

تاثیر نور ماوراء بنفش بر تولید رنگدانه و خصوصیات مورفولوژیکی قارچ *موناسکوس پورپورئوس*آسیه پهلوانی نژاد^۱، مهشید جهادی^{۲*}، نفیسه سادات نقوی^۳، محمدعلی ضیاء^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، 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. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

۴. گروه علوم پایه، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان، ایران.

*نویسنده مسئول: m.jahadi@khuisf.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۸

چکیده

توجه مصرف‌کنندگان مواد غذایی به استفاده از مواد و افزودنی‌های طبیعی، اهمیت نیاز به پژوهش‌های در زمینه تولید رنگدانه‌های طبیعی به‌ویژه رنگدانه‌های میکروبی را دوچندان نموده است. از این‌رو در این مطالعه، سوسپانسیون اسپوری *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش در زمان‌های (20، 30، 45، 60 ثانیه) و فواصل (20، 30، 35 سانتی‌متر) به صورت تصادفی تیمار گردید. سپس تعداد شش کلنی مشکوک برای بررسی ویژگی مورفولوژیکی انتخاب شد و پس از آن تولید رنگدانه و رشد زیست‌توده‌ی آن‌ها در حالت مایع مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نور ماوراء بنفش موجب ایجاد تغییر مورفولوژیکی در قارچ *موناسکوس پورپورئوس* شد. تولید رنگدانه در نمونه‌های تیمار شده نسبت به سویه وحشی به‌طور معناداری افزایش یافت ($p < 0.05$). تیمار UV6 در تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد به ترتیب 5، 7 و 2.8 برابر نسبت به سویه وحشی افزایش داشت. تولید رنگدانه طی نسل اول و دوم در تیمارهای UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نشان نداد به عبارتی تیمارها در تولید رنگدانه طی گذر دو نسل پایدار بودند ($p < 0.05$). بر اساس نتایج این تحقیق، نور ماوراء بنفش یک تیمار فیزیکی موثر جهت افزایش تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد از قارچ *موناسکوس پورپورئوس* است و عموماً تغییرات پایدار در سویه ایجاد می‌کند.

کلید واژه‌ها: *موناسکوس پورپورئوس*، رنگدانه، نور ماوراء بنفش، مورفولوژیکی.

مقدمه

کشورهای آسیایی استفاده می‌شود (Yang et al., 2015; Patakova, 2013). توانایی بالا در تولید رنگدانه از برجسته‌ترین ویژگی‌های *موناسکوس* است. رنگدانه‌های *موناسکوس* مجموعه‌ای از متابولیت‌های قارچی به نام Azaphilones هستند. رنگدانه‌های تولید شده توسط *موناسکوس* را می‌توان به سه گروه اصلی تقسیم کرد: رنگدانه‌های قرمز Monascorubramine و Rubropunctamine، رنگدانه‌های نارنجی Rubropunctatin و Monascorubrin و رنگدانه‌های زرد Monascin و Ankaflavin (Yuliana et al., 2017). امروزه نگرانی مصرف‌کنندگان نسبت به استفاده از مواد شیمیایی بیشتر شده است و تمایل مردم به استفاده از مواد غذایی طبیعی است، چراکه مواد شیمیایی اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان دارند. استفاده از رنگدانه‌ها در

براساس مطالعات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، جنس *موناسکوس* متعلق به نژاد Eumycota، رده‌ی Ascomycotina، گروه Plectomycetes، راسته‌ی Eurociences و خانواده‌ی Elaphomycetaceae یا Monascaceae می‌باشد (Yang et al., 2015). این قارچ برای اولین بار توسط Van tieghem در سال 1884 شناسایی گردید و تا اواخر قرن بیستم بیش از 20 سویه دیگر از آن نیز ثبت شد. سه سویه‌ی *M. ruber*، *M. purpureus* و *M. pilosus* نسبت به سایر سویه‌ها شناخته شده‌تر هستند (Patakova, 2013; Shao et al., 2014). کپک قرمز برنج به طور وسیعی به عنوان رنگدانه‌ی طبیعی غذا و نگهدارنده برای گوشت و ماهی همچنین به عنوان دارو برای بهبود سلامت قلب و عروق و نیز به عنوان استارتر در تخمیر شراب و سرکه در

جهش‌زای فیزیکی و تاثیر آن بر مورفولوژی و افزایش تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد از قارچ موناسکوس پورپورئوس و همچنین بررسی پایداری ویژگی‌های میکروارگانیسم انجام شد.

روش کار

تهیه سویه

کشت *Monascus purpureus* PTCC 5303 از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران، ایران) تهیه گردید. میسلیم قارچ بر روی پلیت حاوی محیط کشت (Yeast Powder (YPSS Soluble Starch Agar کشت داده شد و دردمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز گرمخانه‌گذاری گردید (بخشی و جهادی، 1396؛ اصغری و همکاران، 1398)

تهیه سوسپانسیون جهت اعمال تیمار

آب مقطر استریل بر روی پلیت حاوی *M.purpureus* ریخته شد و سطح اسپورهای قارچ به وسیله‌ی آنس تراشیده شد. سپس به منظور جداسازی میسلیم‌ها، آب روی سطح پلیت، تحت شرایط استریل از کاغذ صافی عبور داده شد. غلظت سوسپانسیون، با استفاده از شمارش اسپورها توسط لام نئوبار بر روی 1×10^6 اسپور بر میلی-لیتر تنظیم شد (Babitha et al., 2007; Dikshit & Tallapragada, 2013).

اعمال نور ماوراء بنفش

سوسپانسیون تحت شرایط استریل در زمان‌های (20، 30، 45، 60 ثانیه) و فواصل (20، 30، 35 سانتی‌متر) در معرض لامپ UV (لامپ NARVA، T 30 W T8 / UVC، آلمان) قرار گرفت و به منظور جلوگیری از بازگشت نور، به مدت 12 ساعت در محیط تاریک قرار گرفت. سپس بر روی محیط آگار کشت داده شد (Arshad et al., 2010; Qi et al., 2014).

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی سویه پس از اعمال تیمار پس از کشت، کلنی‌هایی با ویژگی‌های ظاهری متفاوت ایجاد شدند، هر یک از آن‌ها به صورت جداگانه کشت داده

طیف زیادی از مواد غذایی وجود دارد، پس داشتن رنگدانه با منبع طبیعی به دلیل ماهیت غیرسمی و سالم مورد توجه قرار می‌گیرد. رنگدانه‌های طبیعی نه تنها برای سلامتی انسان مفید هستند، بلکه به دلیل کاهش تولید رنگ‌های سنتزی باعث کاهش مواد شیمیایی خطرناک می‌شوند و به این ترتیب موجب حفظ محیط زیست نیز می‌شوند (Agboyibor et al., 2018). برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از یک منبع میکروبی، تاثیر شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت بر تولید مورد بررسی قرار می‌گیرد (Li et al., 2011). اما بهینه کردن شرایط کشت به تنهایی برای تولید محصول از سویه وحشی، در پاسخگویی به نیازهای صنعتی کافی نیست. به منظور پاسخگویی به نیازهای صنعتی، افزایش تولید رنگدانه ضروری است. رنگدانه‌های میکروبی در بازده کم تولید می‌شوند و از نظر اقتصادی با رنگدانه‌های مصنوعی قابل مقایسه نیستند. بهبود سویه یک ابزار بیولوژیکی مهم برای افزایش راندمان سویه وحشی است. ژنتیک کلاسیک و ژنتیک مولکولی دو روش کاربردی برای این منظور هستند. جهش‌های فیزیکی مانند پرتو ایکس، گاما، نور ماوراء بنفش و جهش‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات در گروه جهش‌های کلاسیک برای اصلاح سویه استفاده می‌شوند (Ahmed et al., 2014). به طور کلی هدف از ایجاد جهش، دستیابی به سویه‌ای بهتر است، که متابولیت‌های هدف را بیش از حد معمول تولید کند (Dikshit & Tallapragada, 2018). از نور ماوراء بنفش و ماده‌ی شیمیایی سدیم آزید به طور موفقیت آمیزی جهت ایجاد جهش و افزایش تولید رنگدانه‌ی کاروتنوئید از *Rhodotorula glutinis* استفاده شد (Yolme & Khomeiri, 2016). در مطالعه‌ای دیگر، از نور ماوراء بنفش و ماده‌ی شیمیایی اتیل متان سولفونات به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه *Monascus sanguineus* استفاده شد (Dikshit & Tallapragada, 2018). این پژوهش برای اولین بار با هدف بررسی استفاده از نور ماوراء بنفش (UV-C) به عنوان یک عامل

(سیگما، 3KC، آلمان). از اسپکتروفوتومتر (UNICO2100، آمریکا) در سه طول موج 470، 400 و 505 نانومتر به ترتیب برای اندازه‌گیری غلظت رنگدانه زرد، نارنجی و رنگدانه قرمز استفاده شد (Kantifedaki et al., 2018; Agboyibor et al., 2019).

اندازه‌گیری زیست‌توده

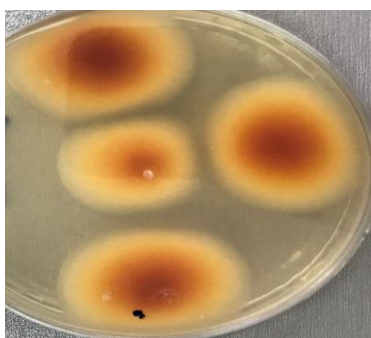
پس از پایان کشت، محتویات ارلن (10 میلی‌لیتر) با استفاده از کاغذ صافی با وزن مشخص صاف گردید و در آون با دمای 65 درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت. سپس با ترازوی دیجیتال وزن شد (Dikshit & Tallapragada, 2013).

تجزیه و تحلیل آماری

ارزیابی پایداری تولید رنگدانه توسط تیمارها با استفاده از طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار SAS9.1 و بر اساس آزمون Least Significant Difference (LSD) در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد.

نتایج

تاثیر نور ماوراء بنفش بر ویژگی‌های ظاهری *M.purpureus* در جدول 1 و تصاویر آن در شکل‌های 1 و 2 (الف و ب) قابل مشاهده است.



و حشی

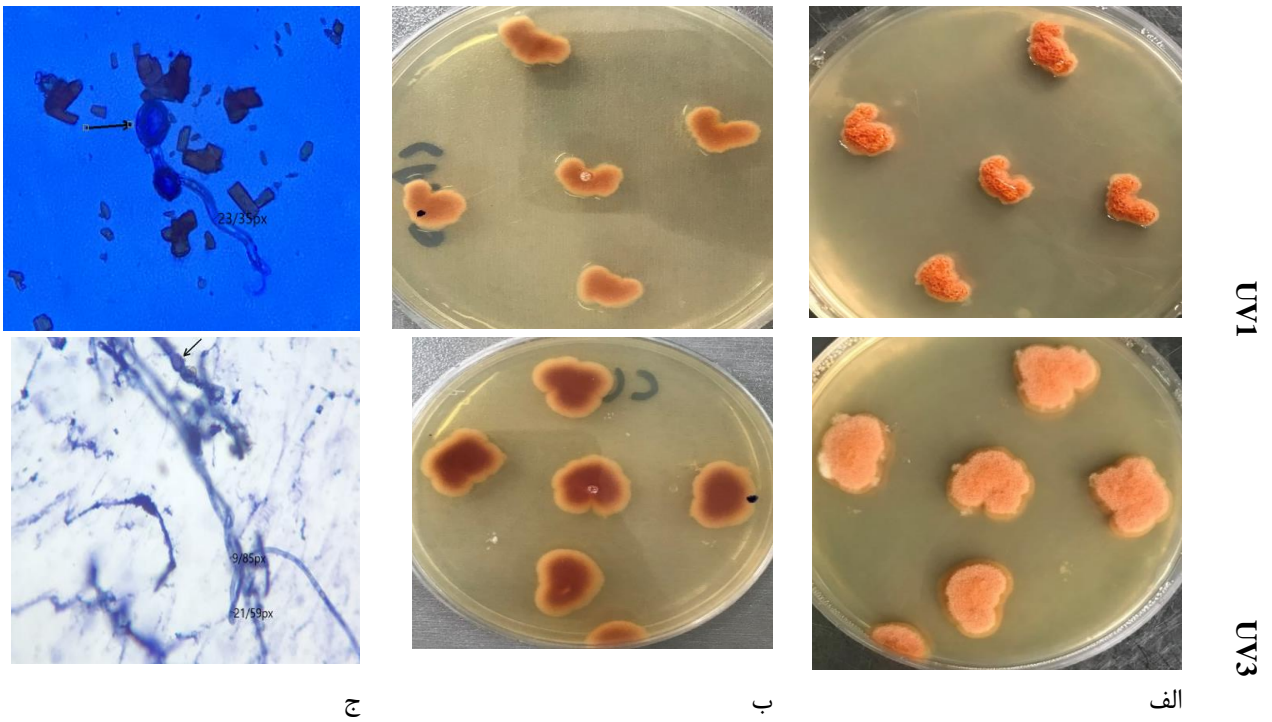
شد و تغییرات رنگ سطح و پشت کلنی، بافت کلنی و قطر کلنی ثبت شد. شکل هایف، تغییرات هایفی از نظر عریض شدن و پیچ‌خوردگی، وجود کلامیدوکنیدی و آسکوسپور و همچنین قطر هایف با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. قطر هایف‌ها با نرم‌افزار (Toup view, Version:x64, 4.88.16143.20191216) اندازه‌گیری گردید (Yongsmith et al., 2000; Suh et al., 2007).

کشت مایع جهت اندازه‌گیری رنگدانه و زیست‌توده

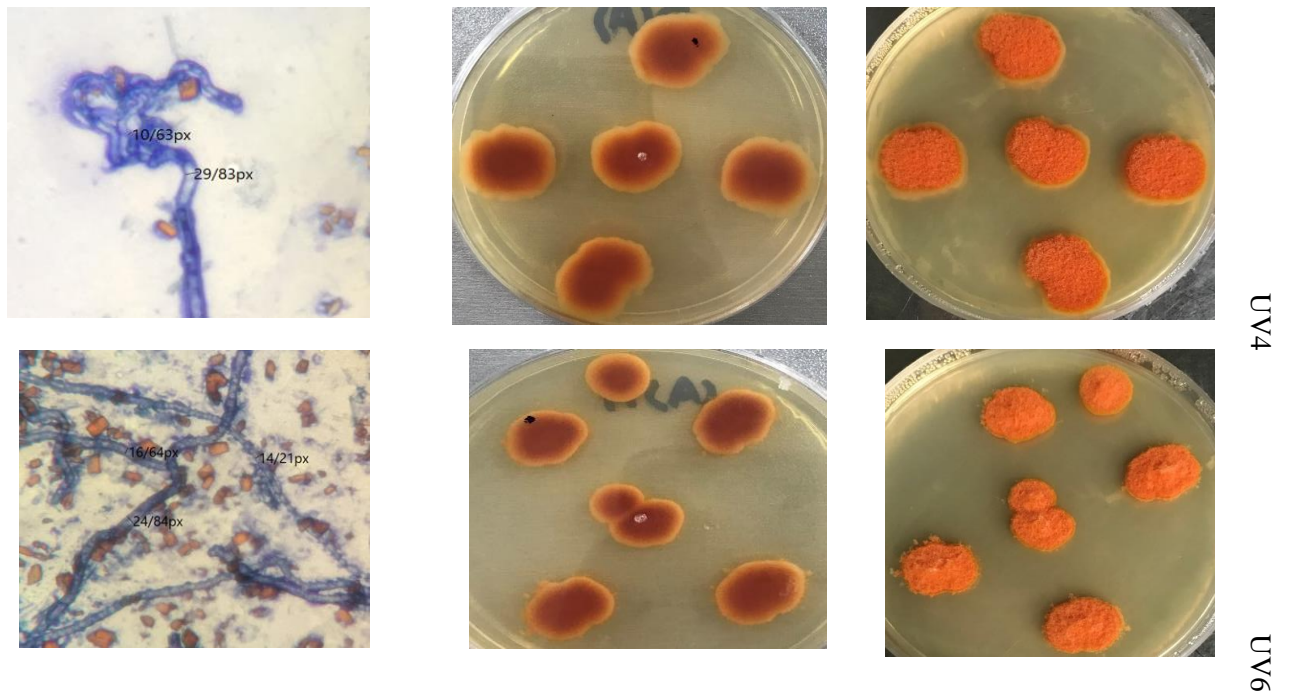
سوسپانسیون با غلظت 5×10^6 اسپور بر میلی‌لیتر تهیه گردید و یک دقیقه در حمام آب 80 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. 10 درصد از سوسپانسیون به ارلن‌های حاوی محیط کشت اضافه شد و 16 روز در انکوباتور شیکردار با دور 100 دور بر دقیقه و دمای 30 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Dikshit & Tallapragada, 2013; Keivani et al., 2020).

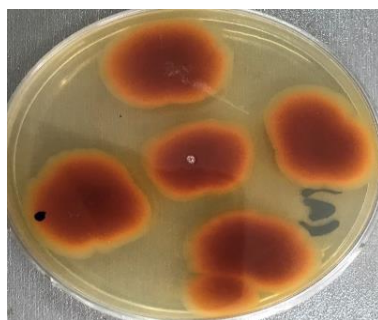
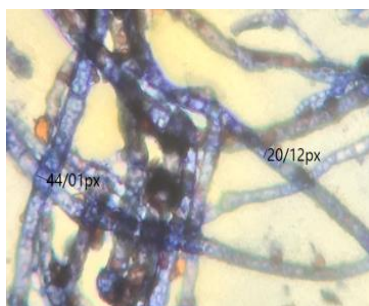
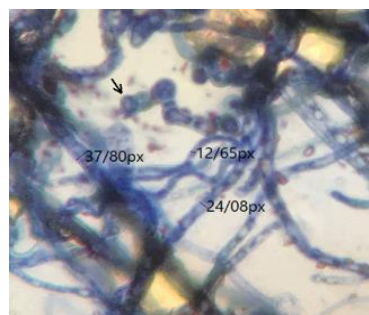
استخراج و اندازه‌گیری رنگدانه

پس از همگن کردن محیط، نمونه با الکل 70 درصد مخلوط و 30 دقیقه در حمام اولتراسونیک (پارسونیک، ایران) 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس یک ساعت در شیکر (نور صنعت فردوس، ایران) با دور 180 (دور بر دقیقه) قرار گرفت. برای جداسازی فاز مایع از زیست‌توده، 10 دقیقه با دور 8000 دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد



شکل ۱- تصویر کلنی و میکروسکوپی *M.purpureus* تیمارهای UV1، UV3 و سویه وحشی. الف: سطح پلیت، ب: پشت پلیت، ج: عکس میکروسکوپ با عدسی 40 و بزرگنمایی 75 درصد





UV7

UV8

ج

ب

الف

شکل ۲ - تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی *M. purpureus* تیمارهای UV4، UV6، UV7 و UV8. الف: سطح پلیت، ب: پشت پلیت، ج: نمای میکروسکوپ با عدسی 40 و بزرگنمایی 75 درصد

جدول ۱- تاثیر نور ماوراء بنفش بر شکل ظاهری کلنی *M. purpureus*

تیمار	زمان (s)	فاصله (cm)	رنگ سطح	رنگ پشت	بافت	قطر کلنی (cm) نسبت به زمان (روز)					
						2	3	4	5	6	7
وحشی	-	-	نارنجی کم رنگ	نارنجی، زرد، با هاله پهن سفید	پرزی/کمی برآمده	0.9	1.4	2.1	2.5	3	3.5
UV1	30	20	نارنجی خیلی پررنگ	نارنجی با هاله باریک زرد/ مات	پرزی/برآمده	0.1	0.4	0.6	0.8	1	1.1
UV3	60	20	نارنجی	قرمز با هاله زرد روشن/ مات	پرزی/برآمده	0.7	1.2	1.4	1.6	1.9	2.2
UV4	30	20	نارنجی خیلی پررنگ	نارنجی پررنگ با هاله زرد باریک/ نسبتاً شفاف	پرزی/صاف	0.5	1.3	1.5	1.7	1.9	2.1
UV6	45	35	نارنجی خیلی پررنگ	قرمز با هاله زرد/ شفاف	پرزی/برآمده	0.6	1.2	1.4	1.5	1.7	1.9
UV7	20	30	نارنجی پررنگ	قرمز، نارنجی تیره با هاله زرد/ مات	پرزی/برآمده	0.2	0.5	0.6	0.7	0.9	1
UV8	20	30	نارنجی خیلی پررنگ	قرمز، نارنجی با هاله زرد/ شفاف	پرزی/صاف	0.9	1.4	2	2.4	2.6	2.9

نداشت. توده میسلیمیومی در تیمار UV1 کم و میسلیومها کوتاه شدند. ساختار آسکوسپور دیده شد و ساختارهای کلامیدوکنیدی در حال تشکیل اند. در تیمار UV3، میسلیومها کوتاه شدند و ساختارهای کلامیدوکنیدی در حال تشکیل هستند. بر اساس شکل 2 پیچ خوردگی و قطور شدن هایف در تیمار UV4 مشاهده شد و تعداد کلامیدوکنیدی کم بود. در تیمار UV6 پیچ خوردگی هایفی و مقدار زیادی رنگدانه مشاهده شد. حجم توده میسلیمیومی در تیمار UV7 زیاد بود و همچنین قطور شدن هایف و ساختارهای کلامیدوکنیدی به تعداد زیاد به صورت زنجیری تشکیل شدند. در تیمار UV8 پهن شدگی در هایف و آسکوسپور نیز تشکیل شد.

مطابق با شکل 1 در سویه وحشی *M. purpureus*، شکل کلنی بیضی با اطراف صاف است. شکل کلنی تیمار UV1 نامنظم و برآمدگی ناهمگن در سطح کلنی وجود دارد. کلنی UV3 شکلی نامرتب با اطراف موج دار دارد. بر اساس شکل 2 کلنی تیمارهای UV4 و UV6 به شکل گرد و اطراف آن کمی موج دار است. شکل کلنی در تیمار UV7 نامنظم است و در تیمار UV8 شکل کلنی گرد مایل به بیضی با اطراف حالت دار است. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی به شرح زیر است و تصاویر آن را می توان در قسمت ج شکل های 1 و 2 دید. مطابق با شکل 1، در سویه وحشی، میسلیومهایی یکپارچه با دیواره عرضی مشاهده شد. قطر هایف حدود 7 میکرومتر است. ساختار آسک دیده شد و ساختار کلامیدوکنیدی وجود

جدول 2- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف نور فرابنفش بر تولید رنگدانه قرمز، نارنجی، زرد و رشد زیست توده از *M. purpureus*

تیمار	رنگدانه قرمز AU/ml		رنگدانه نارنجی AU/ml		رنگدانه زرد AU/ml		زیست توده g/l	
	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک	نسل دو	نسل یک
وحشی	± 0.04 ^{f A}	± 0.04 ^{f A}	± 0.04 ^{e A}	± 0.04 ^{f A}	± 0.06 ^{e B}	± 0.05 ^{ef A}	± 0.06 ^{e A}	± 0.06 ^{d A}
	0.56	0.67±0.02	0.41	0.39	0.93	1.12	4.67	4.62
UV1	± 0.01 ^{f A}	± 0.01 ^{f A}	± 0.04 ^{e B}	± 0.04 ^{e A}	± 0.08 ^{e B}	± 0.06 ^{f A}	± 0.09 ^{d A}	± 0.09 ^{d A}
	0.53	0.67±0.06	0.39	0.62	1.00	1.07	4.79	4.66
UV3	± 0.06 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.10 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.06 ^{d A}	± 0.05 ^{de A}	± 0.06 ^{c A}	± 0.06 ^{c A}
	1.04	1.17	0.89	0.79	1.32	1.26	4.90	4.92
UV4	± 0.04 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.04 ^{b A}	± 0.04 ^{b A}	± 0.08 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}
	2.00	1.85	1.76	1.66	2.25	2.12	5.18	5.42
UV6	± 0.08 ^{a A}	± 0.03 ^{a A}	± 0.08 ^{a A}	± 0.06 ^{a B}	± 0.06 ^{a A}	± 0.04 ^{a A}	± 0.08 ^{a A}	± 0.08 ^{a A}
	2.95	2.81	2.89	2.73	3.21	3.12	5.89	5.78
UV7	± 0.04 ^{c A}	± 0.06 ^{c A}	± 0.04 ^{c A}	± 0.04 ^{c A}	± 0.11 ^{c B}	± 0.08 ^{c A}	± 0.06 ^{b A}	± 0.06 ^{b A}
	1.70	1.58	1.55	1.42	1.72	1.57	5.46±0.08 ^{b A}	5.42
UV8	± 0.08 ^{e A}	± 0.04 ^{e A}	± 0.08 ^{d A}	± 0.13 ^{d A}	± 0.04 ^{d A}	± 0.04 ^{d A}	± 0.18 ^{ab A}	± 0.05 ^{d A}
	0.78	0.75	0.91	0.85	1.20	1.29	5.28	5.62
LSD	0.15	0.13	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.24

در هر ردیف، میانگین هایی با حروف متفاوت بزرگ، در سطح پنج درصد آزمون LSD به صورت جداگانه برای هر مشخصه اختلاف معنی دار دارند.

در هر ستون، میانگین هایی با حروف متفاوت کوچک، در سطح پنج درصد آزمون LSD اختلاف معنی دار دارند.

بررسی پایداری و میزان تولید زیست توده، رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز مطابق با جدول 2، تولید رنگدانه قرمز در سویه وحشی و تیمارهای UV1 و UV8 به طور معناداری کمتر از سایر

بنفش، رنگ بیشتری نسبت به سویه وحشی مشاهده شد (Yongsmith et al., 2000). در استفاده از پرتو گاما برای ایجاد جهش در *موناسکوس* نشان داده شد که رنگ کلنی در سویه جهش یافته نسبت به سویه وحشی تیره تر شده است به طوری که در سویه وحشی رنگ کلنی سفید-نارنجی و در سویه جهش یافته نارنجی-قرمز بود (Suh et al., 2007). ایجاد جهش در *موناسکوس* سنگوئینوس توسط نور ماوراء بنفش و اتیل متان سولفونات نیز افزایش تولید رنگدانه در تمام جهش یافته ها را نسبت به سویه وحشی نشان داد (Dikshit, 2018 & Tallapragada). تیمارهای UV4، UV6 و UV1 بیشترین رنگ را در سطح کلنی داشتند و تیمارهای UV3، UV6، UV7 و UV1 بیشترین رنگ را در پشت کلنی نشان دادند. تیمارهای UV1، UV3 و UV7 در پشت کلنی حالت مات شدگی داشتند درحالیکه پشت کلنی سویه وحشی شفاف بود. سطح کلنی در تیمارهای UV4 و UV6 صاف و در سویه وحشی برآمدگی کمی در کل سطح کلنی دیده شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Suh et al. (2007) که حاکی از کاهش قطر کلنی در نمونه های جهش یافته بود همراستا است (Suh et al., 2007). تیمارهای UV1 و UV7 کمترین قطر را بین سایر تیمارها و سویه وحشی *M. purpureus* میسلیوم های یکپارچه با دیواره ی عرضی دارد. دیواره ی عرضی در اکثر تیمارها مشاهده شد. در طی هفت روز گرمخانه گذاری در سویه وحشی و تیمارهای UV1، UV7 و UV8، آسکوسپور تولید شد. آسکوسپور مسئول تولید مثل جنسی در آسکومیست ها است (Carels and shepherd, 1975). ولی در تیمارهای UV4، UV6 و UV3 این ساختار مشاهده نشد. علت آن را می توان تاثیر نور ماوراء بنفش بر به تعویق انداختن تشکیل آسکوسپور در این تیمارها و تاثیر بر تولید مثل جنسی دانست. در سویه هایی که آسکوسپور مشاهده نشد احتمالاً تولید مثل غیر جنسی انجام شده است. در بررسی میکروسکوپی سویه جهش یافته ی KU609 و سویه

تیمارها است ($P < 0.05$). تولید رنگدانه نارنجی در تمامی تیمارها به طور معناداری از سویه وحشی بیشتر است ($P < 0.05$) درحالیکه در تیمارهای UV8 و UV3 با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نداشت. تولید رنگدانه زرد در تیمارهای UV6، UV4 و UV7 به طور معناداری از سویه وحشی و تیمارهای UV8، UV3 و UV1 بیشتر است ($P < 0.05$). بین تیمارهای UV8، UV3، UV1 و سویه وحشی در تولید رنگدانه زرد اختلاف آماری معناداری وجود نداشت. تیمار UV6 به طور معناداری رشد بیشتری نسبت به سایر تیمارها و سویه وحشی داشت ($P < 0.05$). تیمار UV1 و سویه وحشی کمترین رشد را نشان دادند ($P < 0.05$). بررسی پایداری تولید رنگدانه قرمز و زرد در طی نسل یک و دو، در کلیه تیمارها اختلاف آماری معناداری وجود نداشت. در تولید رنگدانه نارنجی طی دو نسل نیز، تمامی تیمارها به جز تیمار UV1، پایدار بودند. رشد زیست توده در تیمارهای UV1، UV3، UV6، UV7 و سویه وحشی با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نداشت و تا نسل دوم تخمیر حالت مایع، زیست توده رشد نسبتاً یکسانی را از خود نشان داده است.

بحث

نادری بروجنی و همکاران (1387) در بررسی ویژگی های ظاهری سویه *M. purpureus* گزارش دادند که سطح کلنی کمی برآمده با اطراف صاف، ظاهری شفاف و رنگ سطح کلنی اغلب سفید است. قطر کلنی حدود 1.4 تا 4 سانتی متر در محیط های مختلف متغیر است. مطابق با نتایج بدست آمده، تیمارهای UV1، UV4، UV6 و UV7 بیشترین تغییر ظاهری را نسبت به سویه وحشی نشان دادند. از نظر شکل کلنی سویه وحشی بیضی و با اطراف صاف است. تیمارهای UV1، UV3 و UV7 شکل نامنظم با اطراف حالت دار داشتند و تیمارهای UV4، UV6 و UV8 شکل گرد ماندی با اطراف کمی موج دار نشان دادند. رنگ سطح کلنی در تمامی تیمارها از سویه وحشی بیشتر بود. در کلنی سویه های جهش یافته توسط نور ماوراء

بیشتر است. در سایر تیمارها متوسط قطر هایف حدود 20 میکرومتر بود. بر اساس جدول 2 می‌توان نتیجه گرفت، رشد زیست‌توده در سویه وحشی و تیمار UV1 اختلاف آماری معناداری نداشته و از سایر تیمارها در سطح آماری 5 درصد کمتر است ($P < 0.05$). تیمار UV6 به طور معناداری رشد بیشتری نسبت به سایر تیمارها از خود نشان داد و حدود 1.2 برابر بیشتر از سویه وحشی بود ($P < 0.05$). تولید رنگدانه زرد به ترتیب در تیمارهای UV6، UV4، و UV7 به طور معناداری از سویه وحشی و تیمارهای UV8، UV3، و UV1 بیشتر بود ($P < 0.05$) و بین تیمارهای UV8، UV3، و UV1 و سویه وحشی اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد. تیمار UV6 حدود 2.8 برابر تولید رنگدانه زرد را نسبت به سویه وحشی افزایش داد. تولید رنگدانه نارنجی در تمامی تیمارها به طور معناداری سویه وحشی بیشتر بود ($P < 0.05$). تیمارهای UV8 و UV3 در تولید این رنگدانه با یکدیگر اختلاف آماری معناداری نشان ندادند. تیمار UV6 نیز در تولید رنگدانه نارنجی از سایر تیمارها بهتر و افزایش 7 برابری نسبت به سویه وحشی نشان داد. تولید رنگدانه قرمز به ترتیب در تیمارهای UV6، UV4، و UV7 و UV3 در سطح آماری 5 درصد بیشتر از سویه وحشی و تیمارهای UV8 و UV1 بود ($P < 0.05$). تیمار UV6 حدود 5 برابر نسبت به سویه وحشی در تولید رنگدانه قرمز افزایش داشت. تولید رنگدانه در سویه جهش یافته R-10847 نسبت به سویه والد به مقدار زیادی افزایش یافت. این بیش تولیدی در رنگدانه خارج سلولی در اثر افزایش نشت سلول پس از جهش ایجاد شده است با این فرض که رنگدانه‌ها با همان سرعتی که سنتز می‌شوند، دفع شوند (Lin & Iizuka, 1982). تیمار با نور ماوراء بنفش بهترین روش برای بهبود تولید رنگدانه از قارچ موناسکوس است به طوریکه جهش‌یافته‌ی KB10M16، افزایش دو برابری در تولید رنگدانه قرمز در مقایسه با سویه والد ایجاد کرد. جهش‌یافته‌ی KB20M10.2 که از جهش‌یافته‌ی KB10M16 مشتق شده غلظت 6 برابر از رنگدانه را ایجاد

وحشی، تشکیل آسکوسپور مشاهده شد با این تفاوت که قطر آسکوسپور در سویه جهش‌یافته کاهش یافته بود (Suh et al., 2007). در حالی که سویه‌ی جهش یافته‌ی R-10847 توانایی تشکیل آسکوسپور را از دست داد (Lin & Iizuka, 1982). تمام جهش یافته‌ها، تنوع در مورفولوژی اسپور را نشان دادند که به نوبه خود بر تولید متابولیت‌های ثانویه تأثیر گذاشته است. طول زندگی جنسی و غیرجنسی نیز می‌تواند عامل مهمی در سنتز رنگدانه‌ها باشد زیرا سویه آلبینو بدست آمده از تیمار نور ماوراء بنفش، قادر به تولید کلسوتوشیا به عنوان بدن بارده نبود. آلتروکنی‌دیا (چرخه زندگی غیرجنسی) با سویه آلبینو مشاهده شد. جهش‌های UV-4 و EMS-3 در مقایسه با سویه وحشی، آسکوسپورهای رنگی (چرخه زندگی جنسی) نشان دادند که این می‌تواند دلیل بیشتری برای تولید رنگدانه از سویه‌های جهش‌یافته باشد (Tallapragada & Dikshit, 2018). ساختارهای کلامیدوکنی‌دی زمانی تشکیل می‌شوند که سویه تحت تنش و شرایط خاصی قرار گرفته باشد. تشکیل این ساختار به معنای وارد شدن سویه به فاز مقاومت در برابر تنش ایجاد شده است که در سویه وحشی که تحت هیچ تیماری قرار نگرفته مشاهده نشد اما در تیمار UV7 به تعداد زیاد به صورت زنجیری تشکیل شدند. همچنین تیمار UV4 نیز دیده شد. تیمار UV3 به تعداد کمتری کلامیدوکنی‌دی تشکیل داد. در تیمارهای UV1 و UV3 کوتاه‌شدگی در هایف دیده شد. کوتاه شدن هایف در سویه‌های جهش‌یافته KB10M16 و KB20M10.2 نیز مشاهده شد (Yongsmith et al., 2000). میسلیوم‌ها در جهش‌یافته‌ی KU609 نسبت به سویه‌ی وحشی کوتاه‌تر بودند (Suh et al., 2007). تیمارهای UV4 و UV6 پیچ‌خوردگی‌هایی داشتند. قطر هایف در تیمارها نسبت به سویه وحشی افزایش یافته است. بیشترین قطر هایف در تیمار UV8 دیده شد که تقریباً 4 برابر نسبت به سویه وحشی افزایش داشت و کمترین قطر هایف مربوط به تیمار UV3 است که حدود 2.5 برابر از سویه وحشی

بود. طبق نتایج حاصل، با اعمال تیمار ماوراء بنفش به عنوان یک تیمار فیزیکی موثر و کارآمد در تولید رنگدانه توسط *موناسکوس پورپورئوس* می‌توان بازده بیشتری از ترکیبات با ارزش و رنگدانه‌های طبیعی در مقیاس تجاری، از این قارچ به دست آورد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر بدینوسیله مراتب سپاس و قدرانی خود را از مرکز تحقیقات اصلاح و تولید بذر، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان اعلام می‌دارند.

منابع

1. اصغری، مهشید، جهادی، مهشید و قاسمی‌سپرو، نفیسه. (1398). ارزیابی پارامترهای زمان گرمخانه‌گذاری، میزان نمک و ضایعات خرما در تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از روش سطح پاسخ. مجله میکروبیولوژی مواد غذایی، سال ششم، شماره 3، صفحه 69-60.
2. بخشی، فاطمه و جهادی، مهشید. (1396). بهینه‌سازی تولید رنگدانه نارنجی توسط قارچ *موناسکوس پورپورئوس* از ضایعات خرما به روش سطح پاسخ. مجله میکروبیولوژی مواد غذایی، سال چهارم، شماره 4، صفحه 39-31.
3. نادری بروجنی، حمدالله، نحوی، ایرج، شادزی، شهلا و اعتمادیفر، زهرا. (1387). جداسازی و شناسایی قارچ *Monascus* تولید کننده پیگمان. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد 22، شماره 3، صفحه 534-526.
4. Aftab M.N., Haq I.U. and Baig S. 2012. Systematic mutagenesis method for enhanced production of bacitracin by *Bacillus licheniformis* mutant strain UV-MN-HN-6. Braz J Microbiol. 43: 78-88.
5. Agboyibor C., Kong W.B., Chen D., Zhang A.M. and Niu S.H.Q. 2018. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: a review. Biocatal Agric Biotechnol. 16: 433-447.
6. Agboyibor C., Kong W.B., Zhang A.M. and Niu S.H.Q. 2019. Nutrition regulation for the

کرد (Yongsmith et al., 2000). در بحث پایداری در رشد و تولید زیست‌توده، تیمارهای UV1، UV3، UV6، UV7 طی نسل یک و دو اختلاف آماری معناداری نداشتند و تا نسل دوم کشت حالت مایع، زیست‌توده رشد نسبتاً یکسانی را از خود نشان داد. تولید رنگدانه زرد و نارنجی در کلیه تیمارها به جز UV1، در طی دو نسل اختلاف آماری معناداری نداشت این نشان دهنده‌ی ثبات در تولید کشت حالت مایع است. پایداری در تولید رنگدانه قرمز در تمام نمونه‌ها مشاهده شد. پایداری در تولید متابولیت‌های ثانویه از قارچ *موناسکوس سنگوئینوس* جهش‌یافته طی 5 نسل متوالی (Dikshit & Tallapragada, 2018). در تولید باسیتراسین توسط سویه جهش‌یافته *باسیلوس لیچنیفرمیس* طی 15 نسل (Aftab et al., 2012) در تولید ایتاکونیک اسید حاصل از سویه جهش‌یافته *آسپرژیلوس ترئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش (Wu et al., 2017) همراهی با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد که احتمالاً به دلیل تغییر دائمی در توالی DNA ناشی از جهش‌زاهای مورد استفاده است (Aftab et al., 2012).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، نور ماوراء بنفش در زمان و فواصل مختلف، سویه‌هایی با ویژگی مورفولوژیکی و توانایی تولید متفاوت ایجاد می‌کند. تیمار *موناسکوس پورپورئوس* با استفاده از نور ماوراء بنفش موجب افزایش در تولید رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد نسبت به سویه وحشی می‌شود. نمونه‌های UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 در تولید رنگدانه نسبت به سویه وحشی به طور معناداری برتری داشتند ($P < 0.05$). تیمار UV6 (45 ثانیه، 35 سانتی‌متر) نسبت به سایر تیمارها به طور معناداری بیشترین تولید را در هر سه رنگدانه از خود نشان داد ($P < 0.05$). طی دو نسل، تولید رنگدانه و رشد زیست‌توده توسط نمونه‌های UV3، UV4، UV6، UV7 و UV8 با یکدیگر اختلاف آماری معنادار نداشت و پایدار

- production of *Monascus* red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus*. Biocatal Agric Biotechnol. 21: 1-7.
7. Ahmed A.F., AboElmagd H.I. and Housseiny M.M. 2013. Improvement of alkaline protease production by *Penicillium chrysogenum* NRRL792 through physical and chemical mutation, optimization, characterization and genetic variation between mutant and wild-type strains. Ann Microbiol. 64: 521-530.
8. Arshad R., Farooq S.H. and Ali S.SH. 2010. Improvement of penicillin G acylase expression in *Escherichia coli* through UV induced mutations. Braz J Microbiol. 41: 1133-1141.
9. Babitha S., Soccol C.R. and 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. Carels M. and Shepherd D. 1975. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. J Bacteriol. 122: 288-294.
11. Dikshit R. and Tallapragada P. 2013. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. Int Food Res J. 20: 1235-1238.
12. Dikshit R. and Tallapragada P. 2018. Development and screening of mutants from *Monascus sanguineus* for secondary metabolites production. Beni-Suef univ J basic appl sci. 7: 235-240.
13. Kantifedaki A., Kachrimanidou V., Mallouchos A., Papanikolaou S. and Koutinas A.A. 2018. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. J Clean Prod. 185: 882-890.
14. Keivani H., Jahadi M. and Ghasemiseper N. 2020. Optimizing submerged cultivation for the production of red pigments by *Monascus purpureus* on soybean meals using response surface methodology. Appl Food Biotechnol. 7:143-152.
15. Li S.W., Li M., Song H.P., Feng J.L. and Tai X.S. 2011. Induction of a high-yield lovastatin mutant of *Aspergillus terreus* by 12C6+ heavy-ion beam irradiation and the influence of culture conditions on lovastatin production under submerged fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 165: 913-925.
16. Lin C.F and Iizuka H. 1982. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. Nov. Appl Environ Microbiol. 3: 671-676.
17. Patakova P. 2013. *Monascus* secondary metabolites: production and biological activity. J Ind Microbiol Biotechnol. 40: 169-181.
18. Qi Z.H., Wang W., Yang H., Xia X. and Yu X. 2014. Mutation of *Acetobacter pasteurianus* by UV irradiation under acidic stress for high-acidity vinegar fermentation. Int J Food Sci Technol. 49: 468-476.
19. Shao Y., Lei M., Mao Z., Zhou Y. and Chen F. 2014. In sights into *Monascus* biology at the genetic level. Appl Microbiol Biotechnol. 98: 3911-3922.
20. Suh H.S., Rheem S., Mah J.H., Lee W., Byun M.W. and Hwang H.J. 2007. Optimization of production of monacolin K from γ -irradiated *Monascus* mutant by use of response surface methodology. J Med Food. 10: 408-415.
21. Wu X., Liu Q., Deng Y., Li J., Chen X., Gu Y., Lv X., Zheng Z.H., Jiang S.H. and Li H. 2017. Production of itaconic acid by biotransformation of wheat bran hydrolysate with *Aspergillus terreus* CICC40205 mutant. Bioresour Technol. 241: 25-34.
22. Yang Y., Liu B., Du X., Li P., Liang B., Cheng X., Du L., Huang D., Wang L. and Wang S.H. 2015. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. Sci Rep. 5 :8331. 1-9.
23. Yolmeh M. and Khomeiri M. 2016. Using physical and chemical mutagens for enhanced carotenoid production from *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5256). Biocatal Agric Biotechnol. 8: 158-166.

24. Yongsmit B., Kitprechavanich V., Chitradon L., Chairisook C.H. and Budda N. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. J Mol Catal B Enzym. 10: 263-272.

25. Yuliana A., Singgih M., Julianti E. and Blanc P.J. 2017. Derivates of azaphilone *Monascus* pigments. Biocatal Agric Biotechnol. 9: 183-194.

The Effect of ultraviolet light on pigment production and morphological characteristics of *Monascus purpureus*

Pahlevaninezhad A¹, Jahadi M^{2*}, Naghavy NS³, Zia MA⁴

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

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

4. Department of Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan

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

Received: 9 October 2020

Accepted: 7 January 2021

Abstract

People's concerns about the use of synthetic additives have doubled the importance of the need for research in the field of production of natural pigments, especially microbial pigments. Therefore, in this study, the spore suspension of *Monascus purpureus* was treated using ultraviolet light at random times (20, 30, 45, 60 seconds) and intervals (20, 30, 35 cm). Then, six suspicious colonies were selected to study the morphological characteristics, and their pigment production and biomass growth were studied as liquid culture. The results showed that ultraviolet light caused morphological changes in *M. purpureus*. Pigment production in treated samples increased significantly compared to wild strain ($p < 0.05$). UV6 treatment in red, orange and yellow pigment production showed a 5, 7, and 2.8 times increase compared to wild strain significantly, respectively ($p < 0.05$). Pigment production during the first and second generations in UV3, UV4, UV6, UV7, and UV8 treatments did not show a statistically significant difference with each other: in other words, the treatments were stable significantly ($p < 0.05$). According to the results, ultraviolet light was an effective physical treatment to increase the production of red, orange, and yellow pigments from the fungus *M. purpureus* and generally causes lasting changes in the strain.

Keywords: *Monascus purpureus*, Pigment, Ultraviolet Light, Morphological.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited

Copyright © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.