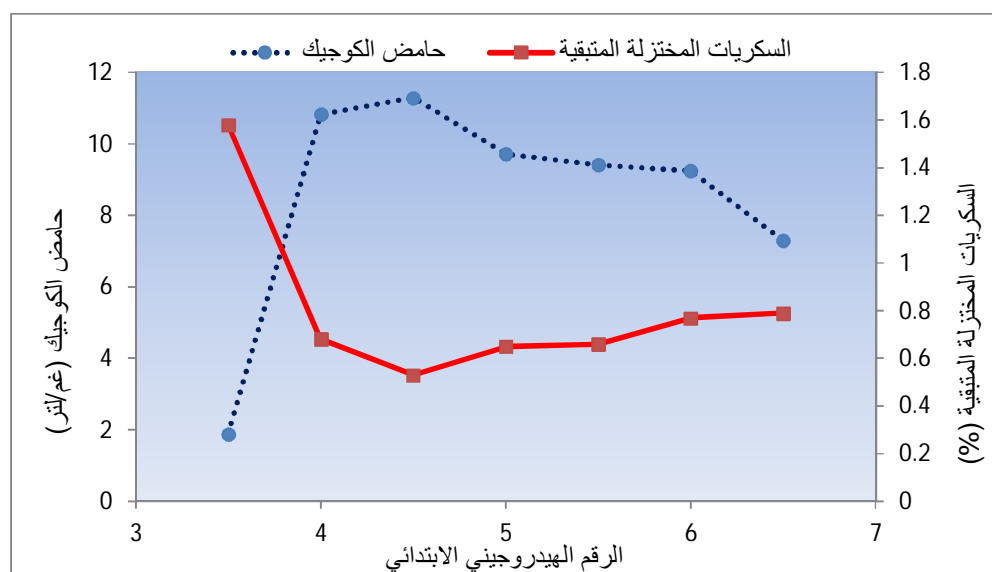
و من جهة أخرى ، لا تتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ما ورد في دراسات أخرى اذ توصلت بعض الدراسات الى أن أقصى إنتاج لحامض الكوجيك يكون عند قيم pH منخفضة جدا و هذا ما أشار اليه Wood(1998) اذ كان الرقم الهيدروجيني ١,٩ هو الأمثل لإنتاج الحامض ، و كان الرقم الهيدروجيني ٣ هو الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر (*A. flavus* Link 44-1 Rosfarizan et al., 2000) . يمكن تفسير اختلاف نتائج دراستنا الحالية مع نتائج الدراسات السابقة الى الاختلاف في مصدر الكربون و مصدر النيتروجين اذ أوضح Rosfarizan et al.(2010) الى أن الـ pH الأمثل لإنتاج حامض الكوجيك يعتمد على نوع المصدر الكربوني و النيتروجيني المستخدمين و مما يؤكد ذلك ما أشار اليه Makio(1967) فقد كان الـ pH الأمثل لإنتاج الحامض بحدود ٢ - ٣ عند استخدام توليفة من الكلوكوز أو السكر كـ مصدر كربون و البيبتون أو مستخلص الخميرة كـ مصدر نيتروجين ، و كذلك ما أشار اليه Basappa et al.(1970) من الـ pH الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر *A. flavus* كان بحدود ٦ - ٧ عند استخدام الخلوات كـ مصدر كربون .

مجلة جامعة بابل / العلوم الحرفية والتطبيقية / لعدد (1) / المجلد (23) : 2015

تتصف الفطريات الخيطية عموماً بتحملها للرقم الهيدروجيني الحامضي إذ يمتلك معظمها رقماً هيدروجينياً مثالياً بين (٥ و ٦) للنمو الخلوي فضلاً عن العديد من النشاطات الأيضية (Rosfarizan *et al.*, 2000) ، وأنّ الرقم الهيدروجيني العالي ربما يساعد في نمو الكائن المجهرى و لكنه يؤدي الى تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن تصنيع حامض الكوجيك (El-Aasar, 2006) ، و قد يعود ذلك الى تأثير الرقم الهيدروجيني في تركيب و فعالية هذه الانزيمات (Lekha & Lonsane, 1997) .
و وفقاً للنتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة فقد تم تثبيت قيمتي الرقم الهيدروجيني ٦ و ٤,٥ لإنتاج الحامض من العزلتين (24) *A. fumigatus* و (29) *A. flavus* ، على التوالي و تم استخدامهما في التجارب اللاحقة كافة .



الشكل(٩): تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة (24) *A. fumigatus*

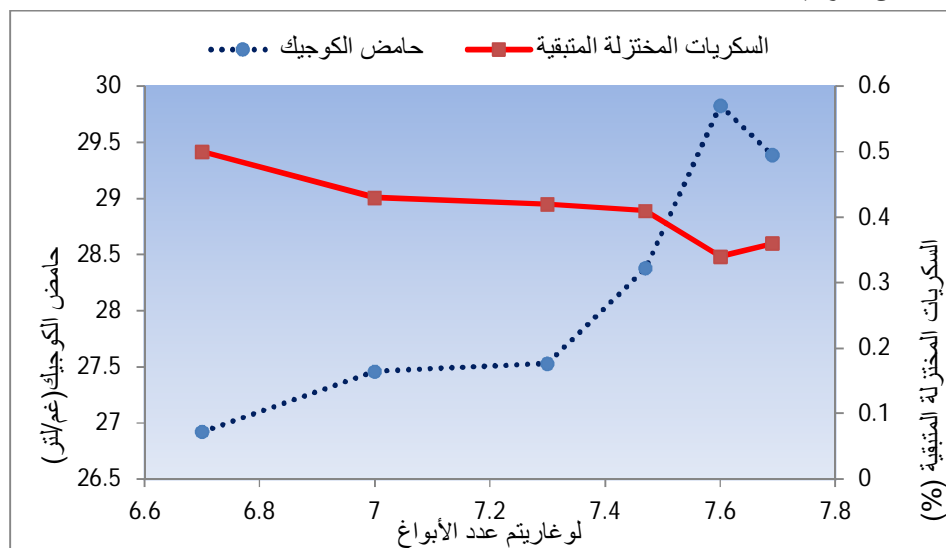


الشكل(١٠): تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٩ *A. flavus*

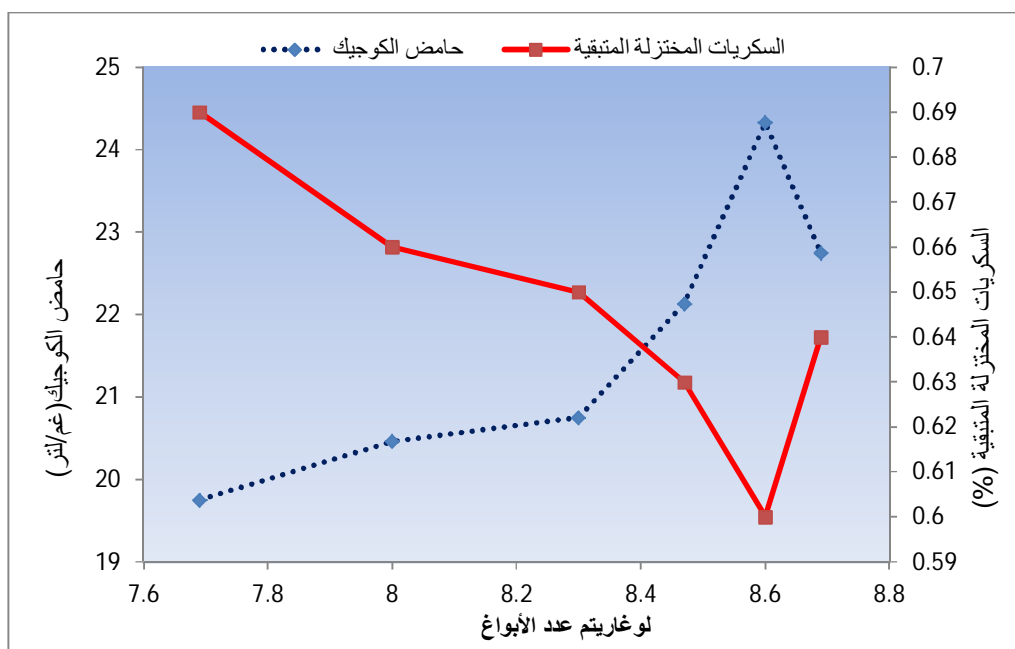
٥- تأثير حجم اللقاح

لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح الأمثل في إنتاج حامض الكوجيك تم تلقیح وسط الإنتاج باستخدام حجوم مندرجة من اللقاح ، و تشير النتائج الموضحة في الشكلين ١١ و ١٢ الى أن أقصى إنتاج من الحامض كان باستخدام حجم لقاح مقداره (٤ × ١٠^٧) بوغ/مل ، و (٤ × ١٠^٨) بوغ/مل من العزلتين *A. fumigatus* (24) و (29) *A. flavus* ، على التوالي . اذ بلغ إنتاج الحامض (٢٩,٨٣ ، ٢٤,٣٣) غم/لتر من العزلتين ، على التوالي . ثم ينخفض بعد ذلك ، لذا تم اعتماد هذه النتيجة و تم استخدام اللقاح المذكور في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

استعملت تراكيز مختلفة من اللقاح في دراسات عديدة ، فقد استعمل Lin et al.(1976) ١٠ بوغ/مل لإنتاج حامض الكوجيك من الفطر *A. parasiticus* UNBF A12 ، أما Wei et al.(1991) فقد استعمل ١,٤ × ١٠^٧ بوغ/مل لإنتاج الحامض من الفطر *A. candidus* ATCC 44054 ، فسي حين كان تراكيز اللقاح المستعملة لإنتاج الحامض من الفطر *A. flavus* هي (١٢ × ١٠^٩ و ٣,٥ × ١٠^٤ و ٣ × ١٠^٨ و ١ × ١٠^٥) بوغ/مل في الدراسات التي قام بها كل من Ariff et al.(1997) و Rosfarizan et al.(2000) و Rosfarizan(2002) و Rosfarizan & Ariff(2006) ، على التوالي. أما El-Aasar(2006) فقد استعمل حجم لقاح 10 بوغ/مل من الفطر *A. parasiticus* لإنتاج حامض الكوجيك .



الشكل (١١): تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٤ *A. fumigatus*



الشكل (١٢): تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض الكوجيك من العزلة ٢٩ *A. flavus*

المصادر

- الخفاجي ، زهرة محمود. (١٩٩٠). التقنية الحيوية. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي/جامعة بغداد. مطابع دار الحكمة للطباعة و النشر.
- الدعي ، علاء عبد الحسين.(٢٠١٣). إنتاج و تنقية حامض الكوجيك من عزلة فطرية محلية . اطروحة دكتوراه . كلية التربية- جامعة القادسية.
- Abubaker**, H.O. ; Sulieman, A.M. and Elamin, H.(2012). Utilization of *Schizosacchaomyces pombe* for production of ethanol from cane molasses. J. Microbiology research, 2(2): 36-40.
- Alil**, H.K.Q. and Zulkali, M.M.D.(2011). Utilization of Agro-Residual Ligno-Cellulosic substances by using solid state fermentation: A review. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 6(1-2): 5-12.
- Ariff**, A.B. ; Rosfarizan, M. ; Heng, L.S. ; Madihah, S. and Karim, M.(1997). Kinetics and modeling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in batch fermentation and resuspended cell mycelial. World J. Microbiology and Biotechnology. 13: 195-201.
- Ariff**, A.B. ; Salleh, M.S. ; Ghani, B. ; Hassan, M.A. ; Rusul, G. and 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.
- Basappa** , S.C. ; Sreenivasamurthy , V. and 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.
- 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.
- 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.
- Demain**, A. and Dana, C.A.(2007). The business of biotechnology. Industrial Biotechnology J. 3(3): 269-283.
- El-Asar**, S.A.(2006). Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus* . International J. of Agriculture and Biology. 8(4): 468-473.
- Gad**, A.S. (2003). Modification of molasses for kojic acid production by *Aspergillus parasiticus* . N. Egyptian. J. Microbiology. 5: 14-26.

- 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.
- Jimbow** K. and Minamitsuji Y. (2001). Topical therapies for melisma and disorders of hyperpigmentation. Dermatologic Therapy J. 14 (1) :35-45.
- 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.
- Kayahara** H. ; Shibata N. ; Tadasa K. ; Maeda H. ; Kotani T. and Ichimoto I. (1990). Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. Agricultural and Biological Chemistry J. 54(9): 2422-2441.
- Kwak** , M.Y. and Rhee , J.S.(1992). Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate-immobilized fungal cells. Applied Microbial Biotechnology J. 36(5): 578-583.
- Lekha**, P.K. and Lonsane, B.K.(1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. Advance Applied Microbiology, 44: 215-260.
- 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.
- Makio**, K.(1967). Studies on kojic acid fermentation (I) Cultural condition in submerged culture. J. Fermentation Technology 45(12): 1101-1107.
- Megalla**, S.E. ; Nassar, A.Y. and Gohar, M.A.S.(1987). The role of copper (I) nicotinic acid complex on kojic acid biosynthesis by *Aspergillus flavus*. Basic Microbiology J. 27: 29-33.
- Miller**, G.L.(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemistry J. 31(3): 426-429.
- Olbrich**, H.(1963). The molasses. Publish by Biotechnologie-Kempe GmbH(2006).
- Rosfarizan**, M. ; Ariff, A.B. ; Hassan, M.A. ; Karim, M.I.A. ; Shimizu, H. and Shioya, S.(2002). Important of carbon source feeding and pH control strategies for maximum kojic acid production from sago starch by *A. flavus*. Biosciences Bioengineering J. 94(2): 99-105.
- Rosfarizan**, M. ; Ariff, A.B. ; Hassan, M.A. and Karim, M.I.(2000). Influence of pH on kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus*. Pakistan J. Biological Sciences. 3(6): 977-982.
- Rosfarizan**, M. ; Mohamad, M.S. ; Suhaili N. ; Saleh M.M. and Ariff A.B. (2010). Kojic acid : Applications and development of fermentation process for production. Biotech. and Mol. Bio. J. 5(2): 24-37.
- Rosfarizan**, M. and Ariff, A.B.(2006). Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* Link S44-1 using Sucrose as a carbon source under different pH conditions. Biotechnology and Bioprocess Engineering J. 11(1): 72-79.
- Saleh**, R.M. ; Kabli, S.A. ; Al-Garni, S.M. and Mohamed, S.A.(2011). Screening and production of antibacterial compound from *Trichoderma* spp. against human-pathogenic bacteria. African J. of Microbiology research. 5(13): 1619-1628.
- Son** S.M. ; Moon K.D. and Lee C.Y.(2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. Food Chemistry J. 73(1): 23-30.
- Stanbury** P.F. and Whitaker, A. (1984). Microbial growth kinetics . In: Principles of fermentation technology. 1st ed. Pergamon Press, New York, Oxford, 11-24
- Wan**, H.M. ; Chen, C.C. ; Giridhar, R. and Chang, T.S.(2005). Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. J. Ind. Microbiology Biotechnology. 32: 227-233.
- Wei**, C.I. ; Huang, T.S. ; Chen, J.S. ; Marshall, M.R. and Chung, K.T.(1991). Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media. J. Food Prot. 54: 546-548.
- Wood**, B.J.B.(1998). Microbiology of Fermented Food (2nd Edition).