Screening of local fungal isolates and optimization environmental conditions for kojic acid production from *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*

غربلة العزلات الفطرية و تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج حامض الكوجيك من الفطرين *A.fumigatus* و *A. flavus*

*م.م. علاء عبد الحسين كريم الدعمي-جامعة كربلاء-كلية العلوم الطبية التطبيقية
أ.م.د. ماجد كاظم عبود الشبلي-جامعة القادسية-كلية التربية
أ.م.د. علي عبد الكاظم جاسم الغانمي-جامعة كربلاء-كلية العلوم
*البحث مستل من اطروحة طالب الدكتوراه علاء عبد الحسين الدعمي
المراسلات الى م.م. علاء عبد الحسين الدعمي

الخلاصة

تم غربلة 31 عزلة فطرية عائدة لانواع الجنسين الـ*Aspergillus* والـ *Penicillium* ، و وجد أن العزلتان المحليتان*Aspergillus fumigatus*24 و*A. flavus*29 كانتا أكفأ العزلات في إنتاج حامض الكوجيك ، كما درست الظروف البيئية لإنتاج الحامض من العزلتين وأوضحت النتائج أن استخدام طريقة النمو الساكنة بدرجة حرارة(35 و 30)° م لمدة (18 و 20) يوما كانت أفضل الظروف للحصول على أعلى انتاج للحامض من العزلتين المذكورتين، على التوالي.

Abstract

Thirty one fungal isolates belong to the two genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The two local fungal isolates *Aspergillus fumigatus*24 and *A.flavus*29 were chosen as the most efficient two isolates for kojic acid(KA) producrion. The environmental conditions for kojic acid production from *Aspergillus fumigatus*24 and *A.flavus*29 were studied and the results showed that incubation in static conditions at (35 and 30)℃ for (18 and 20)days gave the highest production of (KA), respectively.

المقدمة (Introduction)

تحتل الأحماض العضوية التصنيف الثالث في قائمة سوق المنتجات التخمرية بعد المضادات الحيوية و الحوامض الأمينية. تشتمل هذه الأحماض بالدرجة الرئيسة على الستريك (Citric acid) و الكلوكونيك (Gluconic acid) و الايتاكونيك (Itaconic acid) و الكوجيك (Kojic acid) (**1**).

و قد تطور السوق العالمي لحامض الكوجيك منذ عام 1955 بعدما أعلن Charles Pfizer و شركته الامريكية عن أول محاولة لتصنيع هذا الحامض العضوي و حصلت الشركة آنذاك على براءة اختراع في طرق انتاجه و تحضير مشتقاته . و تزايد الطلب على هذا الحامض بشكل كبير على أثر تزايد و تنوع الصناعات المرتبطة بتطبيقاته و خصوصا في صناعة مواد التجميل (Cosmetic)(**2**) و تثبيط فعالية انزيم التايروسينيز(**3**) و استعمالاته في المواد المضافة للأغذية(**4**) و كعامل مبيض للجلد لمعالجة الكلف (Melasma)(**5**) و مضاد للأكسدة و عامل ضد الأورام(**6**) فضلا عن استخدامه كعامل حماية من الاشعة فوق البنفسجية(**7**) .

ينتج حامض الكوجيك من البكتريا و الفطريات ، اذ يقتصر انتاجه من البكتريا على جنسي *Acetobacter* و *Gloconoacetobacter* و بكميات محدودة ، بينما احتلت الفطريات الصدارة في انتاج الحامض على المستوى الصناعي و خصوصا جنس الـ *Aspergillus* الذي يضم عدة أنواع تعد الحجر الاساس في انتاج الحامض و بكميات غزيرة. و يعد الفطر *A.flavus* أحد الانواع المشار اليها اذ تميز بتحويل الكلوكوز الى الحامض بكفاءة عالية تتراوح بين (70-90)% (**8**) ، كما تميزت بعض سلالات هذا الفطر بإنتاجها لسموم Aflatoxins بالدرجة الرئيسة فضلا عن انتاج بعض مركبات الايض الثانوي الاخرى ذات الطبيعة السامة ايضا(**9**) .

و نظرا لما يمتلكه حامض الكوجيك من أهمية تطبيقية لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى انتاج الحامض بكفاءة من عزلة فطرية محلية عبر تحقيق المحاور الآتية :

1- غربلة بعض العزلات الفطرية المحلية لتحديد الأكفأ منها في انتاج حامض الكوجيك.
2- تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج الحامض من العزلتين المنتخبتين .

المواد و طرائق العمل

اختيار العزلة الفطرية المناسبة

تم الحصول على 31 عزلة فطرية تعود لأنواع مختلفة من جنسي الـ *Aspergillus* و الـ *Penicillium* من قسم علوم الحياة في كلية العلوم / جامعة كربلاء ، اذ تم التحري عن حامض الكوجيك في هذه العزلات لتحديد الأكفأ منها في انتاجه، و نشطت هذه العزلات على طبق بتري يحتوي على اكار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة 28 مْ لمدة (7-10)أيام.

استخدم الوسط الموصوف من قبل(**10**) لغربلة العزلات الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة لإنتاج الحامض . يتكون هذا الوسط من 5% كلوكوز و 0.5 % مستخلص الخميرة (Yeast extract) 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 (بقطر 7 ملم) من كل عزلة فطرية نامية على وسط PDA الى دورق الوسط الإنتاجي(كلا على انفراد و بواقع دورقين لكل عزلة) و تم الحضن في الحاضنة الساكنة بدرجة حرارة 30 مْ لمدة عشرة أيام . و بعد انتهاء مدة الحضن تم طرد النماذج مركزيا بسرعة 5000 دورة /دقيقة لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي استخدم في تقدير كمية حامض الكوجيك و السكريات المختزلة المتبقية.

تقدير حامض الكوجيك

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(**11**) في تقدير كمية حامض الكوجيك و اعتمادا على المنحنى القياسي لحامض الكوجيك، و ذلك بمزج 1مل من راشح المزرعة الفطرية مع 2.5مل من محلول حامض الهيدروكلوريك 0.1 M و 0.2مل من كلوريد الحديديك M0.2 في انابيب اختبار و رجت جيدا ثم تمت قراءة الامتصاص على 500نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

تقدير السكريات المختزلة

قدرت السكريات المختزلة في وسط الانتاج بالطريقة الموصوفة من قبل(**12**) و اعتمادا على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل.

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج حامض الكوجيك من العزلتين المنتخبتين

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في انتاج حامض الكوجيك من العزلتين المنتخبتين على الوسط الموصوف من قبل(**13**) و المكون من المولاس بتركيز 4.2% و 0.1%من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و 0.05%من كبريتات المغنيسيوم سباعية جزيء الماء $MgSO_4.7H_2O$ المدعم بـ(0.25 و 0.1)%كبريتات الأمونيوم وبرقم هيدروجيني (6 و 4.5)للعزلتين، على التوالي. و اشتملت هذه العوامل على :

تأثير طريقة الحضن:

تم تنمية العزلتين المنتخبتين بنوعين من طرائق الحضن هما الحاضنة الساكنة و الحاضنة الهزازة بسرعة رج 100 دورة /دقيقة و ذلك لتحديد طريقة النمو الأفضل لانتاج حامض الكوجيك.

تأثير درجة الحرارة:

درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الانتاج الملقح بأبواغ العزلتين المنتخبتين على درجات حرارة(20 و25 و30 و35 و40)مْ.

تأثير مدة الحضن:

تم متابعة انتاج حامض الكوجيك من العزلتين المنتخبتين و تقدير السكريات المختزلة لكل عزلة يوميا و لمدة 24 يوم متتالية.

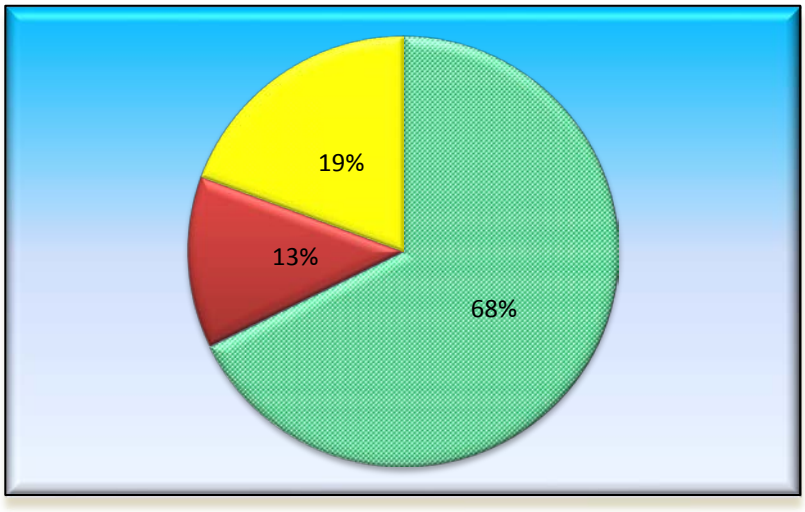
النتائج و المناقشة

غربلة العزلات الفطرية لانتاج حامض الكوجيك

تم استخدام 31 عزلة فطرية محلية عائدة للجنسين *Aspergillus* و *Penicillum* لاختبار قابليتها في انتاج حامض الكوجيك. و قد اظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) أن لجميع العزلات الفطرية المختبرة القابلية على انتاج الحامض و لكن بدرجات متفاوتة، اذ يلاحظ من الشكل 1 أنّ 67.74 % من العزلات الفطرية أظهرت قابلية ضعيفة في انتاج الحامض (دون 1 غم/لتر) اشتملت هذه العزلات على *A.terrus* 1 و 27 و 30 و *A. parasiticus* 3 و 10 و*A.tamari*4 و *A.oryzae*5 و *A. candidus*6 و *A.ustus*9 و .*A.spp*11 و 12 و 26 و *P.chrysogenus* 13و 21 و*P.*sp17 و *P. herquei*19 و *P.lanosco-coeruleum*20 و *A.niger* 14 و 15 و 22.

بينما أظهرت 12.9% من العزلات قابلية متوسطة في انتاج الحامض اشتملت هذه العزلات على *A. flavus* 2 و 18 و 31 و *A. nidulas*16 . في حين أظهرت 19.35% من العزلات قابلية عالية في انتاج الحامض اشتملت هذه العزلات على *A. flavus* 7 و 8 و 28 و 29 و *A. fumigatus*24 و *A. parasiticus*25 .

كما يتضح من النتائج عموما تفوق الفطر *A. flavus* في انتاجه للحامض ، اذ بلغت نسبة عزلات هذا النوع 66.7 % من العزلات الفطرية المتميزة بإنتاج عالي . و في ضوء النتائج أعلاه فقد وقع الاختيار على العزلتين *A.fumigatus*24 و *A.flavus*29 و تم استخدامهما في دراسات الانتاج اللاحقة جميعها.



الشكل (1): النسب المئوية للعزلات الفطرية المدروسة موزعة حسب قابليتها لإنتاج حامض الكوجيك

جدول(1): غربلة العزلات الفطرية المدروسة لإنتاج حامض الكوجيك

العزلة	الفطر	pH للوسط بعد التخمير	تركيز السكريات المختزلة ملغم/مل	تركيز حامض الكوجيك غم/لتر
Control	الوسط بدون تلقيح	5.00	49.35	0.00
1	Aspergillus terrus	4.41	1.67	0.081
2	Aspergillus flavus	3.13	4.23	6.941
3	Aspergillus parasiticus	5.54	37.91	0.101
4	Aspergillus tamari	5.70	30.69	0.089
5	Aspergillus oryzae	5.75	14.05	0.061
6	Aspergillus candidus	5.21	0.094	0.079
7	Aspergillus flavus	5.60	3.65	10.27
8	Aspergillus flavus	3.41	6.83	9.604
9	Aspergillus ustus	2.44	14.20	0.043
10	Aspergillus parasiticus	5.83	11.26	0.076
11	Aspergillus sp.	1.95	6.77	0.020
12	Aspergillus sp.	1.81	0.19	0.048
13	Penicillium chrysogenus	2.51	0.094	0.128
14	Aspergillus niger	2.63	17.49	0.022
15	Aspergillus niger	2.09	0.068	0.024
16	Aspergillus nidulus	5.15	0.53	5.77
17	Penicillium sp.	2.75	0.46	0.201
18	Aspergillus flavus	4.68	0.93	3.9
19	Penicillium herquei	4.03	0.028	0.029
20	Penicillium lanosco-coeruleum	4.44	0.45	0.095
21	Penicillium chrysogenum	3.23	3.79	0.261
22	Aspergillus niger	1.76	10.11	0.015
23	Aspergillus terrus	4.76	0.45	0.055
24	Aspergillus fumigatus	3.37	8.55	10.98
25	Aspergillus parasiticus	4.94	4.15	10.41
26	Aspergillus sp.	4.09	0.17	0.13
27	Aspergillus terrus	5.68	0.39	0.063
28	Aspergillus flavus	4.86	0.82	10.39
29	Aspergillus flavus	4.83	0.23	11.87
30	Aspergillus terrus	5.71	0.16	0.089
31	Aspergillus flavus	5.50	0.31	2.99

تمت غربلة العزلات الفطرية و اختيار الأكفأ لإنتاج حامض الكوجيك في العديد من الدراسات ففي دراسة حديثة لـ 20 عزلة فطرية تعود الى أجناس الـ *Aspergillus* و الـ *Mucor* و الـ *Rhizopus*أظهرت النتائج بأن العزلتين *A. oryzae* var *effuses* NRC14 و الـ *A. flavus* NRC13 هما الأكثر انتاجا من بين العزلات المدروسة اذ بلغت كمية الحامض المنتجة (42 و 41) غم/لتر على التوالي(**14**) ، بينما قام(**15**) بغربلة 6 أنواع من جنس الـ *Trichoderma* اشتملت على *T. harzianum* و *T. viride* و *T. reesei* و *T. psudokoningii* و *T. virens* و *T. v6* ، و لوحظ تفوق الفطر *T. reesei* بكمية حامض منتجة مقدارها 16 ملغم/مل ، يليه الفطر *T.viride* بكمية منتجة مقدارها 12 ملغم/مل . و تشير هـذه النتيجة الى أنّ انتـاج حـامض الكـوجيك لا يقتصر فقط على جنسي الـ *Aspergillus*و الـ *Penicillium* بل يمكن انتاجه حتى من الأنواع العائدة للفطر *Trichoderma* spp. .

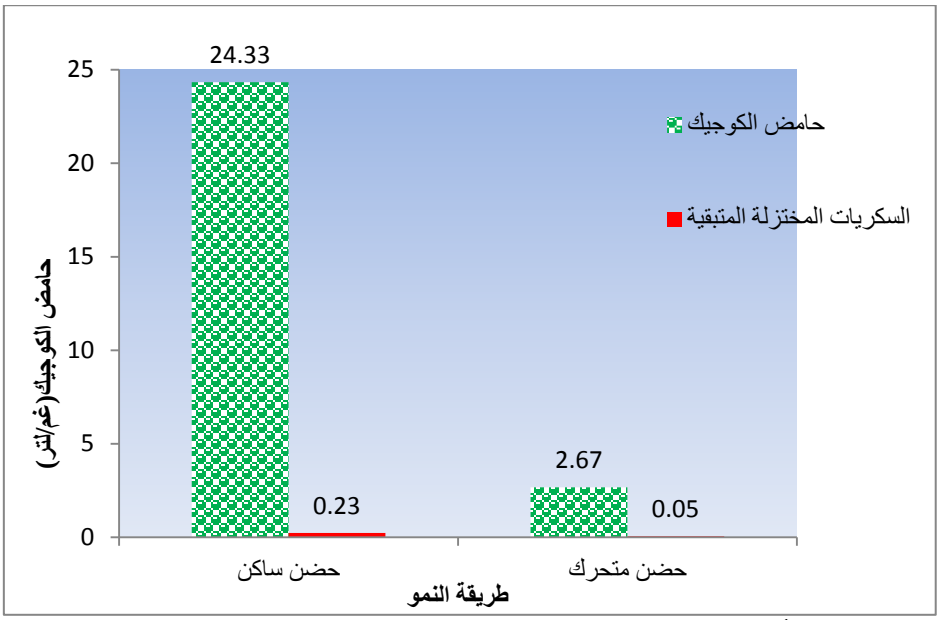
تعد عملية الغربلة مهمة جدا لكونها تسمح بفرز اضافي لتلك الأحياء التي لها قيمة حقيقية في العمليات الصناعية ونبذ تلك التي تنقصها هذه الامكانية (**16**).

تحديد الظروف البيئية المثلى لانتاج حامض الكوجيك من العزلتين *A.fumigatus*24 و *A.flavus*29 .

1- طريقة الحضن:

قورن انتاج حامض الكوجيك من العزلتين *A.fumigatus*24 و *A. flavus*29 باستعمال حالتين من الحضن و هما الحضن تحت الظروف الساكنة و الحضن تحت الظروف المهتزة ، بينت النتائج الموضحة في الشكلين **2** و **3** أنّ أقصى انتاج من الحامض كان باستعمال ظروف الحضن الساكنة اذ بلغت كمية الحامض المنتجة (24.33 و 17.2) غم/لتر من العزلتين *A.fumigatus*24 و *A. flavus*29 ، على التوالي مقارنة بكمية الحامض المنتجة عند ظروف الحضن المهتزة و التي بلغت (2.67 و 16.13)غم/لتر من العزلتين المشار اليهما ، على التوالي ايضا . و اعتمادا على هذه النتائج فقد تم انتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة تحت الظروف الساكنة في مراحل الدراسة اللاحقة.

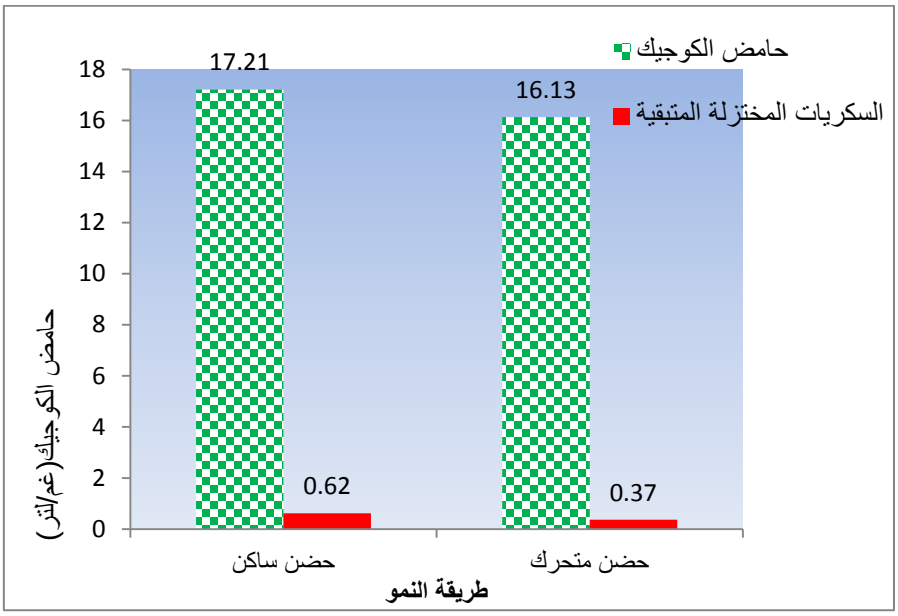
تتفق النتائج نوعا ما مع ما توصل اليه(**17**) الذي وجد أنّ كمية حامض الكوجيك المنتجة من الفطر *A. candidus* بلغت 39 ملغم/مل باستخدام طريقة النمو الساكنة في حين بلغت تلك الكمية 24 ملغم/مل باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج 100 دورة/دقيقة. كما تتفق أيضا مع ما أشار اليه(**18**) من أنّ طريقة النمو الساكنة كانت سريعة و مؤثرة في انتاج الحامض من الفطرين *A. flavus* CCRC 30010 و *A. oryzae* CCRC 30102 . في حين لا تتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ما توصل اليه(**19**) في أنّ أقصى انتاج لحامض الكوجيك من الفطر *A. parasiticus* بلغ (30.45 و 34.38)غم/لتر .باستخدام طريقتي النمو الساكنة و المهتزة ، على التوالي .



الشكل(2): تأثير طريقة النمو في انتاج حامض الكوجيك من العزلة 24 *A . fumigatus*

أوضح(**10**) أنّ شد الأوكسجين المذاب (DOT)(Dissolved Oxygen Tension) يجب أن يتم السيطرة عليه بمستوى تشبع عالي (80% تشبع) خلال طور النمو الفعّال يتبع ذلك خفض مستواه الى 30 % تشبع خلال طور الانتاج . و تم تفسير ذلك بأنّ مستوى التشبع العالي مطلوب لتحفيز انتاج الانزيمات المسؤولة عن تصنيع حامض الكوجيك ، اذ يتحول الكلوكوز الى حامض الكوجيك بوساطة الانزيمات المرتبطة بالخلية خلال طور الانتاج . أمّا خفض مستوى التشبع الى 30 % فهو ضروري خلال طور الانتاج لتجنب تحطم حامض الكوجيك الى مركبات اخرى .

و مما تجدر الاشارة اليه أنّ دورق المزرعة الساكنة يوفر عددا غير محدد تقريبا من ظروف التخمر المتغيرة تتفاوت بين غزارة المواد المغذية الى النقص في المواد المغذية و بين تجهيز وفير للأوكسجين الى تعايش لا هوائي (Anaerobiosis) جزئي (**16**).

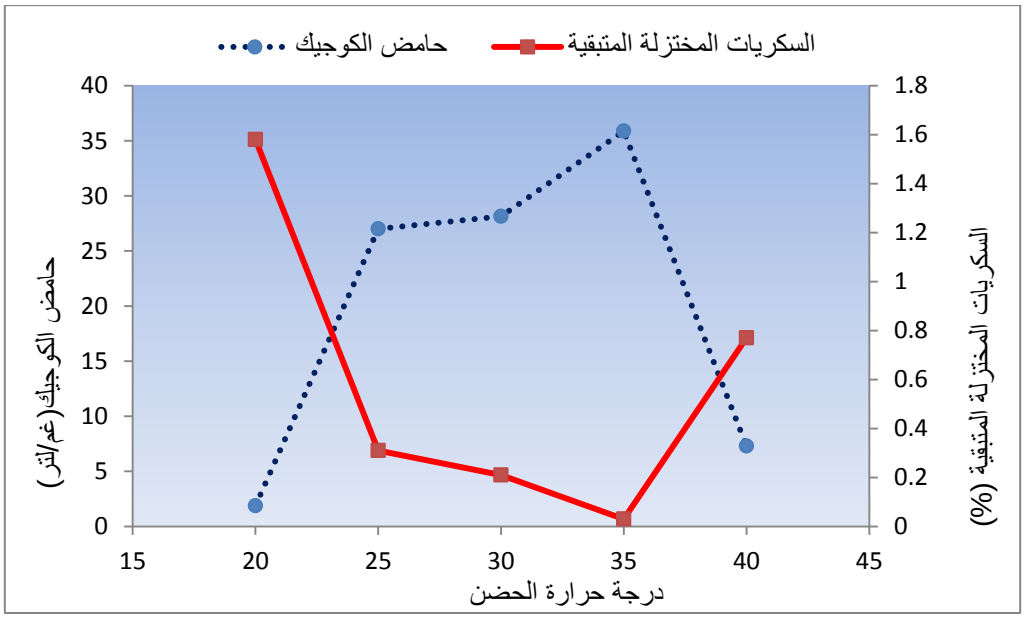


الشكل(3): تأثير طريقة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A . flavus*29

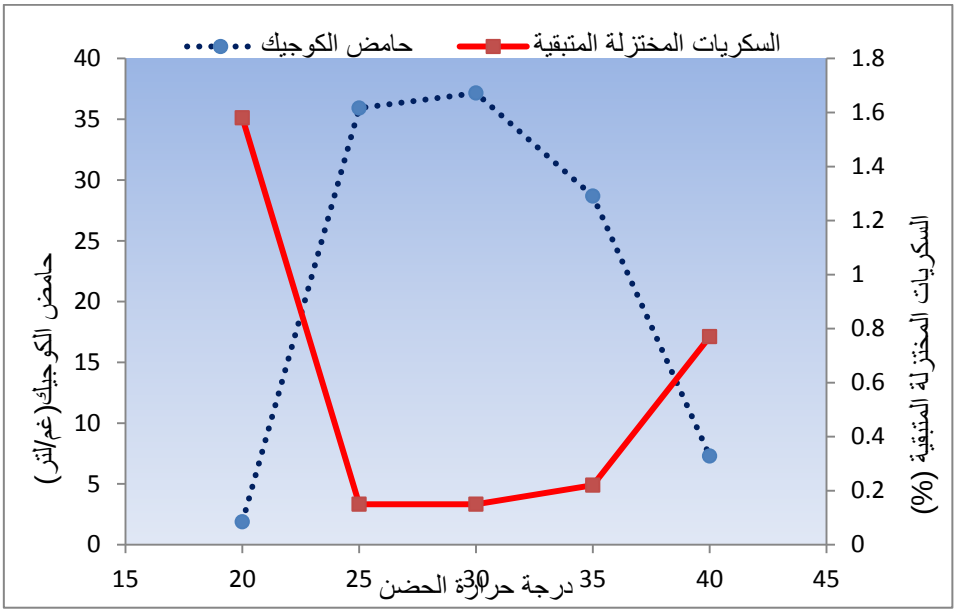
2-تأثير درجة حرارة الحضن:

درس تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلتين *A.fumigatus*24 و *A.flavus*29 و أظهرت النتائج المبينة في الشكل 4 أنّ أعلى انتاج للحامض من العزلة *A. fumigatus*24 تحقق باستخدام درجة الحرارة 35 مْئوية اذ بلغت كمية الحامض 35.88 غم/لتر ، أمّا بالنسبة للعزلة *A.flavus*29 فأن النتائج الموضحة بالشكل 5 أظهرت بأن أعلى انتاج للحامض تحقق باستخدام درجة الحرارة 30 مْئوية اذ بلغت كمية انتاج الحامض 37.16 غم/لتر ، لذا تم استخدام درجة الحضن المثلى المذكورة لكل عزلة في مراحل الدراسة اللاحقة.

تعد درجة الحرارة المثلى لإنتاج حامض الكوجيك من العزلة *A. fumigatus*24 عالية نوعا ما مقارنة بما ورد في العديد من الدراسات و التي أشارت بأنّ درجة الحرارة 30 مْ هي المثلى لانتاج الحامض من العديد من الفطريات . بينما كانت درجة الحرارة المثلى لإنتاج الحامض من الفطر *A. flavus*29 مماثلة لما ورد في دراسات كثيرة ، اذ كانت درجة الحرارة 30 مْ هي المثلى للإنتاج من الفطر *A. flavus* (**20** و **21** و **22**) ، في حين اختلفت النتيجة المستحصل عليها في هذه الدراسة مع ما توصل اليه(**18**) و(**19**) اذ بلغت درجة الحرارة المثلى لإنتاج الحامض من الفطرين *A. flavus* CCRC30010 و *A.parasiticus* (25 و 28) مْ ، على التوالي .



الشكل (4): تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A.fumigatus*24



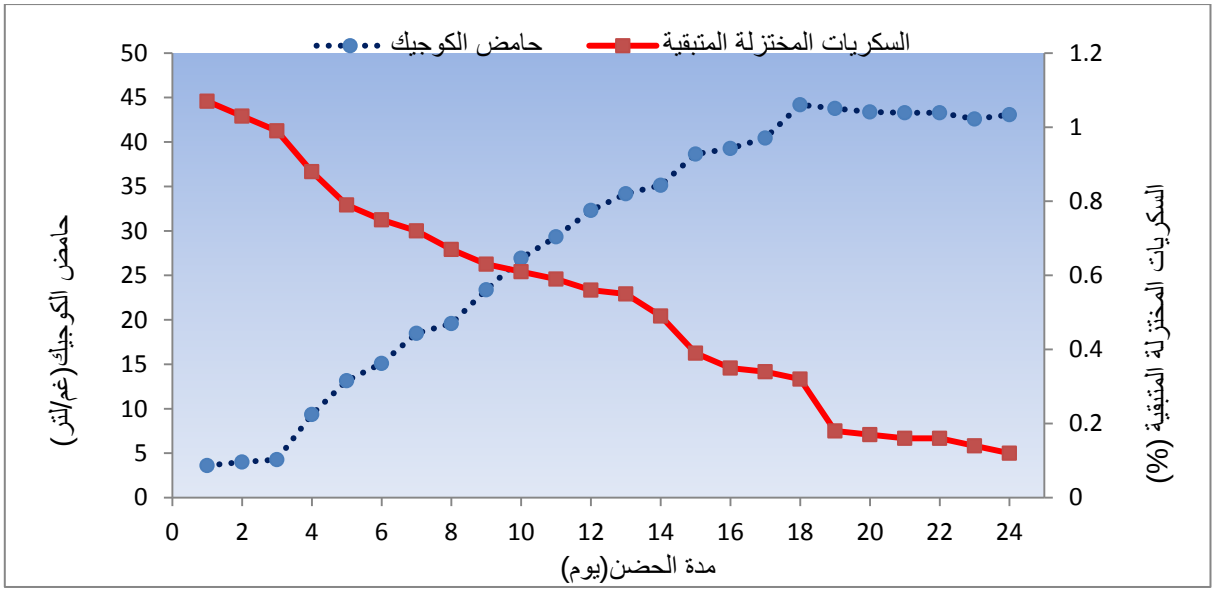
الشكل (5): تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A . flavus*29

3-تأثير مدة الحضن:

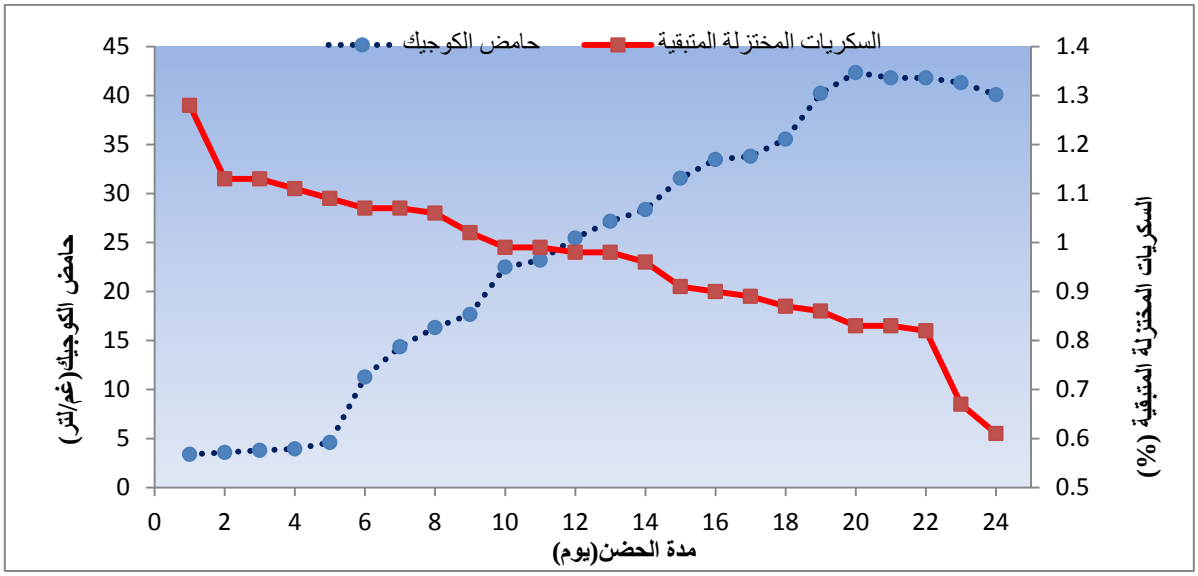
تمت متابعة انتاج حامض الكوجيك من العزلتين قيد الدراسة بمتابعة انتاج الحامض يوميا و لمدة 24 يوما متتالية ، و قد بينت النتائج الموضحة بالشكل 6 أنّ أقصى انتاج للحامض من العزلة *A.fumigatum*24 قد تحقق بعد 18 يوم من الحضن اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 44.18 غم/لتر ، فيما كانت مدة الحضن 20 يوم هي المثلى لإنتاج الحامض من العزلة *A. flavus*29 اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 42.34 غم/لتر (الشكل 7).

ان نتائج هذه الدراسة تتفق مع ما توصل اليه(22) من أنّ مدة حضن 20 يوم هي المثلى لإنتاج الحامض من الفطر *A. flavus* اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 19.2 غم/لتر . و كذلك اتفقت النتائج نوعا ما مع أقصى انتاج للحامض من الفطر *A. candidus* و التي كانت ما بين (18 – 24) يوم عند الحضن في الحاضنة الهزازة(**17**).

تباينت المدد اللازمة للحصول على أقصى انتاج لحامض الكوجيك من الفطريات فقد كانت مدة 11 يوم كافية للحصول على أقصى انتاج للحامض من الفطرين *A.flavus* CCRC30010 و *A.oryzae* CCRC 30102 (**18**) ، كما كانت مدة 12 يوم هي المثلى للحصول على أقصى انتاج للحامض من الفطر *A. parasiticus* اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 30.45 غم/لتر(**19**) ، في حين اقتصرت مدة الحضن على 4 أيام للحصول على أعلى انتاج للحامض من الفطر *A. flavus* (**23**) .



الشكل (6): تأثير مدة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة 24 *A . fumigatus*



الشكل (7): تأثير مدة الحضن في انتاج حامض الكوجيك من العزلة *A . flavus 29*

المصادر

1- **Ramachandran,** S. ; Fontanille, P. ; Pandey, A. and Larroche, C.(2006). Gluconic acid: Properties, Applications and Microbial Production. Food. Tech. Biotech. J. 44(2): 185-195.

2- **Brtko** J. ; Rondahl L. ; Fickova M. ; Hudecova D. ; Eybl V. and Uher M.(2004). Kojic acid and its derivatives : history and present state of art. Cent. Eur. J. Publ. Health 12 : 16-18.

3- **Chang** , T. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. Int. J. Mole. Scien. 10(6): 2440-2475.

4- **Blumenthal** C.Z.(2004).Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger* , *Aspergillus oryzae* and *Trichiderma reesei* : Justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Reg. Toxi. Pharm. J. 39: 214-228.

5- **Mi Ha,** Y.M. ; Chung, S.W. ; Song, S. ; Lee, H. and Chung, H.Y.(2007). 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1, 3-bezendiol: a potent new tyrosinase inhibitor. Biol. Pharm. Bull. J. 30: 1711-1715.

6- **Moto,** M. ; Mori, T. ; Okamura, M. ; Kashida, Y. and Mitsumori, K.(2006). Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. Arch. Toxicol. J. 80: 299-304.

7- **Emami,** S. ; Hosseinimehr, S.J. ; Taghdisi, S.M. and Akhlaghpoor, S. (2007). Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 45-48.

8- **الخفاجي** ، زهرة محمود. (1990). التقنية الحيوية. وزارة التعليم العالي و البحث العلمي/جامعة بغداد. مطابع دار الحكمة للطباعة و النشر.

9- **Guo** B. ; Yu J. ; Holbrook C.C. ; Cleveland T.E. ; Nierman W.C. and Scully B.T.(2009). Strategies in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. Peanut Scie. J. 36: 11-20.

10- **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. Enzy. and Micro. Tech. J. 19(7): 545-550.

11- **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.

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

13- **الدعمي** ، علاء عبد الحسين كريم.(2013). انتاج و تنقية حامض الكوجيك من عزلة فطرية محلية. اطروحة دكتوراه قيد المناقشة، كلية التربية، جامعة القادسية.142.

14- **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. App. Scien. Res. 9(3): 1714-1723.

15- **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. Micro. Res. 5(13): 1619-1628.

16- **ساجدي ,** عادل جورج وعلي , علاء يحيى محمد .(1987) . أساسيات التخمرات الصناعية الجزء الأول . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة البصرة . مطبعة جامعة البصرة.

17- **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.

18- **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.

19- **El-Aasar,** S.A.(2006). Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus* . Intern. J. Agricul. Bio. 8(4): 468-473.

20- **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.

21- **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. Bio. Scien. 3(6): 977-982.

22- **Rosfarizan,** M. ; Madihah, S. and Ariff, A.B.(1998). Isolation of a kojic acid producing fungus capable of using starches as a carbon source. Lett. App. Micro. 26: 27-30.

23- **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.