Archive of SID

مجلهٔ پژوهشی دانشگاه اصفهان(علوم پایه)
جلد ۳۱ ـ شماره ۲ ـ سال ۱۳۸۷
صص۷۴-۶۷

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

حمدالله نادری بروجنی[*]، ایرج نحوی[*]، شهلا شادزی[**] و زهرا اعتمادیفر[*]
*** گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان**
**** گروه قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان**

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: Monascus purpureus، Monascus fumeus، دما، pH.

Evaluation of pH and Temprature Effects on Growth of two Monascus Species

H. Naderi Boroujeni[*], I. Nahvi[*], S. Shadzi[**] and Z. Etemadifar[*]
[*] Biology Department, The University of Isfahan
[**] Department of Mycology, University of Medical Sciences, Isfahan

www.SID.ir

Archive of SID

Abstract

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

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

مقدمه

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

Monascus در طی قرون متمادی در آسیا(بخصوص در چین و ژاپن) برای تولید پنیر از دانه سویا، شراب قرمز برنج و برنج قرمز(برنج تخمیر شده با این قارچ که در چین به آن Hong-qu در ژاپن Beni-koji و در غرب Red yeast rice یا Red mould می‌گویند) بکار رفته است (۱۱).

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

مواد و روش‌ها

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

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

روش: ابتدا با اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۱% توئین ۸۰ به محیط کشت جامد دو

www.SID.ir

Archive of SID

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

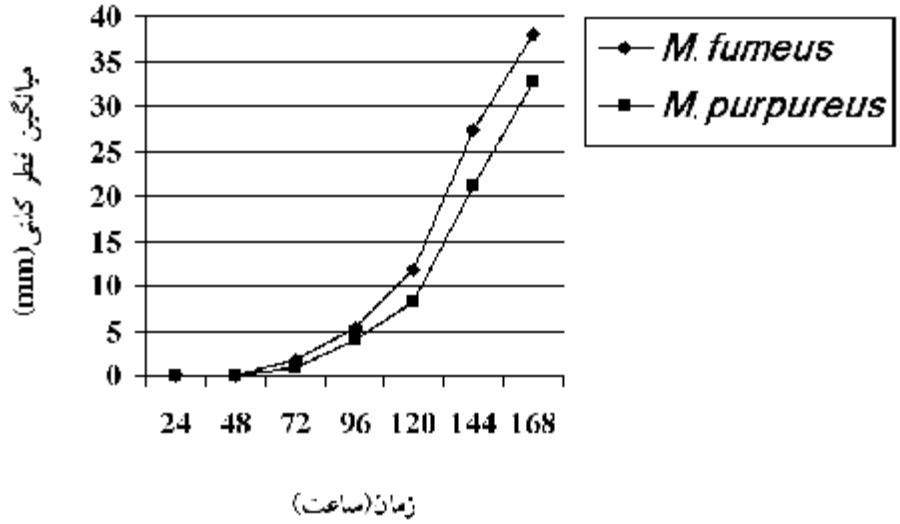
سپس این سوسپانسیون را در دمای۴۰C برای تلقیح محیط‌های کشت نگهداری شد(۸ و۱۵). تلقیح محیط‌های کشت به وسیله آنس کالیبره شده استریل و در مرکز هر پلیت برای چهار دمای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد و در pH های ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ و ۶ (با سه تکرار و مطابق طرح فاکتوریل) به صورت خنجری انجام و پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای مربوطه انکوبه گردید (۹).

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

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

نتایج

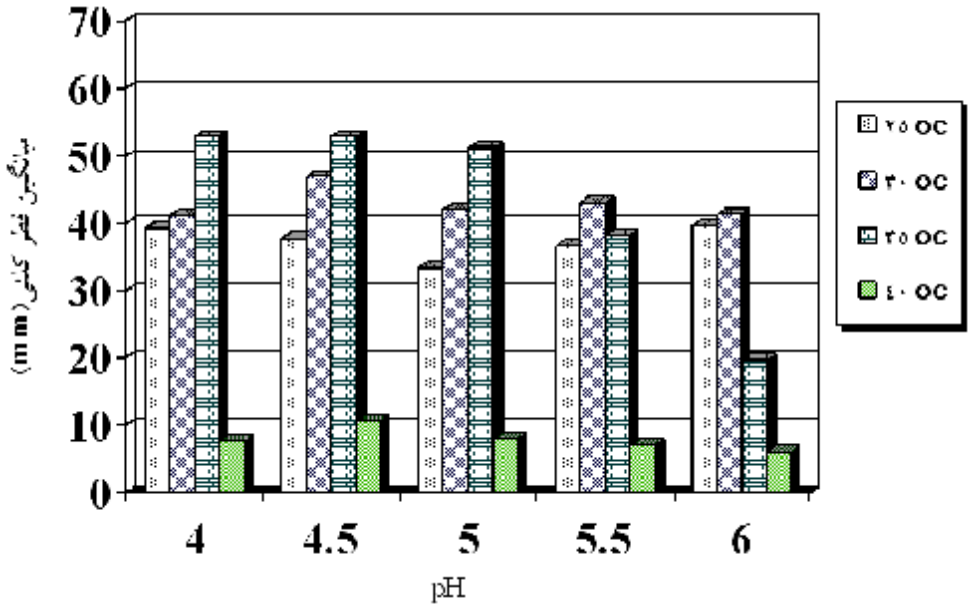
نمودار ۱ نتایج حاصل از اندازه‌گیری رشد کلی دو گونه را در طول زمان نشان می‌دهد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر کلنی دو گونه مورد بررسی در دماها و pHهای مختلف با سه تکرار در نمودارهای ۲ تا ۵ خلاصه شده است. نمودار ۲ و۳ به ترتیب میزان رشد کلنی های M. purpureus وM. fumeus را در دماها و pH های مختلف نشان می دهد. نمودار ۴ تغییرات رشد دو گونه را نسبت pH مقایسه می‌کند و نمودار ۵ این تغییرات را نسبت به دما نشان می‌دهد.



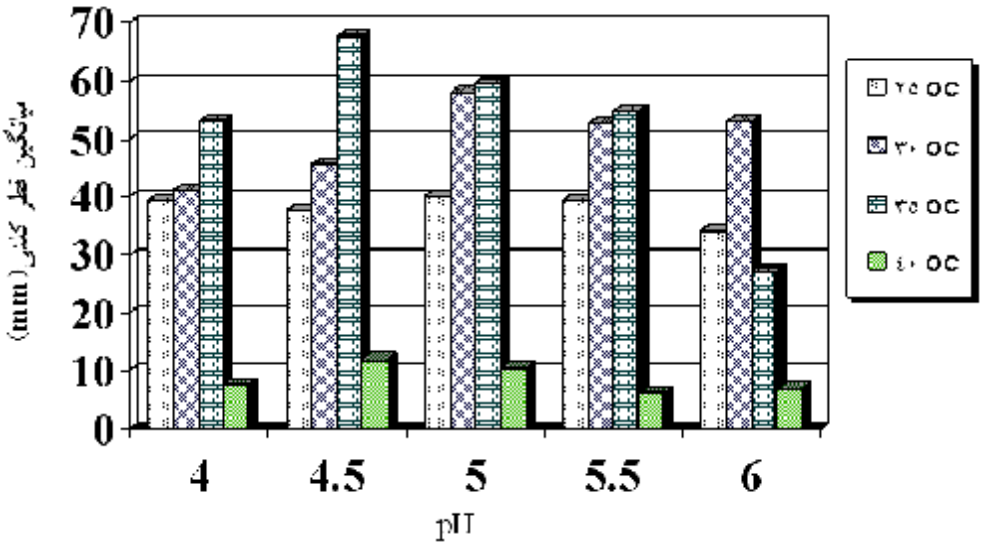
نمودار ۱: نتایج حاصل از اندازه‌گیری رشد کلی دو گونه در طول زمان

www.SID.ir

Archive of SID



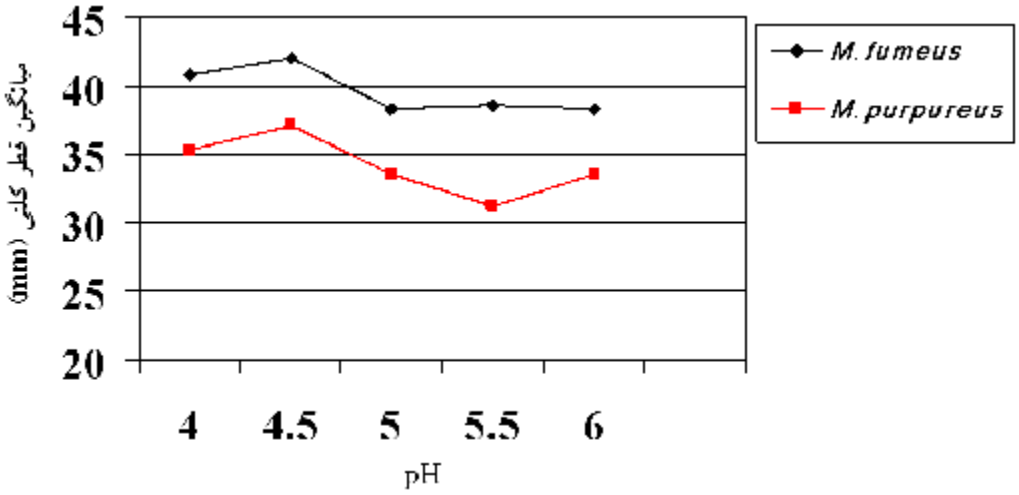
نمودار ۲: میزان رشد کلنی M.purpureus در pHها و دماهای مختلف



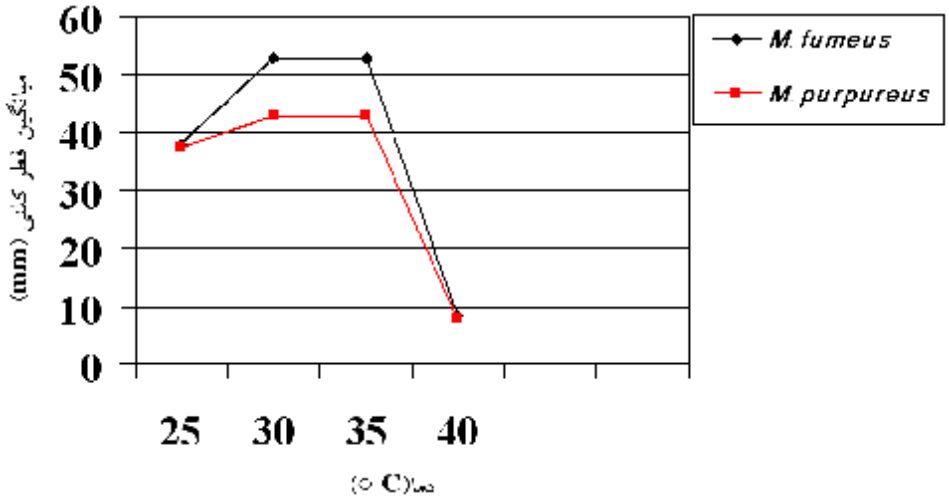
نمودار ۳: میزان رشد کلنی M.fumeus در pHها و دماهای مختلف

www.SID.ir

Archive of SID



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



نمودار ۵: مقایسه تغییرات رشد دو گونه نسبت به دما

آزمون تحلیل واریانس برای گونه M. purpureus نشان می دهد که تغییرات رشد کلنی نسبت به هر دو عامل دما و pH معنی دار است و همچنین تداخل بین عوامل دما و pH نیز وجود دارد. آزمون توکی مشخص می‌کند که نتایج رشد در دماهای ۳۰°C و ۳۵ °C با همدیگر تفاوت معنی داری نشان نمی دهند و سایر دماها رشد های متفاوت معنی داری ایجاد می کنند. بیشترین مقدار میانگین رشد به ترتیب در دماهای ۳۵، ۳۰، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتیگراد است(جدول۱). در مورد pH نیز آزمون توکی نشان می‌دهد که pHهای ۴ و ۴/۵، ۴/۵ و۵، ۵ و ۵/۵، ۵/۵ و ۶، ۴ و ۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ایجاد نمی‌کنند اما pHهای ۴ و۵/۵، ۴ و۶، ۴/۵ و ۵/۵، ۴/۵ و ۶، ۵ و ۶ اختلاف معنی‌داری ایجاد می‌نمایند. بنابراین از پنج سطح pH مورد آزمایش pH های اسیدی تر رشد بهتری را ایجاد نموده‌اند. مقدار میانگین رشد به ترتیب در pHهای ۴/۵، ۴، ۵، ۵/۵ و ۶ صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱: تجزیه واریانس اثر pH و دما بر روی رشد کلنی M. purpureus در محیط جامد

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

*معني دار در سطح ۵%(P<۰/۰۵)

جدول۲:تجزیه واریانس اثر pH و دما بر روی رشد کلنی M. fumeus در محیط جامد

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
مدل تصحیح شده	۲۲۸۳۷/۹۳۳	۱۹	۱۲۰۱/۹۹۶	۳٤/۲٤٥	۰/۰۰۰*
Intercept	۸٦٤۸۸/۰٦۷	۱	۸٦٤۸۸/۰٦۷	۲٤٦٤/۰٤۷	۰/۰۰۰*
pH	۱۰۰۸/۲٦۷	٤	۲٥۲/۰٦۷	۷/۱۸۱	۰/۰۰۰*
دما	۱۹٦۲٥/۱۳۳	۳	٦٥٤۱/۷۱۱	۱۸٦/۳۷٤	۰/۰۰۰*
pH× دما	۲۲۰٤/٥۳۳	۱۲	۱۸۳/۷۱۱	٥/۲۳٤	۰/۰۰۰*
خطا	۱٤۰٤/۰۰۰	٤۰	۳٥/۱۰۰		
کل	۱۱۰۷۳۰/۰۰۰	٦۰			
کل تصحیح شده	۲٤۲٤۱/۹۳۳	٥۹			

*معنی‌دار در سطح ۵%(P<۰/۰۵)

www.SID.ir

Archive of SID

در مورد گونه M. fumeus نیز آزمون تحلیل واریانس مؤثر بودن pH و دما را بر روی رشد کلنی تایید می‌کند و همچنین تداخل بین عوامل دما و pH نیز وجود دارد (جدول۲).

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

بحث

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

در اینجا pH اپتی‌مم ۴ تا ۵ در محیط جامد برای رشد کلنی تعیین شد که با نتایج تحقیقات De Carvalo و همکاران در سال ۲۰۰۵که pH اپتی‌مم رشد را بین ۴ تا ۷ تعیین نموده‌اند مطابقت دارد(۳).

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

منابع

۱- نادری بروجنی ح، نحوی الف، شادزی ش، اعتمادیفر ز، جداسازی و شناسایی قارچ Monascus تولید کننده پیگمان. همایش میکروبیولوژی کاربردی. تیر ماه 1386. دانشگاه الزهرا. تهران، 1386.

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

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

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

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

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

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

11- P., Sanae, S., Fernanda, B., Vahan Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by Monascus sp. Braz. Arch. Boil. Technol. vol.48 No. spe; (2005).

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

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

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

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

www.SID.ir