Archive of SID

جداسازی و شناسایی قارچ *Monascus* تولید کننده پیگمان

حمدالله نادری بروجنی*[۱]، ایرج نحوی[۱]، شهلا شادزی[۲] و زهرا اعتمادیفر[۱]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه قارچ شناسی

تاریخ دریافت: ۸٦/٤/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۷

چکیده

Monascus نوعی قارچ میکروسکوپی از راسته Eurotiales می باشد که با توجه به اهمیت و موارد کاربرد وسیع آن مانند تولید رنگدانه، طعم دهنده و نگهدارنده مواد غذائی و داروی کاهش دهنده کلسترول و همچنین با توجه به پراکندگی جهانی آن، در این تحقیق برای اولین بار در ایران نسبت به جداسازی و شناسایی آن اقدام گردید. طی این تحقیق از ۱۲۲ نمونه جمع آوری شده از منابع مختلف مثل انواع آردها، برنج، خاک، نشاسته، میوه ها و لجن، ٤ سویه قارچی منطبق با استفاده از محیط کشت MEPAG جداسازی گردید. از سویه های جداسازی شده دو سویه با قابلیت تولید پیگمان بودند که پس از مشاهده میکروسکوپی و ماکروسکوپی ، کلنیهای مورد نظر جداسازی و نسبت به شناسایی آنها از طریق کلید های شناسایی موجود اقدام گردید. برای تأیید شناسایی آزمایش PCR برای تکثیر ناحیه خاصی از rDNA بنام ITS (Internal Transcribed Spacer) انجام و ناحیه مذکور تعیین توالی شد که این روش عمل شناسایی را تا سطح جنس تأیید نمود. نتیجه این تحقیق جداسازی دو گونه مختلف از جنس *Monascus* بود که با استفاده از کلید شناسایی یکی ***M. fumeus*** و دیگری ***M. purpureus*** تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: پیگمان، *Monascus purpureus*، *Monascus fumeus*

*نویسنده مسئول، تلفن تماس ۰۹۱۳۱۸۳۱۷۲۹ ، پست الکترونیکی hamidndr@yahoo.com

مقدمه

جنس *Monascus* از رده Ascomycota ، راسته Eurotiales و خانواده Monascacea است (۹) . این قارچ برای اولین بار در سال ۱۸۸٤ شناسایی و تا سال ۱۹۷۰ بیست وسه گونه از آن تشخیص داده شد و در اواخر قرن بیستم شش گونه دیگر نیز به آن اضافه گردید (۱۱) .

بعضی گونه های *Monascus* در مواد نشاسته ای بخوبی رشد می کنند و تخمیر حالت جامد آنها بر روی برنج سابقه ای طولانی در کشور های آسیای شرقی دارد که زمان آن حداقل به قرن اول میلادی برمی گردد (۲). برنج تخمیر شده با این روش که بنام برنج مخمری قرمز Red yeast rice معروف است در آسیا بعنوان افزودنی غذا استفاده می شود که در چین بنام Ang Khak یا Hong QU، در ژاپن Koji یا Beni Koji ، در اروپا Red Koji و در امریکا به Red Mould معروف است (۲).

این قارچها رنگدانه هایی با ساختمان پلی کتاید (Polyketide) تولید می کنند که رنگ آنها از زرد تا قرمز متغیر است و از نظر تولید رنگ برای غذا مهم هستند چون به دست آوردن رنگ قرمز برای غذا که ایمن نیز باشد مشکل است (۸).گونه های مختلفی از این قارچ برای تولید پیگمان مورد استفاده قرار گرفته اند و تحقیق پیرامون گونه ها وسویه های جدید هنوز هم جالب توجه می باشد زیرا به دست آوردن میکروارگانیسمی که خصوصیات مناسب برای کشت غوطه ور (submerged culture) داشته باشد مورد نیاز صنایع مربوطه است (۸).

www.SID.ir

Archive of SID

Monascus علاوه بر پیگمان دارای متابولیتهای ثانویه مختلفی است که خواص جالب توجهی مانند اثرات آنتی باکتریال، جلوگیری کننده از سنتز کلسترول ، آنتی اکسیدان ، آنتی تومور و ایمنوسوپرسیو ایجاد می کند (۱، ٤ و ۱۰).

این قارچ در مواد مختلفی مانند غذاهای تخمیر شده ، غذاهای غنی از نشاسته ، میوه های کپک زده مرطوب، لجن وخاک یافت می شود (۹).

صفات متمایز کننده این جنس عبارتند از آسکوماتای بدون دهانه که به تنهایی در انتهای هیف ساقه مانند قرار گرفته و در سطح میسلیوم ایجاد می شود. دیواره آسکوماتا از دو لایه مجزا ساخته شده است. لایه داخلی که از تورم انتهای ساقه مانند هیف تشکیل شده وساختار ویزیکول مانندی ایجاد می کند و لایه خارجی شامل شاخه هایی از هیفهای رشد کرده بطرف خارج از پایه می باشد که به لایه داخلی جوش خورده است. آسکها ناپایدارند و در مراحل اولیه ناپدید می شوند. آسکوسپورها معمولاً بیضی شکل هستند و مرحله آنامورف این جنس که *Basipetospora* نام دارد را ایجاد می کنند (۹).

Hawksworth و Pitt در سال ۱۹۸۳ گونه های این جنس را بر اساس خصوصیات مورفولوژیک روی محیط کشتهای مختلف شناسایی نمودند (۳). این محققین سه گونه *Monascus* را با استفاده از این روش از هم تفکیک کرده که شامل گونه های *M.pilosus* ، *M.ruber* و *M.purpureus* بود (٦). در سال ۱۹۸۸ یک گونه گزروفیلیک بنام *M.eremophilus* توسط Hoking و Pitt شناسایی شد (٦).

در سال ۲۰۰٤ Li Zhong-Qing و همکاران کلید شناسایی Hawksworth و Pitt را برای ۱۲ گونه توسعه دادند (۱۱) که اساس آن حالت، شکل و رنگ کلنی در محیط کشتهای مختلف است. همچنین DNA ریبوزومی و ناحیه ITS آن که یک توالی حفاظت شده است، در تشخیص قارچها و در این جنس دارای اهمیت ویژه ای می باشد که توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (٦ و ۹).

مواد و روشها

نمونه برداری وجداسازی: نمونه ها ازمواد مختلف شامل انواع آرد مثل آرد برنج، آرد گندم، آرد ذرت و آرد جو، میوه های کپک زده، برنج پخته شده، خاک شالیزار، نشاسته کپک زده و لجن در استانهای اصفهان و چهارمحال و بختیاری برداشته شد و با اسید استیک ۵ درصد (v/v) به مدت ۱۰ دقیقه تیمار گردید (۹) و سپس در محیط کشت MEPAG شامل عصاره مالت ۵ ، پپتون ۱۰، آگار۲۲، گلوکز۲۰ (گرم بر لیتر) و pH = ٦ کشت داده شد (۷ و ۸). کلنیهای ایجاد شده که از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی به *Monascus* شباهت داشتند، جداسازی و خالص گردیدند.

کلید شناسایی: دو نمونه از کلنیهای جداسازی شده که هر دو از نشاسته جدا گردیده بودند و با توجه به صفات مورفولوژی جزو جنس *Monascus* تشخیص داده شدند، برای تعیین گونه مورد بررسی قرار گرفته و از کلید Li Zhong-Qing که کلید کامل شده Hawksworth و Pitt است به این منظور استفاده شد.

محیطهای کشت: محیطهای کشتی که برای کلید شناسایی استفاده گردید عبارت بودند از: CYA ، G25N ، MEA ، WA وMY50G که پس از کشت دو نمونه جداسازی شده در هر کدام از محیطهای فوق بصورت دوتایی، پلیت ها به مدت ۷ روز در ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد (۱۱). سپس کلنیها از نظر فرم، اندازه، رنگ، حاشیه، ساختار، بافت و هیف هوایی مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفت و همچنین مورفولوژی میکروسکوپی آنها شامل شکل هیف، کنیدی، کلیستوتشیا (آسکوماتا) ، آسکوسپور و آسک بوسیله میکروسکوپ مشاهده شد و مشاهدات با کلید شناسایی Li Zhong-Qing مقایسه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA : بعد از رشد میسلیوم در محیط کشت و قبل از تشکیل اسپور، میسلیوم به لوله آزمایش منتقل شده و ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (شامل:Tris 10mM ، EDTA 1mM ، SDS 1% ، Triton X100 2% ، وNaCl 100mM) ، ۳۰۰ میکرولیتر فنل-کلروفرم(۱:۱) و ۳۰۰ میلیگرم ذرات شیشه (به قطر۰/۵ میلی متر)اضافه گردیده وآنها بمدت ۵ دقیقه بشدت تکان داده شدند تا سلولها به طور کامل پاره شوند. سپس لوله ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شده، مایع رویی جدا گردیده و پس از اضافه کردن کلرو فرم به مقدار هم حجم مجدداً سانتریفیوژ شده و به آن ۲-پروپانول به مقدار ۲/۵ برابر حجم اضافه گردید. سپس با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و بعد از خشک کردن در هوا به آن ۱۰۰ میکرولیتر بافر T.E (Tris.EDTA) اضافه گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد(۵).

PCR: واکنش PCR در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش تکثیر شامل ۱ میکرولیتر از DNA الگو، پرایمرهای مستقیم و معکوس ۰/۲ میکرومول، داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP) ۰/۱ میلی مول، ۱۰ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد Taq پلیمراز بود. مرحله دناتوراسیون اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد برای مدت ۵ دقیقه انجام شد و سپس ۲۵ چرخه دناتوراسیون در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. مرحله annealing در ٥٦ درجه سانتی گراد برای ٤٥ ثانیه و استخراج در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه انجام شد. محصولات تکثیر شده به وسیله الکتروفورز با ۱/۵ درصد (w/v) ژل آگارز در بافر TBE (۰/۰۹ مول تریس، ۰/۰۹ مول اسید بوریک و ۲۰ میکرو مول EDTA در pH ۸/۳) و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر) قابل مشاهده گردید وسپس عکسبرداری شد(۵).

تعیین توالی: بعلت ارزش و اهمیت توالی ITS در تشخیص قارچها و حفاظت شده بودن این توالی که مربوط به ژن rDNA است (۳ و ۹) با استفاده از پرایمرهای مربوط به این توالی، عمل PCR انجام و قطعه ای حدود ۵۰۰bp تقویت شد(۵). این قطعه تکثیر شده برای تعیین توالی به کشور ایتالیا فرستاده شد و پس از تعیین توالی به بانک ژن عرضه (با شماره ثبت ۲۰۵۵۵۳۰۷۸٦۳٤-۲۰۷۵٦-۱۱۷۱۰۵۱۹۲۹ در NCBI) و سپس با توالی موجود قارچها مقایسه شد.

نتایج

از میان مواد مختلفی که برای جداسازی *Monascus* بکار رفت، چهار کپک مرتبط جداسازی شد که دونمونه آن از نشاسته کپک زده، یک نمونه از خاک شالیزار و یک نمونه از آرد برنج بود که دو نمونه جدا شده از نشاسته بعلت تشابه بیشتر باخصوصیات *Monascus* و تولید پیگمان مشخص تر، انتخاب و مورد بررسیهای بعدی قرار گرفت (شکل ۱).

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی بر روی کلنیهای رشد کرده در محیطهای کشت مربوط به کلید شناسایی پس از ۷ روز انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی گراد برای دو نمونه جدا شده از نشاسته در جدول ۱ ارائه شده است.

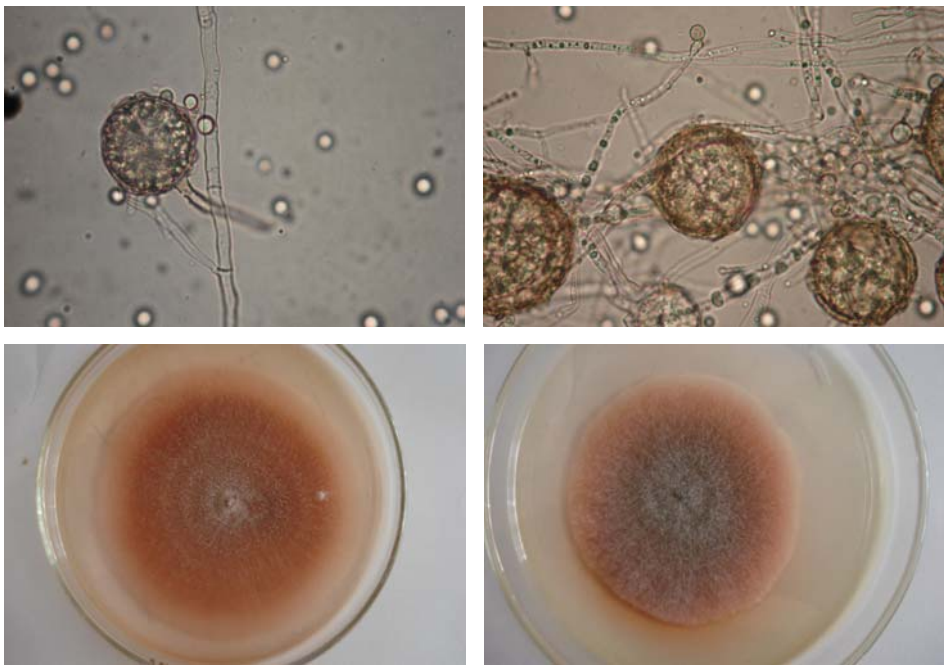
بعلت ارزش و اهمیت توالی ITS در تشخیص قارچها و حفاظت شده بودن این توالی که مربوط به ژن rDNA است (۳ و ۹) با استفاده از آغازگرهای مربوط به این توالی، عمل PCR انجام و قطعه ای حدود ۵۰۰bp تکثیر گردید (شکل ۲). این قطعه تکثیر شده برای تعیین توالی به کشور ارسال و پس از تعیین توالی به بانک ژن عرضه (با شماره ثبت ۲۰۵۵۵۳۰۷۸٦۳٤-۲۰۷۵٦-۱۱۷۱۰۵۱۹۲۹ در NCBI)وسپس با توالی موجود قارچها مقایسه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- مشخصات کلنی دو گونه جداسازی شده بر روی محیط کشتهای کلید Li Zhong-Qing

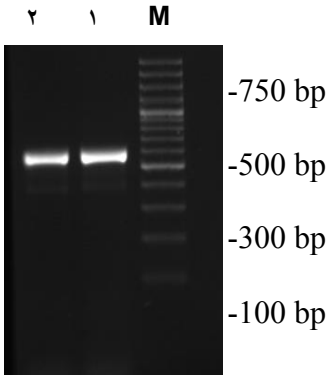
مشخصات ◄	محیط کشت ◄ گونه ▼	CYA	G25N	MEA	MY50G	WA
میانگین قطر کلنی (mm)	H	۲٤	۱٤	۲۷/۵	٤۰	۳۵/۵
	L	۱۵/۵	۱۷	٤۲/۵	۵۲/۵	٦۱
شکل کلنی	H	سطح صاف اطراف نامنظم	سطح محدب و پنبه ای	سطح برآمده اطراف گرد و صاف	سطح چروکیده اطراف گرد وصاف	سطح چروکیده اطراف گرد وصاف
	L	سطح صاف اطراف نامنظم	سطح محدب و پنبه ای	سطح برآمده اطراف گرد و صاف	سطح چروکیده اطراف گرد وصاف	سطح چروکیده اطراف گرد وصاف
رنگ کلنی	H	کرم رنگ وشفاف	رو: سفید پشت:سفید با مرکز	رو:قرمز با مرکزقهوه ای	رو:سفید با مرکزقرمز	رو:سفید با مرکزقهوه ای
	L	کرم رنگ وشفاف	رو: سفید پشت:سفید با مرکز	رو: قهوه ای پشت: خاکستری	رو:سفید با مرکزقرمز	رو:سفید با مرکزخاکستری
میسلیوم هوائی	H	-	+	+	+	+
	L	-	+	+	+	+



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی گونه های جداسازی شده راست: *M.purpureus* چپ:*M.fumeus*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- محصول PCR مربوط به ITS در دو گونه جداسازی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی
۱: *M.fumeus* ۲: *M.purpureus* ، M : مارکر

TSCRRRGWCCCCTTCGTGGAGACCCAAACCTCCCACCCGTGATTATTGTACCTCCTGTTG
CTTCGGCGCGGCCCCCCGGGGCCCGCCGRAAAACATCTTCTCGAACGCTGTCTTTGAAAA
GGATTGCTGTCTGAKYAAACMTACCMMATYGGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGR
TTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAKGCGATAAGTAAKGTGAATTGCAGAATTCAS
YGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCRCCCCCTGSGATTCCGGGGGGGYATGCCTGT
CCRAGCGWCATTACTGCCCCTCAMGCSCGKSTTGTRWGTWGNNCCGCCGTCCCCTGMGCC
TCCRGNCAAGKNGGAYGGTTNMMGAAAGACAGTGTCGTYTYCRNRNCCGGNCMTCGAGRG
TATGNCNCTTTGBCACCCGNTCAGNAGGNCGGNNMGNAACMWTWGCCTTCTCAACNTTTT
TTNCCWNAGGNGGACCCCGAKCRGGARGGNAWCCCGNTKAACTNAANMAAANAANAAG

شکل۳- توالی ITS مربوط به گونه H (*M.purpureus*)

RRGAMCCCTTCGTGGAGACCCAACCTCCCACCCGTGATTATTGTACCTCCTGTTGCTTCG
GCGCGGCCMCCCGGGGCCCGMCGRAGACATCTTCTCGAACGCTGTCTTTGAAAAGGATTG
CTGTCTGAKYAAACMTACCMMATYGGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGG
CAYCGATGAAGAACGCAGCGAAAKGCGATAAGWAATGTGAATTGCAGAAWTCASYGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCRCCCCCTGKGATTCCGGNGGGCATGCCTGTCCRAGS
GWCATTACTGCCCCTCAMGCGCRTSTTGGRTGYAGGAAMCGCCGTCCCCKGCGCCTCCRG
SCAAGGNGGAYGGWWNMMKAAAGACAGTGTYKTCKYCRCRKCCGGNCNTCGAGNGTATGG
CNCTTTGWCACCCSSKCMRGAAGGNCGGGGMMGNAAMAAWWWGCYTYCYCAAACNTTTTT
TTTCCWKAGGGGGGACCCCCSGASNGRAAGG

شکل٤: توالی ITS مربوط به گونه L (*M.fumeus*)

همچنین توالی مشخص شده دو نمونه در شکلهای ۳و٤ آورده شده و نتایج مقایسه این توالیها با برخی توالیهای موجود در بانک ژن در جدولهای ۲و ۳ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲: مقایسه توالی ITS گونه H (*M.purpureus*) با برخی توالی های موجود در بانک ژن

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ978996.1	Monascus fumeus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	67%	6e-161	90%
DQ978994.1	Monascus albidulus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	67%	6e-161	90%
DQ658183.1	Fungal sp. DQY-8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	67%	6e-161	90%
AY498582.1	Monascus pilosus strain ATCC 16368 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	67%	6e-161	90%
AY498581.1	Monascus pilosus strain ATCC 16363 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	575	575	67%	6e-161	90%
AY750723.1	Monascus purpureus strain BCRC31501 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	568	568	67%	1e-158	90%

بحث

Monascus یک کپک میکروسکوپی با کاربردهای فراوان مخصوصاً در صنایع غذائی و داروسازی است که گونه های مختلف آن به راحتی از هم قابل تشخیص نیست به طوریکه تا سال ۱۹۸۳ که Hawksworth و Pitt فقط سه گونه از آن را بر اساس خصوصیات مورفولوژیک از هم تفکیک کردند، هیچ روش عملی و کلید شناسایی خاصی برای تفکیک گونه های آن وجود نداشت(٦).

برخی گونه های این قارچ پیگمانهای زرد، نارنجی و قرمز تولید می کنند و طی سالهای طولانی در کشور های شرق آسیا به عنوان افزودنی غذا و به عنوان دارو مورد استفاده بوده است (۲). اخیراً این قارچ به علت خاصیت کاهش دهندگی کلسترول خون مورد توجه قرار گرفته و محصولات آن به شکلهای مختلف به بازار عرضه می گردد. این خاصیت به علت وجود ماده ای بنام Monacolin K است که در کبد مانع عمل آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآ ردوکتاز شده و تا حدودی از سنتز کلسترول ممانعت می نماید. وجود انواع مختلف اسیدهای چرب غیر اشباع در این قارچ نیز ممکن است به کاهش لیپیدهای سرمی کمک کند. در نهایت مصرف آن باعث کاهش سطح کلسترول بد یا Low Density Lipoprotein (LDL) و افزایش سطح کلسترول خوب یا High Density Lipoprotein (HDL) شده و میزان تری گلسیریدها را

www.SID.ir

Archive of SID

پائین می آورد(۲). تحقیقات مختلف نشان داده است که مصرف برنج تخمیر شده با این قارچ مقدار گلوکز را در افراد دیابتی نوع II پایین آورده و از پیدایش و گسترش سرطان جلوگیری می کند، مانع ایجاد آلزایمر، بیماریهای استخوانی و عضلانی می گردد(۲) و از خستگی جلوگیری می کند(۱۰). بعلاوه اثرات جانبی آن بسیار کم می باشد(۲).

جدول۳: مقایسه توالی ITS گونه L (*M.fumeus*) با برخی توالی های موجود در بانک ژن

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
DQ978996.1	Monascus fumeus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%
DQ978994.1	Monascus albidulus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%
DQ658183.1	Fungal sp. DQY-8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%
AY498582.1	Monascus pilosus strain ATCC 16368 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%
AY498581.1	Monascus pilosus strain ATCC 16363 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%
AY498580.1	Monascus ruber strain ATCC 58358 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	562	562	71%	4e-157	89%

مقایسه مورفولوژی دونوع کلنی جدا شده با کلید شناسایی Li Zhong-Qing نشان می دهد که نمونه اول شباهت بیشتری به گونه *M.purpureus* داشته ونمونه دوم دارای خصوصیات *M.fumeus* می باشد.

همچنین مقایسه توالی ITS این دو قارچ با توالیهای ITS موجود در بانک ژن نشان می دهد که نمونه اول دارای ٦٧ درصد همسانی در توالی ITS با *M.purpureus* و نیز با بسیاری گونه های دیگر *Monascus* بوده و این جنس نزدیکترین جنس به این نمونه از لحاظ مشابهت توالی ITS می باشد و بنابراین کپک جدا شده قطعاً از جنس *Monascus* است. در مورد نمونه دوم نیز مقایسه توالی مورد نظر با گونه *M.fumeus* ۷۱ درصد همسانی نشان می دهد که شناسایی را تا سطح جنس تأیید می کند.

تشکر وقدردانی: نگارندگان این مقاله از انستیتو تحقیقات بهداشتی اصفهان وآقای دکتر حسین میرهندی جهت

www.SID.ir

Archive of SID

همکاری در انجام آزمایش PCR و تعیین توالی تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1- Akihisa T., Tokuda H., Ukya M. (2005) Anti-tumor initiating effect of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice. Chemistry&Biodiversity 2(10) 1305-1309

2- Erdogrul O., Azirak S.(2004) Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*). Turkish electronic journal of biotechnology 2,37-49

3- Lacord K., Chaisrisook C., Yongsmith B., Skinner D.Z.(2000) RAPD analysis of genetic variation within a collection of *Monascus* spp. isolated from red rice and sofu. Mycol. Res. 104(4) 403-408

4- Martinkova L. (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus.* Food additivwes& contaminants 16(1) 15-24

5- Mirhendi H., Makimora K., Khoramizadeh M., Yamaguchi H. (2006) A one enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Jpn.J.Med.Mycol. 47,225-229

6- Park H.G., Stamenova E.k., Jong S.C.(2004) Phylogenic relationship of *Monascus* species inferred from the ITS and the partial β-tubulin gene. Bot. Bull. Acad. Sin. 45,352-330

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

8- Rasheva T., Hallet J.N., Kujumdzieva A.(1998) Taxonomic investigation of *Monascus purpureus* 94-95 strain. Jornal of culture collection 2,51-59

9- Stchigel A.M., Cano J., Samir K.A., Guarro J.(2004) New and interesting species of *Monascus* from soil with a key to Known species. Studies in mycology 50,299-307

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

11- Zhong Q.L., Fang G.(2004) A further studies on the species of *Monascus.* Mycosystema, 23(1)1-6

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and identification of pigment producing *Monascus* fungi

Naderi Boroujeni H.[1], Nahvi I.[1], Shadzi S.[2] and Etemadifar Z.[1]

[1] **Biology Dept., Isfahan University, Isfahan, I.R. of IRAN**

[2] **Mycology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. of IRAN**

Abstract

Monascus is a microscopic fungus belonging to Eurotials order and due to it's importance and extensive applications, such as pigment, flavouring and preservative agents production for foods and in drugs as cholesterol-lowering agent and also according to it's worldwide distribution, we isolated and identified natives strains of this fungus for the first time in Iran. In this study, out of 122 samples collected from different sources such as flours, rice, soil, starch, fruits and slime, 4 conformed fungi strains were isolated using MEPAG culture medium in which two strains of the isolated colonies had capability for pigment production. After microscopic and macroscopic observation, the proper cases were isolated and identified by identification keys. To further confirm the identify of the two isolates, the PCR was applied for a rDNA specific region called ITS (Internal Transcribed Spacer) and was sequenced, that this method confirmed the genus recognition. The result of this research was isolation and identification of two *Monascus* species. Using standard taxonomic key, we recognized them as *M. fumeus* and *M. purpureus.*

Keywords: Pigment, *Monascus purpureus*, *Monascus fumeus*

www.SID.ir