

تأثیر عوامل pH و دما بر روی رشد دو گونه از قارچ *Monascus*

حمداالله نادری بروجنی*، ایرج نحوی*، شهلا شادزی** و زهرا اعتمادیفار*

* گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان

** گروه قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

چکیده

Monascus یک قارچ میکروسکوپی با کاربردهای مختلف صنعتی از جمله تولید پیگمان های غذایی و داروی کاهش دهنده کلسترول است. با توجه به اینکه به تازگی در ایران دو گونه از این قارچ بنام های *M. purpureus* و *M. fumeus* توسط نگارندگان این مقاله جداسازی و شناسایی گردید، به منظور تعیین شرایط بهینه رشد، اثر دما و pH روی رشد این دو گونه با روش کشت در محیط جامد و اندازه گیری قطر کلنی در چهار دمای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد و در pH های ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ بررسی گردید. نتایج بدست آمده از اندازه گیری قطر کلنی ها به کمک نرم افزار آماری SPSS تحلیل گردید و دما و pH مناسب برای رشد هر کدام مشخص شد. یافته های این تحقیق نشان می دهد که برای گونه *M. purpureus* دمای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد با pH های ۴ تا ۵ رشد بهتری را ایجاد نموده و برای گونه *M. fumeus* دمای ۳۰ تا ۳۵ با pH های ۴ تا ۵/۵ رشد بیشتری را القاء می نمایند. واژه های کلیدی: *Monascus purpureus*، *Monascus fumeus*، دما، pH.

Evaluation of pH and Temperature Effects on Growth of two *Monascus* Species

H. Naderi Boroujeni*, I. Nahvi*, S. Shadzi** and Z. Etemadifar*

* Biology Department, The University of Isfahan

** Department of Mycology, University of Medical Sciences, Isfahan

Abstract

Monascus is a microscopic fungus with extensive industrial applications such as production of food-grade pigments and cholesterol-lowering drugs. The isolation and identification of *M. purpureus* and *M. fumeus* have been carried out for the first time in Iran by authors. In order to determine the optimal temperature and pH for the growth of the fungi they were cultured on MEPAG culture medium with 4 different temperatures (25, 30, 35 and 40°C) and 5 different pH (4, 4.5, 5, 5.5 and 6) thereafter colonies diameter was measured. The data were analysed by SPSS statistical software and the optimum temperature and pH for colonies growth were determined. The data analyses showed that the optimal temperature range for the species *M. purpureus* is 30 to 35°C and optimum pH is 4 to 5. For the species *M. fumeus* the optimum temperature is 30 to 35°C and optimum pH is 4 to 5.5.

Keywords: *Monascus.purpureus*, *Monascus.fumeus*, pH, temperature.

مقدمه

Red yeast rice یا Red mould می گویند) بکار رفته است (۱۱).

از عوامل مؤثر در رشد و تولید متابولیت‌ها در این قارچ می‌توان به دما (۳ و ۹)، نور (۶)، اسیدیته (۱۰، ۸، ۳، ۴ و ۷)، فعالیت آبی (۱۰ و ۷) و منابع کربن و ازت (۹، ۴ و ۱۳) اشاره نمود که در این تحقیق تأثیر عوامل pH و دما روی رشد دو گونه مذکور در محیط جامد سنجیده شده است.

مواد و روش‌ها

محیط کشت: در این تحقیق از محیط کشت MEPAG حاوی عصاره مالت ۵، پپتون ۱۰، آگار ۲۲ و گلوکز ۲۰ (g/L) استفاده شد (۹ و ۱۰) که این محیط‌های کشت با پنج pH مختلف (۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶) تهیه گردیدند.

سویه‌ها: دو سویه قارچی از دو گونه *M. purpureus* و *M. fumeus* که قبلاً توسط نگارندگان این مقاله از نشاسته جداسازی و شناسایی شده بود برای بررسی انتخاب گردیدند (۱).

روش: ابتدا با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۱/۱% توئین ۸۰ به محیط کشت جامد دو

جنس *Monascus* از شاخه *Ascomycota*، رده *Ascomycetes*، راسته *Eurotiales* و خانواده *Monascaceae* است (۴) که به عنوان تولیدکننده پیگمان‌های پلی‌کتایدی زرد و قرمز بخوبی شناخته شده و طی قرون متمادی در شرق آسیا به عنوان یک طعم‌دهنده، رنگ دهنده و نگهدارنده غذاها و نوشیدنی‌ها مورد استفاده بوده است (۹ و ۴). گونه‌ها و سویه‌های مختلفی از این جنس در صنعت مورد استفاده می‌باشند و کار روی سویه‌های جدید هنوز هم جالب توجه و مفید است (۹). این قارچ علاوه بر پیگمان که ارزش اقتصادی فراوانی داشته و جانشین مناسبی برای نیتريت و نیترات در گوشت است (۵)، متابولیت‌های با ارزش دیگری مانند *monakolin k* به عنوان یک داروی *statin* (کاهش دهنده کلسترول خون) (۴) و سیتترین به عنوان ماده ضد باکتری (۱۵، ۱۲، ۴ و ۲) و همچنین ترکیبات ضد تومور (۱۴ و ۱۱) را تولید می‌کند.

Monascus در طی قرون متمادی در آسیا (بخصوص در چین و ژاپن) برای تولید پنیر از دانه سویا، شراب قرمز برنج و برنج قرمز (برنج تخمیر شده با این قارچ که در چین به آن *Hong-qu* در ژاپن *Beni-koji* و در غرب

پس از انکوباسیون قطر کلنی ها بطور روزانه در دو جهت متفاوت اندازه گیری و میانگین آنها به میلیمتر یادداشت گردید (۹).

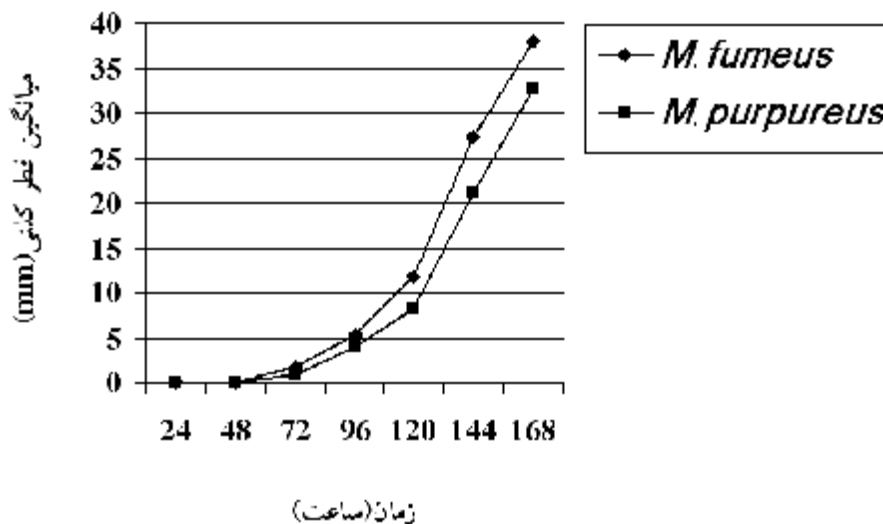
آنالیز آماری: در این تحقیق از طرح فاکتوریل استفاده شد و نتایج بدست آمده بوسیله نرم افزار SPSS و با تست آنالیز واریانس بررسی و از آزمون توکی بعنوان تست تعقیبی استفاده شد.

نتایج

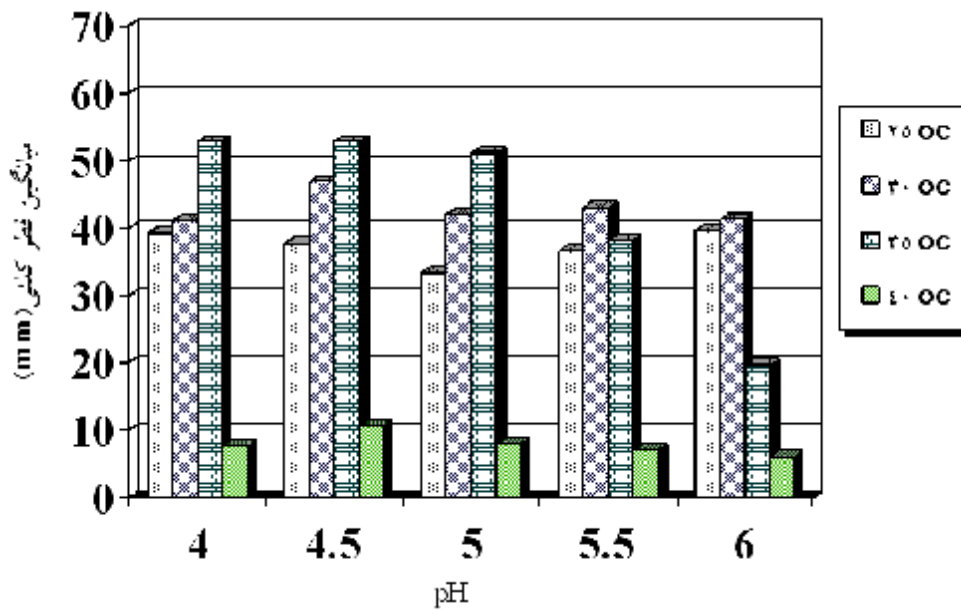
نمودار ۱ نتایج حاصل از اندازه گیری رشد کلی دو گونه را در طول زمان نشان می دهد. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر کلنی دو گونه مورد بررسی در دماها و pH های مختلف با سه تکرار در نمودارهای ۲ تا ۵ خلاصه شده است. نمودار ۲ و ۳ به ترتیب میزان رشد کلنی های *M. purpureus* و *M. fumeus* را در دماها و pH های مختلف نشان می دهد. نمودار ۴ تغییرات رشد دو گونه را نسبت به pH مقایسه می کند و نمودار ۵ این تغییرات را نسبت به دما نشان می دهد.

سویه فوق و تراشیدن آهسته کلنی به داخل این مایع، سوسپانسیونی از میسلیموم، کلیستوتشیا، و کنیدی های قارچ تهیه گردید و سپس این سوسپانسیون بوسیله شیکر تکان داده شد تا سلول ها از هم جدا گردند و بوسیله لام نئوبار تعداد سلول قارچ شمارش شده (به دلیل استفاده از تووین ۸۰، تکان دادن لوله و برداشتن از وسط لوله تنها کنیدی های تک سلولی مشاهده و شمارش گردید.) و با اضافه نمودن آب مقطر استریل تعداد سلول برای هر دو سویه به مقدار استاندارد ۱۰۶ سلول در هر میلی لیتر رسانده شد.

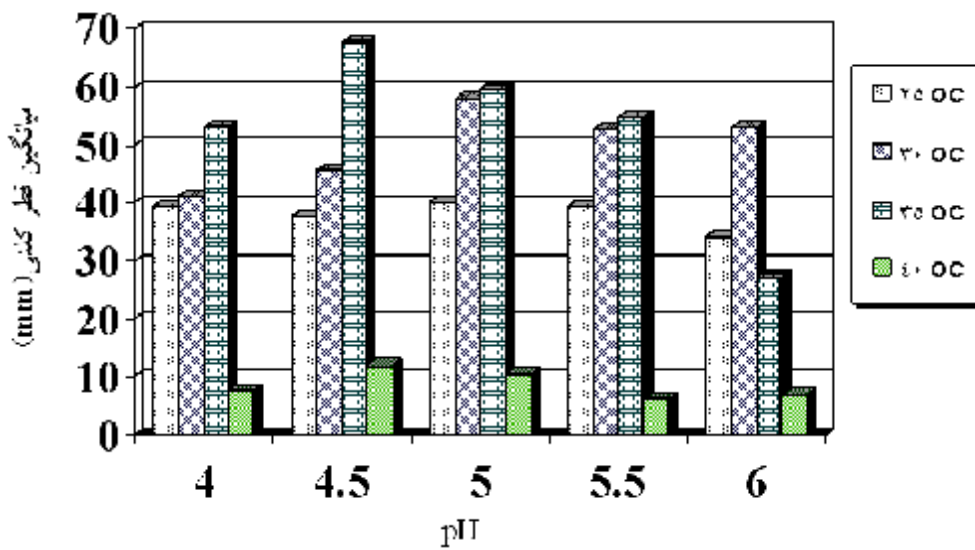
سپس این سوسپانسیون را در دمای ۴۰C برای تلقیح محیط های کشت نگهداری شد (۸ و ۱۵). تلقیح محیط های کشت به وسیله آنس کالیبره شده استریل و در مرکز هر پلیت برای چهار دمای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد و در pH های ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ (با سه تکرار و مطابق طرح فاکتوریل) به صورت خنجری انجام و پلیت ها به مدت یک هفته در دمای مربوطه انکوبه گردید (۹).



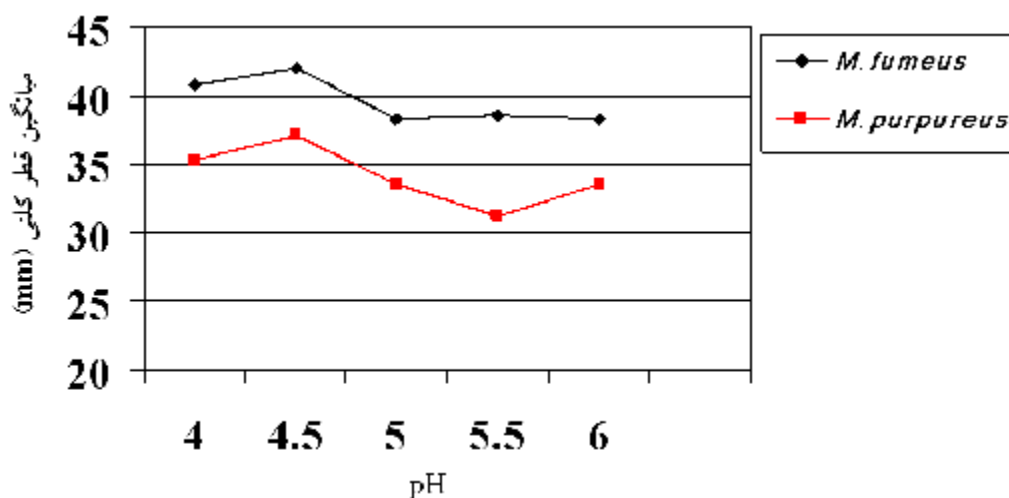
نمودار ۱: نتایج حاصل از اندازه گیری رشد کلی دو گونه در طول زمان



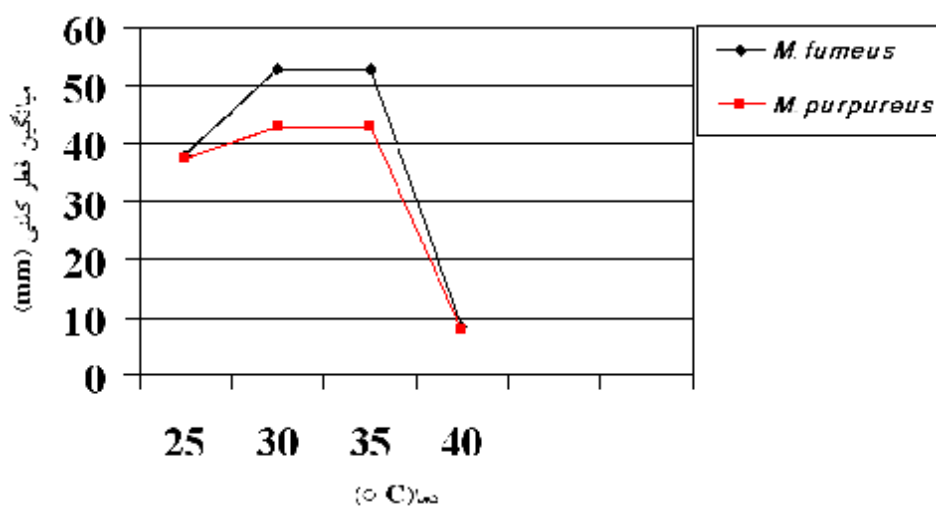
نمودار ۲: میزان رشد کلنی *M. purpureus* در pH و دماهای مختلف



نمودار ۳: میزان رشد کلنی *M. fumeus* در pH و دماهای مختلف



نمودار ۴: مقایسه تغییرات رشد دو گونه نسبت به pH.



نمودار ۵: مقایسه تغییرات رشد دو گونه نسبت به دما

آزمون توکی نشان می‌دهد که pH های ۴ و ۴/۵، ۴/۵ و ۵، ۵ و ۵/۵، ۵/۵ و ۶، ۴ و ۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نمی‌کنند اما pH های ۴ و ۵/۵، ۴ و ۶، ۴/۵ و ۵/۵، ۴/۵ و ۶، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری ایجاد می‌نمایند. بنابراین از پنج سطح pH مورد آزمایش pH های اسیدی تر رشد بهتری را ایجاد نموده‌اند. مقدار میانگین رشد به ترتیب در pH های ۴/۵، ۴، ۵، ۵/۵ و ۶ صورت گرفته است.

آزمون تحلیل واریانس برای گونه *M. purpureus* نشان می‌دهد که تغییرات رشد کلنی نسبت به هر دو عامل دما و pH معنی‌دار است و همچنین تداخل بین عوامل دما و pH نیز وجود دارد. آزمون توکی مشخص می‌کند که نتایج رشد در دماهای ۳۰°C و ۳۵°C با همدیگر تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند و سایر دماها رشد های متفاوت معنی‌داری ایجاد می‌کنند. بیشترین مقدار میانگین رشد به ترتیب در دماهای ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد است (جدول ۱). در مورد pH نیز

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر pH و دما بر روی رشد کلنی *M. purpureus* در محیط جامد

| P | F | میانگین مربعات | درجه آزادی | مجموع مربعات | منابع تغییرات |
|--------|----------|-------------------|------------|-----------------|------------------|
| ۰/۰۰۰* | ۵۳/۲۹۵ | ۸۰۰/۳۱۱ | ۱۹ | ۱۵۲۰۵/۹۱۷ | مدل تصحیح شده |
| ۰/۰۰۰* | ۴۲۴۱/۹۸۱ | ۶۳۷۰۰/۴۱۷ | ۱ | ۶۳۷۰۰/۴۱۷ | Intercept |
| ۰/۰۰۰* | ۱۳/۶۷۱ | ۲۰۵/۲۹۲ | ۴ | ۸۲۱/۱۶۷ | pH |
| ۰/۰۰۰* | ۲۷۷/۳۸۵ | ۴۱۶۵/۳۹۴ | ۳ | ۱۲۴۹۶/۱۸۳ | دما |
| ۰/۰۰۰* | ۱۰/۴۸۰ | ۱۵۷/۳۸۱ | ۱۲ | ۱۸۸۸/۵۶۷ | pH × دما |
| | | ۱۵/۰۱۷ | ۴۰ | ۶۰۰/۶۶۷ | خطا |
| | | | ۶۰ | ۷۹۵۰۷/۰۰۰ | کل |
| | | | ۵۹ | ۱۵۸۰۶/۵۸۳ | کل تصحیح شده |

* معنی دار در سطح ۵٪ ($P < ۰,۰۵$)جدول ۲: تجزیه واریانس اثر pH و دما بر روی رشد کلنی *M. fumeus* در محیط جامد

| P | F | میانگین مربعات | درجه آزادی | مجموع مربعات | منابع تغییرات |
|--------|----------|-------------------|------------|-----------------|---------------|
| ۰/۰۰۰* | ۳۴/۲۴۵ | ۱۲۰۱/۹۹۶ | ۱۹ | ۲۲۸۳۷/۹۳۳ | مدل تصحیح شده |
| ۰/۰۰۰* | ۲۴۶۴/۰۴۷ | ۸۶۴۸۸/۰۶۷ | ۱ | ۸۶۴۸۸/۰۶۷ | Intercept |
| ۰/۰۰۰* | ۷/۱۸۱ | ۲۵۲/۰۶۷ | ۴ | ۱۰۰۸/۲۶۷ | pH |
| ۰/۰۰۰* | ۱۸۷/۳۷۴ | ۶۵۴۱/۷۱۱ | ۳ | ۱۹۶۲۵/۱۳۳ | دما |
| ۰/۰۰۰* | ۵/۲۳۴ | ۱۸۳/۷۱۱ | ۱۲ | ۲۲۰۴/۵۳۳ | pH × دما |
| | | ۳۵/۱۰۰ | ۴۰ | ۱۴۰۴/۰۰۰ | خطا |
| | | | ۶۰ | ۱۱۰۷۳۰/۰۰۰ | کل |
| | | | ۵۹ | ۲۴۲۴۱/۹۳۳ | کل تصحیح شده |

* معنی دار در سطح ۵٪ ($P < ۰,۰۵$)

همکاران در سال ۲۰۰۵ که pH ایتی مم رشد را بین ۴ تا ۷ تعیین نموده‌اند مطابقت دارد (۳).

به طور کلی برای گونه *M. purpureus* دماهای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد با pH های ۴ تا ۵ رشد بهتری را القاء نموده و برای گونه *M. fumeus* دماهای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد با pH های ۴ تا ۵/۵ رشد بهتری را باعث می‌شود.

منابع

۱- نادری بروجنی ح، نحوی الف، شادزی ش، اعتمادیفر ز، جداسازی و شناسایی قارچ *Monascus* تولید کننده پیگمان. همایش میکروبیولوژی کاربردی. تیر ماه ۱۳۸۶. دانشگاه الزهراء. تهران، ۱۳۸۶.

2- A. Q. M., Al-sarrani, M. Y. M., El-naggar Application of Placket-Burman factorial design to improve citrinin production in *Monascus* rubber batch cultures. *Botanic. Stud.* 47,167-174; (2006).

3- J. C., De Carvalho, B. O., Oishi, A., Pandey, C. R., Soccol Biopigment from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Braz. Arch. Boil. Technol.* vol.48 No. 6; (2005).

4- O., Erdogru, S., Azirak Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). *Turk. Elec. J. Biotec.* 2,37-49; (2004).

5- K., Lacord, C., Chaisrisook, D. Z., Skinner Transformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMOcosX reduces fertility. *Elec. J. Biotec.* vol.6 No.2; (2003).

در مورد گونه *M. fumeus* نیز آزمون تحلیل واریانس مؤثر بودن pH و دما بر روی رشد کلنی تایید می‌کند و همچنین تداخل بین عوامل دما و pH نیز وجود دارد (جدول ۲).

آزمون توکی نشان می‌دهد که به جز دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد سایر دماها با هم اختلاف معنی‌داری در رشد ایجاد می‌کنند و این آزمون برای عامل pH اختلاف معنی‌داری بین pH ۶ با pH های دیگر را در تأثیر بر رشد این گونه مشخص کرده و نشان می‌دهد که pH بالاتر رشد کمتری را باعث می‌شود. اما بجز pH ۶ سایر pHها با همدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نمی‌کنند. ترتیب میانگین رشد در این گونه در دماهای ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۴۰ و در pH های ۴/۵، ۴، ۵/۵، ۵ و ۶ می‌باشد.

بحث

در مقایسه با تحقیقات Rasheva و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۹) که دمای ایتی مم رشد ۳۴ °C را در محیط جامد برای گونه *M. purpureus* تعیین نمود، تعیین دمای ایتی مم ۳۰-۳۵ °C در محیط جامد برای این قارچ با تحقیق فوق مطابقت دارد. در مورد pH ایتی مم برای رشد، منابع مختلف بسته به سویه‌های مورد بررسی pH های مختلفی را تعیین نموده‌اند.

در اینجا pH ایتی مم ۴ تا ۵ در محیط جامد برای رشد کلنی تعیین شد که با نتایج تحقیقات De Carvalo و

intracellular red pigments produced by *Monascus* sp. *Braz. Arch. Boil. Technol.* vol.48 No. spe; (2005).

12- T., Shimizu, H., Kinoshita, S., Ishihara, K., Sakai S., Nagai, T., Nihira Polyketide Synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *App. and Env. Microbiol.* 71(7)3453-3457; (2005).

13- Y. Y., Tseng, M. T., Chen, C. F., Lin Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *App. Microbiol.* 88(1)31-37; (2000).

14- J. J., Wang, M. J., Shieh, S. L., Kuo, C. L., Lee Effect of red mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise. *App. Microbiol. Biotechnol.* 70(2)247-253; (2006).

15- Y. Z., Ju X. L., Wang, Y. G., Zhou The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. *Food microbiol.* 22,145-148; (2005).

6- T., Miyake, A., Mori, T., Kii, T., Okuno, Y., Usui, F., Sato, H., Sammoto, A., Watanabe, M., Kariyama Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *Indust. Micribio. And biotec.*32(3)103-108; (2005).

7- E. Z., Panagou, P. N., Skandamis, G. J. E., Nychas Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus rubber*, a heat resistant fungus isolated from green table olives. *App. Microbiol.* 94(1)146-156; (2003).

8- E. Z., Panagou, P. N., Skandamis, G. J. E., Nychas Use of gradient plates to study combined effect of temperature, pH, and NaCl concentration on growth of *Monascus rubber van Tieghem*, an ascomycetes fungus isolated from Green table olives. *App. and Env. Microbiol.* 71(1)392-399; (2005).

9- T., Rasheva, J. N., Hallet, A., Kujumdzieva Taxonomic investigation of *Monascus purpureus* 94-95 strain. *J. of Cult. Collec.* 2,51-59; (1998).

10- T., Rasheva, J. N., Hallet, A., Kujumdzieva Fermentation process for industrial production of *Monascus purpureus* pigment from milk permeate. *Proc. Symp. On Monascus culture and application*, 8-10 July, Tolouse, France; (1998).

11- P., Sanae, S., Fernanda, B., Vahan Concentration determination of extracellular and