استفاده از ضایعات سیب‌زمینی جهت تولید رنگدانه توسط *موناسکوس پورپورئوس* در کشت غوطه‌وری

فرزانه کمالی[a]، مهشید جهادی[b]*، الهام خسروی[C]، نفیسه قاسمی سپرو[d]

[a] *دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران*

[b]* *دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران*

[c] *مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران*

[d] *کارشناس ارشد آزمایشگاه گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲

https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1401.20.1.1.5 DOI:10.30495/jftn.2022.65783.11184

چکیده

مقدمه: از بین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده رنگ‌دانه، *Monascus purpureus* به دلیل تولید رنگ‌دانه‌های قرمز و نارنجی با خواص درمانی در بیماریهای سرطان، التهاب، دیابت و پیشگیری و کاهش چربی اهمیت دارد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تاثیر سه عامل جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (۱۰۰– ۲۰ درصد)، مقدار کلریدسدیم (۱۴–۶ گرم) و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۹۰–۵۰ ثانیه) بر رشد قارچ *M. purpureus* و تولید رنگدانه‌های قرمز و نارنجی در شرایط دمای ۳۰ درجه سلسیوس در کشت غوطه‌وری توسط طرح مرکب مرکزی در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد افزایش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی تا ۵۰ درصد به طور معنی‌داری رنگدانه‌های قرمز و نارنجی را کاهش و تولید زیست‌توده را افزایش داد ($p<۰/۰۵$). از طرفی افزایش زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری تا ۷۳ ثانیه و افزایش میزان کلریدسدیم در غلظت بالای ۹ گرم در لیتر تولید زیست‌توده و رنگدانه‌های قرمز و نارنجی را به طور معنی‌داری افزایش داد ($p<۰/۰۵$). در دو نقطه‌ی بهینه با میزان جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (۲۰/۳ و ۴۲/۵) (درصد)، مدت‌زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۶۵ و ۸۱) (ثانیه) و غلظت کلرید سدیم (۱۲ و ۶) (گرم در لیتر) به ترتیب میزان زیست‌توده (g/l)، رنگ‌دانه‌های قرمز و نارنجی (OD/l) در نقطه بهینه یک (۵/۲۴، ۴/۵۵ و ۵/۳) و در نقطه بهینه دو (۴/۵۵، ۴/۳۷ و ۵/۴) بدست آمد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، تولید زیست‌توده را افزایش اما تولید رنگدانه‌های قرمز و نارنجی توسط *Monascus purpureus* را کاهش داد، ضایعات نشاسته سیب‌زمینی باید در سطح بهینه در محیط کشت استفاده شود تا بهترین بهره‌وری تولید به‌دست آید.

واژه‌های کلیدی: *ضایعات نشاسته سیب زمینی، کشت غوطه‌وری، موناسکوس پورپورئوس*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: m.jahadi@khuisf.ac.ir

مقدمه

موناسکوس یک قارچ خشکی‌دوست و متعلق به خانواده Monascaceae، راسته Eurotiales، کلاس Ascomycetes، شاخه Ascomycota می‌باشد که در انواع بسترهای طبیعی ازجمله برنج و سایر غلات رشد می‌کند (Silbir & Goksungur, 2019). سه گونه رایج مورداستفاده از این خانواده شامل *M. pilosus*، *M. purpureus* و *M. ruber* است. *موناسکوس* حداقل شش رنگدانه یعنی دو نوع رنگدانهٔ زرد، دو نوع رنگدانهٔ نارنجی و دو نوع رنگدانهٔ قرمز تولید می‌کند که می‌تواند به‌عنوان رنگدانه‌ی مواد غذایی مورداستفاده قرار گیرد (Shi *et al*., 2022). علاوه بر بهبود رنگ مواد غذایی، به عنوان افزایش‌دهنده طعم و نگهدارنده نیز در صنایع غذایی کاربرد دارد (Abdel-Raheam *et al*., 2016). رنگدانه‌های *موناسکوس* به حرارت حساس است. مدل تخریب حرارتی این رنگدانه تحت تاثیر حرارت، نمک و pH را مورد بحث قرار گرفته است (Abdollahi *et al*., 2021). *M. purpureus* به دلیل تولید رنگ‌دانه‌های قرمز، زرد و نارنجی و به دلیل خواص درمانی برنج تخمیر شده با آن مانند ضد سرطان، ضدالتهاب، پیشگیری و کاهش دیابت و چربی اهمیت دارد (Silbir & Goksungur, 2019; Keivani *et al*., 2020). جهت افزایش تولید متابولیت‌های میکروبی دو راهکار استفاده از عوامل جهش‌زا به منظور افزایش تولید و بهینه‌سازی شرایط رشد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Shi *et al*., 2022). گرچه به کارگیری اشعه UV، گاما و مواد شیمیایی جهش‌زا جهت ایجاد *M. purpureus* با کارایی تولید بیشتر رنگدانه مورد استفاده پژوهشگران قرار گرفت است (Salimian *et al*., 2021; Shi *et al*., 2022; Kolahdozan *et al*., 2021; Pahlavaninezad *et al*., 2021)؛ اما محدودیت به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های جهش‌یافته موجب شده تا بهینه‌سازی شرایط کشت و به خصوص استفاده از ضایعات کشاورزی و صنایع غذایی به عنوان منابع ارزان قیمت بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد. در این راستا، با توجه به اینکه منابع کربن حدود ۷۰ درصد قیمت محیط کشت را به خود اختصاص داده است این منبع بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Shojaosadati and Asadollahi, 2015).

برای رشد *M. purpureus* چندین محیط کشت مناسب وجود دارد، اما رایج‌ترین آن‌ها سیب‌زمینی دکستروز آگار[2] و عصاره مالت آگار است (Carvalho *et al*., 2003). آلدوهگزوزها مانند گلوکز و دکستروز منابع کربن بهتری برای رشد *M. purpureus* نسبت به الکل‌های قندی مانند سوربیتول و مانیتول هستند، درحالی‌که ساکارز رشد قارچ را کاهش می‌دهد (Nimnoi and Lumyong, 2011). به منظور دستیابی به فرآیندهای اقتصادی‌تر تولید رنگدانه، از ضایعات و محصولت جانبی کشاورزی و صنایع غذایی مانند ضایعات خرما (Bakhshi *et al*., 2018; Asghari *et al*., 2019; Bakhshi *et al*., 2022)، کنجاله سویا (Keivani *et al*., 2020)، تفاله سیب (Vendruscolo & Ninow, 2014)، ضایعات فرآوری پرتقال (Kantifedaki *et al*., 2018)، لاکتوز (Costa & Vendruscolo, 2017)، هیدرولیز ذرت (Zhou *et al*., 2014)، اوکارا (Sun *et al*., 2020)، هیدرولیز باگاس نیشکر (Hilares *et al*., 2018)، پودر سیب‌زمینی (Sharmila *et al*., 2013) و کنجاله ذرت، کنجاله بادام‌زمینی (Nimnoi & Lumyong, 2011) به عنوان بستر کشت رشد *M. purpureus* و تولید رنگدانه قرمز استفاده شده است (Lopes *et al*., 2013). سیب زمینی به طور گسترده در جهان کاشته می‌شود و مقدار زیادی تفاله سیب زمینی به صورت ضایعات ایجاد می‌شود. تفاله سیب زمینی مرطوب اگر مستقیماً دور ریخته شود، به دلیل فساد آسان، آلودگی جدی ایجاد می‌کند. در واقع، تفاله سیب زمینی سرشار از مواد قابل تخمیر، به عنوان مثال منابع کربن (نشاسته) و نیتروژن (پروتئین) است. از نظر تئوری، تفاله سیب زمینی می‌تواند به عنوان منبع مقرون به صرفه برای تولید متابولیت‌های با ارزش افزوده بالا توسط میکروارگانیسم‌ها استفاده شود. با این حال، گزارش‌های مربوط به تولید متابولیت‌های ثانویه از تفاله سیب‌زمینی توسط تخمیر غوطه‌ور، به‌ویژه در مورد تولید رنگدانه‌ها کم است (Chen *et al*., 2021). سنتز رنگ‌دانه‌های *موناسکوس* عموماً از طریق مسیر پلی‌کتید با چند شاخه مصنوعی انجام می‌شود

[1] Potato Dextrose Agar

و عمدتاً توسط تخمیر حالت‌جامد و تخمیر غوطه‌ور تولید می‌شود (He *et al*., 2021). اگرچه رنگ‌دانه‌های *موناسکوس* اغلب با استفاده از تخمیر حالت جامد تولید می‌شوند، اما تخمیر غوطه‌وری جایگزین مناسبی است که تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه را به همراه دارد (Srivastav *et al*., 2015). تخمیر غوطه‌ور یکی از روش‌های اصلی تخمیر *موناسکوس* است که دارای مزایای دوره تخمیر کوتاه، کیفیت پایدار و کنترل آسان است. در مقایسه با تخمیر حالت‌جامد، تخمیر غوطه‌ور بهره‌وری و غلظت محصول نهایی بالاتر و مهار کاتابولیسم کمتری دارد (Zhang, Lu & Xu, 2015). *M. purpureus* به سرعت در تمام محیط‌ها رشد می‌کند، اما رنگ و بافت میسلیوم تولید شده به نوع محیط بستگی دارد (Nimnoi & Lumyong, 2011). استفاده از ضایعات تفاله سیب‌زمینی در تحقیقات Nimnoi & Lumyong (۲۰۱۱) و Sharmila و همکاران (۲۰۱۳) برای تولید رنگدانه *موناسکوس* مورد تایید قرار گرفته است. با توجه به وجود ضایعات نشاسته‌ای کارخانجات فراوری محصولات سیب‌زمینی به عنوان یک فراورده جانبی با قیمت کم این کارخانجات که ناخاصی‌های زیادی دارد، این پژوهش به بررسی تاثیر جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (۲۰–۱۰۰ درصد) حاصل از شرکت تولید فرآورده ای سیب‌زمینی خلال و سیب زمینی منجمد به جای نشاسته خالص، مقدار کلریدسدیم (۶–۱۴ گرم) و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۵۰–۹۰ ثانیه) در محیط کشت حالت غوطه‌وری جهت تولید رنگ‌دانه قرمز و نارنجی *Monascus purpureus* با استفاده از روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

- میکروارگانیسم و محیط کشت

سویه *Monascus purpureus* 5303(DSM1603) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران[1] تهیه شد. سویه قارچ به صورت کشت اسلنت تهیه شد و سپس بر روی محیط PDA کشت گردید و به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. محیط‌کشت مورد استفاده، دکستروز آگار سیب‌زمینی بود. محیط کشت مذکور در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد (Keivani *et al*., 2020).

- آماده سازی مایع تلقیح

ده میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی پلیت حاوی *Monascus purpureus* ریخته شد، سپس با استفاده ازلام هموسیتومتر تعداد اسپور در سوسپانسیون اسپوری را به میزان 10^6 (اسپور/ میلی‌لیتر) توسط میکروسکوپ تنظیم شد (اصغری و همکاران، ۲۰۱۹). سوسپانسیون اسپور در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ تا ۹۰ ثانیه در تنش حرارتی قرار گرفت و با همزن در ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه گرمخانه گذاری شد (Keivani *et al*., 2020).

- آماده‌سازی کشت

جهت تهیه محیط کشت از ضایعات نشاسته سیب‌زمینی حاصل از شرکت تولید فرآورده‌ای سیب‌زمینی خلال و سیب زمینی منجمد استفاده شد. محیط کشت مطابق محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز ساخته و ضایعات نشاسته سیب زمینی مطابق با جدول یک جایگزین نشاسته خالص شد. محیط‌های کشت تهیه شده در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر (v/v) از مایع تلقیح به محیط افزوده و به مدت ۱۴ روز با استفاده از دستگاه شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد (Keivani *et al*., 2020).

- استخراج و اندازه‌گیری رنگ‌دانه

پنج گرم از محیط‌کشت مایع حاوی قارچ با ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد همگن سازی شد و در حمام اولتراسونیک (مدل Parsonic 15s، ایران) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرارگرفت. سپس به مدت ۱ ساعت در شیکر (مدل MS 3 BASIC، آلمان) با دور ۱۸۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرارگرفت. برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ی نارنجی و قرمز جذب نمونه در

[1] Persian Type Collection Culture (PTCC)

طول‌موج‌های ۴۷۰ و ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت Unico، مدل ۲۱۰۰، آمریکا) خوانده و میزان جذب بر حسب OD بر لیتر گزارش شد (Asghari *et al*., 2019).

- اندازه‌گیری زیست‌توده

۲۵ میلی‌لیتر از هر تیمار پس از همگن شدن نمونه‌گیری و غلظت توده زیستی به کمک روش خشک‌کردن توسط کاغذ صافی (قطر حفرات ۰/۴۵ میکرومتر) و در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس (ساخت شرکت Memmert، مدل ۱۰۰–۸۰۰، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد (Zhang *et al*., 2015).

- تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی تأثیر جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (۱۰۰–۲۰ درصد)، مقدار کلریدسدیم (۱۴–۶ گرم بر لیتر) و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۹۰–۵۰ ثانیه) بر میزان زیست‌توده و رنگ‌دانه‌های زرد، قرمز و نارنجی از آزمایش روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. جامعه آماری مورد مطالعه شامل ۲۰ تیمار بود وکلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد. برای هر یک از متغیرهای مستقل سه سطح تعیین شد و نمودارها توسط نرم‌افزار Design-Expert 7.0.0 رسم گردید.

یافته‌ها

- تاثیر مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، مقدار نمک و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری بر میزان زیست‌توده

جدول یک تاثیر متغیرهای مستقل بر میزان تولید زیست‌توده و رنگدانه ای قرمز و نارنجی را نشان می‌دهد. با توجه به جدول تجزیه واریانس نهایی (۲) مشاهده شد مدل مورد پژوهش (معادله ۱) معنی‌دار است (p<۰/۰۵) و عدم برازش معنی‌دار نمی‌باشد (P = ۰/۷۳۰۷). در این مدل (معادله ۱) اثر عامل مقدار نمک (B) و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (C) به‌صورت خطی معنی‌دار است. هم‌چنین اثر عامل جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (A) به صورت توان دو معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵). با توجه به (شکل ۱–a)، مقدار زیست‌توده با افزایش زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری افزایش می‌یابد، اما این تغییرات با در بیشینه‌ی جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی تولید زیست‌توده کاهش می‌یابد. علاوه بر این در مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۵۸/۱ ثانیه) با افزایش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی در محیط کشت تا حدود ۵۰ درصد، مقدار زیست‌توده افزایش می‌یابد. بیشترین غلظت زیست‌توده زمانی مشاهده شد که مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری در بیشترین مقدار خود (۸۱/۹ ثانیه) و مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی حدود ۳۵ درصد بود. با توجه به شکل (۱–b)، افزایش غلظت کلریدسدیم، غلظت زیست‌توده را افزایش می‌دهد.

زیست‌توده (g/l) = 5.23 +(0.051A) + (0.39C) + (0.63B)
$-(0.46A^2)$ - (0.26AC)-
معادله (۱)

- تاثیر مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، مقدار نمک و مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری بر میزان رنگ‌دانه قرمز

جدول آنالیز واریانس نهایی (۲) نشان داد مدل مورد پژوهش (معادله ۲) معنی‌دار بوده (p<۰/۰۵) و عدم برازش معنی‌دار نمی‌باشد (P=۰/۷۸۰۷). این مدل (معادله ۲) نشان داد اثر عامل جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی به‌صورت خطی و اثر برهمکنش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی– مقدار کلریدسدیم و مقدار کلریدسدیم– مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری معنی‌دار است (p<۰/۰۵). هم‌چنین اثر هریک از دو عامل مقدار نمک و مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری به صورت توان ۲ نیز معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

رنگدانه قرمز (mg/l) = 3.41-(0.20A)-(0.041B) +
$(0.10C) - (0.18AB) - (0.29BC) + (0.19B^2) -(0.18C^2)$
معادله (۲)

شکل (۲–a و ۲–b) نشان داد در ابتدا اگر مقدار کلریدسدیم زیاد شود غلظت رنگ‌دانه قرمز کاهش می‌یابد تا اینکه غلظت رنگ‌دانه قرمز به یک نقطه‌ی کمینه (۹/۵ میلی‌گرم بر لیتر) برسد و از آن نقطه به بعد با افزایش مقدار

کلریدسدیم غلظت رنگ‌دانه قرمز نیز افزایش می‌یابد. علاوه بر این مشاهده شد تاثیر برهم‌کنش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی با کلریدسدیم باعث کاهش تولید رنگدانه قرمز می‌شود. با توجه به شکل (۲–a)، افزایش مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، تولید رنگ‌دانه قرمز را کاهش می‌دهد. نتایج نشان داد که افزایش زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری تولید رنگ‌دانه قرمز را افزایش و در غلظت بالای کلریدسدیم تولید رنگدانه قرمز را کاهش می‌دهد (شکل ۲–b).

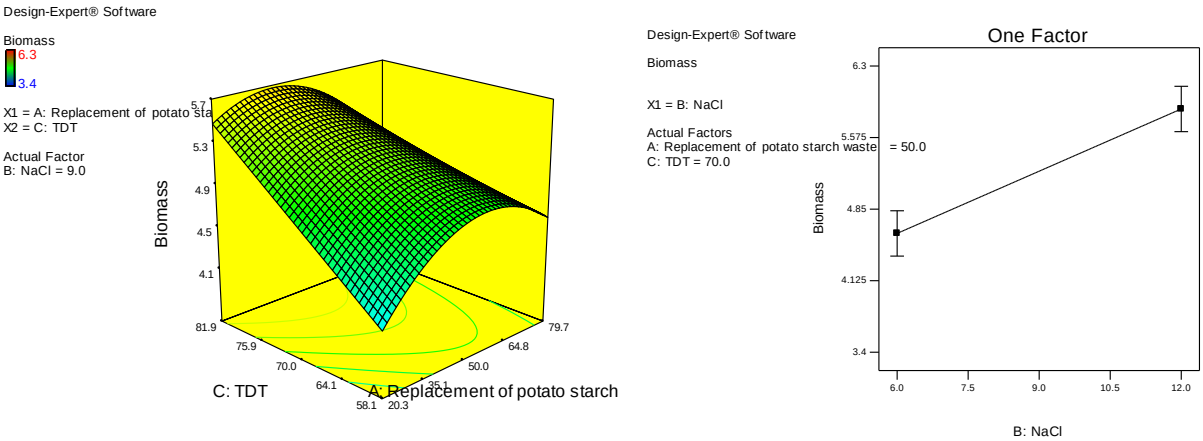

Figure 1- Effect of thermal stress time of spore suspension and replacement of potato starch waste (a) and the amount of sodium chloride (b) on the biomass production of *Monascus purpureus* in submerge cultivation

شکل۱- تاثیر زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری و جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (a) مقدار کلریدسدیم (b) بر میزان تولید زیست‌توده قارچ *مونا‌سکوس پورپورئوس* در کشت غوطه‌وری

جدول ۱- طرح مرکب مرکزی با اطلاعات تجربی در میزان تولید زیست‌توده، رنگ‌دانه قرمز و نارنجی توسط *M.purpureus*

Table 1- Central composite design with the experimental data on biomass, red and orange pigment production by *M.purpureus*

No	Independent Variables			Response variables		
	Replacment of Potato Starch Waste (%)	NaCl (%)	Thermal Stress Time (s)	Biomass ($m.l^{-1}$)	Red Pigment ($OD.l^{-1}$)	Orange pigment ($OD.l^{-1}$)
1	20.3	6	58.1	1.3	3.3	4
2	79.7	6	58.1	1.3	3.6	4.1
3	20.3	12	58.1	8.4	4.6	5.6
4	79.7	12	58.1	3.5	3.7	4.5
5	20.3	6	81.89	1.5	4.6	5.6
6	79.7	6	81.89	2.4	4.3	5.3
7	20.3	12	81.89	8.5	4.1	5
8	79.7	12	81.89	8.5	3.4	4.2
9	0.05	9	70	2.4	4.4	5.4
10	99.94	9	70	5.3	3.4	4.2
11	50	3.95	70	9.3	4.9	6
12	50	14.4	70	3.6	4.6	5.6
13	50	9	50	2.4	3.4	4.2
14	50	9	90	4.5	3.6	4.5
15	50	9	70	7.5	4.4	5.5
16	50	9	70	1.6	4.3	5.3
17	50	9	70	6.3	4	4.9
18	50	9	70	1.5	3.9	4.6
19	50	9	70	3.5	4.3	5.3
20	50	9	70	3.5	3.6	4.4

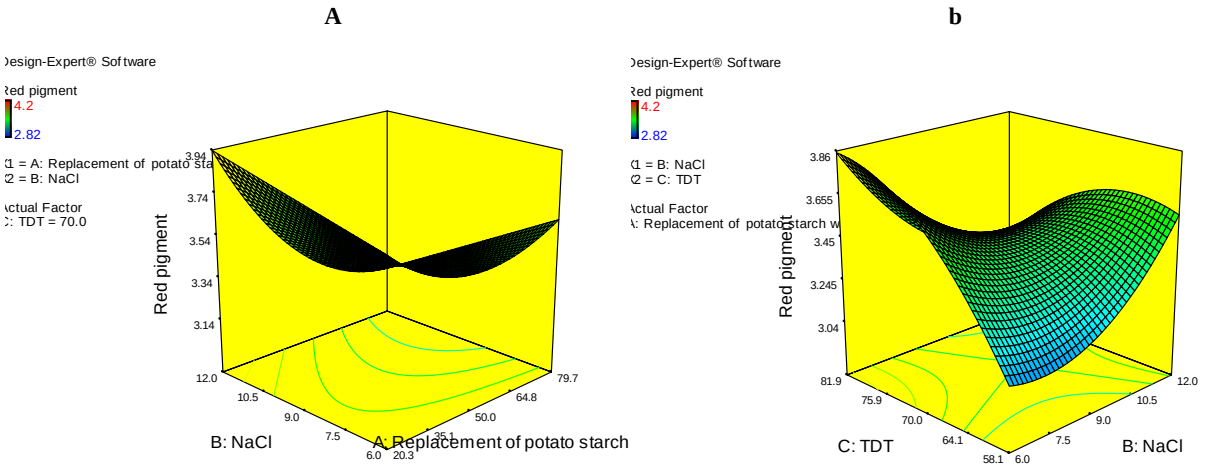

Figure 2- Effect of sodium chloride and replacement of potato starch waste (a) thermal stress time of spore and the amount of sodium chloride (b) on red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged cultivation

شکل۲- تاثیر مقدار کلریدسدیم و جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (a) مقدار کلریدسدیم و زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (b) بر تولید رنگدانه قرمز توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* در کشت حالت غوطه‌وری

جدول ۲- آنالیز واریانس برای تولید میزان تولیدزیست‌توده و رنگدانه‌های قرمز و نارنجی توسط *M.purpureus* در طرح مرکب مرکزی

Table 2- Analysis of variance for biomass, red and orang Monascus pigment production by *M.purpureus* results of the central composite design

	Biomass				Orange pigment				Red Pigment			
	df	Mean of Square	F-value	P-value	df	Mean of Square	F-value	P-value	df	Mean of Square	F-value	P-value
Model	6	2.23	15.07	0.0001	6	0.90	6.30	0.0027*	7	0.39	8.05	0.0010
A	1	0.035	0.24	0.63	1	1.20	8.42	0.0124*	1	0.55	11.33	0.0056
B	1	5.43	36.66	0.0001	1	0.014	0.097	0.7604	1	0.023	0.48	0.5017
C	1	2.06	13.88	0.0023	1	0.43	3.04	0.1049	1	0.15	3.04	0.1065
AB	-	_	_	_	-	_	_	_	1	0.25	5.20	0.0417
AC	1	0.55	3.68	0.0756	-	_	_	_	-	_	_	_
BC	-	_	_	_	1	1.65	11.56	0.0047*	1	0.65	13.46	0.0032
A2	1	3.09	20.88	0.0004	-	_	_	_	-	_	_	_
B2	-	_	_	_	1	0.92	6.46	0.0246	1	0.53	10.98	0.0062
C2	-	_	_	_	1	0.99	6.91	0.0209*	1	0.47	9.77	0.0088
Residual Error	14	0.15	_	_	13	0.14	_	_	12	0.048	_	_
Lack of fit	9	0.12	0.65	0.7307	8	0.11	0.59	0.7610	7	0.036	0.54	0.7807
Total error	5	0.19	_	_	5	0.19	_	_	5	0.066	_	_
Total	19	_	_	_	19	_	_	_	19	_	_	_
R^2	0.8433				0.7441				0.8244			
CV	7.82				7.71				6.43			

- تاثیر مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، مقدار نمک و مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری بر میزان رنگدانه نارنجی

همانطور که در جدول ۲ آنالیز واریانس نهایی مشاهده شد، مدل (معادله ۳) معنی‌دار بوده (p<۰/۰۵) و عدم برازش معنی‌دار نمی‌باشد (P = ۰/۷۶۱۰). علاوه بر آن اثر عامل جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی به‌صورت خطی و اثر برهمکنش مقدار کلریدسدیم- مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری معنی‌دار است. هم‌چنین اثر توان ۲ هریک از دو عامل مقدار نمک و مدت زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری نیز معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

رنگدانه نارنجی (mg/l) = + 4.91-(0/30A)-(0.032B) (0.18C) - (0.45BC) + (0.25B^2) - (0.26C^2)
معادله (۳)

آنالیز منحنی سه بعدی (a–۳ و b–۳) نشان داد که افزایش مقدار ۹ تا ۱۲ گرم کلریدسدیم، باعث افزایش غلظت رنگ‌دانه نارنجی می‌شود که این افزایش غلظت رنگدانه نارنجی با افزایش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی و مدت زمان تنش حرارتی، متغیر خواهد بود به طوری که در بیشینه‌ی جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی و مدت زمان تنش حرارتی، تولید رنگدانه نارنجی کاهش می‌یابد. با توجه به شکل (a–۳)، با افزایش مقدار جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی، غلظت رنگ‌دانه نارنجی کاهش می‌یابد. شکل (b–۳) نشان داد در غلظت کم نمک (۶ گرم بر لیتر) افزایش مدت زمان تنش حرارتی، مقدار رنگ‌دانه نارنجی را افزایش می‌دهد.

بحث

وجود منبع کربن در محیط کشت به عنوان منبع انرژی و سازنده‌ی اسکلت سلولی برای میکرواورگانیسم‌ها ضروری است. نشاسته به عنوان یک پلی‌ساکارید موجود در طبیعت می تواند به عنوان منبع انرژی در رشد قارچها استفاده شود (Shojaosadati and Asadollahi, 2015). استفاده از پودر سیب‌زمینی در تولید رنگدانه قرمز توسط *M. purpureus* تولید رنگدانه را افزایش می‌دهد (Sharmila *et al*., 2013). این در صورتی بود که در استفاده از نشاسته سیب‌زمینی جهت تولیدات میکروبی مشکلاتی از جمله‌ی ایجاد ویسکوزیته زیاد در غلظت‌های زیاد نشاسته ایجاد می‌شود که منجر به کاهش انتقال جرم اکسیژن و نهایتاً کاهش تولید رنگ‌دانه می‌شود (Teng and Feldheim, 1998). نتایج مطالعات Lee و همکاران (۱۹۹۵) نشان داد، با استفاده از نشاسته تاپیوکا به عنوان بستر کربن، بالاترین سرعت رشد کشت، در یک کشت ناپیوسته در محیط حاوی نشاسته مشاهده شد. علاوه بر آن نتایج نشان داد که پودر سیب‌زمینی به‌عنوان بستر مناسبی برای رشد *M. purpureus* عمل می‌کند که منجر به تولید مقدار قابل‌توجهی رنگ‌دانه می‌شود (Abdel-Raheam *et al*., 2016). استفاده از ضایعات خرما در کشت حالت جامد و غوطه‌وری در تولید رنگدانه موناسکوس مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از مناسب بودن این منبع در تولید رنگدانه نارنجی و قرمز موناسکوس بود. به طوریکه با افزایش میزان ضایعات خرما تولید این رنگدانه افزایش یافت (Asghari *et al*., 2021 Bakhshi *et al*., 2018, Asghari *et al*., 2019). در پژوهش حاضرافزایش جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی در محیط کشت به جای نشاسته خالص تا حدود ۵۰ درصد، موجب افزایش مقدار زیست‌توده و کاهش تولید رنگ‌دانه قرمز و نارنجی شد. اختلاف در نتایج حاصل احتمالا به دلیل تفاوت در ماهیت منبع کربن مورد کاربرد و تفاوت در میزان ناخالصی

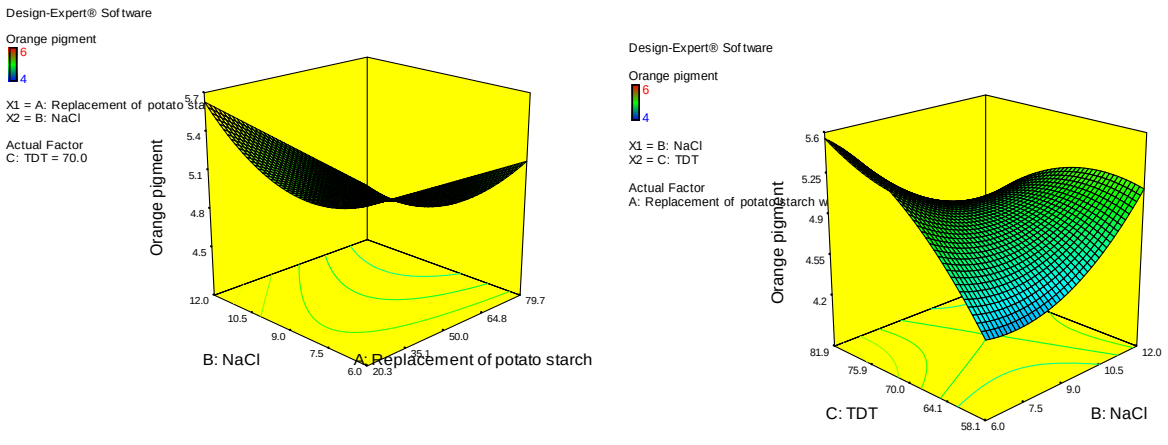

Figure 2– Effect of sodium chloride and replacement of potato starch waste (a) thermal stress time of spore and the amount of sodium chloride (b) on orange pigment production by *Monascus purpureus* in submerged cultivation

شکل۳- تاثیر کلریدسدیم و جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (a) مقدار کلریدسدیم و تنش حرارتی (b) بر تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* در کشت غوطه‌وری

در ضایعات املاح موجود در ضایعات نشاسته و خرما و تاثیر آن بر تولید رنگدانه است. احتمالا ضایعات نشاسته سیب‌زمینی حاوی ناخالصی است. این ناخالصی‌ها حاوی برخی ترکیباتی است که توسط میکروارگانیسم مصرف می‌شود و در رشد تاثیر مثبتی دارد، اما در تولید رنگدانه اثر منفی دارد (Panesar *et al*., 2015).

با افزایش غلظت کلریدسدیم، تولید زیست‌توده و رنگدانه‌ی قرمز و نارنجی افزایش یافت. در همین راستا Chen و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند زیست‌توده به‌دست‌آمده در طی تخمیر با ۵، ۲۰ و ۳۵ گرم در لیتر کلریدسدیم تقریباً ۱۱ گرم در لیتر بود و پس از افزایش غلظت نمک به ۵۰ و ۷۰ گرم در لیتر، زیست‌توده به مقدار قابل‌توجهی کاهش یافت. این نتایج نشان دهنده‌ی این موضوع بود که غلظت کلریدسدیم باید در یک مقدار بهینه باشد تا بیشترین تولید زیست‌توده حاصل شود. بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه به تنش شوری مرتبط است. به‌عنوان‌مثال، قارچ‌های مشتق شده از دریا مانند *Spicaria elegans* می‌توانند متابولیت جدیدی را تحت تنش نمکی بالا تولید کنند. غلظت مشخصی از کلریدسدیم می‌تواند محتوای رنگ‌دانه قرمز خارج سلولی را افزایش دهد. علاوه بر آن مشخص شد تیمار کلریدسدیم ممکن است بیان ژن رنگ‌دانه را افزایش دهد، علاوه بر آن کلریدسدیم می‌تواند بیوسنتز سیترینین را مهار کند و به تولید متابولیت‌های ثانویه مفید ازجمله رنگدانه‌ها کمک کند (Zhen *et al*., 2019). در همین راستا Bakhshi و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که با کاهش غلظت قند خرما و کاهش درصد نمک، تولید رنگدانه نارنجی افزایش می‌یابد.

مقدار زیست‌توده و تولید رنگ‌دانه قرمز و نارنجی موناسکوس با افزایش مدت زمان تنش حرارتی افزایش یافت. Babitha و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند تولید زیست‌توده زمانی که اسپورها در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تحت تیمار قرار گرفتند افزایش یافت. زیرا در دمای بالا سرعت رشد و جوانه زنی کاهش یافت. این در حالی است‌که بازده رنگدانه در تنش حرارتی سوسپانسیون اسپور ۶۰ درجه سلسیوس کاهش نشان داد، اما تحت یک شوک حرارتی در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به طور قابل توجهی تولید رنگدانه موناسکوس افزایش یافت. نتایج این پژوهش با نتایج Abrashev و همکاران (۲۰۰۵) متفاوت بود. آن‌ها مشاهده کردند افزایش زمان شوک حرارتی در دماهای (۳۰–۸۰ درجه سلسیوس) تجمع زیست توده *A. niger* را در مقایسه با شاهد تیمار نشده کاهش داد. به طور کلی تأثیر دمای بالا وابسته به زمان بود. در معرض دماهای بالا، بسیاری از ارگانیسم‌ها به سرعت مجموعه‌ای از پروتئین‌های حفاظت‌شده را که پروتئین‌های شوک حرارتی نامیده می‌شوند، سنتز می‌کنند و به نظر می‌رسد القای آنها با سازگاری ارگانیسم به شرایط تنش هیپوترمی مرتبط است (Schlesinger *et al*., 1990). تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری *M. purpureus* حداکثر رنگدانه را برای اسپورهای تیمار شده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تولید کرد و در دماهای کمتر، کاهش ثابتی داشت. *M. purpureus* هنگامی که اسپورها در دمای ۹۰ درجه سلسیوس تیمار شدند هیچ رنگدانه‌ای نشان نداد در حالی که *M. sanguineus* حداکثر بازده رنگدانه را در دماهای بالا نشان داد (Dikshit and Tallapragada, 2013). Keivani و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که افزایش زمان تنش حرارتی منجر به کاهش تولید زیست توده شد. زیرا این میکروارگانیسم در شرایط کشت مورد آزمایش به زمان تنش حرارتی بالاتر از دمای ۷۰ درجه سلسیوس حساس بودند. تولید رنگدانه موناسکوس قرمز بیشتر به سطوح بالاتر زمان تنش حرارتی در دمای ۷۰ درجه سلسیوس حساس بود و محتوای رنگدانه قرمز با افزایش زمان تنش حرارتی به دلیل اختلال در متابولیسم قارچ کاهش یافت بنابراین، فرآیند کاهش در سطوح بالاتر زمان تنش حرارتی (بیشتر از ۷۰ ثانیه) معنی‌دار بود که این می تواند با تاخیر در جوانه زنی مرتبط باشد. این نتایج نشان می‌دهد که زمان تنش حرارتی بر سوسپانسیون اسپوری باید به صورتی بهینه اعمال شود تا تولید زیست توده افزایش یابد.

نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به این پژوهش نشان می‌دهد که در دو نقطه‌ی بهینه با میزان جایگزینی ضایعات نشاسته سیب‌زمینی (۲۰/۳ و ۴۲/۵) (درصد)، مدت‌زمان تنش حرارتی سوسپانسیون اسپوری (۶۵ و ۸۱) (ثانیه) و غلظت کلرید سدیم (۱۲ و ۶) (گرم در لیتر) به ترتیب میزان زیست‌توده (g/l)، رنگ‌دانه‌های قرمز و نارنجی (OD/l) در نقطه بهینه یک (۵/۲۴، ۴/۵۵ و ۵/۳) و در نقطه بهینه دو

(۴/۵۵، ۴/۳۷ و ۵/۴) بدست آمد. نتایج حاکی از آن است که گرچه استفاده از ضایعات نشاسته سیب‌زمینی در محیط کشت به عنوان کربن موجب کاهش تولید متابولیت رنگدانه های قرمز و نارنجی می‌شود، اما جایگزینی آن در سطحی بهینه می‌تواند موجب کاهش قیمت محیط کشت مصرفی شود. انجام تحقیقات جهت بهینه سازی میزان املاح موجود در محیط کشت احتمالا محققین را برای دستیابی به حداکثر تولید زیست‌توده و رنگدانه‌های *موناسکوس* هدایت خواهد کرد.

منابع

Abdel-Raheam, H., Farag, M. K., Ragab, W. S., Ramadan, E. S. A. & Mahmoud, N. M. (2016). Potato Manufacturing Wastes–a Novel Substrate for the Production of Natural Pigments from *Monascus purpureus*. Assiut Journal of Agriculture Science, 47, 13-23.

Abdollahi, F., Jahadi, M. & Ghavami, M., (2021). Thermal Stability of Natural Pigments Produced by *Monascus purpureus* in Submerged Fermentation. Food Science & Nutrition, 9(9), 4855-4862.

Abrashev, R., Dolashka, P., Christova, R., Stefanova, L. & Angelova, M. (2005). Role of Antioxidant Enzymes in Survival of Conidiospores of *Aspergillus niger* 26 Under Conditions of Temperature Stress. Journal of Applied Microbiology, 99(4), 902-909.

Asghari. M., Jahadi. M. & Ghasemi-sepro. N. (2019). Evaluation of Incubation Time, Salt and Date Waste in Production of Orange Pigment by Monascus purpureus Using Response Surface Methodology. Journal of Food Microbiology, 6(3), 66-69. [In Persian]

Asghari, M., Jahadi, M., Hesam, F. & Ghasemi-Sepro, N. (2021). Optimization of Monascus Pigment Production on Date Waste Substrates Using Solid State Fermentation. Applied Food Biotechnology, 8(3), 247-254.

Babitha, S., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2007). Effect of Stress on Growth, Pigment Production and Morphology of *Monascus* sp. in Solid Cultures. Journal of Basic Microbiology, 47, 118-126.

Bakhshi. F. & Jahadi. M. (2018). Optimization of the Orang Pigment Production by *Monascus purpureus* from Date Waste Using Response Surface Methodology. Journal of Food Microbiology, 4(4), 31-39. [In persiaan]

Bakhshi. F., Jahadi. M., Ghasemisepro. N., Jahanfar. S. (2022). Modeling Red Monascus Pigment Production on Date Waste Substrate Using Submerged Cultivation. Journal of Food Biosciences and Technology, 12(3), 15-26.

Carvalho, J. C., Pandey, A., Babitha, S. & Saccol, C. R. (2003). Production of Monascus biopigments: an overview. Agro Food Industry Hi Tech, 14. 37-43.

Chen, G., Yang, S., Wang, C., Shi, K., Zhao, X. & Wu, Z. (2020). Investigation of the Mycelial Morphology of *Monascus* and the Expression of Pigment Biosynthetic Genes in High-Salt-Stress Fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 104(6), 2469-2479.

Chen, X., Chen, M., Wu, X. & Li, X. (2021). Cost-effective Process for the Production of Monascus Pigments Using Potato Pomace as Carbon Source by Fed-batch Submerged Fermentation. Food Science & Nutrition, 9(10), 5415-5427.

Costa, J.P.V. & Vendruscolo, F. (2017). Production of Red Pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 Using Lactose as a Substrate. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 11, 50-55.

Dikshit, R. & Tallapragada, P. (2013). Comparative Study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for Red Pigment Production Under Stress Condition. International Food Research Journal, 20(3), 1235.

He, J., Jia, M., Li, W., Deng, J., Ren, J., Luo, F., Bai, J. & Liu, J. (2021). Toward improvements for enhancement the productivity and color value of Monascus pigments: a critical review with recent updates. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, pp.1-15.

Hilares, R. T., de Souza, R. A., Marcelino, P. F., da Silva, S. S., Dragone, G., Mussatto, S. I. & Santos, J. C. (2018). Sugarcane Bagasse Hydrolysate as a Potential Feedstock for Red Pigment Production by *Monascus ruber*. Food Chemistry, 245, 786-791.

Kantifedaki, A., Kachrimanidou, V., Mallouchos, A., Papanikolaou, S. & Koutinas, A.A. (2018). Orange Processing Waste Valorisation for the Production of Bio-based Pigments Using the Fungal Strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. Journal of Cleaner Production, 185, 882-890.

Keivani, H., Jahadi, M. & Ghasemisepero, N. (2020). Optimizing Submerged Cultivation for the Production of Red Pigments by *Monascus purpureus* on Soybean Meals Using Response Surface Methodology. Applied Food Biotechnology, 7, 143-152.

Kolahdozan, R., Jahadi, M., Naghavy, N.S. & Zia, M.A. (2021). Investigating the Effect of Sodium Azide and Nitrous Acid on the Morphological Characteristics of *Monascus purpureus* and Pigment Production. Biological Journal of Microorganism, 10(39), 13-28. [In Persian]

Lee, Y.K., Chen, D.C., Chauvatcharin, S., Seki, T. & Yoshida, T. (1995). Production of *Monascus*

pigments by a Solid-liquid State Culture Method. Journal of Fermentation and Bioengineering, 79(5), 516-518.

Lopes, F.C., Tichota, D.M., Pereira, J.Q., Segalin, J., de Oliveira Rios, A. & Brandelli, A. (2013). Pigment Production by Filamentous Fungi on Agro-industrial Byproducts: an Eco-friendly Alternative. Applied Biochemistry and Biotechnology, 171(3), 616-625.

Nimnoi, P. & Lumyong, S. (2011). Improving Solid-State Fermentation of *Monascus purpureus* on agricultural products for pigment production. Food and Bioprocess Technology, 4, 1384-1390.

Pahlavaninezad. A., Jahadi. M., Naghavi, N. S. & Zia. M. A. (2021). The Effect of Ultraviolet Light on Pigment Production and Morphological Characteristics of *Monascus purpureus*. Journal of Food Microbiology, 8(3), 18-29. [In Persian]

Panesar, R., Kaur, S. & Panesar, P.S., (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. Current Opinion in Food Science, 1, 70-76.

Salimian Rizi, E., Jahadi, M. & Zia, M. (2022). Evaluation of gamma irradiation effect on morphological changes, macroscopic, microscopic characteristics and pigment production of *Monascus purpureus*. Journal of Food Processing and Preservation, 46 (1), e16129.

Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins. Journal of Biological Chemistry, 265(21), 12111-12114.

Sharmila, G., Nidhi, B. & Muthukumaran, C. (2013). Sequential statistical optimization of red pigment production by Monascus purpureus (MTCC 369) using potato powder. Industrial Crops and Products, 44, 158-164.

Shi, J., Qin, X., Zhao, Y., Sun, X., Yu, X. & Feng, Y. (2022). Strategies to enhance the production efficiency of Monascus pigments and control citrinin contamination. Process Biochemistry, 117, 19-29.

Shojaosadati, S. A. & Asadollahi, M.A. (2015). Industrial Biotechnology, 8th Edition, Publisher: Tarbiat Modares University, Tehran. [In Persian]

Silbir, S. & Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by Monascus purpureus in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. Foods, 8. 161.

Srivastav, P., Yadav, V.K., Govindasamy, S. & Chandrasekaran, M. (2015). Red pigment production by Monascus purpureus using sweet potato-based medium in submerged fermentation. Nutrafoods, 14(3), 159-167.

Sun, C., Wu, X., Chen, X., Li, X., Zheng, Z. & Jiang, S. (2020). Production and characterization of okara dietary fiber produced by fermentation with Monascus anka. Food chemistry, 316, 126243.

Teng, S.S. & Feldheim, W. (1998). Analysis of anka pigments by liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. Chromatographia, 47(9), 529-536.

Vendruscolo, F. & Ninow, J.L. (2014). Apple pomace as a substrate for fungal chitosan production in an airlift bioreactor. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(4), 338-342.

Zhang, B. B., L. P. Lu, & G. R. Xu. (2015). Why solid-state fermentation is more advantageous over submerged fermentation for converting high concentration of glycerol into Monacolin K by Monascus purpureus 9901: A mechanistic study. Journal of Biotechnology 206, 60–65.

Zhang, L., Chen, L., Wang, J., Chen, Y., Gao, X., Zhang, Z. & Liu, T. (2015). Attached cultivation for improving the biomass productivity of Spirulina platensis. Bioresource Technology, 181, 136-142.

Zhen, Z., Xiong, X., Liu, Y., Zhang, J., Wang, S., Li, L. & Gao, M. (2019). NaCl inhibits citrinin and stimulates Monascus pigments and monacolin K production. Toxins, 11(2), 118.

Zhou, B., Wang, Y., Lu, H. & Zhou, Y. (2014). Effect of ammonium salts on pigments production by Monascus anka mutant in 5L bioreactor. Chiang Mai Journal of Science, 41, 1032-1043.

Use of Potato Waste for Pigments Production by *Monascus purpureus* in Submerged Cultivation

F. Kamali [a], M. Jahadi [b]*, E. Khosravi [c], N. Ghasemisepro [d]

[a] M.Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[b*] Associate of professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[c] Educator of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

[d] Laboratory Expert of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Isfahan Branch (Khorasgan), Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Received: 31 January 2022 Accepted: 3 July 2022

Abstract

Introduction: Among the pigment-producing microorganisms, *Monascus purpureus* is important for controlling diabetes and preventing and reducing fat due to the production of red and orange pigments with therapeutic properties such as anti-cancer, anti-inflammatory.
Materials and Methods: In this study, the effect of replacement of potato starch waste (RPSW) (20-100%), sodium chloride (6-14 g) and thermal stress time of spore suspension (TST) (50-90 seconds) on the growth of *M. purpureus* and production of red and orange pigments at 30 ° C in submerge culture were studied by the central composite design at 95% confidence level.
Results: The results showed that increasing the RPSW by up to 50% significantly reduced red and orange pigments and increased biomass production ($p < 0.05$). On the other hand, increasing the TST of spore suspension to 73 seconds and increasing the amount of sodium chloride at the concentrations above 9 g / l significantly increased the production of biomass and red and orange pigments ($p < 0.05$). At the two optimal point with the RPSW (20.3, 42.5) (%), TDT spore suspension (65, 81)(s) and concentration of sodium chloride (12, 6) (g/l) respectively, the biomass (g / l), red and orange pigments (OD/l) (5.24, 4.55 and 3.5) and (4.55, 4.37 and 5.4), respectively, were obtained.
Conclusion: The results of this study showed that since the replacement of potato starch waste increased biomass production but reduced the production of red and orange pigments *Monascus purpureus*, its amount should be used optimally in culture to achieve the best productivity.

Keywords: *Monascus purpureus, Potato Starch Waste, Submerge Cultivation*.

* Corresponding Author: m.jahadi@khuisf.ac.ir