ارزیابی پارامترهای زمان گرمخانه‌گذاری، میزان نمک و ضایعات خرما در تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از روش سطح پاسخ

مهشید اصغری[1]، مهشید جهادی[2*]، نفیسه قاسمی‌سپرو[3]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان) دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۲.گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان) دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۳. کارشناس آزمایشگاه، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان) دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۲

چکیده

قارچ *موناسکوس‌پورپورئوس* توانایی تولید شش نوع رنگدانه از رنگ زرد روشن تا قرمزتیره دارد. قارچ *موناسکوس*، به علت تنوع تولید رنگدانه و خواص درمانی بسیار زیاد مورد استقبال قرار گرفته است. هدف از این پژوهش ارزیابی پارامترهای زمان گرمخانه‌گذاری(۱۱-۲۱روز) ، میزان نمک (۷-۱۲درصد) و ضایعات خرما (۱۵-۵۵ درصد) در تولید رنگدانه نارنجی توسط *قارچ موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از روش سطح پاسخ در شرایط کشت حالت جامد با استفاده از ضایعات خرما و کاه گندم تولید شد. پس از بهینه‌سازی عوامل مذکور مشخص شد، بیشترین مقدار رنگدانه نارنجی در زمان گرمخانه‌گذاری ۲۱ روز، نمک ۷ درصد و غلظت شیره خرما ۵۵درصد است. در شرایط بهینه مقدار تولید رنگدانه نارنجی۵/۳۱ ($ODU.ml^{-1}$)، راندمان تولید رنگدانه۰/۲۵۲($ODU.ml^{-1}.day^{-1}$) ، میزان تولید رنگدانه نسبت به قند مصرفی ۰/۰۴۳ ($ODU.gr^{-1}$)، میزان تولید رنگدانه نسبت به توده زیستی۰/۶۲۳($ODU.mg^{-1}$) ، میزان تبدیل سوبسترا ۹۳ درصد بود. نتایج این تحقیق نشان داد ضایعات خرما و کاه گندم می‌تواند به عنوان سوبسترای مقرون به صرفه و موثر برای تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس*استفاده گردد.

کلید واژه ها: *موناسکوس پورپورئوس*، ضایعات خرما، کاه گندم، رنگدانه نارنجی، روش سطح پاسخ.

مقدمه

رنگ‌ها در بسیاری از زمینه‌ها از جمله موادغذایی، رنگرزی، لوازم‌آرایشی، دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد(Seyedin et al., 2015) . رنگ‌ها از نظر منشا تولید به سه گروه رنگ‌های معدنی (غیر خوراکی)، رنگ‌های طبیعی، رنگ‌های سنتزی تقسیم می‌شوند (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۵). رنگ‌های مصنوعی سبب ایجاد اثرات آلرژیک و سرطان‌زایی می‌شوند (Mohamad al aamin & Farhan, 2017) همچنین این رنگ‌ها می‌تواند وارد فاضلاب‌ها می‌شود و آلودگی محیط‌زیست را سبب می‌شود (Velmurugan et al., 2011). رنگ‌های طبیعی از منابع مختلفی، از قبیل گیاهان، حیوانات، میکرواورگانیسم‌ها به دست می‌آیند (Heer & Sharma, 2017). در میان رنگ‌های با منشا طبیعی رنگ‌های تولید شده توسط قارچ‌ها کاربرد وسیع و مهمی در تغذیه‌ی انسان دارند. یکی از میکرواورگانیسم‌هایی که توانایی تولید رنگدانه در مقیاس بالا را دارد، *موناسکوس‌پورپورئوس* است (Makhmur & Bibhu Prasad, 2014). قارچ*موناسکوس‌پورپورئوس* از رده قارچ‌های کیسه‌ای و خانواده‌ی *Monascaceae* است (Seyedin et al., 2015). قارچ *موناسکوس‌پورپورئوس* توانایی تولید محصولات فرعی چون لواستاتین و آنتی‌اکسیدان ها را دارد (Mohamad Al Aamin & Farhan, 2017). اخیرا، محیط کشت جامد به عنوان زیستگاه بسیار مناسب برای قارچ ها با هزینه ی کم وتولید زیاد معرفی شده است (Velmurugan et al., 2011). از محاسن

محیط کشت جامد می‌توان به بازده بیشتر آن نسبت به کشت حالت غوطه‌وری، کاهش آلودگی باکتریایی، کاهش هزینه‌ی سوبسترا، نیاز به تکنولوژی و تجهیزات کم‌تر اشاره کرد (Carvalho et al., 2006). با توجه به هزینه‌های بالای محیط‌های کشت مصنوعی، تلاش بسیار زیادی برای استفاده از ضایعات کشاورزی و صنعتی در تولید متابولیت‌های ثانویه صورت گرفته است. این امر سبب کاهش هزینه‌ی تولید رنگدانه و همچنین مدیریت ضایعات موادغذایی می‌شود. در سال‌های اخیر، از تفاله برنج، تفاله گندم، ضایعات ذرت به عنوان سوبسترا استفاده شده است (Velmurugan et al., 2011). استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترای میکرواورگانیسم‌ها سبب کاهش هزینه‌های تولید متابولیت‌ها هم‌چنین ، مدیریت ضایعات حاصل از مواد غذایی می‌شود (Nimnoi & Lumyong, 2011). تاکنون از ضایعات خرما برای تولید متابولیت-هایی از جمله، صمغ زانتان توسط *زانتوموناس کمپستریس* (خسروی دارانی و همکاران،۱۳۸۸)، اتانول توسط *ساکارومایسس سروزیه* (ابوالحسنی و همکاران، ۱۳۸۸)، پروتئین‌های تک یاخته توسط *کاندیدا اوتیلیس* (توسلیان، ۱۳۹۴) مورد استفاده قرار گرفته است. هم‌چنین از کاه و کلش گندم به منظور تولید اسیدسیتریک (ذوقی و همکاران،۱۳۹۲) و تولید آنزیم لاکاز (Gupta & Jana, 2018) استفاده شده است. این پروژه با هدف امکان سنجی استفاده از خرمای ضایعاتی در محیط کشت حالت جامد برای تولید رنگدانه نارنجی توسط *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از روش سطح پاسخ، طرح ماتریکس مرکب مرکزی انجام شد. متغیرهای ضایعات خرما (۵۵-۱۵درصد)، نمک (۱۲-۷درصد)، زمان گرمخانه‌گذاری (۲۱-۱۱روز) در سه سطح با استفاده از نرم‌افزار Design expert 7.0.0 تدوین شد.

روش کار

تهیه سویه

کشت *موناسکوس پورپورئوس* (PTCC- ۵۳۰۳) از سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران به صورت کشت زنده بر روی محیط کشت آگار خریداری گردید. سپس بر روی پلیت حاوی محیط کشت Yeast powder-Soluble starch agar کشت داده شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد و هر ۳۰ روز یکبار، روی محیط کشت تازه انتقال داده شد و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد (نور صنعت فردوس، ایران) به مدت ۷ روز انکوبه گردید. پس از گذشت مدت زمان لازم در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شد (بخشی و جهادی، ۱۳۹۴).

تهیه مایع تلقیح

تحت شرایط کاملا استریل، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی پلیت حاوی *موناسکوس پورپورئوس*ریخته، سپس با استفاده از لام هموسیتومتر تعداد 10^5 (اسپور/میلی‌لیتر) توسط میکروسکوپ شمارش گردید (Velmurugan et al., 2011) و طی تحقیق به محیط کشت حالت جامد اضافه شد.

تهیه و تلقیح محیط کشت

به منظور آماده سازی شیره خرما ضایعات خرما به نسبت ۱ به ۳ با آب مقطر مخلوط گردید. ۱۰ گرم کاه با اندازه ذرات ۰/۵ تا ۳/۵ سانتی‌متر و مقدار ۳ میلی‌لیتر از مخلوط املاح شامل سدیم نیترات، سولفات آهن۷آبه، سولفات منیزیم ۷آبه، دی پتاسیم فسفات، پتاسیم کلرید و عصاره مخمر مطابق با جدول ۱ تهیه شد. سپس رطوبت آن با آب مقطر و pH آن با استفاده از سود و اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال بر ۶ تنظیم شد (ذوقی و همکاران،۱۳۹۲) محیط‌های کشت در ارلن-های ۵۰۰ میلی‌متر شامل شیره خرما (۵۵-۱۵ درصد) و مقدار نمک (۱۲-۷ درصد) مطابق با طرح سطح پاسخ (Response Surface Methodology) تهیه شد. محیط کشت‌ها در دمای۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار۱۵پوند بر اینچ و زمان ۲۰ دقیقه استریل شدند (Makhmur & Bibhu Prasad, 2014) سپس مایع

تلقیح حاوی 10^5 (اسپور/میلی‌لیتر) تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با مدت زمان مشخص گرمخانه‌گذاری (۱۱-۲۱روز) شد (Rashmi & Padmavthi, 2011).

جدول۱ -ترکیبات افزوده شده به سوبسترای میکرواورگانیسم

ترکیب	آب مقطر (لیتر)	$NaNO_3$ (گرم)	$FeSO_4.7H_2O$ (گرم)	$MgSO_4.7H_2O$ (گرم)	K_2HPO_4 (گرم)	KCl (گرم)	عصاره مخمر (گرم)
مقدار	۱	۶	۰/۰۲	۱	۲	۱	۸

استخراج و اندازه‌گیری رنگدانه

پس از همگن کردن تمام محیط کشت ۵ گرم از کل محیط کشت جامد را برداشته سپس ۵۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ به آن افزوده، به مدت۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به مدت ۱ساعت در شیکر (نور صنعت فردوس، ایران) با دور ۱۸۰ (دور بر دقیقه) در دمای۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. به منظور جداسازی ذرات جامد و توده زیستی از محلول رنگی استخراج شده کل محتویات توسط کاغذ صافی واتمن ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. برای اندازه‌گیری میزان رنگدانه‌ی نارنجی، جذب نمونه در طول موج۴۷۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO2100، آمریکا) خوانده شد. درضمن، از الکل ۷۰درصد به عنوان بلانک دستگاه اسپکترفتومتر استفاده گردید (Johns & Stuart, 1991).

اندازه‌گیری توده زیستی

مقدار ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک به ۰/۵ گرم از کل محیط کشت جامد افزوده به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط سپس اتوکلاو شد، به وسیله کاغذ صافی فیلتر کرده و ۱ میلی‌لیتر استیل استون به آن افزوده، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام بن‌ماری قرار داده پس از سرد شدن الکل۹۶ درصد و معرف ارلیش به آن افزوده و جذب آن در طول موج ۵۳۰ با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های متفاوت ان-استیل گلوکز آمین استفاده گردید (Nor Farhan & Farhan, 2018).

اندازه‌گیری میزان قند مصرفی

۵ گرم از کل محیط کشت جامد را عصاره‌گیری کرده و ۴میلی‌لیتر معرف آنترون به آن افزوده به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن‌ماری قرار داده و پس از سرد شدن جذب آن در طول موج ۶۲۵ با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. از غلظت‌های مختلف گلوکز جهت رسم منحنی استاندارد استفاده گردید (Fales, 1951).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از روش سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی استفاده شد تا بیش‌ترین اطلاعات با کم‌ترین تعداد تیمار از طریق نقاط آزمایشی در محدوده مورد نظر استخراج شود. برای هر یک از متغیرهای موثر سه سطح تعیین شد. به این ترتیب ۲۰ تیمار حاصل از ترکیب سه عامل زمان گرمخانه‌گذاری(۲۱-۱۱ روز)، مقدار نمک (۱۲-۷ درصد)، شیره خرما (۵۵-۱۵ درصد) شامل ۶ تکرار در نقطه مرکزی (آلفا برابر با ۱/۷) با نرم افزار Design-Expert7.0.0 انجام شد. آزمایشات با رعایت اصل تصادفی کردن و دو تکرار انجام گرفته و رنگدانه نارنجی به عنوان پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. سپس تیمار بهینه مطابق با نتایج روش سطح پاسخ تعیین شد. سینتیک رشد و تولید رنگدانه، راندمان تولید رنگدانه، میزان تولید رنگدانه نسبت به قند مصرفی، میزان تولید رنگدانه نسبت به توده زیستی و میزان تبدیل سوبسترا در نمونه بهینه در شرایط کشت حالت جامد مورد محاسبه قرار گرفت (بخشی و همکاران، ۱۳۹۶).

نتایج

شرایط تولید رنگدانه‌ی نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس*۵۳۰۳ در حالت تخمیر جامد با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.۲۰ فرمولاسیون حاصل از ترکیب سه عامل شامل زمان گرمخانه گذاری (X_1)، درصد نمک (X_2)، مقدار شیره خرما (X_3) بر میزان رنگدانه نارنجی بررسی شد.

جدول ۲- نمایش تاثیر ترکیب‌های مختلف متغییرهای مستقل بر رنگدانه نارنجی

آزمایش	زمان گرمخانه‌گذاری(روز)	نمک (درصد)	مقدار خرما (درصد)	رنگدانه (ODU/ml)
۱	۱۱	۷	۱۵	۳/۰۱۵
۲	۲۱	۷	۱۵	۳/۱
۳	۱۱	۱۲	۱۵	۲/۴۶۵
۴	۲۱	۱۲	۱۵	۲/۵۷
۵	۱۱	۷	۵۵	۳/۶۷۵
۶	۲۱	۷	۵۵	۵/۵۶۵
۷	۱۱	۱۲	۵۵	۳/۵
۸	۲۱	۱۲	۵۵	۴/۱۴۵
۹	۷	۹/۵	۳۵	۲/۳۴۵
۱۰	۲۴	۹/۵	۳۵	۳/۴
۱۱	۱۶	۵/۲۵	۳۵	۴/۶۲
۱۲	۱۶	۱۳/۷۵	۳۵	۲/۹۳
۱۳	۱۶	۹/۵	۱	۲/۱۶۵
۱۴	۱۶	۹/۵	۶۹	۳/۹
۱۵	۱۶	۹/۵	۳۵	۳/۹۴
۱۶	۱۶	۹/۵	۳۵	۳/۱
۱۷	۱۶	۹/۵	۳۵	۲/۴۹۵
۱۸	۱۶	۹/۵	۳۵	۳/۳۵۵
۱۹	۱۶	۹/۵	۳۵	۳/۹۷
۲۰	۱۶	۹/۵	۳۵	۲/۸۸

به طوریکه فرمولاسیون‌های ۱ تا ۱۴ آزمایشات فاکتوریل و ۱۵ تا ۲۰ آزمون‌های تکرار در نقطه مرکزی بودند. آزمون در نقطه مرکزی جهت تخمین خطا در ۶ تکرار انجام گرفت.با توجه به جدول ۲، بیش‌ترین رنگدانه نارنجی مربوط به تیمار۶ (زمان گرمخانه‌گذاری ۲۱ روز، مقدار نمک ۷ درصد، مقدار شیره خرما ۵۵ درصد) عدد ۵/۵۶۵ $ODU.ml^{-1}$ است. همچنین کم‌ترین مقدار رنگدانه نارنجی مربوط به تیمار ۱۳ (زمان گرمخانه‌گذاری ۱۶ روز، محتوی نمک ۹/۵ درصد، محتوی ۱درصد شیره خرما) عدد ۲/۱۶۵ $ODU.ml^{-1}$ است. با توجه به جدول ۳ برخی از متغیرها از جمله مجذور زمان گرمخانه‌گذاری و مجذور مقدار شیره خرما و اثر متقابل زمان گرمخانه‌گذاری– مقدار نمک، مقدار نمک– مقدار شیره خرما به دلیل معنی‌دار نبودن در سطح آماری ۵ درصد حذف گردید. نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل واریانس پس از حذف شدن عوامل غیر معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد در جدول۳ نشان داده شده است. خطا در عدم برازش معنادار نمی‌باشد (P = ۰/۸۹۶۹). هم‌چنین ضریب تبیین برابر ۰/۷۸۲ است که بیانگر ضریب همبستگی نسبتا خوبی بوده و این مقدار هرچه به عدد۱ نزدیک تر باشد تطبیق داده-های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیش‌تر بوده و مدل دقت بالاتری دارد.. اثر سه عامل زمان گرمخانه‌گذاری، مقدار نمک، مقدار شیره خرما به صورت خطی و اثر برهمکنش زمان گرمخانه‌گذاری – مقدار شیره خرما و اثر مجذور مقدار نمک معنی‌دار است. معادله ۱ نشان دهنده‌ی یک مدل رگرسیون غیر خطی با فاکتورهای

واقعی است. این معادله اثر سه عامل، زمان گرمخانه‌گذاری و مقدار نمک و مقدار شیره خرما پس از حذف عوامل غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

جدول۳- نتایج آنالیز واریانس نهایی تاثیر سه متغیر (زمان گرمخانه‌گذاری، مقدار نمک، مقدار شیره خرما) بر تولید رنگدانه نارنجی

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	F	P
مدل	۵	۱۰/۵۶	۱۰/۰۸	۰/۰۰۰۳
زمان گرمخانه‌گذاری (X_1)	۱	۱/۶۹	۸/۰۷	۰/۰۱۳۱
مقدار نمک (X_2)	۱	۲/۲۳	۱۰/۶۷	۰/۰۰۵۶
مقدار شیره خرما (X_3)	۱	۵/۰۹	۲۴/۳۳	۰/۰۰۰۲
X_1X_3	۰/۶۹	۰/۶۹	۳/۲۸	۰/۰۹۱۵
X_2^2	۰/۸۵	۰/۸۵	۴/۰۷	۰/۰۶۳۴
خطا باقیمانده‌ها	۱۴	۰/۲۱		
عدم برازش	۹	۰/۱۳	۰/۳۹	۰/۸۹۶۹
خطا کل	۵	۰/۳۵		
کل	۱۹			

R2 =۰/۷۸۲
C.V.% =۱۳/۶۳

معادله ۱.

$$Y= (+7.59715) - (0.032572X_1) - (0.88028X_2) - (0.016499X_3) + (2.93125E\text{-}003X_1X_3) +(0.037854X_2^2)$$

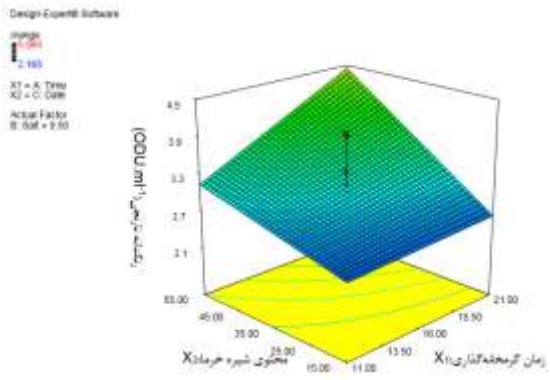
Y= مقدار رنگدانه نارنجی تولید شده

X_1=زمان گرمخانه‌گذاری میکرواورگانیسم

X_2=مقدار نمک محیط کشت

X_3=مقدار شیره خرما

مطابق معادله‌ی ۱ زمان گرمخانه‌گذاری و مقدار شیره خرما و مقدار نمک با ضریب منفی تاثیر کاهنده‌ای بر تولید رنگدانه نارنجی دارد ولی برهم‌کنش زمان گرمخانه‌گذاری- مقدار شیره خرما و مقدار نمک به صورت مجذور اثر فزاینده‌ای بر تولید رنگدانه نارنجی نشان می‌دهد. شکل ۱ تاثیر سطوح مختلف زمان گرمخانه‌گذاری و مقدارشیره خرما را بر مقدار رنگدانه نارنجی در محیط کشت در شرایط ثابت درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH برابر۶ و رطوبت۵۰٪ نشان می‌دهد. شکل۱ نشان دهنده‌ی مقدار رنگدانه نارنجی به صورت لبه بالارونده می‌باشد و با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و افزایش میزان شیره خرما تولید رنگدانه نارنجی افزایش می‌یابد.



شکل ۱- نمودار سه بعدی تاثیر سطوح مختلف زمان گرمخانه-گذاری و غلظت خرما بر میزان رنگدانه نارنجی در محیط کشت حالت جامد

شرایط تیمار بهینه برای تولید رنگدانه نارنجی

همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است، مقادیر به دست آمده از فرایند بهینه‌سازی تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* برای متغیرهای زمان گرمخانه‌گذاری، درصد نمک و مقدار

شیره خرما به ترتیب ۲۱روز، ۷درصد، ۵۵ درصد می-باشد. مقدار پیش‌بینی شده برای متغیر پاسخ ۵/۰۸ واحد جذب نوری بود. به منظور بررسی تطابق نتایج عملی با مقادیر تئوری پیش‌بینی شده، آزمایش تأییدکننده در شرایط بهینه انجام شد. تحت شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط این تحقیق مقدار متوسط رنگدانه نارنجی تولید شده ۵/۵۷ واحد جذب نوری بدست آمد که نزدیک به مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل می‌باشد. بنابراین نتایج نشان می‌دهد مدل بدست آمده قابل اعتماد برای پیش بینی تولید رنگدانه نارنجی توسط کشت قارچ *موناسکوس پورپورئوس* بر ضایعات خرما می‌باشد. جدول ۴ تولید رنگدانه نارنجی در طی زمان به مدت ۲۱ روز را نشان می‌دهد. تولید رنگدانه نارنجی از روز ۳ آغاز شده و تا روز ۱۵ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در تولید رنگدانه دارد و از روز ۱۸ تا ۲۱ اختلاف معنی‌دار بین آن وجود ندارد و تقریبا تولید رنگدانه از روز ۱۸ ثابت می‌شود. سینتیک تولید میزان رنگدانه نارنجی در شرایط بهینه این متابولیت در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۴- نتایج مقایسه تولید رنگدانه نارنجی طی ۲۱ روز گرمخانه‌گذاری

زمان (روز)	نارنجی ($ODU.ml^{-1}$)
۰	۰^{e} + ۰
۳	$۰/۹۲^{de}$ + ۰/۳۵
۶	$۱/۹۱^{cde}$ + ۰/۴۴
۹	$۲/۶۵^{bcd}$ + ۱/۷۱
۱۲	$۳/۱^{a-d}$ + ۰/۷۴
۱۵	$۳/۸۴^{abc}$ + ۰/۰۱
۱۸	$۴/۵۵۵^{ab}$ + ۰/۰۶
۲۱	$۵/۳۱^{a}$ + ۰/۳

حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) بین نمونه‌ها در روزها متفاوت طی رشد است.

جدول ۵-بررسی سینتیک تولید میزان رنگدانه نارنجی در شرایط بهینه

پارامترهای تخمیربرای رنگدانه نارنجی	مقادیر
مقدار رنگدانه نارنجی تولید شده ($ODU.ml^{-1}$)	۵/۳۱
مقدار رنگدانه نارنجی پیش بینی شده($ODU.ml^{-1}$)	۵/۰۸
راندمان تولید رنگدانه ($ODU.ml^{-1}.day^{-1}$)	۰/۲۵۲
میزان تولید رنگدانه نسبت به توده زیستی ($ODU.mg^{-1}$)	۰/۶۲۳
میزان تبدیل سوبسترا (٪)	۹۳
میزان تولید رنگدانه نسبت به قند مصرفی ($ODU.gr^{-1}$)	۰/۰۴۳

بحث

با توجه به جدول۳، اثر خطی زمان گرمخانه‌گذاری و درصد نمک و مقدارشیره خرما و اثر درصد نمک به صورت درجه دوم و اثر متقابل زمان گرمخانه‌گذاری و درصد شیره خرما بر تولید رنگدانه نارنجی معنی‌دار هستند. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که افزایش زمان گرمخانه‌گذاری سبب افزایش تولید رنگدانه نارنجی می‌شود که نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از دیگر پژوهش‌ها هم‌خوانی دارد (Farhan binti, 2010; Subhasree et al., 2011). در تحقیقی که توسط سابهاسری و همکاران (2011) انجام گرفت، اثر زمان ۲، ۷، ۱۴ روز گرمخانه‌گذاری قارچ *موناسکوس پورپورئوس*بر روی دانه جک فروت و منابع کربن و نیتروژن مختلف مورد بررسی قرار گرفت، در روز دوم میسلیوم‌های قارچ شروع به رشد می‌کند و با افزایش زمان تا ۱۴ روز رشد متراکم و رنگدانه به مقدار زیاد تولید می‌شود (Subhasree et al., 2011). هم‌چنین در تحقیقی که توسط فرهان بینتی (2010) انجام گرفت نشان می‌دهد میکرواورگانیسم برای شکستن کربوهیدرات‌های محیط و آغاز رشد به مدت زمان نسبتاً زیاد (۵-۳ روز) نیازمند است (Farhan Binti, 2010). ضمن اینکه، در محیط‌های کشت حالت جامد به علت دسترسی کمتر به املاح، میکرواورگانیسم نیازمند مدت زمان بیشتر برای رشد و تولید متابولیت‌های خود دارد (شجاع الساداتی و اسداللهی، ۱۳۹۵). تجزیه و تحلیل

در رابطه با افزایش درصد نمک نشان دهنده‌ی کاهش تولید رنگدانه می‌شود که در همین راستا تحقیقی توسط بابیدا و همکاران (2007) در رابطه با استفاده از نمک و دما و گلیسرول برای ایجاد استرس انجام گرفته، نشان می‌دهد در زمانی که نمک به محیط اضافه می‌شود در ۷۲ ساعت اول گرمخانه‌گذاری هیچ‌گونه رشد و تولید رنگدانه مشاهده نشده در حالی که در نمونه کنترل در ۲۴ ساعت اولیه رشد قابل توجهی دیده می‌شود (Babitha et al., 2007). در پژوهش دیگر که توسط آنسل و همکاران (1997) انجام پذیرفت مهار رشد توسط میکرواورگانیسم را ثابت می‌کند (Ansell et al., 1997). استرس ایجاد شده توسط نمک می‌تواند تعادل اسمزی سلول‌های قارچی را بر هم زند و هجوم سدیم سبب ایجاد متابولیت سمی که موجب کاهش شدید تولید می‌شود (Babitha et al., 2007). در تحقیقی که توسط قدا و ولید (2017) بر روی تولید رنگدانه انجام گرفت نشان می‌دهد که افزودن تنها ۱٪ نمک سبب افزایش و تحریک تولید رنگدانه می‌شود (Ghada & Walid, 2017). حضور کربن به عنوان منبع انرژی برای میکرواورگانیسم‌ها هم‌چنین سازنده‌ی اسکلت سلولی در محیط ضروری است. میزان کربن موجود در محیط رابطه مستقیمی با میزان تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه دارد (شجاع الساداتی و اسداللهی، ۱۳۹۵). در تحقیقی که توسط بخشی و جهادی (۱۳۹۴) به روش غوطه‌وری با استفاده از قند ضایعات خرما انجام شد، نشان میدهد که قند ناشی از ضایعات خرما می‌تواند به عنوان یک منبع انرژی مناسب برای تولید رنگدانه توسط *موناسکوس پورپورئوس* شود. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که افزایش مقدار خرما سبب افزایش تولید رنگدانه نارنجی می‌شود. افزایش غلظت گلوکز در محیط سبب افزایش فشار اسمزی بر میکرواورگانیسم شده و این امر باعث تراوش بیش‌تر رنگدانه به محیط می‌شود (Kim et al., 1997). جدول ۴ نشان می‌دهد که افزایش زمان گرمخانه‌گذاری سبب افزایش تولید رنگدانه می‌شود.تولید رنگدانه نارنجی از روز ۳ آغاز شده که مطابق با پژوهش های دیگر می‌توان سه روز اول را زمان لازم جهت آداپته شدن و آغاز رشد دانست (Bau & Wong, 1979; Subhasree et al., 2011). از روز ۶ تولید رنگدانه به صورت چشم‌گیر آغاز شده است و از تا روز ۱۸ بیش‌ترین تولید و از روز ۱۸ تقریبا تولید رنگدانه ثابت شده است. مطابق با پژوهش انجام گرفته توسط فرهان و همکاران (2014) با گذشت زمان میزان تولید رنگدانه نارنجی افزایش می‌یابد و پس از گذشت زمان تقریبا تولید رنگدانه ثابت می‌شود (Farhan et al., 2014) که علت آن را می‌توان کاهش منبع کربن محیط دانست (Mohamad Al Aamin & Farhan, 2017). با این وجود، به علت ناشناخته بودن برخی از جنبه‌های علمی و فنی سوبسترای جامد سینتیک تولید رنگدانه بر محیط کشت حالت جامد در تحقیقات کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته است (شجاع الساداتی و اسداللهی، ۱۳۹۵).

نتیجه‌گیری

قارچ *موناسکوس پورپورئوس* به علت تنوع در رنگ (زرد، نارنجی، قرمز) و همچنین خواص درمانی زیاد مورد استقبال انسان‌ها قرار گرفته است. نتایج مربوط به این پژوهش نشان می‌دهد که بهترین شرایط برای تولید رنگدانه نارنجی زمان گرمخانه‌گذاری ۲۱ روز و نمک ۷ درصد و شیرهخرما ۵۵درصد است. با توجه به تجزیه و تحلیل آماری اثر خطی زمان گرمخانه‌گذاری و درصد نمک و مقدار شیره خرما و اثر درجه دوم درصد نمک و اثر متقابل زمان گرمخانه‌گذاری و مقدار شیره خرما بر روی تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* معنی‌دار است و همچنین مدل با مقدار عددی ضریب تبیین مناسبی رابطه‌ی خوبی بین زمان گرمخانه‌گذاری و درصد نمک و درصد شیره خرما نشان داد. نتایج حاکی بر آن است که خرما

می‌تواند به عنوان یک منبع کربن مقرون به صرفه و کاه گندم (ایجاد تخلخل و بهبود هوادهی) عمل کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر بدینوسیله مراتب سپاس و قدرانی خود را از مجتمع آزمایشگاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) اعلام می‌دارند.

منابع

۱. ابوالحسنی، و، ثقه الاسلامی، ن، مسکوکی، ع، سرگلزایی ج، (۱۳۸۸). تولید اتانول از خرما به روش تخمیر با مخمر ساکارومایسس سروزیه با رویکرد کاهش ضایعات. همایش ملی مهندسی شیمی، اسلامشهر، دانشگاه آزاداسلامی واحد اسلامشهر، ۳۰ دی ۱۳۸۸.

۲. بخشی، ف، جهادی، م. (۱۳۹۴). بهینه‌سازی تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* از ضایعات خرما به روش سطح پاسخ. مجله میکروب شناسی مواد غذایی، ۴: ۳۹-۳۱.

۳. توسلیان، ا. (۱۳۹۴). تولید پروتئین تک سلولی از شیره خرما. دومین همایش ملی و جشنواره علمی خرمای ایران، مجتمع آموزش عالی بم، ۲۵ الی ۲۶ شهریور ۹۶.

۴. خسروی دارانی، ک، فرهادی، غ، محمدی‌فر، م، هادیان، ز، سیداحمدیان، ف، کمیلی فنود، ر، حاج سید جوادی، ن، کوهی کمالی، پ، کمالی ز. (۱۳۸۸). مقایسه تولید زانتان در تخمیر حالت جامد و غوطه‌ور با *زانتوموناس کمپستریس* در مقیاس آزمایشگاهی. مجله علوم و تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱:۴۹-۵۶.

۵. ذوقی، آ، خسروی دارانی، ک، سهراب وندی، س. (۱۳۹۲). تولید اسیدسیتریک از کاه گندم و باگاس خام نیشکر با استفاده از قارچ *آسپارژیلوس نایجر* به روش تخمیر در بستر جامد. مجله‌ی علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۳: ۱۵۵-۱۶۶.

۶. رحیمی پردنجانی، س، کیانی، م، عزتی، پ، پور محمدی ب، بیابانی ج، ترابی ح، خزایی ظ. (۱۳۹۵). بررسی میزان فراوانی رنگ‌های مصرفی در مواد غذایی با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک در سال ۱۳۹۴. فصلنامه علمی پژوهشی کمیته تحقیقات دانشجویی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۶۱: ۱-۷.

۷. شجاع‌الساداتی، ع، اسداللهی، م.ع. (۱۳۹۵). بیوتکونولوژی صنعتی، انتشارات دانشگاه تهران، ۲۵۵-۲۶۳.

8. Ansell, R., Gralath, K., Hohmann, S.M., Thevelein, J., Adler, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD^+-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J .16: 2179-2187.

9. Babitha, S., Ricardo Soccol, C., Pandey, A. 2007. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus sp*. in solid cultures. J. Basic Microbiol .47: 118–126.

10. Bau, Y.S., Wong, H.CH. 1979. Zinc effects on growth, pigmentation and antibacterial activity of *Monascuspurpureus*. J Physiol. Plant. 46: 63-67.

11. Carvalho, J.C.D., Pandey, A., Oisha, B.O., Brand, D., Leon, J.A.R., Soccol, C.R. 2006. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus purpureus* by solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 29: 262-269.

12. Fales, F.W. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J. Biol. Chem. 193: 113-24.

13. Farhan Binti, M.S. 2010. *MonascusRuber ICMP 15220* fermentation for the production of pigments. Doc Thesis, Univercity of Massey, New Zealand.

14. Farhan, M.S., John, B., Chisti, Y. 2014. Optimal C:N ratio for the production of red pigments by *Monascusruber*. World J. Microbiol Biotechnol. 9: 2471-2479.

15. Ghada, A., Walid, M. 2017. Red yeast as a powerful stable biopigment producer under

Monascuspurpureus FTC 5356 using response surfamethodology. Iium Eng J. 1:34-48.

24. Rashmi, D., padmavthi, T. 2011. *Monascuspurpureus*: A potential source for natural pigment production. Microbiol Biotechnol Res. 1: 164-174.

25. Seyedin, A., Yazdian, F., Hatamian Zarmi, A., Rasekh, B., Mir derikvand, M. 2015. Natural pigment production by Monascuspurpureus: bioreactor yield improvement through statistical analysis. Appiled Food Biotech. 2: 23-30.

26.Subhasreer, S., dineshbabu, P, vidyalakshmi, R., Chandra mohan, V. 2011. Effect of carbon and nitrogen sources on stimulation of pigment production by *Monascuspurpureus* on jackfruit seeds. International J Microbiol Res. 2: 184-187.

27. Subhasreer, S., dineshbabu, P., vidyalakshmi, R., Chandra mohan, V. 2011. Effect of carbon and nitrogen sources on stimulation of pigment production by *Monascuspurpureus*on jackfruit seeds. Int J Microbiol Res. 2: 184-187.

28. Velmurugan, P., Hur, H., Vellingiri, B., Seralathan K., Kui-Jae, L., Sang-Myung, L., Jong-Chan, C.H., Patrick, J.SH., Byung-Taek, O. 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. J Biosci Bioeng. 6: 590 – 594.

various growth conditions. Curr Res Environ Appl Mycol. 7: 331-345.

16. Gupta, A., Jana, A.K. 2018. Effects of wheat straw solid contents in fermentation media on utilization of soluble/insoluble nutrient, fungal growth and laccase production. US National Library of Medicine National Institutes of Health. 8: 35.

17. Heer, K., Sharma, S. 2017. Microbial pigments as a natural color: a review. IJPSR. 8: 1913-1922.

18. Johns, M.R., Stuart, D.M. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. J. Ind. Microbiol. 8: 23-28.

19. Kim, S.Y., Lee, K.H., Kim, J.H., Oh, D.K. 1997. An integrated fermentation – separation process for the production of red pigment by *Serratia sp*. KH-95. Process Biochem. 35: 458-490.

20. Makhmur, A., Bibhu prasad, P. 2014. Optimization of red pigment production by *Monascuspurpureus MTCC* 369 under solid-state fermentation using response surface methodology. SJST. 36: 439-444.

21. Mohamad, A., Aamin, R., Farhan, M.S. 2017. Red pigment production by *Monascuspurpureus* in stirred-drum bioreactor. Sci. Herit. J. 1: 13-15.

22. Nimnoi, P., Lumyong, S. 2011. Improving solid-state fermentation of *Monascus purpureus*on agricultural products for pigment production. Food Bioprocess Tech. 4: 1384–1390.

23. Nor Farhana H, Farhan M.S. 2018. Optimization of red pigment production by

Evaluation of Incubation Time, Salt and Date Waste in Production of Orange Pigment by *Monascus purpureus* Using Response Surface Methodology

Asghari M[1], Jahadi M[*2], Ghasemisepro N[3]

1. M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Laboratory Expert, Department of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

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

Received: 11 February 2019 Accepted: 12 May 2019

Abstract

Monacus purpureus (*M. purpureus*) produce six types of pigments from yellow to dark red color pigments. *Monascus* fungus has been welcomed due to its various pigment production and healing properties. The aim of this study, evaluation of incubation time (11-21days), salt (7-12 %) and date waste (15-55%) in production of orange pigment by *M. purpureus* using response surface methodology in solid state. After optimization of these factors, it was showed the highest amount of orange pigment was obtained during the 21-day incubation period, 7% salt and the date syrup concentration was 55%. In optimum conditions, a maximum yield of orange pigment was 5.31 (ODU.ml-1), fermentation yield was 0.252 (ODU.ml-1.day-1), pigment production yield per biomass 0.623 (ODU.mg-1), yield of orange production per carbon source consumption 0.043 (ODU.gr- 1), the substrate conversion rate was 93 (%). The results of this study showed that date waste and Wheat Straw could be used as an affordable and effective substrate for the production of orange pigment by *M. purpureus* fungus.

Keywords: *Monascus purpureus*, Date waste, Wheat straw, Orange pigment, Response surface method.